



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 306 485**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/10** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98965172 .4**  
86 Fecha de presentación : **23.11.1998**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1034261**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.09.2000**

54 Título: **Procedimiento de cribado en paralelo de mutantes de inserción y un dispositivo para llevar a cabo dicho procedimiento.**

30 Prioridad: **25.11.1997 EP 97203680**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

73 Titular/es: **Oryzon Genomics, S.A.**  
**Parc Científic de Barcelona, Edifici Helix**  
**c/ Baldri i Reixac, 15-21**  
**08028 Barcelona, ES**

72 Inventor/es: **Maes, Tamara y**  
**Gerats, Tom**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 306 485 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de cribado en paralelo de mutantes de inserción y un dispositivo para llevar a cabo dicho procedimiento.

La presente invención se refiere a un procedimiento de selección paralela y, como consecuencia de ello, simultánea de uno o más mutantes insercionales de genes en una población de cualquier organismo.

**Antecedentes de la invención**

La alteración de genes es una herramienta poderosa para asignar funciones biológicas a las proteínas que son codificadas, por ejemplo, por los numerosos marcos de lectura abiertos (ORF) no caracterizados resultantes de proyectos de genoma o de bases de datos de etiquetas de secuencia expresada (EST). Para caracterizar la función biológica de estos ORF de forma eficaz, deben abordarse tres problemas: (i) cómo obtener una población saturada de mutantes, (ii) cómo identificar de forma eficaz los genes que se han mutado en los diferentes individuos o viceversa, cómo encontrar individuos mutados en un gen específico, y (iii) cómo analizar sus fenotipos. Se han presentado varias estrategias para alterar genes específicos o para simplificar la identificación de ORF alterados. En *Saccharomyces cerevisiae*, se han generado mutantes etiquetados de forma masiva usando transposición aleatoria del elemento Ty1 endógeno (Smith *et al.*, 1995). Como alternativa, se mutagenizó una biblioteca de levadura en *E. coli* con un elemento Tn3 (que lleva lacZ para el control de la expresión) seguido de recombinación homóloga de las secuencias de levadura mutadas en el genoma de levadura (Bums *et al.*, 1994). Shoemaker *et al.* (1996) describieron una estrategia para realizar un ensayo fenotípico cuantitativo de mutantes de delección de levadura, consistente en tres etapas: (i) el reemplazo de cada una de los ~ 6000 ORF de *S. cerevisiae* con una única etiqueta de 20 pb y un marcador de kanamicina por recombinación homóloga, (ii) el agrupamiento de los mutantes de delección y el crecimiento competitivo en diferentes condiciones de selección, (iii) la amplificación de las etiquetas de la cepa superviviente y la identificación de sus genes correspondientes mediante hibridación de las etiquetas aisladas en una micromatriz que presentaba oligonucleótidos complementarios a las etiquetas para todos los genes de levadura.

En el caso de otros organismos, aún no es posible o es demasiado laborioso obtener mutantes mediante recombinación homóloga. En su lugar, se han generado grandes poblaciones de individuos que llevan inserciones de transposones aleatorias para *Drosophila melanogaster* (Ballinger y Benzer, 1989, Kaiser y Goodwin, 1990), *Caenorhabditis elegans* (Zwaal *et al.*, 1993), *Petunia hybrida* (Koes *et al.*, 1995) y *Zea mays* (Das y Martienssen, 1995). En el caso de *Arabidopsis thaliana*, se han obtenido grandes poblaciones de mutantes insercionales de ADN-T a través de transformación mediada por *Agrobacterium* (Bechtold *et al.*, 1993, Mc Kinney *et al.*, 1995, Mollier *et al.*, 1995). Para seleccionar en estas poblaciones individuos que lleven inserciones en genes de interés, se han usado estrategias basadas en PCR. Mediante combinación de un cebador con especificidad de gen y un cebador con especificidad de inserción en la selección por PCR, se amplifican productos específicos únicamente cuando el elemento transponible se ha insertado en ese gen (Ballinger y Benzer, 1990, Kaiser y Goodwin, 1990). Estas poblaciones comúnmente se organizan en grupos de una forma piramidal o 3D, para permitir una rápida selección y una fácil identificación de los individuos que llevan un alelo mutante. Usando esta estrategia, tiene que repetirse la selección por PCR para cada ORF individual o en la misma selección puede combinarse, a lo sumo, una serie limitada de cebadores con especificidad de gen (Mc Kinney *et al.*, 1995). Éste es un proceso que requiere mucho tiempo y es extremadamente laborioso de realizar.

El procedimiento de acuerdo con la invención ofrece una alternativa atractiva a la estrategia existente usada para seleccionar mutantes insercionales en grandes poblaciones. El fundamento de la selección basada en PCR descrita previamente de mutantes insercionales es que siempre que en un gen se haya insertado un elemento de inserción, el producto puede amplificarse en una reacción de PCR usando un cebador con especificidad de gen y de inserción (Ballinger y Benzer, 1989; Kaiser y Goodwin, 1990).

La técnica de acuerdo con la invención amplifica de forma reproducible todas las secuencias flanqueantes de transposones en un grupo de individuos, y posteriormente identifica inserciones por hibridación con una sonda con especificidad de gen. Eliminando el uso del cebador con especificidad de gen, se vuelve posible realizar una selección seriada de inserciones en una gran serie de genes usando una sola serie de reacciones de PCR. Como alternativa, los grupos de secuencias flanqueantes pueden usarse como sondas para explorar genes diana.

Esta estrategia se ensayó usando iPCR anidada como medio para amplificar las secuencias flanqueantes del transposón *dTph1* a partir de grupos de ADN de una biblioteca 3D de 1000 individuos de *Petunia* W137. Para amplificar secuencias flanqueantes de *dTph1*, se usó un tetra cutter que no corta dentro del elemento, los fragmentos de ADN obtenidos se circularizaron, y las secuencias flanqueantes de *dTph1* se amplificaron por iPCR usando una serie de cebadores internos y un cebador individual basado en la TIR para la reamplificación anidada. Los resultados indican que puede detectarse una inserción de *dTph1* en un gen específico de una planta específica frente a un fondo de aproximadamente 100 individuos de tipo salvaje, tanto en el procedimiento de selección seriado como en el procedimiento de selección paralelo (véase más adelante). Sin embargo, la variación en las señales producidas para la inserción de control positivo en *PhAp2A* indica que el protocolo tenía que optimizarse para asegurar que las secuencias flanqueantes de *dTph1* de todas las muestras reunidas que representan la población se amplifican suficientemente. La eficacia del sistema de etiquetado influirá en el tamaño óptimo de la población a explorar. Si se encuentran n inserciones por 1000 plantas para un clon de ADNc específico, se producirán 3n señales. La identificación directa de la planta candidata sólo es posible si n es igual a 1. Las inserciones somáticas en un gen interferirán y pueden conducir a una hibridación

## ES 2 306 485 T3

de fondo. Los sistemas de inserción estables (por ejemplo inserciones de ADN-T) o los sistemas con una frecuencia de inserción somática controlable o baja no sufrirán este problema.

La elección de las dianas también puede influir en la eficacia de recuperación de mutantes fenotípicos. Si sólo se usan dianas de ADNc, el porcentaje de fragmentos amplificados por promotor e intrón que se recuperan se deberían reducir estadísticamente, y pueden recuperarse más mutantes knock-out, especialmente si el elemento transponible es pequeño, no lleva ninguna señal de terminación de la transcripción y tiene poca probabilidad de interferir con la función del gen cuando se ha insertado en un intrón, tal como *dTph1* en *Petunia*.

La técnica presentada puede aplicarse al sistema de mutagénesis de inserción respectivo usado para cualquier organismo. Cuando el tetracutter reconoce un sitio dentro del elemento de inserción, como ocurrirá en la mayoría de los casos, tiene que usarse una serie de dos cebadores con especificidad de inserción para amplificar las secuencias flanqueantes. En lugar de iPCR, las secuencias flanqueantes del transposón también pueden obtenerse por PCR mediada por adaptador, como describen Van Den Broeck *et al.*, (1998) o por vectorette PCR (Riley *et al.*, 1990). La selección basada en filtro, descrita en este documento para ilustrar el potencial de la técnica, podría extenderse fácilmente a la tecnología de micromatriz. En teoría, pueden producirse micromatrices que representan hasta 20.000 dianas y más, y puede detectarse la hibridación de secuencias flanqueantes marcadas con fluorescencia con esas dianas por medio de microscopía confocal (Schena *et al.*, 1995). Cuando se dispone de (micro)matrices, que representan de manera ordenada el genoma entero de un organismo, el procedimiento puede usarse para catalogar rápidamente las inserciones individuales y evaluar simultáneamente la aleatoriedad de las inserciones en una población dada. También pueden usarse micromatrices que contienen dianas de ADNc de un organismo para seleccionar genes etiquetados en un organismo muy relacionado que no es en sí mismo el objeto de los esfuerzos mayoritarios de secuenciación, si se adaptan las condiciones de rigurosidad usadas en las reacciones de hibridación. Estos catálogos también podrían ser útiles para identificar genes en estrategias de clonación basadas en mapas. Después del mapeo fino de una mutación interesante, podrían recuperarse las semillas de todos los mutantes insercionales diferentes en la región de interés a partir de la biblioteca de inserción. Después, los fenotipos mutantes en la descendencia de los mutantes insercionales primarios podrían compararse con el del mutante mapeado originalmente. Cuando en dicha familia aparece el mismo fenotipo o un fenotipo comparable, probablemente el gen de interés se ha etiquetado y por lo tanto se ha identificado. También pueden generarse catálogos de mutantes insercionales por aislamiento y secuenciación de todos los sitios flanqueantes de inserción encontrados en una población. Usando un sistema de mutagénesis eficaz por transposón con trampas génicas (en inglés "gene-trap") y detector de potenciadores (en inglés "enhancer-trap"), basado en los elementos de maíz *Ac/Ds* y el gen indicador *GUS*, se ha generado una población de más de 10.000 mutantes insercionales de una sola copia en *Arabidopsis* y se han secuenciado unos pocos cientos estos alelos de inserción. El elemento *dTph1* en *Petunia* tiene un alto número de copias (150-200) en la línea usada para el etiquetado. Cada individuo W137 lleva de 10 a 20 nuevas inserciones de línea germinal. El análisis de los nuevos sitios de inserción requeriría la clonación de las secuencias flanqueantes de *dTph1* individuales y la selección del 10% de los clones que representan las nuevas inserciones. Por lo tanto, para sistemas de marcaje de alto número de copias tales como *dTph1* en *Petunia*, *Mu* en maíz y *Tc1* en *C. elegans*, la estrategia de secuenciación parece demasiado laboriosa. El sistema de selección actual de acuerdo con la invención ofrece la oportunidad de seleccionar mutantes insercionales en grandes poblaciones de individuos. Cuando se use en todo su potencial, la eficacia de la selección aumentará varios órdenes de magnitud con respecto a la del procedimiento de selección basado en PCR existente.

De esta manera, el primer aspecto de la presente invención es un procedimiento para seleccionar simultáneamente uno o más mutantes insercionales de genes en una población de cualquier organismo, por medio de:

a) la preparación de una biblioteca de mutantes de elementos de inserción procedente de una población definida de un organismo o línea celular donde tiene(n) que detectarse dicha(s) inserción/inserciones,

b) la amplificación de las secuencias flanqueantes del elemento de inserción a partir de dicha biblioteca de mutantes de elementos de inserción,

c1) la fijación de la serie de productos de amplificación de ácido nucleico obtenidos de esta manera que representan dichas secuencias flanqueantes de elementos de inserción obtenidas a partir de dicha biblioteca de mutantes de elementos de inserción en un soporte sólido como diana para la hibridación, o

c2) la producción de una serie de productos de amplificación marcados que representan dichas secuencias flanqueantes de elementos de inserción obtenidas a partir de dicha biblioteca de mutantes de elementos de inserción para uso como una sonda para hibridar con un soporte sólido al que se han fijado uno o más ácidos nucleicos como diana o dianas para la hibridación.

Los productos de amplificación de ácido nucleico obtenidos de esta manera en la etapa b) mencionada anteriormente pueden obtenerse, por ejemplo, por iPCR usando al menos un cebador o una serie de cebadores basados en la secuencia del elemento de inserción o por PCR de presentación en transposón.

La iPCR mencionada anteriormente se realiza mediante

a) la digestión de las secuencias de ácido nucleico de dicha biblioteca de mutantes de elementos de inserción con una enzima de restricción que reconoce opcionalmente motivos de cuatro nucleótidos en el ADN genómico, o con una combinación de enzimas de restricción que dan como resultado una colección de fragmentos amplificables,

## ES 2 306 485 T3

b) el autoligamiento de los fragmentos genómicos obtenidos de esta manera y

c1) la amplificación de secuencias flanqueantes de elementos de inserción usando una serie de cebadores internos

o

c2) la amplificación de secuencias flanqueantes de elementos de inserción usando un cebador o una serie de cebadores basados en la parte terminal del elemento de inserción.

Los productos de amplificación descritos anteriormente de la etapa c1 pueden reamplificarse usando al menos un cebador o una serie de dos cebadores anidados basados en la secuencia del elemento de inserción.

Los productos de amplificación descritos anteriormente en la etapa b) también pueden obtenerse por la denominada amplificación de presentación en transposón, realizándose dicha amplificación de presentación en transposón mediante

a) la digestión de las secuencias de ácido nucleico de dicha biblioteca de mutantes de elementos de inserción con una primera enzima de restricción que reconoce seis nucleótidos conservados en el elemento de inserción y con una segunda enzima de restricción que reconoce un motivo de cuatro nucleótidos en el genoma, generando al menos un fragmento de restricción por inserción que contiene al menos el sitio del hexacutter, una parte del elemento de inserción y parte de la secuencia flanqueante del elemento de inserción,

b) el ligamiento de un adaptador biotilado a los sitios del hexacutter y un ligamiento de un segundo adaptador a los sitios del tetraacutter de los fragmentos de restricción generados en a),

c) la selección de fragmentos de restricción biotilados usando perlas magnéticas de estreptavidina,

d) la amplificación de secuencias flanqueantes del elemento de inserción usando un cebador basado en la secuencia del adaptador biotilado y en la secuencia del elemento de inserción y un cebador complementario al segundo adaptador,

e) la reamplificación de dichas secuencias flanqueantes del elemento de inserción usando un cebador anidado basado en el elemento de inserción y un cebador complementario al segundo adaptador.

El soporte sólido como se ha descrito anteriormente en cualquiera de los procedimientos puede ser un filtro, micromatriz, microchip que contiene secuencias de ácido nucleico o una perla y similares, mientras que la secuencia de ácido nucleico es ADN genómico, ADNc, una secuencia oligonucleotídica o un APN.

En el procedimiento de acuerdo con la invención, una biblioteca de mutantes de elementos de inserción puede comprender 30 muestras de ADN de 100 plantas cada una, donde la biblioteca de mutantes de elementos de inserción se construye en una matriz 3D de grupos de 10 bloques, 10 filas y 10 columnas, conteniendo cada uno ADN de 100 plantas caracterizadas por las tres coordenadas B, R, C.

Dependiendo del procedimiento de acuerdo con la presente invención que se use, como enzima de restricción se usa BfaI o MseI y/o MnlI.

El organismo, que tiene un genoma en el que se debe detectar una o más inserciones de genes de acuerdo con la invención, puede ser en principio cualquier organismo incluyendo microorganismos tales como levadura, *C. elegans*, plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas tales como preferiblemente maíz, pero también *Arabidopsis thaliana*, *Petunia* y otras especies de plantas de floración y similares.

La serie de secuencias flanqueantes de elementos de inserción puede marcarse opcionalmente, por ejemplo con fluoresceína, sin embargo para este fin puede usarse cualquier marcador adecuado conocido para una persona experta en la materia.

El sistema en el que está presente la biblioteca de ADN genómico organizada de acuerdo con la invención puede ser, aunque sin limitación, un denominado sistema tridimensional (matriz 3-D como se representa en la Figura 1A) y se describe claramente en Koes *et al.*, (1995) que se incorpora en el presente documento por referencia.

La presente invención se describe en lo sucesivo con más detalle por motivos de claridad para facilitar la comprensión de la invención.

Además, a continuación se proporcionan algunas definiciones de lo que se entiende por los términos usados en la presente descripción.

### Definiciones

- Endonucleasa de restricción o enzima de restricción: es una enzima que reconoce una secuencia de nucleótidos específica (sitio diana) en una molécula de ADN bicatenario, y que escinde las dos cadenas de la molécula de ADN en cada sitio diana. La escisión de la molécula de ADN puede aparecer en diferentes posiciones en las dos cadenas,

## ES 2 306 485 T3

dando como resultado la generación de salientes de ADN monocatenarios que son específicos para la endonucleasa de restricción.

5 - Fragmentos de restricción: moléculas de ADN producidas por digestión con una enzima de restricción. Cualquier genoma determinado será digerido por una enzima de restricción particular dando una serie discreta de fragmentos de restricción.

10 - Elemento de inserción se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico integrada en un genoma. Los elementos de inserción comprenden, a modo de ejemplo pero sin limitación: elementos transponibles, retrotransposones e inserciones de ADN-T.

15 - Las secuencias flanqueantes del elemento de inserción son las secuencias de nucleótidos que flanquean un elemento de inserción determinado en el genoma. Las secuencias flanqueantes de inserción pueden ser amplificadas, a modo de ejemplo pero sin limitación, mediante PCR inversa (iPCR), presentación en transposones, amplificación de sitios mutagenizados por inserción (AIMS), vectorette PCR, o PCR entrelazada de asimetría térmica (TAIL-PCR).

20 - La biblioteca de mutantes de elementos de inserción en esta invención se refiere a una serie de muestras de ADN aisladas a partir de la población y que representan la población. Los grupos de ADN se organizan de tal forma que permiten referirse al individuo o línea celular en la que se ha insertado un elemento de inserción en una posición definida en el genoma, cuando se detecta una inserción en una subserie específica de grupos de ADN de la biblioteca de mutantes de elementos de inserción. A modo de ejemplo, la biblioteca de mutantes de elementos de inserción que representa una población de 1000 individuos puede obtenerse dando a cada uno de los 1000 individuos 3 coordenadas (B, R, C) (siendo  $1 \leq B \leq 10$ ,  $1 \leq R \leq 10$ ,  $1 \leq C \leq 10$ ), y aislando 30 muestras de ADN que contengan el ADN de los 100 individuos, donde cada muestra de ADN procede de los 100 individuos para los cuales una de las tres coordenadas 25 equivale a un número comprendido entre 1 y 10.

30 - Ligamiento es la unión del extremo 5' fosforilado de un ácido nucleico a un extremo 3' de otro ácido nucleico. El ligamiento de ADN bicatenario está mediado por la enzima ADN ligasa e implica la unión del extremo 5' y 3' de una molécula de ADN al extremo 3' y 5' de otra molécula de ADN. El extremo 5' de un ácido nucleico puede unirse al extremo 3' de un segundo ácido nucleico en una reacción intermolecular, o puede unirse a su propio extremo 3' en una reacción intramolecular que se denominará retroligamiento o autoligamiento.

35 - Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): reacción enzimática en la que se sintetizan fragmentos de ADN a partir de un ADN sustrato *in vitro* como se describe por Cetus en las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195 y 4.683.202. En resumen, la reacción implica el uso de dos oligonucleótidos/cebadores sintéticos, que son complementarios a secuencias de nucleótidos presentes en moléculas de ADN que están separadas por una corta distancia de unos pocos cientos a unos pocos miles de pares de bases, y el uso de una ADN polimerasa termoestable. Después de la desnaturalización de las moléculas de ADN bicatenario, los cebadores hibridarán con los nucleótidos complementarios en la molécula plantilla a una temperatura de hibridación específica. Una ADN polimerasa adecuada inicia después 40 la síntesis de una cadena de ADN complementaria a la molécula plantilla. La reacción en cadena continúa durante un número variable de ciclos, por ejemplo, una serie de 10 a 30 ciclos.

45 - Amplificación de ADN: esta expresión se usa para indicar la síntesis *in vitro* de moléculas de ADN bicatenarias usando, por ejemplo, PCR como técnica de amplificación de secuencias de ácido nucleico. Los productos de la PCR se denominan fragmentos de ADN amplificados.

- Cebadores: este término, en general, se refiere a una cadena de ADN que puede cebar la síntesis de ADN. La ADN polimerasa no puede sintetizar ADN *de novo* sin cebadores.

50 - Un adaptador es un oligonucleótido bicatenario que contiene un saliente de ADN monocatenario que puede unirse por ligamiento a un fragmento de restricción que contiene un saliente de ADN complementario.

55 - Los ácidos nucleicos comprende ADN, ARN o análogos sintéticos de los mismos. El genoma de un organismo consiste en ácido desoxirribonucleico (ADN). El ADN es una doble hélice consistente en dos cadenas de nucleótidos. Cada cadena consiste en una hebra de nucleótidos unidos entre sí por enlaces fosfodiéster entre el grupo 5' hidroxilo del azúcar de un nucleótido unido al grupo 3' hidroxilo del azúcar del nucleótido adyacente. Como consecuencia, una molécula de ADN monocatenario tiene una orientación definida por su extremo 5' y su extremo 3'. Los dúplex de ADN contienen dos moléculas de ADN monocatenario unidas entre sí en la orientación opuesta. El ADN monocatenario consiste en una combinación de cuatro nucleótidos diferentes, que contienen las bases: adenina (A), guanina (G), 60 timina (T) y citosina (C). El dúplex de ADN es el resultado de la formación de enlaces de hidrógeno entre guanina y citosina y entre adenina y timina localizadas en dos cadenas diferentes. La guanina y la citosina son bases complementarias, como también lo son la timina y la adenina. La información contenida dentro del genoma se transcribe en el ARN. El ARN es una sola cadena de ácido ribonucleico. El ARN consiste en cuatro nucleótidos diferentes, que contienen las bases: adenina, guanina, citosina y uracilo. El uracilo y la adenina son bases complementarias. 65

- La hibridación es el proceso de la unión de un ácido nucleico a un segundo ácido nucleico mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre las bases de los ácidos nucleicos. La hibridación de los ácidos nucleicos se obtiene por interacción de dos ácidos nucleicos complementarios en condiciones específicas de fuerza iónica, pH y temperatura.

## ES 2 306 485 T3

- La desnaturalización es el proceso de separación de cadenas de ácido nucleico. La desnaturalización puede obtenerse aumentando la temperatura o reduciendo la fuerza iónica de una solución de ácido nucleico bicatenario.

5 - Un ácido nucleico monocatenario es complementario a un segundo ácido nucleico monocatenario en caso de que las dos cadenas contengan los nucleótidos complementarios en el orden opuesto. Un ácido nucleico puede hibridar con una molécula que es un complemento perfecto, con un ácido nucleico que comprende su complemento perfecto, o con un ácido nucleico que está comprendido en su complemento perfecto. En condiciones de hibridación tolerantes, un ácido nucleico también puede hibridar con complementos no perfectos, siempre que el complemento no perfecto tenga una cantidad suficiente de similitud con el complemento perfecto. Los ácidos nucleicos que no son idénticos pero que presentan una cantidad significativa de similitud se denominan homólogos.

- El término sonda se refiere a un ácido nucleico monocatenario que es capaz de unirse a un segundo ácido nucleico, que recibe el nombre de diana.

15 Típicamente, la sonda se asocia con un marcador para identificar la diana a la que se une la sonda.

- El término marcador se refiere a una porción molecular que puede detectarse y puede incluir, a modo de ejemplo, isótopos radiactivos, quimioluminiscencia, fluorescencia, colorantes, etc. Un marcador también puede ser una porción capaz de interactuar con otras moléculas, que puede detectarse directa o indirectamente, tal como, a modo de ejemplo pero sin limitación, antígenos que pueden detectarse inmunológicamente mediante anticuerpos, acoplados a enzimas que pueden convertir un sustrato en una molécula detectable.

20 - En esta invención, el término sonda comprende el ácido nucleico o el grupo de ácidos nucleicos que hibridan con la diana, siendo la sonda un ácido nucleico o un grupo de ácidos nucleicos en solución, y siendo la diana un ácido nucleico o una serie de ácidos nucleicos fijados a un soporte sólido. Soporte sólido se refiere a soportes convencionales que comprenden filtros, membranas, soportes de silicato tales como vidrio, pero también se refiere a soportes más sofisticados tales como micromatrices o microchips que contienen secuencias de ácido nucleico.

25 - El término "población" comprende un grupo de individuos discretos o un grupo de líneas celulares discretas, conteniendo el grupo al menos 1 pero típicamente 1000 individuos o líneas celulares.

### 30 Descripción más detallada de la técnica

Para seleccionar mutantes insercionales de una forma eficaz, las plantas no se analizan individualmente sino que se organizan, por ejemplo, en una matriz 3D de conjuntos de bloques, filas y columnas de 100 plantas como describen Koes *et al.* (1995). En una población de 1000 plantas, cada individuo se caracteriza por tres coordenadas ( $B_{1 \leq B \leq 10}$ ,  $R_{1 \leq R \leq 10}$ ,  $C_{1 \leq C \leq 10}$ ).

Se preparan grupos de diez bloques, diez filas y diez columnas de ADN de 100 plantas cada uno generando una biblioteca de mutantes de elementos de inserción consistente en 30 muestras de ADN.

#### 40 Selección de mutantes insercionales usando *i*PCR y/o presentación en transposones

Las secuencias flanqueantes de elementos de inserción en las diferentes muestras de la biblioteca de mutantes de elementos de inserción se recuperan en cuatro etapas. Se digiere el ADN genómico usando una enzima de restricción tetracutter. Los fragmentos obtenidos se circularizan por autoligamiento, se amplifican usando una serie de cebadores internos derivados del elemento de inserción y se reamplifican por PCR anidada para asegurar la especificidad de los productos obtenidos (Figura 1A).

50 Como alternativa, las secuencias flanqueantes de los elementos de inserción en un grupo específico pueden recuperarse usando la amplificación por Presentación en transposones. En este caso, las muestras de ADN de la biblioteca de mutantes de elementos de inserción se digieren con una enzima de restricción que reconoce un sitio conservado de seis bases (esta enzima de restricción se denomina hexacutter) en el elemento de inserción y una enzima de restricción que reconoce un sitio de cuatro bases (esta enzima de restricción se denomina tetracutter). Se unen adaptadores a los fragmentos obtenidos y se seleccionan los fragmentos que contienen el sitio hexacutter. Las secuencias flanqueantes de inserción pueden amplificarse en dos etapas. En la reacción de preamplificación se usa un cebador basado en el adaptador del sitio del hexacutter y el elemento de inserción en combinación con un cebador basado en el adaptador del sitio del tetracutter para amplificar una subserie de fragmentos de PCR. En la segunda etapa, estos fragmentos se usan como plantilla para amplificar fragmentos específicos de inserción usando un cebador con especificidad de transposón y un cebador basado en el adaptador del sitio del tetracutter (Figura 2).

60 Para seleccionar individuos que llevan inserciones en los genes específicos de interés, son posibles dos estrategias.

En la primera estrategia, los 30 grupos de secuencias flanqueantes amplificadas pueden presentarse en filtros e hibridarse con un gen diana de interés en un punto de tiempo (Figura 1B). Este procedimiento ya ofrece una ventaja con respecto a los procedimientos basados en cebadores con especificidad de gen existentes, ya que los mismos productos de PCR pueden usarse para seleccionar muchos, al menos 300-500 genes mientras que es posible el aumento a escala. En la segunda estrategia, se presenta una gran serie de dianas en 30 filtros replicados, y se hibridan con la serie marcada de 30 grupos de secuencia amplificada (Figura 1C). Esta estrategia es útil cuando se están seleccionando más de 30

## ES 2 306 485 T3

genes diana. Una gran ventaja de este procedimiento es que no se necesita *a priori* la información de secuencia de los genes diana.

### Determinación de los límites de detección

Se realizó un experimento de reconstrucción en el que se mezcló ADN genómico de *Petunia* W137 con cantidades decrecientes de ADN del mutante insercional heterocigoto *PhAp2A* (V2025-6) y se sometió al protocolo de iPCR. Los productos de iPCR se sometieron a transferencia en minifiltros y se hibridaron con una serie de diluciones de una sonda específica de *Ap2A*. A una concentración de sonda de 250 pg/ml, pudo detectarse claramente la señal de hibridación de la dilución 1/256 de *PhAp2A* (V2025-6)/W137 por encima de la señal de fondo. Como los individuos de *Petunia hybrida* W137 llevan aproximadamente 150-200 elementos *dTph1*, esto significa que se detectó una secuencia flanqueante de transposón específica frente a un fondo de ~50000 (256x200) copias. Por consiguiente, deben ser detectables inserciones específicas en grupos de 100 plantas de *Petunia* W137. Para otros sistemas modelo, cuando se esperan menos inserciones por individuo, pueden explorarse conjuntos mayores.

### Construcción de una biblioteca de secuencias flanqueantes de inserción 3D y selección de mutantes insercionales

Se prepararon treinta muestras de ADN genómico de grupos de cien individuos cada uno, que representaban una población de 1000 plantas W137. Una planta individual que llevaba el alelo de inserción *PhAp2A*(V2025-6) se incluyó en la población para servir como control positivo. Las secuencias flanqueantes de los treinta grupos de ADN y una serie de dilución de mutantes insercionales se generaron usando iPCR con los cebadores de repetición terminal invertida del transposón, con una serie de cebadores de transposón internos o combinando la última reacción de iPCR con una reamplificación anidada con los cebadores de repetición terminal invertida del transposon (compárese con la Fig. 1A). Esta última estrategia proporciona claramente la mejor amplificación en los conjuntos.

Para que funcione la técnica, es esencial que todos los conjuntos tengan amplificadas eficazmente las secuencias flanqueantes de los elementos *dTph1*. Para controlar la calidad general de las reacciones de amplificación, se comprobó si dos fragmentos flanqueantes de *dTph1*, *Pete1* y *Pete2*, se habían amplificado igualmente en todos los conjuntos. *Pete1* y *Pete2* se identificaron mediante presentación en transposón (Van den Broeck *et al.*, 1998) y son heredados por todos los individuos de la población W137. Esto implica que están presentes a una concentración 200 veces mayor en los conjuntos que una inserción heterocigota presente en una sola planta de la población. Todos los conjuntos se consideraron positivos para *Pete1* y *Pete2*, excepto R9 en la primera serie y R5 en la segunda serie.

Sin embargo, las secuencias flanqueantes de *dTph1* en Cep2 en la planta (VIII, 6, h) de esta población, identificada previamente mediante la estrategia de selección 3D clásica, solo se demostró ser positiva en una de las tres dimensiones.

Por lo tanto, se creó un control positivo más sensible añadiendo una dilución 1/100 de ADN genómico de una planta heterocigota para el alelo de inserción *PhAp2A* (V2025-6) a todos los grupos de ADN genómico. Después de la digestión y de la iPCR anidada, los productos agrupados se sometieron a spot blot y se hibridaron con una sonda específica para *PhAp2A*. El protocolo se repitió hasta que todos los conjuntos dieron un resultado positivo para la inserción de *PhAp2A*. Después de esta mejora cualitativa, la inserción Cep2 podía detectarse en los conjuntos que se esperaba que fueran positivos (Figura 3A y 3B).

### Selección paralela de mutantes insercionales

Para la selección paralela, se marcaron grupos de secuencias flanqueantes de transposones y se usaron como sonda para hibridar genes potencialmente etiquetados. Una serie de dilución de *PhAp2A* y ADN diana de control negativo (secuencia de vector) se transfirió a pequeños filtros redondos y se hibridó con un grupo de bloque III marcado para determinar la cantidad de ADN que necesitaba presentarse en los filtros diana para obtener una señal claramente positiva. Se realizó una serie de 30 réplicas, representando cada una 80 genes diana, usando una Beckman Biomek 2000 Laboratory Automated Workstation. La mayoría de las dianas presentadas (73) eran insertos amplificados por PCR procedentes de clones de ADNc recogidos aleatoriamente a partir de una biblioteca de ADNc con especificidad de carpelo. Entre las siete dianas con secuencias conocidas estaba *PhAp2A*, que se incluyó como control positivo constitutivo para las 30 muestras. Usando el procedimiento de exploración 3D clásico, se había identificado una inserción de *dTph1* en *PhAp2C* en la planta (V, 8, g), de esta manera se usó *PhAp2C* como control positivo que representaba un solo mutante insercional que aparecía en la población.

Los 30 grupos de secuencias flanqueantes de transposón obtenidas por iPCR anidada se marcaron con fluoresceína y se hibridaron con las 30 réplicas del gen diana. Cada diana se presentó tres veces y formó un patrón que podía distinguirse fácilmente de las manchas falsas en el filtro. La señal de *PhAp2A* de control puede detectarse como una diagonal de tres puntos en la posición (2, E) en cada filtro usando sondas hechas de las secuencias flanqueantes del elemento de inserción que se habían amplificado bien como se determina por el ensayo de control de calidad descrito bajo la construcción de una biblioteca 3D de secuencias flanqueantes de inserción. Se detectó una inserción de *dTph1* en *PhAp2C* en la posición correcta en la diagonal de la posición (4, E) de los filtros hibridados con las sondas hechas de las secuencias flanqueantes del elemento de inserción que pasaron el ensayo de control de calidad, y que se obtuvieron a partir de las muestras de bibliotecas de mutantes de elementos de inserción que contenían el ADN de la planta individual que contenía una inserción de *dTph1* en *PhAp2C*.

## Ejemplos

*Procedimiento para la determinación de los límites de detección*

5 Se diluyó ADN genómico del mutante insercional *PhAp2A* heterocigoto con cantidades crecientes de ADN de tipo salvaje (en proporciones que variaban de 1/1 a 1/256 de ADN mutante insercional/ADN de tipo salvaje). Se digirieron 10  $\mu\text{g}$  de cada mezcla de ADN en 100  $\mu\text{l}$  de tampón 4 de New England Biolabs 1x con la enzima tetracutter *BfaI*, que no corta dentro del elemento *dTph1* de 284 pb. Después de completar la digestión, la enzima se inactivó con calor y la mezcla se extrajo con fenol:cloroformo, se precipitó y se disolvió en dd  $\text{H}_2\text{O}$ . Se ligaron 2  $\mu\text{g}$  de ADN a 14°C en 10 400  $\mu\text{l}$  de tampón de ligamiento T4 1x en presencia de 2,5 unidades de ADN ligasa de T4. La mezcla de ligamiento se extrajo con fenol:cloroformo, con cloroformo y se precipitó en presencia de 20  $\mu\text{g}$  de ARNt de timo de ternero, se lavó y se secó. El sedimento secado al vacío se resuspendió en 30  $\mu\text{l}$  de dd  $\text{H}_2\text{O}$ . En la reacción iPCR se usaron 5 15  $\mu\text{l}$  de fragmentos autoligados con el cebador de repetición invertida de transposon (TIR) exterior, consistiendo dicha reacción en 35 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de hibridación a 55°C y 1,5 min de polimerización a 72°C. Las reacciones de PCR también se realizaron en cantidades equivalentes de W137 no digerido y ADN de mutante insercional. Los productos de reacción se aplicaron en octuplicado en filtros individuales Hybond N<sup>+</sup> que se habían cortado a un tamaño suficientemente pequeño para ajustarse en placas de 96 pocillos, se desnaturalizaron, neutralizaron y se calentaron en una estufa según lo prescrito por el fabricante. Los filtros se prehibridaron en 50  $\mu\text{l}$  de mezcla de hibridación (como prescribe Amersham). 50 ng de un fragmento *SpeI/EcoRI* de 900 pb de *Ap2A* se marcó 20 con <sup>32</sup>P con un kit Megaprime en una reacción de 50  $\mu\text{l}$  con 5  $\mu\text{l}$  de  $\alpha$ -dCTP (incorporación ~50%). La mitad de la sonda desnaturalizada se diluyó a 1200  $\mu\text{l}$  con mezcla de hibridación, 600  $\mu\text{l}$  se dividieron en 12 alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  que se añadieron a la mezcla de prehibridación y los otros 600  $\mu\text{l}$  se usaron para siete diluciones dobles consecutivas. De esta manera, la concentración de la sonda en la primera serie de doce hibridaciones fue ~1 ng/100  $\mu\text{l}$ , reduciéndose cada vez en un factor de dos para las siete siguientes diluciones. Los lavados se realizaron a 60°C, 2 veces en SSC 2x, SDS al 0,1% y 4 veces en SSC 0,5x, SDS al 0,1% durante 10 minutos cada vez. Los filtros hibridados se expusieron a 25 un casete Phosphor Image y se exploraron usando un Beckman Phosphor Imager.

*Procedimiento para la construcción de una biblioteca 3D de secuencias flanqueantes de inserción incluyendo un control de calidad*

30 Se organizaron 1000 plantas W137 en una matriz 3D de 10 bloques, 10 filas y 10 columnas, como describe Koes et al. (1995). Se extrajo ADN a partir de las hojas de los 30 grupos usando un procedimiento de extracción CTAB. A cada grupo se le añadió ADN extraído de un mutante insercional *Ap2A* heterocigoto en una relación de 1:100 como control positivo. Se digirieron 10  $\mu\text{g}$  de cada una de las 30 muestras de ADN a 37°C durante 6 h con 10 35 unidades de enzima de restricción *BfaI* de Biolabs en tampón NEB4 1x. Las reacciones de restricción se extrajeron con fenol, fenol:cloroformo y cloroformo. Se añadió 1  $\mu\text{l}$  de ARNt a 10 mg/ml, las muestras se precipitaron con NaOAc y EtOH, se lavaron con EtOH al 70% y se disolvieron en 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . 20  $\mu\text{l}$  de esta mezcla (2  $\mu\text{g}$ ) se ligaron durante una noche a 16°C mediante 6 unidades de ADN ligasa de T4 (Pharmacia) en 400  $\mu\text{l}$  de tampón de ligamiento (MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris.Cl 30 mM pH 7,8, DTT 10 mM, ATP 0,5 mM). La mezcla de ligamiento se extrajo 40 con fenol, fenol:cloroformo y cloroformo, se precipitó como se ha indicado anteriormente y se disolvió en 30  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . 5  $\mu\text{l}$  de esta solución se usaron como plantilla en una primera reacción de amplificación realizada con dos cebadores internos con especificidad de transposón (IntA: 5'-GGGAATTCTTGAACGAGTTGTCCTC-3' e IntB: 5'-GGGAATTCAGTGTAATTTTGC GC-3', véase también Souer *et al.*, 1995), durante 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 1 min 30 segundos a 72°C en 50  $\mu\text{l}$  de Perkin Elmer 1x con 30 pmol de cada cebador, 45 dNTP 200 nM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM y 1 unidad de Taq polimerasa de Perkin Elmer. 3  $\mu\text{l}$  de las secuencias flanqueantes de transposón resultantes se reamplificaron con un cebador basado en la repetición terminal invertida del transposón (5'-GGGAATTCGCTCCGCCCTG-3').

*Control de calidad de los grupos de secuencias flanqueantes amplificadas*

50 0,25  $\mu\text{l}$  de los productos de PCR se sometieron a spot blot en una membrana Hybond N<sup>+</sup> y se hibridaron con una sonda específica de *Ap2A*  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP para ver si el mutante insercional de control podía detectarse. Los lavados y la detección se realizaron como en el experimento de reconstrucción.

*Procedimiento para la selección paralela de mutantes insercionales*

60 Se distribuyeron alícuotas de 20  $\mu\text{l}$  de solución de ADN diana (100 ng/ $\mu\text{l}$ ) en placas de microtitulación con fondo de forma en V y se transfirieron (spot blot) a filtros Hybond N<sup>+</sup> usando una Beckman Biomek 2000 Laboratory Automation Workstation. Cada réplica tenía el tamaño de 1/3 de una placa de microtitulación de 96 pocillos. En cada una de las 4x8 posiciones (de 1 a 4 y de A a H), se representó una matriz de 3 dianas como se indica a continuación:

a	b	c
a	c	b
c	a	b

## ES 2 306 485 T3

De esta forma, pueden presentarse  $4 \times 8 \times 3 = 96$  dianas por réplica (se ha usado una matriz de  $4 \times 7 \times 3 = 84$  dianas). Los filtros se trataron para hibridación como describe Amersham. 5-10  $\mu\text{l}$  de los grupos de secuencias flanqueantes amplificadas se marcaron con fluoresceína usando el módulo de marcaje de cebador aleatorio de Gene Images (Amersham). Se añadió una pequeña cantidad de cebador de IR en la reacción de marcaje para garantizar que se marcaban fragmentos pequeños. Los filtros de réplica se hibridaron en 5 ml de tampón de hibridación y se lavaron de acuerdo con el protocolo de Amersham. Las señales de hibridación se visualizaron usando el módulo de detección de Gene Images (Amersham) después de la exposición a películas de rayos-X Fuji.

### 10 *Selección de mutantes insercionales usando presentación en transposones*

#### *Determinación de los límites de detección*

Se realizó un experimento de reconstrucción en el que se mezcló ADN genómico de Petunia W137 con cantidades decrecientes de ADN de un mutante insercional que contenía una inserción de *dTph1* en *Ap2A* ( $A = 1/2$ ,  $B = 1/4$ ,  $C = 1/8$ ,  $D = 1/16$ ,  $E = 1/32$ ,  $F = 1/64$ ,  $G = 1/128$ ), y se sometió al protocolo de amplificación de presentación en transposones, que se realizó con los cebadores de PCR no marcados. Los productos de amplificación de Presentación en transposones se sometieron a spot blot en filtros y se hibridaron con una sonda específica de *Ap2A* marcada. El fragmento flanqueante de *dTph1* amplificado que contenía parte del gen *Ap2A* pudo detectarse fácilmente en la dilución 1/128 del ADN mutante con el ADN de W137 de tipo silvestre (Figura 4A).

#### *Construcción de una biblioteca 3D de secuencias flanqueantes de inserción y selección de mutantes insercionales*

Se realizó un segundo experimento de reconstrucción en el que se aisló el ADN genómico de un grupo de respectivamente 4 (2x2), 9 (3x3), 16 (4x4), 25 (5x5), 36 (6x6), 49 (7x7), 64 (8x8), 81 (9x9) y 100 (10x10) individuos diferentes. En cada grupo, 1 de los individuos posteriormente se reemplazó por un individuo que contenía una inserción de *dTph1* en el gen *Ap2A* y se extrajeron los ADN.

Se realizó amplificación de presentación en transposones en cada uno de los grupos usando cebadores no marcados y los productos de amplificación de presentación en transposones resultantes se sometieron a spot blot en filtros y se hibridaron con una sonda específica de *Ap2A*. El fragmento flanqueante de *dTph1* amplificado que contenía parte del gen *Ap2A* pudo detectarse fácilmente como una señal positiva en cada uno de los grupos que llevaban la inserción de *Ap2A*. En los grupos de control que no contenían ADN del mutante insercional, no se observó esta señal. Después, las secuencias flanqueantes de *dTph1* pudieron amplificarse a partir de los 30 grupos de una población de 1000 organizados en Bloques, Filas y Columnas, se transfirieron (spot blot) en un filtro y se usaron para seleccionar inserciones en cualquier gen de interés.

#### *Selección paralela de mutantes insercionales*

Para seleccionar inserciones en muchos genes simultáneamente, los fragmentos de presentación en transposones amplificados se marcan y se usan como sonda para hibridar con un filtro que contenía una serie de genes diana.

Los dos fragmentos de presentación en transposones obtenidos a partir de la amplificación de fragmentos flanqueantes de *dTph1* de la serie de dilución F y G, descritas anteriormente, y los obtenidos a partir de los 2x2, 6x6, 8x8 y 10x10 grupos que contenían un individuo con una inserción de *dTph1* en *Ap2A*, mencionada anteriormente, se marcaron por separado y se usaron para hibridar con filtros que presentaban un fragmento del gen *Ap2A*. Todas las sondas obtenidas por PCR de presentación en transposones en los grupos que contenían la inserción de *Ap2A* pudieron detectar el gen *Ap2A* en los filtros.

Las secuencias flanqueantes de *dTph1* pueden amplificarse a partir de los 30 grupos de una población de 1000 organizados en Bloques, Filas y Columnas, marcarse y usarse como sondas para hibridar con filtros que contienen múltiples dianas génicas. Se identificó una inserción en el gen *Stig1* en los grupos correctos de los fragmentos de presentación en transposones obtenidos a partir de dicha población (Figura 5B).

### 55 *Procedimientos para seleccionar mutantes insercionales usando presentación en transposones*

La presentación en transposones se realizó como describe Van den Broeck *et al.*, 1998, con las siguientes modificaciones:

Las perlas con estreptavidina se suspendieron en 50 en lugar de 200  $\mu\text{l}$  de tampón T01E, las reacciones de preamplificación selectiva se realizaron con 5  $\mu\text{l}$  de los 50  $\mu\text{l}$  anteriores en un volumen de reacción de 50  $\mu\text{l}$  usando el cebador *MunI*-ACAC y un cebador *MseI*, pero usando un perfil de PCR "touch down" como se describe en la PCR caliente. Los productos de preamplificación se diluyeron 10 veces y se reamplificaron usando 5  $\mu\text{l}$  del producto de preamplificación diluido, el cebador de IR y el cebador *MseI*, en un volumen de reacción de 50  $\mu\text{l}$  pero sin marcaje del cebador de IR, dando como resultado el producto final.

## ES 2 306 485 T3

Para realizar una selección sencilla de mutantes insercionales, los 50  $\mu$ l de producto final se secaron, se resuspendieron en 5  $\mu$ l de agua, se desnaturalizaron y se aplicaron en Hybond N+ y se hibridaron con una sonda específica de gen desnaturalizada marcada usando el kit CDP-star de Amersham, en un tampón que contenía SSC 5x, a 60°C y las manchas de transferencia se lavaron a 60°C a una rigurosidad de SSC 0,5x.

Para realizar una exploración paralela de mutantes insercionales, 2  $\mu$ l de los 50  $\mu$ l del producto final se marcaron usando una PCR lineal usando 1,5  $\mu$ l de cebador de IR, 10  $\mu$ l de mezcla de nucleótidos del kit CDP-star de Amersham, 5  $\mu$ l de tampón de PCR 10x y 0,2  $\mu$ l de Taq polimerasa en un volumen de 50  $\mu$ l, usando un perfil de PCR de 30 ciclos de 94°C/30 s, 56°C/30 s, 72°C/ 60 s.

Las hibridaciones de los filtros con genes diana se realizaron con estas sondas en un tampón que contenía SSC 5x a 60°C, y las manchas de transferencia se lavaron a 60°C con una rigurosidad de SSC 0,5x.

### Bibliografía

**Ballinger, D.G., and Benzer, S. (1989).** Targeted gene mutations in Drosophila. *PNAS* 86, 9402-9406

**Bechtold N., Ellis, J., Pelletier, G. (1993).** In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences* 316, 1194-1199.

**Burns, N., Grimwade, B., Ross-Macdonald, P.B., Choi, E-Y., Finberg, K., Roeder, G.S. and Snyder, M. (1994).** Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Dev.* 8, 1087-1105.

**Das, L. and Martienssen, R. (1995).** Site-Selected Transposon Mutagenesis at the hcf106 Locus in Maize. *Plant Cell* 7(3), 287-294

**Gerats, A.G.M., Beld, M., Huits, H., Prescott, A. (1989).** Gene tagging in *Petunia hybrida* using homologous and heterologous transposable elements. *Dev. Gen.* 10,561-568

**Kaiser, K., and Goodwin, S.F. (1990).** "Site-selected" mutagenesis of Drosophila. *PNAS* 87, 1686-1690.

**Koes, R., Souer, E., Van Houwelingen, A., Mur, L., Spelt, C, Quattrocchio, F., Wing, J., Oppedijk, B., Ahmed, S., Maes, T., Gerats, T., Hoogeveen, P., Meesters, M., Kloos, D., Mol, J.N.M. (1995).** Targeted gene inactivation in petunia by PCR-based selection of transposon insertion mutants. *PNAS* 92 (18), 8149-8153

**McKinney, E.C., Aali, N., Traut, A., Feldmann, K. A., Belostotsky, D.A., McDowell, J.M., Meagher, R. (1995).** Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in Arabidopsis: Actin mutants act2-1 and act4-1. *Plant Journal* 8(4), 613-622

**Mollier, P., Montoro, P., Delarue, M., Bechtold, N., Bellini, C., Pelletier, G. (1995).** Promoterless gusA expression in a large number of *Arabidopsis thaliana* transformants obtained by the in planta infiltration method. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences* 318, 465-474.

**Riley, J., Butler, R., Ogilvie, D., Finniear, R., Jenner, R., Powell, S., Anand, S., Smith, S., and Markham, A.F. (1990).** A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *NAR* 18, 2887-2890.

**Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O. (1995).** Quantative monitoring og gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.

**Shoemaker, D.D., Lashkari, D.A., Morris, D., Mittmann, M. and Davis, R.W. (1996).** Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. *Nature Genetics* 14,450-456.

**Smith, V., Botstein, D. and Brown, P.O. (1995).** Genetic footprinting: A genomic strategy for determining a gene's function given its sequence. *PNAS* 92, 6479-6483.

**Souer, E., Quattrocchio, F., de Vetten, N., Mol, J. and Koes, R. (1995).** A general method to isolate genes tagged by a high copy number transposable element. *Plant Journal* 7(4): 677-685.

**Van den Broeck, D., Maes, T., Sauer, M., Zethof, J., Van Montagu, M. and Gerats, T. (1998)** Transposon Display identifies individual transposable elements in high copynumber lines. *Plant Journal* 13(1): 121-129.

**Zwaal, R.R., Broecks, A., Van Meurs, J., Groenen, J.T.M., Plasterk, R.H.A. (1993).** Target-selected gene inactivation in *Caenorhabditis elegans* by using a frozen transposon insertion mutant bank. *PNAS* 90(16): 7431-7435

**Referencias citadas en la descripción**

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

**Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción**

**BALLINGER, D.G.; BENZER, S.** Targeted gene mutations in Drosophila. *PNAS*, 1989, vol. 86, 9402-9406 [0051]

**BECHTOLD N.; ELLIS, J.; PELLETIER, G.** In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences*, 1993, vol. 316, 1194-1199 [0051]

**BURNS, N.; GRIMWADE, B.; ROSS-MACDONALD, P.B.; CHOI, E-Y.; FINBERG, K.; ROEDER, G.S.; SNYDER, M.** Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Dev.*, 1994, vol.8, 1087-1105 [0051]

**DAS, L.; MARTIENSSEN, R.** Site-Selected Transposon Mutagenesis at the hcf106 Locus in Maize. *Plant Cell*, 1995, vol. 7 (3), 287-294 [0051]

**GERATS, A.G.M.; BELD, M.; H U ITS, H.; PRESCOTT, A.** Gene tagging in *Petunia hybrida* using homologous and heterologous transposable elements. *Dev.Gen.*, 1989, vol. 10, 561-568 [0051]

**KAISER, K.; GOODWIN, S.F.** Site-selected" mutagenesis of Drosophila. *PNAS*, 1990, vol. 87, 1686-1690 [0051]

**KOES, R.; SOUER, E.; VAN HOUWELINGEN, A.; MUR, L.; SPELT, C.; QUATTROCCHIO, F.; WING, J.; OPPEDIJK, B.; AHMED, S.; MAES, T.** Targeted gene inactivation in petunia by PCR-based selection of transposon insertion mutants. *PNAS*, 1995, vol. 92 (18), 8149-8153 [0051]

**MCKINNEY, E.C.; AALI, N.; TRAUT, A.; FELDMANN, K. A.; BELOSTOTSKY, D.A.; MCDOWELL, J.M.; MEAGHER, R.** Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in Arabidopsis: Actin mutants act2-1 and act4-1. *Plant Journal*, 1995, vol. 8(4), 613-622 [0051]

**MOLLIER, P.; MONTORO, P.; DELARUE, M.; BECHTOLD, N.; BELLINI, C.; PELLETIER, G.** Promoterless gusA expression in a large number of *Arabidopsis thaliana* transformants obtained by the in planta infiltration method. *C.R.Acad.Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences*, 1995, vol. 318,465-474 [0051]

**RILEY, J.; BUTLER, R.; OGILVIE, D.; FINNIEAR, R.; JENNER, R.; POWELL, S.; ANAND, S.; SMITH, S.; MARKHAM, A.F.** A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *NAR*, 1990, vol. 18, 2887-2890 [0051]

**SCHENA, M.; SHALON, D. ; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O.** Quantative monitoring og gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, vol. 270, 467-470 [0051]

**SHOEMAKER, D.D.; LASHKARI, D.A.; MORRIS, D.; MITTMANN, M.; DAVIS, R.W.** Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. *Nature Genetics*, 1996, vol. 14, 450-456 [0051]

**SMITH, V.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O.** Genetic footprinting: A genomic strategy for determining a gene's function given its sequence. *PNAS*, 1995, vol. 92, 6479-6483 [0051]

**SOUER, E.; QUATTROCCHIO, F.; DE VETTEN, N.; MOL, J.; KOES, R.** A general method to isolate genes tagged by a high copy number transposable element. *Plant Journal*, 1995, vol. 7 (4), 677-685 [0051]

**VAN DEN BROECK, D.; MAES, T.; SAUER, M.; ZETHOF, J.; VAN MONTAGU, M.; GERATS, T.** Transposon Display identifies individual transposable elements in high copynumber lines. *Plant Journal*, 1998, vol. 13(1), 121-129 [0051]

**ZWAAL, R.R.; BROECKS, A.; VAN MEURS, J.; GROENEN, J.T.M.; PLASTERK, R.H.A.** Target-selected gene inactivation in *Caenorhabditis elegans* by using a frozen transposon insertion mutant bank. *PNAS*, 1993, vol. 90 (16), 7431-7435 [0051]

## ES 2 306 485 T3

### REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para seleccionar simultáneamente uno o más mutantes insercionales de genes en una población de cualquier organismo o línea celular derivada del mismo mediante:

a) preparación de una biblioteca de mutantes de elementos de inserción procedente de una población definida de un organismo o línea celular donde se ha detectado dicha(s) inserción (inserciones),

10 b) amplificación de las secuencias flanqueantes de elementos de inserción de dicha biblioteca de mutantes de elementos de inserción,

15 c1) fijación de la serie de productos de amplificación de ácido nucleico obtenidos de esta manera que representan dichas secuencias flanqueantes de elementos de inserción derivadas de dicha biblioteca de mutantes de elementos de inserción en un soporte sólido como diana para hibridación, o

c2) producción de una serie de productos de amplificación marcados que representan dichas secuencias flanqueantes de elementos de inserción derivadas de dicha biblioteca de mutantes de elementos de inserción para uso como sonda para hibridar con un soporte sólido al que se han fijado uno o más ácidos nucleicos como diana(s) para hibridación.

20 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los productos de amplificación de ácido nucleico obtenidos de esta manera en la etapa b) se obtienen mediante iPCR usando al menos un cebador o una serie de cebadores basados en la secuencia del elemento de inserción.

25 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la iPCR se realiza mediante

a) digestión de las secuencias de ácido nucleico de dicha biblioteca de mutantes de elementos de inserción con una enzima de restricción que opcionalmente reconoce motivos de cuatro nucleótidos en el ADN genómico, o con una combinación de enzimas de restricción que dan como resultado una colección de fragmentos amplificables,

30 b) autoligamiento de los fragmentos genómicos obtenidos de esta manera y cualquiera de

c1) amplificación de secuencias flanqueantes de elementos de inserción usando una serie de cebadores internos o

35 c2) amplificación de secuencias flanqueantes de elementos de inserción usando un (una serie de) cebador (cebadores) basados en la parte terminal del elemento de inserción.

40 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que los productos de amplificación de la etapa c1 se reamplifican usando al menos un cebador o una serie de dos cebadores anidados basados en la secuencia del elemento de inserción.

5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los productos de amplificación de la etapa b) se obtienen amplificación de presentación en transposones, que se realiza mediante

45 a) digestión de las secuencias de ácido nucleico de dicha biblioteca de mutantes de elementos de inserción con una primera enzima de restricción que reconoce seis nucleótidos conservados en el elemento de inserción y con una segunda enzima de restricción que reconoce un motivo de cuatro nucleótidos en el genoma, generando al menos un fragmento de restricción por inserción que contiene al menos el sitio del hexacutter, una parte del elemento de inserción y parte de la secuencia flanqueante del elemento de inserción,

50 b) ligamiento de un adaptador biotilado a los sitios del hexacutter y ligamiento de un segundo adaptador a los sitios del tetracutter de los fragmentos de restricción generados en a),

c) selección de fragmentos de restricción biotilados usando perlas magnéticas de estreptavidina,

55 d) amplificación de secuencias flanqueantes de elementos de inserción usando un cebador basado en la secuencia del adaptador biotilado y en la secuencia del elemento de inserción y un cebador complementario al segundo adaptador, y

60 e) reamplificación de dichas secuencias flanqueantes de elementos de inserción usando un cebador anidado basado en el elemento de inserción y un cebador complementario al segundo adaptador.

6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el soporte sólido es un filtro, micromatriz o chip que contiene secuencias de ácido nucleico.

65 7. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de ácido nucleico es ADN genómico o ADNc.

## ES 2 306 485 T3

8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la biblioteca de mutantes de elementos de inserción comprende 30 muestras de ADN de 100 plantas cada una.

5 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la biblioteca de mutantes de elementos de inserción se construye en una matriz 3D de grupos de 10 Bloques, 10 Filas y 10 Columnas cada uno, que contienen ADN de 100 plantas, **caracterizado** por las tres coordenadas B, R, C.

10 10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que como enzima de restricción se usa BfaI.

11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que como enzima de restricción se usa MseI y/o MunI.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

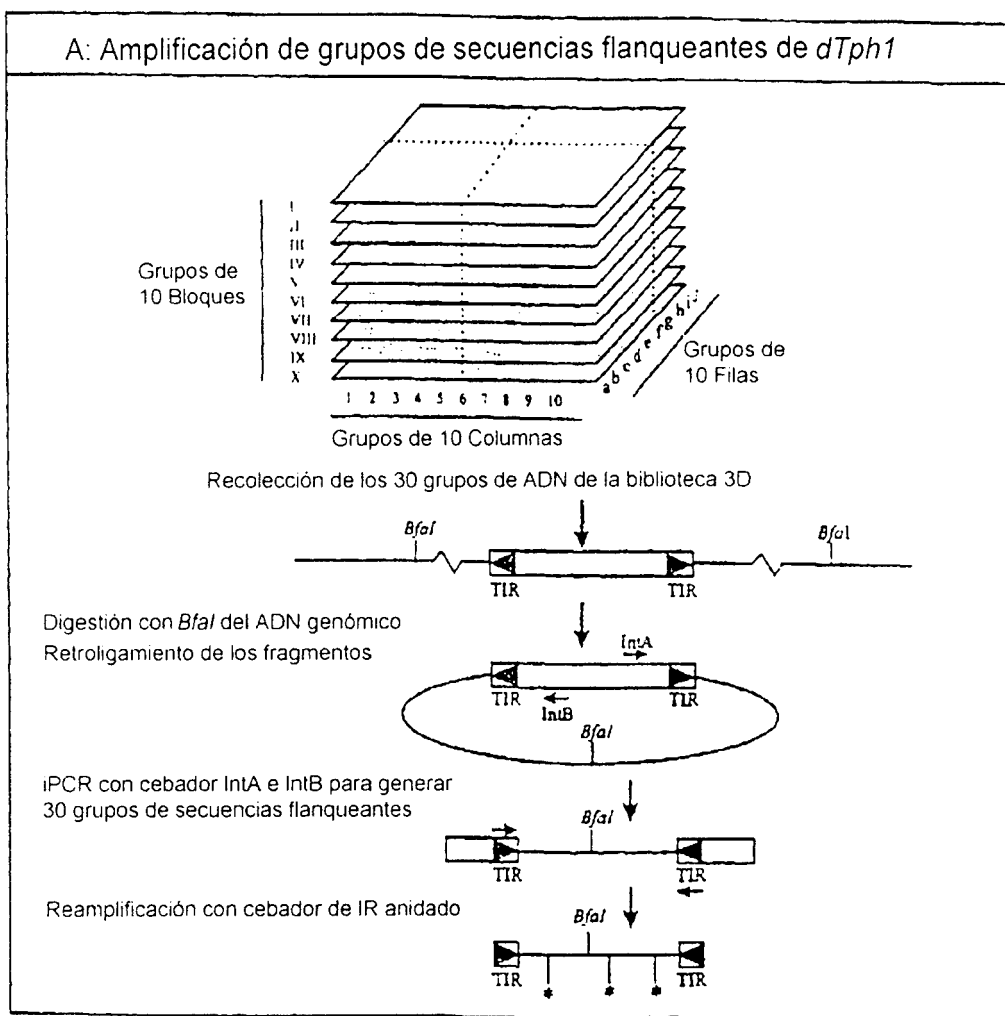


Figura 1A

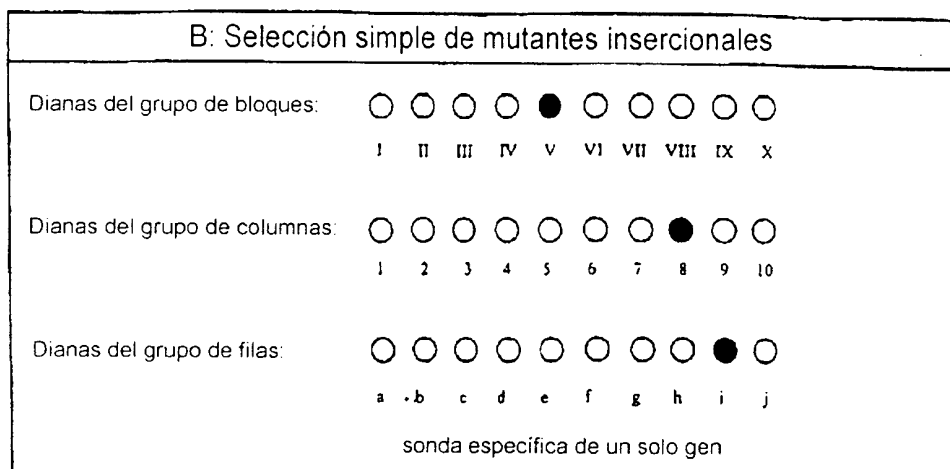


Figura 1B

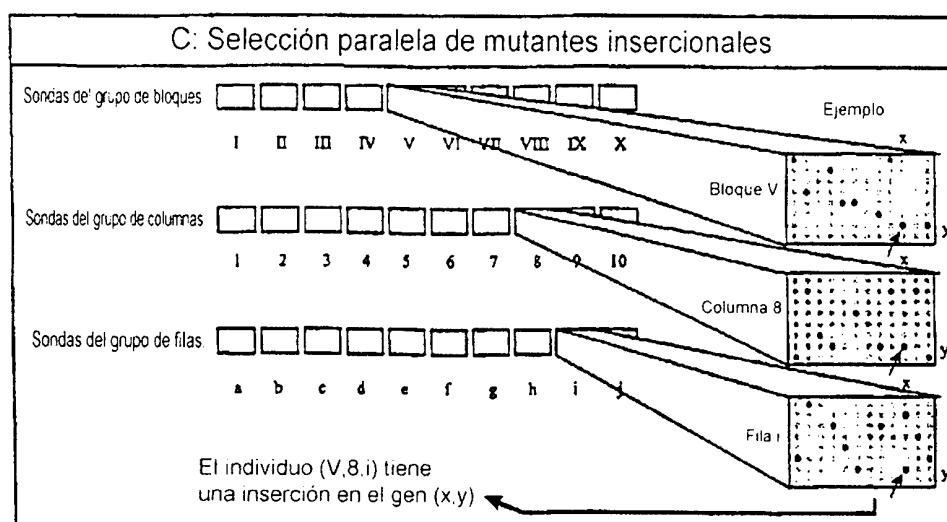


Figura 1C

Figura 1: Selección paralela de mutantes insercionales usando IPCR: Representación esquemática de la técnica

A: Amplificación de las secuencias flanqueantes de *dTph1*: 1000 plantas se organizan en matriz 3D y se preparan 30 grupos de ADN genómico, representando cada uno 100 plantas individuales. Los 30 grupos de ADN genómico se digieren con una enzima tetracutter (*Bfal*). Los fragmentos genómicos se autoligan y las secuencias flanqueantes de la inserción se amplifican por PCR usando dos cebadores internos con especificidad de inserción, IntA e IntB. La especificidad de los productos amplificados puede aumentarse mediante reamplificación anidada de las secuencias flanqueantes usando el cebador de repetición terminal invertida (TIR).

B: Selección simple de mutantes insercionales: Los grupos de secuencias flanqueantes amplificadas se presentan en un filtro y se hibridan con una sonda para cualquier gen diana de interés de manera seriada.

C: Selección paralela de mutantes insercionales: Los 30 grupos de secuencias flanqueantes amplificadas se marcan y se usan para sondar una matriz de genes diana presentados en 30 filtros de réplica (o micromatrices) en una serie de 30 reacciones de hibridación.

AMPLIFICACIÓN y DETECCIÓN de SECUENCIAS FLANQUEANTES DE TRANSPOSÓN  
USANDO PRESENTACIÓN EN TRANSPOSONES (Después de Van den Broeck et al., 1998)

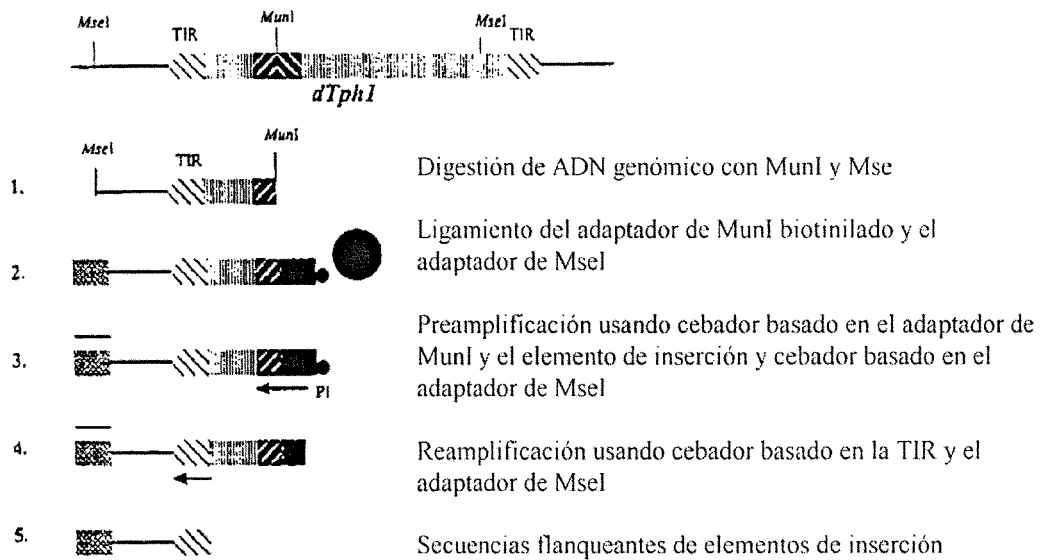
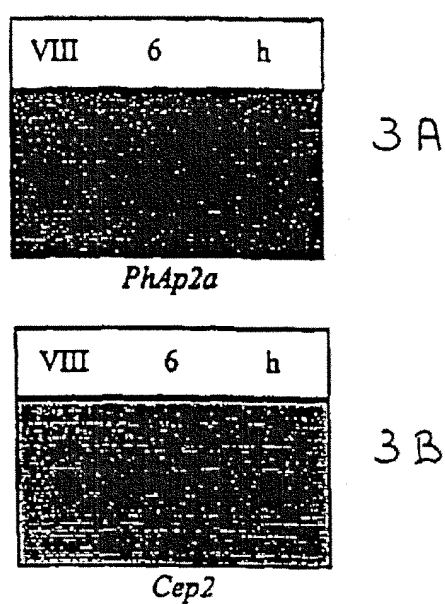
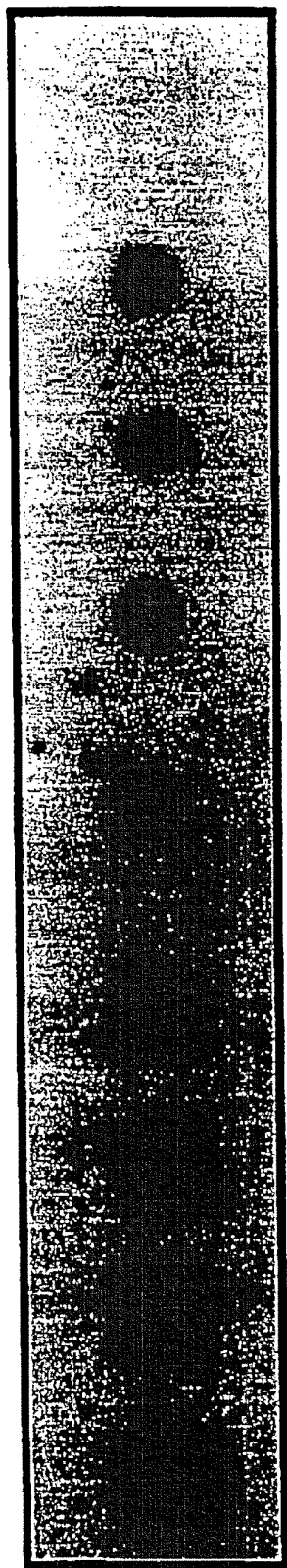


FIGURA 2



**Figura 3: Generación de una biblioteca 3D de secuencias flanqueantes**

Se añadió ADN de un mutante insercional *PhAp2A* como control positivo a todos los grupos 3D, los fragmentos flanqueantes de *dTph1* se amplificaron como se describe. Los grupos VIII, 6, h se sometieron a spot blot y se hibridaron con A: una sonda de *PhAp2A*; B: una sonda de *Cep2*



Dilución:

Mut	A	B	C	D	E	F	G	Wt
-----	---	---	---	---	---	---	---	----

Figura 4a: Selección 3D con fragmento Xbal de Ap2-A de 4 Kb como sonda. Presentación en transposones de los fragmentos de las manchas de transferencia; A-G representa una serie de dilución como se describe en el texto; Wt es el tipo salvaje. La sonda estaba marcada con fluoresceína, tiempo de exposición 5 minutos.

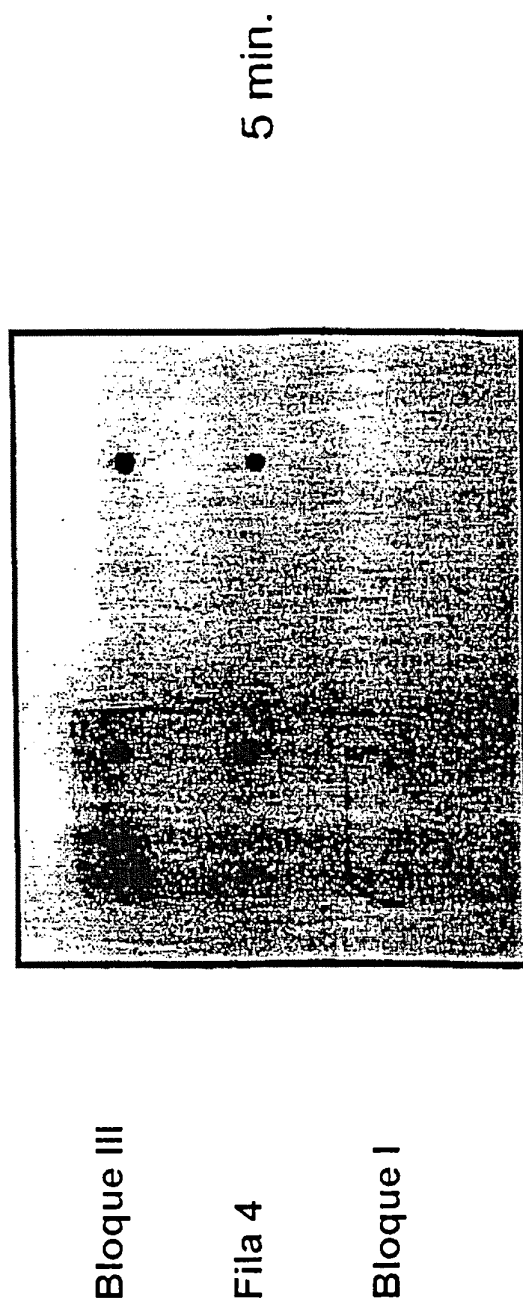


Figura 4b: Selección paralela del mutante insercional Stig 1

Se reunieron y muestrearon 49 plantas (lado izquierdo de la ilustración) o 100 plantas (lado derecho). Se sabía que dos muestras (Bloque III y Fila 4) contenían un mutante insercional para el gen Stig1, mientras que se sabía que una muestra (Bloque I) no contenía este inserto. Se prepararon seis filtros replicados, que llevaban ADN sometido a spot blot procedente del gen Ap2A (lado izquierdo de cada filtro) o procedente del gen Stig 1 (lado derecho).

Las muestras mencionadas no contenían una inserción para el gen Ap2A. Los productos de PCR de cada muestra, obtenidos por presentación en transposones, se marcaron con fluoresceína y se usaron como sonda.