



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 381**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98107881 .9**

86 Fecha de presentación : **29.04.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **0877094**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.1998**

54

Título: **Detección y cuantificación de analitos diana de una o más secuencias de nucleótidos en una muestra usando replicación de analito diana localizada espacialmente.**

30

Prioridad: **29.04.1997 US 841267**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

73

Titular/es: **Robert Aaron Levine**
31 Pilgrim Lane
Guilford, Connecticut 06437, US
Stephen Clark Wardlaw

72

Inventor/es: **Levine, Robert Aaron y**
Wardlaw, Stephen Clark

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 273 381 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

Detección y cuantificación de analitos diana de una o más secuencias de nucleótidos en una muestra usando replicación de analito diana localizada espacialmente.

5

Campo técnico

Esta invención se refiere a un método para detectar la presencia o ausencia de un analito diana en una muestra de sustancia; y para cuantificar el analito cuando se descubre que está presente la muestra. La muestra que se está analizando puede ser una sustancia biológica; una sustancia medioambiental; una sustancia de un producto alimenticio; o alguna otra sustancia que pueda contener el analito diana. El analito diana es una secuencia de nucleótidos específica que se sospecha que está en la sustancia que se está ensayando. La presencia o ausencia del organismo sospechado o la secuencia diana puede determinarse amplificando el analito diana con reactivos de amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Si una secuencia de nucleótidos de ARN es el analito diana y se emplean reactivos de SDA o PCR, será necesario convertir el ARN a ADN por transcripción inversa desde la etapa de amplificación. Como alternativa, los métodos de amplificación de ARN del analito diana, tal como $Q\beta$ replicasa o amplificaciones por ARN-X puede, en ciertos casos, usarse sin transcripción. El análisis puede realizarse en un gel o en un medio semisólido que permita la amplificación del analito diana, pero restrinja la migración del analito diana amplificado de modo que los productos de amplificación formen colonias de analito diana estacionarios detectables en el medio. Las colonias pueden detectarse y contarse por diversas técnicas, incluyendo el uso de cebadores de SDA o PCR detectables; o secuencias de nucleótidos específicas complementarias al analito diana; o el uso de sondas intercalantes detectables tales como bromuro de etidio, naranja de acridina, verde SYBR, y productos relacionados. Dichas sondas están disponibles en Molecular Probes, Inc. de Eugene, Oregon.

Técnica antecedente

Se conoce bien el análisis de muestras para la presencia o ausencia de analitos bacterianos diana, donde la muestra se coloca en un medio de crecimiento estéril. Pueden detectarse diversas bacterias de este modo en agua, productos alimenticios; y en muestras biológicas de muestra, tales como orina, fluido cefalorraquídeo, fluido pleural, fluido ascítico, fluido articular, deposiciones y similares. Este procedimiento de ensayo depende de la capacidad de los analitos diana de replicarse en el medio de crecimiento al grado que puedan observarse colonias visibles de los analitos diana. Los diversos tipos de bacterias pueden marcarse de forma diferencial para ayudar a la diferenciación entre diferentes colonias bacterianas que crecen en el medio. Cuando se emplea este procedimiento analítico, el tiempo necesario para formar colonias detectables pueden ser tan corto como un día, o tal largo como varias semanas.

35

J. L. Burg *et al* describen un procedimiento de detección por fluorescencia a tiempo real de ARN amplificado por la $Q\beta$ replicasa, en el Vol. 230 de *Analytical Biochemistry* (pág. 263-272) 1995, Academic Press, Inc. El procedimiento de detección mencionado anteriormente es no específico y requiere una cantidad considerable de preparación de muestra para funcionar apropiadamente. Además, el procedimiento de Burg *et al* no puede usarse para detectar ADN en una muestra, y no puede detectar más de un ARN diana en cada momento. La cuantificación de cualquier ARN amplificado es una función del retardo en el tiempo entre el comienzo del procedimiento y la presencia de fluorescencia detectable en el recipiente de muestra.

Sería enormemente deseable ser capaces de detectar la presencia o ausencia de uno o más analitos diana de secuencia de nucleótidos más replicables en un único ensayo, y cuantificar los analitos diana en un periodo corto de tiempo. También sería deseable ser capaces de detectar organismos que no puedan replicarse en sistemas acelulares, y detectar genomas de ADN que se cree que están presentes en la mayoría de las formas de vida.

Descripción de la invención

50

El asunto de la invención es un método para determinar la presencia o ausencia de uno o más analitos diana de secuencia de nucleótidos, mencionados a partir de ahora como "analitos diana", en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) proporcionar una muestra a analizar;

(b) proporcionar un medio de ensayo adecuado para la introducción de la muestra, conteniendo dicho medio de ensayo materiales de amplificación específicos para el analito diana que están esencialmente distribuidos homogéneamente en todo dicho medio;

60

(c) liberar cualquiera de dichos analitos diana de los organismos diana que pueden estar contenidos en la muestra;

(d) hacer reaccionar cualquier analito diana liberado con dicho material de amplificación del analito diana en dicho medio para formar colonias amplificadas esencialmente inmóviles de dicho analito diana en dicho medio; y

65

(e) hacer reaccionar cualquier analito diana liberado con un material que está sustancialmente distribuido homogéneamente en todo dicho medio de ensayo y que puede migrar a través de dicho medio de ensayo, siendo funcional dicho material para unirse con unidades de analito diana amplificado en cualquier colonia de analito diana formada en

dicho medio para destacar dichas colonias de analito diana de lo que queda de dicho medio y siendo dicho material un material específico de analito marcado (LASM) para destacar de forma diferencial cualquier colonia de analito diana amplificado o un agente intercalante que pueda intercalarse en dicho analito diana (como se sabe a partir de la Patente de Estados Unidos 5 616 478),

5 caracterizado porque dicho medio define un campo de medio y proporciona una primera área que es una parte de dicho campo de medio como área de control negativo en la que se introduce una muestra que no contiene nucleótidos diana y/o proporciona una segunda área que es una parte de dicho campo de medio como área de control positivo en la que se introduce una muestra de control que contiene una cantidad conocida del analito diana.

10 Esta invención se refiere a un método para detectar la presencia o ausencia de uno o más nucleótidos diana en una muestra. La detección del nucleótido diana se consigue amplificando una parte única de la secuencia de ADN o ARN en un medio viscoso adecuado para formar colonias relativamente estacionarias de la secuencia de nucleótidos amplificada en el medio, y después detectar y contar cualquier colonia de secuencia de nucleótidos resultante que pueda formarse en el medio. El analito diana que se está detectando, es por tanto, la secuencia o secuencias de nucleótidos amplificados de la forma de vida sospechada. La difusión de las colonias de analito diana formadas en el medio se restringe con relación a la difusión de los reactivos marcadores o de sonda.

15 El nucleótido o los nucleótidos diana pueden cuantificarse, si se desea. Las realizaciones preferidas del método de la presente invención se reivindican en las reivindicaciones dependientes.

20 El medio contiene, o está combinado con, los cebadores específicos del analito diana y enzimas adecuadas y reactivos que provocarán la amplificación de la secuencia del nucleótido especificada en el ADN o ARN del analito diana a través del uso de amplificación por desplazamiento de cadena (SDA); o a través del uso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o cualquier otro procedimiento de amplificación tal como amplificación con un cebador único o sin cebador 3SR, y en ciertos casos, amplificación de ARN por $Q\beta$ replicasa. En ciertos casos, pueden usarse otros procedimientos de amplificación como los descritos en PCR Technology: *Principals and Amplifications for DNA Amplification*, Ehrlich, H.A. ed. 1989, Stockton Press, New York, en la realización de esta invención. El resultado es la creación de colonias de poblaciones de alta densidad localizadas de la secuencia de nucleótidos especificada en el medio. Los segmentos de genomas no diana que están contenidos en la muestra y se introducen en el medio, y que no se replican por la etapa de amplificación, no se multiplicarán, ni se detectarán. El análisis se realiza en un medio que también puede contener, o estar combinado con uno o más materiales específicos del analito marcado (LASM). Los LASM incluyen una secuencia de nucleótidos sintética que es complementaria a una parte de la secuencia de nucleótidos específica que forma el analito diana y cuya secuencia de nucleótidos específica se ha amplificado. El marcador puede ser un colorante libre o fluoróforo, o uno que esté unido a la secuencia de nucleótidos sintética complementaria. Los LASM están inicialmente distribuidos de forma homogénea en todo el medio. Los LASM, siguiendo las leyes de difusión en el medio, migrarán a través del medio a las colonias de secuencia de nucleótidos amplificada, y se unirán a estas secuencias de nucleótidos destacando de este modo de forma diferencial las colonias con relación al resto del medio. Se formarán halos marcados con baja intensidad alrededor de cada colonia debido a la migración localizada de LASM hacia las colonias, y en el centro de cada halo habrá un pico de alta intensidad correspondiente a la colonia marcada. Cualquier molécula no amplificada de ADN o ARN presente en el medio no será detectable a causa de su baja concentración, incluso si se tiñen con naranja de acridina, bromuro de etidio u otros colorantes. En ciertos casos, el marcador puede unirse a uno o ambos cebadores oligonucleotídicos usados para la amplificación por PCR o SDA. En estos casos, los cebadores funcionarán como LASM. El uso de un estudio cinético de intensidad de señal puede invalidar señales de fondo no específicas tales como las que pueden estar causadas por los desechos celulares, ya que dichas señales de fondo no específicas no aumentarán significativamente con la amplificación.

25 Cuando se está ensayando una muestra para la presencia o ausencia de un único analito diana, las colonias puede detectarse por colorantes no específicos para ADN o ARN tal como naranja de acridina o bromuro de etidio. La razón de esto es que estos fluoróforos son capaces de intercalarse no específicamente en cualquier secuencia de nucleótidos amplificada, cuando ésta se produce, y se consigue especificidad por la especificidad de los cebadores de amplificación sin la necesidad de unir el fluoróforo a secuencias de nucleótidos complementarias. En casos en los que la muestra se está ensayando para la presencia de más de un analito diana, entonces más de una secuencia de nucleótidos complementaria puede unirse a uno o más fluoróforos diferentes para destacar cualquier colonia de secuencia de nucleótidos amplificada que se forme en el medio y para determinar su tipo. Hasta veintiún analitos diana diferentes podrían detectarse en único ensayo o análisis a través del uso de un LASM que lleva hasta tres fluoróforos detectables de forma diferencial.

30 En la realización del análisis de esta invención, es importante que la secuencia de nucleótidos amplificada del ADN o ARN del analito diana seleccionado sea de un tamaño determinado, es decir, aproximadamente 150 unidades a aproximadamente 500 unidades, de modo que las copias serán incapaces de migrar rápidamente en el medio, y por tanto permanecerán relativamente estacionarias en el medio durante el transcurso del análisis. También es importante que los LASM seleccionados sean de un tamaño determinado, es decir, de aproximadamente 18 unidades a aproximadamente 40 unidades, de modo que sean suficientemente pequeños para que sean capaces de difundir más rápidamente que las secuencias del analito diana amplificadas en el medio, y aún suficientemente largos para tener la especificidad necesaria para las secuencias de nucleótidos amplificadas. De forma ideal, puede usarse un LASM de aproximadamente 18 unidades. Adicionalmente, se dirigen dos o más LASM de tamaño apropiado frente a diferentes secuencias de ácido nucleico en el analito diana amplificado para la especificidad potenciada. El medio debe, por supuesto, ser

ES 2 273 381 T3

también de un tipo tal que los reactivos de amplificación, incluyendo las sondas, puedan difundirse en el medio suficientemente rápido para permitir que suceda la amplificación más rápidamente que puedan difundir los productos de dicha amplificaciones desde la colonia.

5 La muestra se prepara para el análisis lisando primero todos sus componentes celulares y del organismo para liberar en la solución todo el material genético de los componentes celulares y del organismo de la muestra, véase: Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1987) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed. Cold Spring Harbor Press. Después se introduce un volumen conocido de la alícuota rica en nucleótidos de la muestra lisada en el medio y se reparte uniformemente sobre el medio. Si es necesario, la difusión del analito diana en el medio podría aumentarse por electroforesis vertical, y/o reduciendo su tamaño antes del análisis por digestión con enzimas de restricción o rotura mecánica. El material genético, ADN y/o ARN del componente diana de la muestra se dispone de este modo a los materiales de amplificación en el medio. Por tanto, se amplifica una secuencia de nucleótidos diana en el material genético expuesto al grado en que las colonias de copias del analito diana se formarán en el medio. Como el tamaño del analito diana, y por tanto el tamaño de las copias es relativamente grande, las colonias de analito diana amplificado permanecerán relativamente estacionarios en el medio. Los LASM, si no se preincorporan en el medio, se añadirán al medio después de la etapa de amplificación y estarán distribuidos de forma relativamente homogénea sobre el mismo. Los LASM tienen un tamaño adecuado para ser capaces de emigrar en o través del medio. Por lo tanto, los LASM migrarán después a las colonias de analito diana y se unirán a las copias en las colonias de analito diana. Esta unión provocará que las colonias emitan un nivel superior de señal marcadora que las áreas circundantes en el medio, y de hecho, las áreas inmediatamente circundantes que bordean las colonias emitirán una señal marcadora debilitada. El resultado neto será la formación de manchas “brillantes” rodeadas por halos “tenues” en el medio. En el caso de que no haya analito diana presente en la muestra, entonces el medio mantendrá un nivel relativamente uniforme de señal de emisión marcadora, y aparecerán como uniformemente “coloreado”. La detección de la unión de los nucleótidos complementarios que contienen un fluoróforo a sus analitos diana respectivos también puede conseguirse por fluorescencia resuelta en el tiempo como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.485.530, Lokowicz *et al.* Si se desea, la muestra podría aplicarse al medio antes de la lisis celular, de modo que pudiera determinarse la localización de la diana con respecto a los nucleótidos celulares, es decir, para determinar si la diana es intracelular o extracelular. Si se desea, los LASM, así como los otros reactivos necesarios para la amplificación, podrían impregnarse en un soporte sólido tal como membrana de nylon o tira de papel, y dejarse difundir en el medio colocando la membrana en la parte superior del medio.

El ensayo puede completarse en varias horas después de inocular el medio con la muestra produciendo copias de los analitos diana en el medio. Pueden ensayarse virus, bacterias, hongos, microplasma, protozoos o nucleótidos específicos presentes en cualquier tipo de célula o muestra usando la amplificación de secuencia de nucleótidos específica y el método de detección de esta invención, y como se conoce el volumen de la muestra añadida al medio, contando la cantidad de colonias destacadas en el medio, se puede detectar la cantidad de analito diana por unidad de volumen de la muestra, posibilitando de este modo la seguridad de un análisis cuantitativo de la muestra para el analito diana.

Se inoculará una parte del medio con una muestra de control que no contienen nucleótidos diana conocidos, pero está tratada y preparada exactamente como la muestra conocida. Esta parte del medio servirá como control negativo. En el caso de que las colonias marcadas amplificadas se formen en el área de control negativo del medio, puede suponerse una contaminación del medio o los reactivos de amplificación o lisado, o todos, y los resultados del ensayo quedan invalidados. Otra parte del medio también puede segregarse y usarse como control positivo aplicando una muestra que contiene una cantidad conocida del analito o analitos diana en la misma cuando se realiza el ensayo. Si el área de control positivo del medio no logra tener la cantidad apropiada y tipo de colonias, entonces las etapas de amplificación y/o detección del ensayo no están funcionando apropiadamente, y el ensayo queda invalidado.

Por lo tanto, un objeto de esta invención es proporcionar un método que pueda usarse para ensayar una muestra para la presencia o ausencia de un analito diana.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un método de la naturaleza descrita donde la muestra se coloca en un medio que se combina con un material marcado específico para el analito diana que puede migrar en el medio.

Un objeto adicional de esta invención es proporcionar un método de la naturaleza descrita donde el analito diana es una secuencia o secuencias de nucleótidos clave derivadas de ARN o ADN de una forma de vida.

Un objeto adicional de esta invención es proporcionar un método de la naturaleza descrita donde el analito diana se detecta formando colonias amplificadas del mismo, y marcando de forma diferencial cualquier colonia amplificada que se forme en el medio.

Estos y otros objetos y ventajas de la invención llegarán a ser más fácilmente evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención cuando se consideran junto con los dibujos adjuntos, en los que:

65 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista esquemática de una mezcla específica de analito diana marcado y medio de crecimiento de acuerdo con esta invención;

ES 2 273 381 T3

las Figuras 2 y 3 son vistas esquemáticas similares a la Figura 1 pero que muestran la formación de grados variables de áreas marcadas intensamente localizadas en la mezcla debido a la presencia del analito diana en la muestra que se está ensayando; y

- 5 la Figura 4 es un rastro pictográfico de los niveles de intensidad de señal que surgen de la muestra según se escanea está última por un instrumento automático de detección de señales.

Ejemplo detallado para realizar la invención

- 10 Con referencia ahora a la Figura 1, se muestra una vista esquemática de una sección rectangular de un medio, indicado generalmente por el número 2, que está adaptado para realizar el método de esta invención. El campo de medio como se muestra en la Figura 1 está uniformemente sombreado para indicar una emisión de señal marcadora uniformemente distribuida que se detectará por el ojo humano o por un instrumento de exploración antes de que se haya inoculado el medio con la muestra; o después de la introducción e incubación de la muestra, cuando no hay
- 15 analito diana presente en la muestra. El área 3 en el medio 2 es un área que no se expondrá a la muestra que se está ensayando, pero que contiene todos los reactivos usados en el ensayo, y por lo tanto sirve como área de control negativo. El área de la Figura 5 es un área que también contiene todos los reactivos usados en el ensayo. El área 5 no se expondrá a la muestra, pero se expondrá a una solución de control positivo que contiene una concentración conocida del analito diana. Las Figuras 2 y 3 son ilustrativas del cambio resultante en el patrón de emisión en el medio 2 cuando
- 20 el analito diana está presente en la muestra. La Figura 2 muestra el resultado de un nivel relativamente bajo de analito diana en la muestra que producirá una pluralidad de colonias marcadas más elevadamente 4 rodeadas por halos 6 de un marcador de nivel inferior en el medio 2. La Figura 3 muestra el resultado cuando hay un nivel relativamente alto de analito diana en la muestra. Se observará a partir de las Figuras 2 y 3 que pueden contarse las colonias 4, y como el volumen del inóculo de muestra y el tamaño del campo de medio 2 es conocido, puede obtenerse una concentración
- 25 del analito diana por unidad de volumen siguiendo el procedimiento de esta invención. También se observará a partir de las Figuras 2 y 3 que el área de control positivo 5 tendrá la misma cantidad de colonias independientemente de la cantidad de colonias que se formen en el resto del medio 2.

- La Figura 4 es un pictograma de la intensidad de emisión del marcador que se detectará por un instrumento de auto-análisis según se realiza una exploración lineal del medio. El rastro 8 representa el nivel de emisión del medio *per se*; los hundimientos 10 representan los niveles bajos de emisión en los halos 6; y el pico 12 representa el alto nivel de emisión en las colonias 4.

- A continuación se proporcionan ejemplos de analitos diana específicos de un organismo sospechado que pueden detectarse utilizando la técnica de esta invención, y reactivos para su uso en la detección de cada analito diana.

Ejemplo 1

- Un organismo que puede detectarse y cuantificarse usando la técnica de esta invención es el virus VIH-1. Un gen de analito diana para detectar VIH-1 es la polimerasa viral, cuya función es la replicación del genoma viral. (Se observa que el gen de la polimerasa es sólo uno de los varios genes de VIH-1 que podrían detectarse con este método. De hecho, un protocolo que cuantifique simultáneamente las concentraciones de dos genes de VIH-1, por ejemplo, tanto la polimerasa como la proteasa, sería susceptible de muy pocos resultados positivos falsos ya que la proporción polimerasa a proteasa será relativamente constante.) Un cebador directo que puede usarse para amplificar el gen de la
- 45 polimerasa viral usando PCR es:

GCACCTTTAAATTTTCCCATTAGTCC;

y un cebador inverso es:

50

CCTGCGGGATGTGGTATTCC.

- Si se usa un LASM diferente, será complementario a alguna región entre los cebadores y directo o inverso mencionados anteriormente. La secuencia de nucleótidos complementaria puede unirse covalentemente a fluoróforo que proporcionará la señal de emisión necesaria. En este caso el LASM debe carecer de un grupo hidroxilo en la posición 3' del nucleótido en el extremo 3' del oligonucleótido para inhibir la amplificación del producto resultante de la hibridación de un LASM con otro. Sino no se usa un LASM diferente, entonces el fluoróforo se unirá al extremo 5' de uno o ambos cebadores oligonucleotídicos usados para PCR o a uno o más de las uniones entre nucleósidos. Todos los cebadores y LASM deben carecer un grupo hidroxilo en la posición 3' del nucleótido en el extremo 3' del oligonucleótido para inhibir la amplificación del producto resultante de la hibridación de un LASM con otro. El medio adecuado incluye geles de acrilamida que contienen acrilamida del 2,5 al 5,0%, y bisacrilamida entre el 0,025 y el 2,5%; o agarosa al 0,5%; y geles de agarosa convencionales y de bajo punto de fusión que contienen agarosa del 0,75 al 1,5%. Como se ha indicado anteriormente, la técnica de esta invención está optimizada para usar composiciones de medios con porcentajes bajos de gel, por ejemplo de aproximadamente el 4 al 5% para un gel de acrilamida y del 2%
- 65 o menos para agarosa.

Puede prepararse un medio impregnado con los reactivos de PCR apropiados del siguiente modo. Se preparan 100 ml de solución de lavado compuesta por Tris 20 mM, que tiene un pH de aproximadamente 8,0, en EDTA 50 mM; y

ES 2 273 381 T3

10 ml de solución de almacenamiento compuesta por Tris 2 mM, que tiene un pH de aproximadamente 8,0, en EDTA 0,5 mM. El gel se sumerge en 5 ml de la solución de lavado durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Esta etapa se repite 5 veces en solución de lavado reciente. El gel después se sumerge en 5 ml de la solución de almacenamiento que contiene los cebadores de PCR, enzimas y dNTP, y similares.

Para la amplificación por el método de SDA, se usaran cebadores relacionados que contienen los sitios de restricción apropiados. Por ejemplo, un cebador directo que puede usarse para amplificar el gen de la polimerasa viral por SDA es:

TTGAATAGTCGGTTACTTGTGACTCGGCACTTTAAAT;

y un cebador inverso es:

ACCGACTATTGTTGACTGCCTGCGGGATGTGGTATTCC.

Si se usa un LASM diferente, será complementario a alguna región entre los cebadores directo o inverso mencionados anteriormente. El LASM basado en oligonucleótido no debe ser complementario al cebador directo o inverso, pero debe ser complementaria una parte de la molécula diana. Esta acción concentrará específicamente el agente detectable en la colonia molecular, y no en los cebadores que pueden distribuirse libremente en todo el medio. La secuencia de nucleótidos complementaria puede unirse covalentemente a uno o más fluoróforos que proporcionarán la señal o señales de emisión necesarias. Si no se usa un LASM diferente, entonces el fluoróforo se unirá al extremo 3' de uno o ambos cebadores oligonucleotídicos usados para SDA, o a uno o más de las uniones entre nucleósidos.

Puede prepararse un medio impregnado con los reactivos de SDA apropiados del siguiente modo. Se prepara una solución de lavado de 100 ml compuesta por fosfato potásico 50 mM, que tiene un pH de aproximadamente 7,4 y MgCl₂ 6 mM; y una solución de almacenamiento de 10 ml compuesta por la solución de lavado más los cebadores de SDA, un enzima de restricción apropiada, exo-polimerasa Klenow y dNTP. El gel se sumerge en 5 ml de la solución de lavado durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Esta etapa se repite 5 veces en solución de lavado reciente. El gel después se sumerge en 5 ml de la solución de almacenamiento.

Un LASM puede prepararse del siguiente modo. Para un marcador de colorante isotiocianato, las cadenas de las secuencias de nucleótidos complementarias contendrán una o más bases modificadas que llevan una amina primaria unida. La cadena a marcar se disuelve en bicarbonato sódico 0,1 M que tiene un pH de 9,0, y el colorante isotiocianato se disuelve en DMF seca a una concentración de 10 mg/ml. La solución colorante después se añade gota a la solución de la secuencia de nucleótidos complementaria con agitación y la reacción se incuba a temperatura ambiente durante 12 horas. El colorante libre después se retira por filtración en gel y el conjugado de colorante-secuencia de nucleótidos complementaria se purifica por electroforesis en gel o HPLC. Para un marcador de colorante de éster de succinimidilo, la secuencia de nucleótidos complementaria a marcar se disuelve en fosfato sódico 0,1 M que tiene un pH de 8,0, y la reacción de conjugación de la secuencia de nucleótidos complementaria-marcador se realiza a 4°C para minimizar la hidrólisis del marcador de éster de succinimidilo. Pueden prepararse diversos ADN marcados con colorante directamente por síntesis química y se usa ampliamente para la secuenciación del ADN.

El analito diana puede incluirse en el medio de la siguiente manera. Se prepara una suspensión de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ células a partir de un homogeneizado o cultivo tisular, y se lava minuciosamente en medio de cultivo tisular (sin suero de ternera fetal) o solución salina isotónica. Después se centrifuga la mezcla a 2.000 g durante 20 minutos a 4°C, se retira el sobrenadante, y se drena minuciosamente el sedimento que contiene ácido nucleico. Las células se resuspenden en 5 ml de Tris 50 mM (pH 8,0) y EDTA 50 mM y se congelan a -20°C. A la solución congelada se añaden 0,5 ml de solución de lisozima (10 mg/ml de lisozima en Tris 0,25 M (pH 8,0)) y la mezcla se incuba a 4°C durante 45 minutos. Se añade un mililitro de solución STEP (dodecil sulfato sódico al 0,5%, Tris 50 mM (pH 7,5), EDTA 0,4 M, 1 mg/ml de Proteinasa K (añadida inmediatamente antes del uso) y la solución se incuba a 50°C durante una hora. Se añaden seis mililitros de fenol tamponado y la emulsión se centrifuga a 1.000 g durante 15 minutos. La capa superior que contiene ácido nucleico se transfiere a un tubo diferente y se añaden 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. El precipitado, que contiene ADN y ARN se vuelve a disolver en 5 ml de Tris 50 mM (pH 7,5) y EDTA 1 mM. Si sólo se desea el ADN celular, pueden añadirse 200 µg de ARNasa A. El ácido nucleico puede aplicarse directamente al medio, o puede tratarse primero con una enzima de restricción o romperse con una aguja para reducir su tamaño medio.

La reacción de PCR para amplificar el analito diana puede realizarse del siguiente modo. El gel, la muestra, la mezcla de PCR y LASM se calientan a 95°C durante 3 minutos, y después se hacen 30 ciclos de calentamiento a 95°C durante 45 segundos, hibridación a 55°C durante 90 segundos, y extensión a 72°C durante 1 minuto por cada 750 nucleótidos. Por ejemplo, si se está amplificando una diana que tiene 750 nucleótidos de longitud, se podría dejar que la reacción de extensión transcurriera durante 1 minuto; y por otro lado, si la diana fuera de 375 nucleótidos de longitud, se podría dejar que la extensión transcurriera durante 30 segundos. La reacción se finaliza con una extensión de 10 minutos a 72°C. Después se examina el medio para determinar la presencia o ausencia de colonias de analito diana en el medio.

ES 2 273 381 T3

La reacción de SDA para amplificar el analito diana puede realizarse del siguiente modo. El gel, la muestra, la mezcla de SDA y LASM se incuban a 37°C entre treinta minutos y cuatro horas. Después se examina el medio para determinar la presencia o ausencia de colonias de analito diana en el medio.

5 Ejemplo 2

Otro analito diana que puede detectarse y cuantificarse usando la técnica de esta invención es *M. tuberculosis*. El gen diana para detectar *M. tuberculosis* es inhA cuya función es la biosíntesis de ácidos grasos. El cebador directo para la amplificación de inhA por PCR es:

10

ACCCAATCGAATTGCCACACCCCG;

y el cebador inverso es:

15

GGCGCGGAGGCCGGCAAGTACGG.

Estos cebadores amplificarán una región de 279 pares de bases en el gen inhA en *M. tuberculosis*. Si se usa un LASM diferente, será complementario a alguna región entre los cebadores directo o inverso mencionados anteriormente. El LASM basado en oligonucleótido no debe ser complementario a ninguno de los cebadores directo o inverso, pero debe ser complementario a una parte de la molécula diana. Esta acción concentrará específicamente el agente detectable en la colonia molecular, y no en los cebadores que pueden distribuirse libremente en todo el medio. Los procedimientos de preparación del medio y LASM son esencialmente iguales a los expuestos en el Ejemplo 1, ya que es el procedimiento de introducción.

25 Para la amplificación del gen inhA por SDA, un cebador directo es:

AGTCGGTACTTGTTGACACTCGACCCAATCGAATTGCCA;

y el cebador inverso es:

30

ACCGACTATTGTTGACACTGCGCGAGGCCGGCAAGTACGG.

Si se usa un LASM diferente, será complementario a alguna región entre los cebadores directo o inverso mencionados anteriormente. Los procedimientos de preparación del medio y LASM son esencialmente iguales a los expuestos en el Ejemplo 1, ya que es el procedimiento de introducción.

Ejemplo 3

Un organismo adicional que puede detectarse cuantificarse usando la técnica de la esta invención es *M. tuberculosis* resistente a INH. El gen del analito diana para detectar *M. tuberculosis* resistente a INH es inhA mutante cuya función es la biosíntesis de ácidos grasos. El cebador directo para la amplificación del gen inhA mutante por PCR es:

ACCCAATCGAATTGCCACACCCCG;

45 y el cebador inverso es:

GCCGATCGATGAACCCCGGAGGTTCC.

Estos cebadores amplificaron una región de 159 pares de bases del gen inhA mutante en *M. tuberculosis* resistente a INH. Si se usa un LASM diferente, será complementario a alguna región entre los cebadores directo o inverso mencionados anteriormente. El LASM basado en oligonucleótido no debe ser complementario a ninguno de los cebadores directo o inverso, pero debe ser complementario a una parte de la molécula diana. Esta acción concentrará específicamente el agente detectable en la colonia molecular, y no en los cebadores que pueden distribuirse libremente en todo el medio. Los procedimientos de preparación del medio y LASM son esencialmente iguales a los expuestos en el Ejemplo 1, ya que es el procedimiento de introducción.

Para la amplificación del gen inhA mutante por SDA, un cebador directo es:

AGTCGGTACTTGTTGACACACCCAATCGAATTGCCACAC;

60

y el cebador inverso es:

ACCGACTATTGTTGACACTGCGATGAACCCCGGAGGTTCC.

65 Si se usa una LASM diferente, será complementario a alguna región entre los cebadores directo o inverso mencionados anteriormente. Los procedimientos de preparación del medio y LASM son esencialmente iguales a los expuestos en el Ejemplo 1, ya que es el procedimiento de introducción.

ES 2 273 381 T3

Ejemplo 4

Un organismo adicional que puede detectarse y cuantificarse usando la técnica de esta invención es HBV. El gen diana para detectar HBV es el gen pX cuya función es la transcripción. El cebador directo para la amplificación del gen pX por PCR es:

GGTGAAGCGAAGTGCACACGGACCGGC;

y el cebador inverso es:

GCTGGGGGAGGAGATTAGTTAAAGG.

Estos cebadores amplificarán una región de 196 pares de bases del gen pX en HBV. Si se usa un LASM diferente, será complementario a alguna región entre los cebadores directo e inverso mencionados anteriormente. El LASM basado en oligonucleótido no debe ser complementario a ninguno de los cebadores directo o inverso, pero debe ser complementario a una parte de la molécula diana. Esta acción concentrará específicamente el agente detectable en la colonia molecular, y no en los cebadores que pueden distribuirse libremente en todo el medio. Los procedimientos de preparación del medio y LASM son esencialmente iguales a los expuestos en el Ejemplo 1, ya que es el procedimiento de introducción.

Para la amplificación del gen pX de HBV por SDA, un cebador directo es:

AGTCGGTTACTTGTGACACGGTGAAGCGAAGTGCACACG;

y un cebador inverso es:

ACCGACTATTGTTGACACTGGCTGGGGGAGGAGATTAG.

Si se usa una LASM diferente, será complementario a alguna región entre los cebadores directo o inverso mencionados anteriormente. Los procedimientos de preparación del medio y LASM son esencialmente iguales a los expuestos en el Ejemplo 1, ya que es el procedimiento de introducción.

Ejemplo 5

Otro organismo que puede detectarse cuantificarse usando la técnica de esta invención es *Pneumocystis carinii*. El gen del analito diana para detectar *Pneumocystis carinii* es el ARNr mitocondrial cuya función es la síntesis de proteínas. El cebador directo para la amplificación del gen del ARNr mitocondrial de *Pneumocystis carinii* es:

GATGGCTGTTTCCAAGCCCA;

y el cebador inverso es:

GTGTACGTTGCAAAGTACTC.

Estos cebadores amplificaron una región de 344 pares de bases del gen del ARNr mitocondrial en *Pneumocystis carinii*. Si se usa un LASM diferente, será complementario a alguna región entre los cebadores directo o inverso mencionados anteriormente. El LASM basado en oligonucleótido no debe ser complementario a ninguno de los cebadores directo o inverso, pero debe ser complementario a una parte de la molécula diana. Esta acción concentrará específicamente el agente detectable en la colonia molecular, y no en los cebadores que pueden distribuirse libremente en todo el medio. Los procedimientos de preparación del medio y LASM son esencialmente iguales a los expuestos en el Ejemplo 1, ya que es el procedimiento de introducción.

Para la amplificación del gen del ARNr mitocondrial de *Pneumocystis carinii* por SDA, un cebador directo es:

AGTCGGTTACTTGTGACACGATGGCTGTTTCCAAGCCCA;

y el cebador inverso es:

ACGTGTACGTTGCAAAGTACGTGTACGTTGCAAAGTACTC.

Si se usa un LASM diferente, será complementario a alguna región entre los cebadores directo o inverso mencionados anteriormente. Los procedimientos de preparación del medio y LASM son esencialmente iguales a los expuestos en el Ejemplo 1, ya que es el procedimiento de introducción.

ES 2 273 381 T3

Ejemplo 6

Un organismo adicional que puede detectarse y cuantificarse usando la técnica de esta invención es *S. aureus* resistente a meticilina. El gen diana para detectar *S. aureus* resistente a meticilina es *mecA* que es una proteína de unión a penicilina. El cebador directo para amplificar el gen *mecA* por PCR es:

AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC;

y el cebador inverso es:

AGTTCTGCAGTACCGGATTTC.

Estos cebadores amplificarán una región de 533 pares de bases del gen *mecA*. Si se usa un LASM diferente, será complementario a alguna región entre los cebadores directo o inverso mencionados anteriormente. El LASM basado en oligonucleótido no debe ser complementario a ninguno de los cebadores directo o inverso, pero debe ser complementario a una parte de la molécula diana. Esta acción concentra específicamente el agente detectable en la colonia molecular, y no en los cebadores que pueden distribuirse libremente en todo el medio. Los procedimientos de preparación del medio y LASM son esencialmente iguales a los expuestos en el Ejemplo 1, ya que es el procedimiento de introducción.

Para amplificación del gen *mecA* por SDA, un cebador directo es:

AGTCGGTACTTGTGGACACAAAATCGATGGTAAAGGTTG;

y el cebador inverso es:

GCTGGGGGAGGAGATTAGACAGTTCTGCAGTACCGGATT.

Si se usa un LASM diferente, será complementario a alguna región entre los cebadores directo o inverso mencionados anteriormente. Los procedimientos de preparación del medio y LASM son esencialmente iguales a los expuestos en el Ejemplo 1, ya que es el procedimiento de introducción.

Se apreciará que si se usa un LASM diferente, puede ser complementario a cualquier región entre los cebadores directo e inverso. Las muestras que pueden analizarse por medio de esta invención incluyen tejido, sangre, fluidos biológicos tales como esputo para análisis diana respiratorios, deposiciones para análisis diana intestinales. Puede detectarse esencialmente la presencia o ausencia, y la cuantificación de cualquier forma de vida, incluyendo, aunque sin limitación, protozoos, bacterias, virus, hongos, y similares, en esencialmente cualquier muestra usando la tecnología de esta invención. Asimismo, pueden detectarse y cuantificarse diversas formas de vida, tales como virus y bacterias, por nombrar dos, en un único ensayo que se realiza en una muestra común siguiendo los preceptos de esta invención. Por tanto, pueden determinarse diferentes causas de enfermedad respiratoria, diarrea, enfermedad genital y muchas otras enfermedades en único ensayo usando el procedimiento de esta invención.

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para determinar la presencia o ausencia de uno o más analitos diana de secuencia de nucleótidos, mencionados a partir de ahora como “analitos diana”, en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) proporcionar una muestra a analizar;

10 (b) proporcionar un medio de ensayo adecuado para la introducción de la muestra, conteniendo dicho medio de ensayo materiales de amplificación específicos para el analito diana que están esencialmente distribuidos homogéneamente en todo dicho medio;

(c) liberar cualquiera de dichos analitos diana de los organismos diana que pueden estar contenidos en la muestra;

15 (d) hacer reaccionar cualquier analito diana liberado con dicho material de amplificación del analito diana en dicho medio para formar colonias amplificadas esencialmente inmóviles de dicho analito diana en dicho medio; y

20 (e) hacer reaccionar cualquier analito diana liberado con un material que está sustancialmente distribuido homogéneamente en todo dicho medio de ensayo y que puede migrar a través de dicho medio de ensayo, siendo funcional dicho material para unirse con unidades de analito diana amplificado en cualquier colonia de analito diana formada en dicho medio para destacar dichas colonias de analito diana de lo que queda de dicho medio y siendo dicho material un material específico de analito marcado (LASM) para destacar de forma diferencial cualquier colonia de analito diana amplificado o un agente intercalante que pueda intercalarse en dicho analito diana;

25 **caracterizado** porque dicho medio define un campo de medio y proporciona una primera área que es una parte de dicho campo de medio como área de control negativo en la que se introduce una muestra que no contiene nucleótidos diana y/o proporciona una segunda área que es una parte de dicho campo de medio como área de control positivo en la que se introduce una muestra de control que contiene una cantidad conocida del analito diana.

30 2. El método de la reivindicación 1, que comprende la etapa de determinar el porcentaje de colonias amplificadas de secuencias de ácido nucleico en la muestra y/o el porcentaje de organismos o células lisados *in situ* en la muestra que contiene dicho analito diana.

35 3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho material es suficientemente móvil en dicho medio para ser capaz de formar áreas de colonias de analito diana marcadas con alta intensidad en dicho medio, estando rodeadas dichas áreas por zonas marcadas con una intensidad inferior en dicho medio.

40 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho LASM es una secuencia de nucleótidos específica de un analito diana artificial que es complementario a dicho analito diana.

45 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos reactivos de amplificación son reactivos de reacción en cadena de la polimerasa.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos reactivos de amplificación son reactivos de amplificación por desplazamiento de cadena.

50 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que hay más de un LASM, y dichos LASM son funcionales para destacar de forma diferencial cualquier colonia de analito diana amplificado que pueda formarse en dicho medio por lo que será distinguible cualquier colonia de uno de los analitos diana de cualquier colonia de otro analito diana que se forme en el medio.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha muestra tiene un volumen fijado y en el que la cantidad de colonias de analito diana amplificado destacadas se cuenta para obtener un analito diana por unidad de volumen de concentración de muestra.

55 9. El método de la reivindicación 8 que comprende la etapa de determinar el porcentaje de colonias amplificadas de secuencias de ácido nucleico en la muestra y/o el porcentaje de organismos o células lisados *in situ* que contienen dicho analito diana en la muestra.

60

65

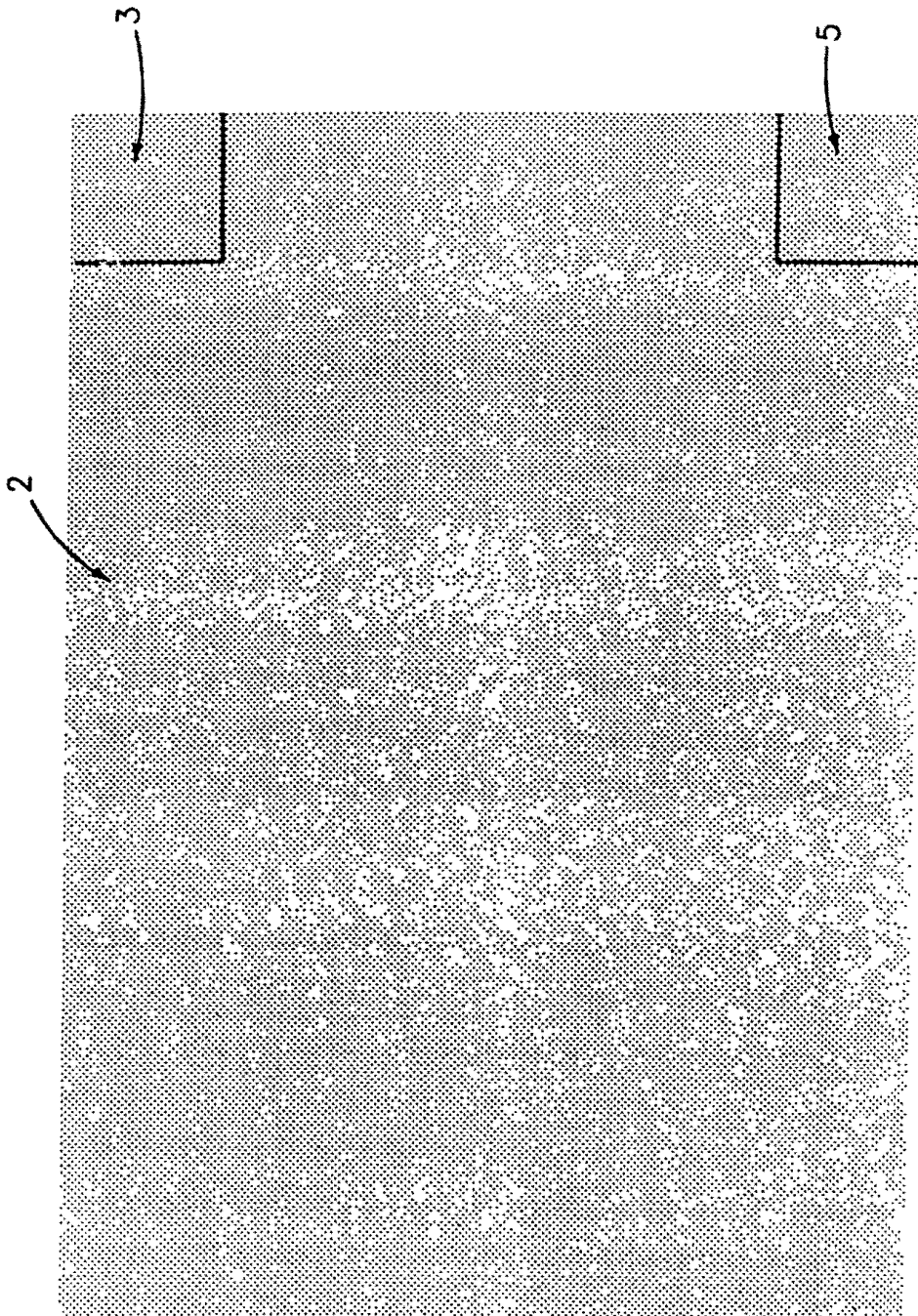


FIG. 1

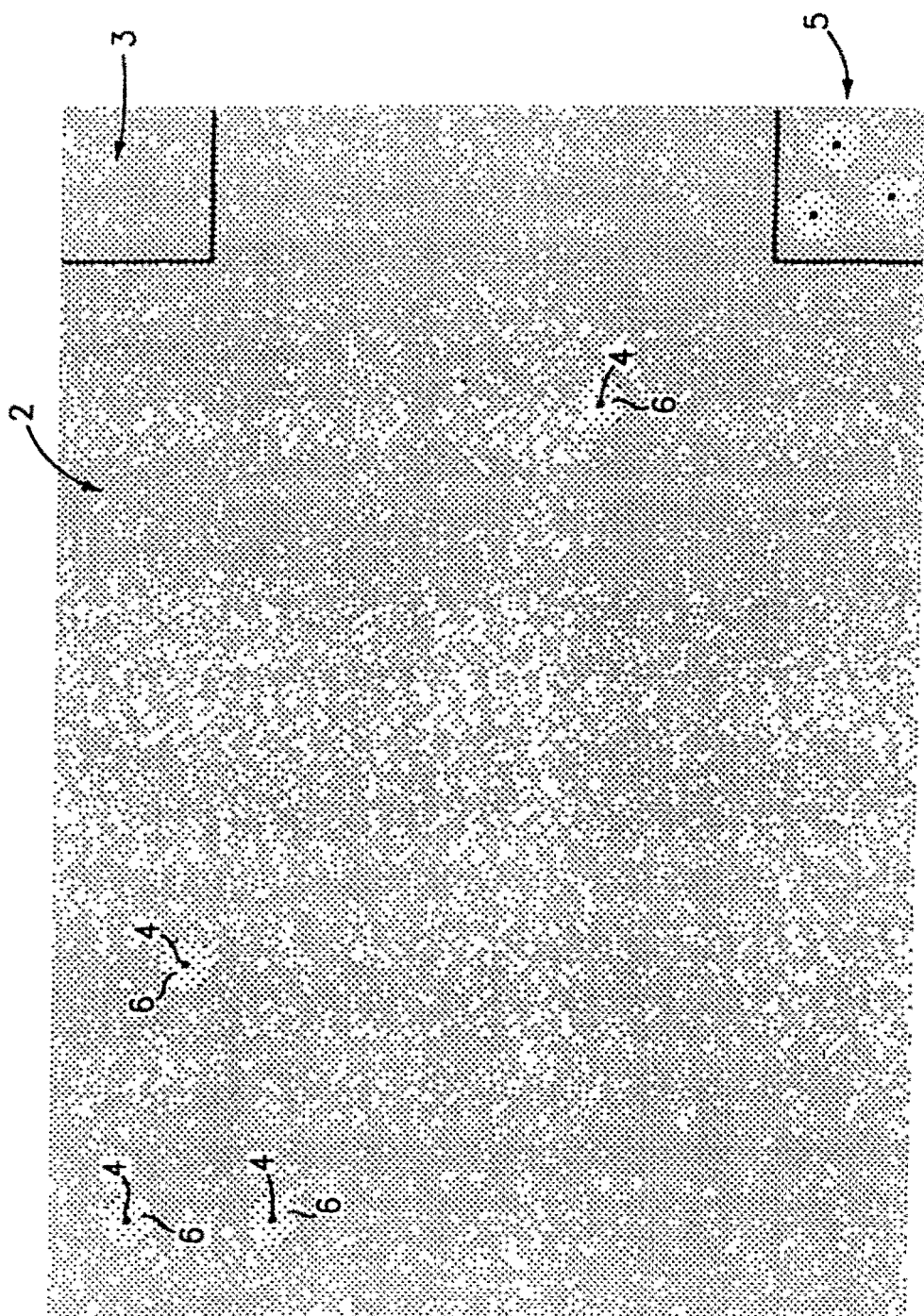


FIG. 2

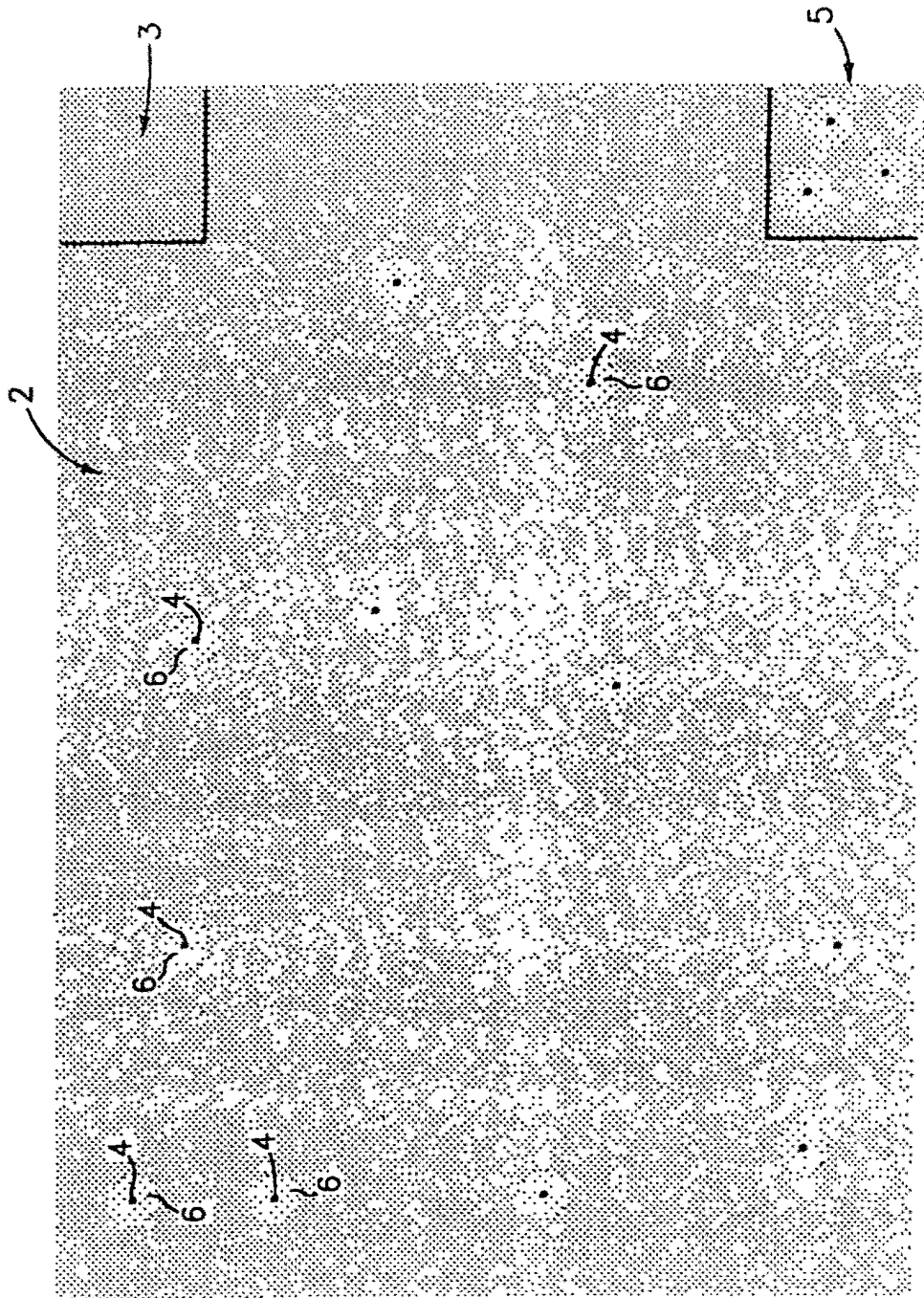


FIG. 3

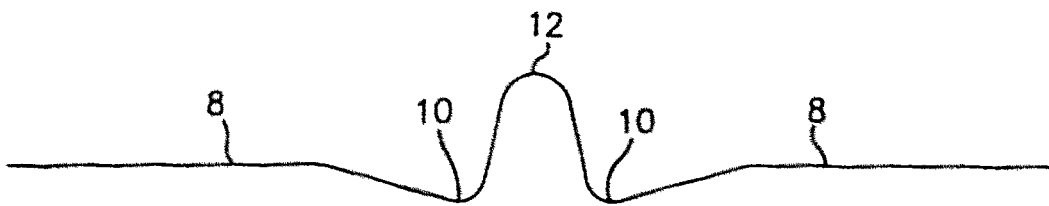


FIG. 4

ES 2 273 381 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) Levine, Robert A.;
 - (B) Wardlaw, Stephen C.;
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Detección y Cuantificación de Analitos Diana de una o más Secuencias de Nucleótidos en una Muestra Usando Replicación de Analito Diana Localizada Espacialmente
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 24
- 15 (iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: William W. Jones
 - (B) CALLE: 6 Juniper Lane
 - (C) CIUDAD: Madison
 - 20 (D) ESTADO: CT
 - (E) PAÍS: EEUU
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 06433
- 25 (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: disquete
 - (B) ORDENADOR: Macintosh Performa 637CD
 - 30 (C) SISTEMA OPERATIVO: Macintosh 7.5
 - (D) SOFTWARE: ClarisWorks 2.1
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- 35 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/841.267
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 29 de abril de 1997
 - (C) CLASIFICACIÓN: Clase 435
- 40 (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR: N/A
- (viii) INFORMACIÓN DEL MANDATARIO/AGENTE:
- 45 (A) NOMBRE: William W. Jones.
 - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 24.607
 - (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: UFB-001
- (ix) INFORMACIÓN TELECOMUNICACIÓN:
- 50 (A) TELÉFONO: (203) 245-2418
 - (B) FAX: (203) 245-9294

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 1:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 25 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: sencilla
 - 60 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico
- (iii) HIPOTÉTICA: no
- 65 (iv) ANTISENTIDO: no
- (vi) FUENTE ORIGINAL:

ES 2 273 381 T3

- (A) ORGANISMO: viral
- (B) CEPA: VIH-1
- (C) AISLADO INDIVIDUAL: gen de la polimerasa

5

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

- (A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador directo

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

10

GCACTTTAAATTTTCCCATT AGT CC

(3) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 2;

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA:

25

(A) DESCRIPCIÓN: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

30

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: viral

(B) CEPA: VIH-1

35

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen de la polimerasa

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

- (A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador inverso

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

CCTGCGGGAT GTGGTATTCC

(4) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 3;

45

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

50

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

55

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

60

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: viral

(B) CEPA: VIH-1

65

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen de la polimerasa

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

ES 2 273 381 T3

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador directo

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

5 TTGAATAGTC GGTACTTGT TGACACTCGG CACTTAAAT

(5) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 4;

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

20 (iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

25 (A) ORGANISMO: viral

(B) CEPA: VIH-1

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen de la polimerasa

30 (viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador inverso

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

35 ACCGACTATT GTTGACTG CCTGCGGGAT GTGGTATTCC

(6) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 5;

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

50 (iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

55 (A) ORGANISMO: bacteriano

(B) CEPA: bacilo M. tuberculosis

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen inhA

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

60 (A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador directo

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

65 ACCCAATCGA ATTGCCACAC CCC G

ES 2 273 381 T3

(7) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 6;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: bacteriano
- (B) CEPA: bacilo M. tuberculosis
- (C) AISLADO INDIVIDUAL: gen inhA

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

- (A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador inverso

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

GGCGCGCGAG GCCGGCAAGT ACG G

(8) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 7;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: bacteriano
- (B) CEPA: bacilo M. tuberculosis
- (C) AISLADO INDIVIDUAL: gen inhA

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

- (A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador directo

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

AGTCGGTTAC TTGTTGACAC TCGACCCAAT CGAATTGCCA

(9) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 8;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla

ES 2 273 381 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

5 (iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

10 (A) ORGANISMO: bacteriano

(B) CEPA: bacilo M. tuberculosis

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen inhA

15 (viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador inverso

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

20 ACCGACTATT GTTGACTG CGCGAGGCCG GCAAGTACGG

(10) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 9;

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

35 (iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

40 (A) ORGANISMO: bacteriano

(B) CEPA: bacilo M. tuberculosis resistente a INH

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen inhA

45 (viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador directo

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

50 ACCCAATCGA ATTGCCACAC CCC G

(11) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 10;

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

60 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

65 (iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

ES 2 273 381 T3

- (A) ORGANISMO: bacteriano
- (B) CEPa: bacilo M. tuberculosis resistente a INH
- (C) AISLADO INDIVIDUAL: gen inhA mutante

5

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

- (A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador inverso

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

GCCGATCGAT GAACCCCGGA GGT TCC

(12) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 11;

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

25

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

30

(A) ORGANISMO: bacteriano

(B) CEPa: bacilo M. tuberculosis resistente a INH

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen inhA mutante

35

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

- (A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador directo

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

40

AGTCGGTTAC TTGTTGACAC ACCCAATCGA ATTGCCACAC

(13) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 12;

45

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

50

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

55

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

60

(A) ORGANISMO: bacteriano

(B) CEPa: bacilo M. tuberculosis resistente a INH

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen inhA mutante

65

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

- (A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador inverso

ES 2 273 381 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

ACCGACTATT GTTGACACTG CGATGAACCC CGGAGGTTCC

5

(14) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 13;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

20

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: viral

(B) CEPA: HBV

25

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen pX

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador directo

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

GGTGAAGCGA AGTGCACACG GAC CGG C

35

(15) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 14;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

50

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: viral

(B) CEPA: HBV

55

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen pX

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador inverso

60

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

GCTGGGGGAG GAGATTAGGT TAA AGG

65

(16) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 15;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 273 381 T3

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: viral

(B) CEPA: HBV

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen pX

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador directo

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

AGTCGGTTAC TTGTTGACAC GGTGAAGCGA AGTGCACACG

(17) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 16;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 38 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: viral

(B) CEPA: HBV

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen pX

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador inverso

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

ACCGACTATT GTTGACACTG GCTGGGGGAG GAG ATT AG

(18) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 17;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: protozoo

(B) CEPA: *Pneumocystis carinii*

(C) AISLADO INDIVIDUAL: ARNr mitocondrial

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador directo

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

GATGGCTGTT TCCAAGCCCA

(19) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 18;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: protozoo

(B) CEPA: *Pneumocystis carinii*

(C) AISLADO INDIVIDUAL: ARNr mitocondrial

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador inverso

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

GTGTACGTTG CAAAGTACTC

(20) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 19;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: protozoo

(B) CEPA: *Pneumocystis carinii*

ES 2 273 381 T3

(C) AISLADO INDIVIDUAL: ARNr mitocondrial

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador directo

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

AGTCGGTTAC TTGTTGACAC GATGGCTGTT TCCAAGCCCA

(21) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 20;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: protozoo

(B) CEPA: *Pneumocystis carinii*

(C) AISLADO INDIVIDUAL: ARNr mitocondrial

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador inverso

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

ACGTGTACGT TGCAAAGTAC GTGTACGTTG CAAAGTACTC

(22) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 21;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: bacteriano

(B) CEPA: *S. aureus* resistente a meticilina

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen *mecA*

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador directo

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

AAAATCGATG GTAAAGGTTG GC

ES 2 273 381 T3

(23) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 22;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: bacteriano

(B) CEPA: *S. aureus* resistente a meticilina

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen mecA

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador inverso

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

AGTTCTGCAG TACCGGATTT GC

(24) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 23;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

(iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: bacteriano

(B) CEPA: *S. aureus* resistente a meticilina

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen mecA

(viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador directo

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

AGTCGGTTAC TTGTTGACAC AAAATCGATG GTAAAGGTTG

(25) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 24;

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

ES 2 273 381 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico

5 (iii) HIPOTÉTICA: no

(iv) ANTISENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

10 (A) ORGANISMO: bacteriano

(B) CEPA: *S. aureus* resistente a meticilina

(C) AISLADO INDIVIDUAL: gen *mecA*

15 (viii) POSICIÓN EN EL GENOMA:

(A) SEGMENTO CROMOSÓMICO: cebador inverso

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:

20 GCTGGGGGAG GAGATTAGAC AGTTCTGCAG TACCGGATTT

25

30

35

40

45

50

55

60

65