



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 298 139**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00921163 .2**

86 Fecha de presentación : **10.04.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1175512**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **30.01.2002**

54 Título: **Método para el análisis de mezclas de reacción de AFLP utilizando técnicas de extensión del iniciador.**

30 Prioridad: **09.04.1999 EP 99201112**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

73 Titular/es: **KEYGENE N.V.**
P.O. Box 216
6700 AE Wageningen, NL

72 Inventor/es:
Van Eijk, Michiel, Josephus, Theresia y
Witsenboer, Hanneke

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 298 139 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para el análisis de mezclas de reacción de AFLP utilizando técnicas de extensión del iniciador.

5 La presente invención se relaciona con un método para analizar secuencias de ácido nucleico y con una disposición para utilizarla en tal método.

10 En particular, la invención se relaciona con disposiciones y métodos para determinar si una secuencia específica de ácido nucleico está presente o ausente en una secuencia de ácido nucleico o en una mezcla de secuencias de ácido nucleico.

15 Más particularmente, la invención se relaciona con un método y con una disposición para determinar la presencia o la ausencia, en ADN genómico o en una muestra de fragmentos de restricción derivados de ADN genómico, de secuencias que corresponden a fragmentos de restricción únicos que pueden servir como marcadores genéticos, tal como los marcadores de AFLP.

20 El método y las disposiciones de la invención son particularmente adecuados para el análisis de mezclas amplificadas de fragmentos de restricción, tal como las mezclas de reacción que resultan del AFLP.

25 Se conocen una cantidad de métodos para analizar secuencias de ácido nucleico. En general, estos métodos comprenden la inmovilización de las secuencias que van a ser analizadas, por ejemplo por medio de formación de manchas; hibridación de las secuencias con una sonda marcada de ADN o de ARN; lavados severos para remover el material no hibridado; seguido por la detección de aquellas secuencias que se han hibridado con la sonda.

30 Tales técnicas son algunas veces llevadas a cabo después de una amplificación previa -tal como por medio de PCR- de las secuencias de ácido nucleico de partida, usualmente una mezcla de fragmentos de restricción de un ADN genómico. La mezcla resultante de fragmentos amplificados es luego separada, por ejemplo con base en las diferencias en longitud o de peso molecular, tal como por ejemplo por medio de electroforesis en gel, y luego se visualiza, esto es, por medio de formación de manchas seguida por hibridación. El patrón de bandas resultante se denomina la huella digital o identificación genética del ADN.

35 Usualmente en la identificación genética del ADN, se comparan las huellas digitales de especies relacionadas, subespecies, variedades, variedades cultivadas, razas o individuos. Tales huellas digitales relacionadas pueden ser idénticas o muy similares, esto es, contienen un gran número de bandas correspondientes - y por lo tanto menos informativas.

40 Las diferencias entre dos huellas digitales relacionadas se denominan como "polimorfismos de ADN". Estos son fragmentos de ADN (esto es, de bandas) que son únicas en o para una huella digital específica. La presencia o la ausencia de tales bandas polimórficas, o el patrón de las mismas, puede ser utilizado como un marcador genético, esto es, para identificar una especie específica, subespecie, variedad, variedad cultivada, raza o individuo, para establecer la presencia o la ausencia de un rasgo heredable específico, de un gen, o para determinar el estado de una enfermedad.

45 Para una discusión adicional y definiciones de las huellas digitales del ADN, clasificación del ADN, polimorfismos de ADN, obtención del genotipo, PCR y técnicas similares, se hace referencia a la discusión del estado del arte en EP-0 534 858 A1.

50 En el estado del arte también se describen disposiciones de oligonucleótidos para el análisis de secuencias de ácido nucleico o mezclas de los mismos, véase por ejemplo WO 97/27317, WO 97/22720, WO 97/43450, EP 0 799 897, EP 0 785 280, WO 97/31256, WO 97/27317 y WO 98/08083. WO9325563 describe un método de extensión del iniciador específico del alelo. WO9631622 describe un método para detectar mutaciones, por medio del cual se incuban secuencias objetivo con una sonda de oligonucleótido sobre un soporte sólido para formar un dúplex. WO9905321 divulga el uso de sustratos sólidos para llevar a cabo una amplificación o reacciones enzimáticas sobre los mismos.

55 WO 90/09455, WO 91/02087, WO 91/13075, WO 92/15712 y EP 0 123 513 describen todas técnicas para detectar mutaciones puntuales en un sitio predeterminado de una secuencia de ADN (usualmente ADN o ADNc genómico de longitud completa), que generalmente se denominan como "minisequenciación". Ver también Syvänen, 1999 (Human Mutation 13:1-10).

60 La minisequenciación se basa en la extensión de un iniciador que hibrida con parte de la secuencia de ADN de tal manera que el extremo 3' del iniciador esté inmediatamente adyacente a la mutación puntual. El híbrido así obtenido se pone en contacto -usualmente en una etapa única de reacción en "un solo tubo"- con una mezcla que contiene al menos un nucleótido detectable, bajo condiciones en las cuales la extensión del iniciador con el nucleótido detectable tiene lugar cuando el nucleótido detectable es complementario con el nucleótido presente en el sitio de la mutación puntual, pero no se presenta extensión cuando el nucleótido detectable no corresponde al nucleótido presente en la mutación puntual, de tal manera que ya sea que tenga lugar o no la extensión del iniciador, provea información sobre el nucleótido presente en el sitio de la mutación puntual. (Alternativamente, se pueden utilizar

ES 2 298 139 T3

simultáneamente nucleótidos marcados en posiciones diferentes a 2-4, siendo indicativa la extensión con un nucleótido específico marcado de la presencia de un nucleótido complementario en el sitio de la mutación).

Además de ser proveída con una funcionalidad detectable, el(los) nucleótido(s) detectable(s) y las mezclas/condiciones de reacción utilizadas en la minisequenciación se escogen también de tal manera que, después de que se ha añadido el nucleótido marcado al iniciador, no tiene lugar una extensión adicional del iniciador (“mezclas terminadoras”). Por ejemplo, se pueden utilizar trifosfatos de didesoxiribonucleósidos terminadores de cadena (ddNTPs) o tionucleótidos.

El método descrito difiere de la minisequenciación al menos en los siguientes aspectos no limitantes:

- a) La minisequenciación se utiliza para detectar/determinar mutaciones puntuales en un sitio específico conocido en el genoma, y no se la utiliza para determinar la presencia o la ausencia de fragmentos polimórficos en una mezcla de fragmentos de restricción (amplificados);
- b) Parcialmente como consecuencia de a), en una minisequenciación, se utiliza como el material de partida ADNc o ADN genómico total (amplificado), no una mezcla de fragmentos de restricción (amplificados);
- c) En una minisequenciación, usualmente únicamente uno o a lo sumo un pequeño número de mutaciones son investigadas simultáneamente; en la invención, usualmente se analizará una mezcla de fragmentos de restricción (amplificados) por la presencia de al menos 100 a más de 1000 marcadores simultáneamente;
- d) En una minisequenciación, generalmente es difícil generar un ADN molde en forma de múltiplex;
- e) Parcialmente como consecuencia de c) y de d), en una minisequenciación, no se utilizarán disposiciones que contengan un gran número de iniciadores diferentes.

La amplificación selectiva de un fragmento de restricción o AFLP, una técnica de huellas digitales de ADN que no requiere del conocimiento previo de la secuencia que va a ser analizada, es descrita en la solicitud de patente europea No. 0 534 858 por el solicitante y por Vos y colaboradores, 1995 (Nucleic Acid Research Vol. 23, No. 21: 4407-4414). Esta técnica generalmente comprende las etapas de:

- a) digerir ácido nucleico, en particular un ADN, con una o más endonucleasas de restricción específicas, para fragmentar dicho ADN en una serie correspondiente de fragmentos de restricción;
- b) ligar los fragmentos de restricción así obtenidos al menos con un adaptador oligonucleótido sintético bica-tenario, uno de cuyos extremos es compatible con uno o ambos extremos de los fragmentos de restricción, para producir así los fragmentos de restricción marcados del ADN de partida;
- c) poner en contacto a dichos fragmentos de restricción marcados bajo condiciones de hibridación al menos con un iniciador oligonucleótido,
- d) amplificar dicho fragmento de restricción marcado hibridado con dichos iniciadores por medio de PCR o una técnica similar a fin de provocar un alargamiento adicional de los iniciadores hibridados a lo largo de los fragmentos de restricción del ADN de partida al cual se hibridaron dichos iniciadores; e
- e) identificar o recuperar el fragmento de ADN amplificado o alargado así obtenido.

Los fragmentos de ADN así amplificados pueden ser entonces analizados y/o visualizados, por ejemplo por medio de electroforesis en gel, para proveer una huella digital genética que muestre las bandas correspondientes a aquellos fragmentos de restricción que se han enlazado al adaptador, reconocidos por el iniciador, y por lo tanto amplificados durante la etapa de amplificación; las bandas resultantes que proveen información sobre el patrón específico del sitio de restricción del ADN de partida.

Por medio de la comparación de las huellas digitales del AFLP de individuos relacionados, se pueden identificar bandas que son únicas para cada huella digital. Estos polimorfismos se denominan como “marcadores del AFLP” y se pueden utilizar nuevamente para identificar a un individuo específico, variedad cultivada, raza, variedad, subespecie o especie, y/o para establecer la presencia o la ausencia de un rasgo heredado específico, gen o estado enfermizo.

Para una descripción adicional del AFLP, sus ventajas, sus modalidades, así como las técnicas, enzimas, adaptadores, iniciadores y compuestos adicionales y herramientas utilizadas en este, se hace referencia a la EP-A-0 534 858 y a las solicitudes europeas que también están pendientes de trámite EP 0 976 835 y EP 0 974 672, todas por el mismo solicitante. También, en la descripción que viene a continuación, se utilizarán las definiciones dadas en el párrafo 5.1 de EP-0 534 858, a menos que se indique otra cosa.

Aunque la técnica del AFLP generalmente consume menos tiempo que las técnicas con base en hibridación, aún sufre de la desventaja de que los fragmentos amplificados tienen que ser separados (esto es, por medio de electroforesis en gel) y visualizados (esto es, por medio de la generación de una huella digital). Estos son procedimientos muy

ES 2 298 139 T3

elaborados y que consumen mucho tiempo, que requieren de aparatos especiales, tales como electroforesis y equipos de autorradiografía. Después de eso, se tienen que analizar las huellas digitales -hoy en día generalmente se lleva a cabo "leyendo" la huella digital en un computador- para identificar las bandas polimórficas.

5 Sin embargo, tal detección por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida puede ser un factor limitante de la enorme capacidad múltiple de la tecnología del AFLP para la detección de marcadores con alto rendimiento.

WO98/30721 divulga un método con base en el AFLP, por medio del cual la necesidad de PAGE se hace superflua analizando la muestra amplificada por su habilidad para hibridar con una sonda de polinucleótido generada por AFLP.

10 Por lo tanto, una primera pretensión de la invención es la de proveer una técnica alternativa para WO98/30721 para analizar secuencias de ácido nucleico -en particular para determinar la presencia o la ausencia de marcadores de AFLP- que ya no requieren del uso de electroforesis en gel y preferiblemente evita también el uso de autorradiografía y/o de materiales radioactivos, y por lo tanto mejora el rendimiento (y provee un método para la detección de marcadores de AFLP con alto rendimiento).

15 Esto se logra por medio del método de la invención, que se basa en la extensión/alargamiento específico de una secuencia de oligonucleótidos (esto es, iniciador) que es complementaria con (parte de) del fragmento que va a ser detectado, de tal manera que la extensión del oligonucleótido complementario tendrá lugar únicamente cuando el fragmento que va a ser detectado está presente, y no tendrá lugar cuando el fragmento que va a ser detectado está ausente. Por lo tanto, ya sea que el oligonucleótido sea extendido o no, será indicativo de la presencia o de la ausencia (respectivamente) del fragmento que va a ser detectado.

20 Se puede utilizar esta detección con base en la extensión en vez de la electroforesis sobre gel/autorradiografía, en el análisis de las mezclas de reacción del AFLP, en particular para rutina, obtención del genotipo con alto rendimiento. Para este propósito, la invención, entre otras cosas también provee una disposición de oligonucleótidos que puede ser utilizada para analizar una mezcla de reacción del AFLP por la presencia de diferentes marcadores de AFLP simultáneamente, esto es, en una única etapa de detección.

30 En un primer aspecto, la invención se relaciona por lo tanto con un método para determinar la presencia o la ausencia de un fragmento de restricción objetivo en una mezcla de fragmentos de restricción, utilizando una secuencia de nucleótidos que es esencialmente complementaria con parte del fragmento de restricción respectivo, dicho método comprendiendo las etapas de:

- 35 a) poner en contacto la mezcla de los fragmentos de restricción con la secuencia del oligonucleótido bajo condiciones de hibridación, de tal manera que cuando está presente el fragmento de restricción objetivo, se forma un híbrido entre el fragmento de restricción objetivo y la secuencia del oligonucleótido, de tal manera que el híbrido resultante tenga al menos un nucleótido desapareado del fragmento de restricción objetivo directamente adyacente al extremo 3' de la secuencia del oligonucleótido;
- 40 b) añadir al menos un nucleótido marcado o un análogo de nucleótido a la mezcla resultante de la etapa a), bajo condiciones adecuadas para la extensión de un oligonucleótido; para que cuando un híbrido del fragmento de restricción objetivo y el nucleótido están presentes, y al menos uno de dichos nucleótidos marcados o análogo de nucleótido sea complementario con al menos un nucleótido desapareado de dicho fragmento de restricción objetivo directamente adyacente al extremo 3' de la secuencia del oligonucleótido, la secuencia del nucleótido se extiende con el nucleótido marcado o el análogo de nucleótido;
- 45 c) detectar la presencia o la ausencia de cualquier híbrido con un nucleótido marcado añadido o análogo de nucleótido, y/o de cualquier secuencia de oligonucleótido con un nucleótido marcado añadido o análogo de nucleótido.
- 50

55 El método de la invención puede contener además una o más etapas en las cuales el híbrido formado entre el fragmento de restricción y la secuencia del oligonucleótido se separa de cualquiera de los fragmentos de restricción no hibridado con una secuencia de oligonucleótido, así como con cualquiera de las otras secuencias o compuestos no deseados. Tal etapa se puede llevar a cabo después de la etapa a), después de la etapa b), o de ambas.

60 Además, será claro para una persona capacitada en el tema que el orden en el cual los diferentes compuestos/secuencias (esto es, los fragmentos de restricción, el oligonucleótido y el nucleótido marcado) se añaden a/se mezclan entre sí en las etapas a) y b) se puede variar, y que tales variaciones caerán dentro del alcance de la invención y de las reivindicaciones. Sin embargo, el orden descrito anteriormente representa la forma más conveniente de llevar a cabo la invención.

65 La invención se relaciona además con un método para determinar la presencia o la ausencia de uno o más fragmentos de restricción objetivo en una mezcla de fragmentos de restricción, comprende las etapas de:

- a) poner en contacto la mezcla de los fragmentos de restricción bajo condiciones de hibridación al menos con una secuencia de oligonucleótido, siendo dicha secuencia de oligonucleótido complementaria con parte de un fragmento de restricción objetivo, pero no con ningún otro fragmento de restricción en la mezcla,

ES 2 298 139 T3

de tal manera que el híbrido resultante tiene al menos un nucleótido desapareado de dicho fragmento de restricción objetivo directamente adyacente al extremo 3' de la secuencia del oligonucleótido;

5 b) extender la secuencia del oligonucleótido con al menos un nucleótido marcado o análogo de nucleótido, siendo al menos un nucleótido marcado o análogo de nucleótido complementario con al menos un nucleótido desapareado de dicho fragmento de restricción objetivo directamente adyacente al extremo 3' de la secuencia del oligonucleótido;

10 c) detectar la secuencia del oligonucleótido con el nucleótido marcado añadido o el análogo de nucleótido.

Nuevamente este método puede contener una o dos etapas opcionales para separar los fragmentos de restricción objetivo hibridados con la secuencia del oligonucleótido de cualquiera de los fragmentos de restricción no hibridados con una secuencia de oligonucleótido; así como otras secuencias no deseadas y reactivos en exceso.

15 En el método de la invención, durante la etapa a), usualmente se pondrá en contacto la mezcla de los fragmentos en restricción simultáneamente al menos con 3, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 50, lo más preferible al menos 100 secuencias de oligonucleótido diferentes, en donde cada secuencia de oligonucleótido es más preferiblemente específica para únicamente un fragmento de restricción objetivo. Para este propósito, en el método de la invención, la(s) secuencia(s) de oligonucleótido(s) utilizada(s) se enlazan preferiblemente a un soporte sólido, más
20 preferiblemente para formar una disposición, y dichas disposiciones forman un aspecto adicional de la invención.

Por "un oligonucleótido específico para un fragmento de restricción objetivo" se entiende que la secuencia del oligonucleótido es esencialmente complementaria únicamente con el fragmento de restricción objetivo pretendido, pero lo más preferible no esencialmente complementaria con ningún otro fragmento de restricción en la mezcla. Una
25 secuencia de oligonucleótido se considera "esencialmente complementaria con" un fragmento de restricción objetivo cuando tiene un grado alto de homología de secuencia con la parte correspondiente del fragmento de restricción objetivo (determinado con base en la longitud total e la secuencia del oligonucleótido), esto es de al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, lo más preferiblemente al menos 99%.

30 En la presente descripción, el fragmento de restricción que va a ser detectado es denominado como la "Secuencia Objetivo".

Generalmente, una Secuencia Objetivo se caracterizará porque se puede obtener/obtiene cortando un ADN de inicio, usualmente un ADN genómico o ADNc, con al menos una, pero comúnmente con al menos dos enzimas de
35 restricción, de las cuales preferiblemente al menos una es una enzima de restricción "cortadora frecuente" y al menos una es una enzima de restricción "cortadora rara". (En el caso del ADN genómico, la "cortadora frecuente" sirve el propósito de reducir el tamaño de los fragmentos de restricción hasta un rango de tamaños que son eficientemente amplificados y en una forma compatible con la técnica de detección utilizada, y la "cortadora rara" sirve el propósito de
40 controlar el número total de fragmentos generados. Para ambas, el solicitante hace referencia a EP-A-0 534 858 y EP-A-0 721 987; los ejemplos no limitantes de las enzimas cortadoras frecuentes incluyen *MseI* y *TaqI*. Los ejemplos no limitantes de las cortadoras raras comercialmente disponibles incluyen *PstI*, *HpaII*, *MspI*, *ClaI*, *HhaI*, *EcoRI*, *EcoRII*, *BstBI*, *HinP1*, *HinDIII*, *MaeII*, *BbvI*, *PvuII*, *XmaI*, *SmaI*, *NciI*, *AvaI*, *HaeII*, *SalI*, *XhoI*, *BstYI*, *BamHI*, *BglII* y *PvuII*, de las cuales se prefieren *PstI*, *HpaII*, *MspI*, *ClaI*, *EcoRI*, *EcoRII*, *BstBI*, *HinP1*, *HinDIII*, *BamHI*, *BglII* y *MaeII*.

45 Preferiblemente, la Secuencia Objetivo es un fragmento de restricción como el presente en una mezcla de fragmentos de restricción, más preferiblemente un fragmento de restricción amplificado como el presente en una mezcla de fragmentos de restricción y/o de fragmentos de restricción amplificados.

Aún más preferiblemente, la Secuencia Objetivo es un fragmento de restricción que corresponde a un fragmento
50 polimórfico o banda de interés, tal como un marcador de AFLP. Como tal, la Secuencia Objetivo puede ser un fragmento no amplificado presente en una mezcla de ADN restringido, o puede ser un fragmento de restricción amplificado por medio del AFLP como el presente en una mezcla de reacción obtenida después de la amplificación del AFLP.

55 La secuencia del oligonucleótido utilizado para detectar la Secuencia Objetivo se denominará de aquí en adelante como el "Oligonucleótido de Detección", la "Secuencia de Detección" o el "Iniciador de Detección", cuyos términos se consideran equivalentes.

Las Secuencias de Detección pueden contener además una "cola" -tal como una secuencia poliT- para mejorar la
60 accesibilidad para la Secuencia Objetivo.

Cada Secuencia de Detección debe ser al menos en parte complementaria a una Secuencia Objetivo específica, como se definió anteriormente. La Secuencia de Detección puede ser cualquier ácido nucleico (esto es, ADN o ARN) pero se prefiere ADN. La Secuencia de Detección tendrá generalmente un tamaño aproximado de 10 a 100 pares de bases, preferiblemente aproximadamente de 20 a 50 pares de bases. Las Secuencias de Detección pueden ser todas
65 del mismo tamaño, o pueden ser de diferentes tamaños. La Secuencia de Detección se puede obtener en cualquier forma adecuada. Por ejemplo, cuando una o más bandas polimórficas han sido identificadas en una huella digital del AFLP de un conjunto específico de individuos (preferiblemente relacionados), se puede determinar la secuencia de cada banda/fragmento en una forma ya conocida, y las Secuencias de Detección se pueden sintetizar para que sean

complementarias con cualquier parte de la secuencia de cada una de las bandas polimórficas, esto es, utilizando un sintetizador automatizado de ADN o en cualquier otra forma ya conocida. También, se pueden utilizar técnicas de síntesis de ácidos nucleicos en fase sólida, lo cual puede resultar directamente en una disposición con las Secuencias de Detección deseadas, como se describe más adelante. Además, se puede obtener la Secuencia de Detección
5 utilizando técnicas conocidas de ingeniería genética, por ejemplo por medio de extensión del iniciador utilizando la Secuencia Objetivo como molde, y/o por medio del uso de una o más enzimas de restricción, utilizando opcionalmente amplificación.

También, la Secuencia de Detección puede obtener uno o más “nucleósidos alternativos” como se describe en
10 la solicitud europea de los solicitantes EP 0 974 672 que también está pendiente de trámite, de tal manera que la Secuencia de Detección sea de un “iniciador alternativo” como se describe allí. En forma similar, en la etapa b), la Secuencia de Detección se puede extender con tal nucleósido/nucleótido alternativo, suministrado con una etiqueta. Los ejemplos de la misma incluyen a las bases Inosina (I) y Uracilo (U), así como dUTP y dITP, y estos se incluyen dentro del término “análogo de nucleótido marcado” como se mencionó anteriormente”. Se entiende que la presencia
15 de tales nucleósidos alternativos no evita que la Secuencia de Detección y la Secuencia Objetivo sean esencialmente complementarias entre sí como se definió anteriormente.

Cuando la mezcla de los fragmentos de restricción sea investigada por la presencia de una o más secuencias objetivo, ha sido amplificada utilizando AFLP, (parte de) la Secuencia de Detección puede ser complementaria con
20 (parte de) el fragmento de restricción original, con (parte de) la secuencia adaptadora, o con ambos. De acuerdo con una modalidad preferida, la Secuencia de Detección corresponde a un iniciador del AFLP con uno o más nucleótidos selectivos (adicionales) añadidos al extremo 3'. Más preferiblemente, la Secuencia de Detección corresponde a (uno de) el(los) iniciador(es) del AFLP utilizada para amplificar los fragmentos de restricción, con uno o más nucleótidos selectivos (adicionales) añadidos al extremo 3'.

Por ejemplo, cuando los fragmentos de restricción han sido amplificados utilizando un iniciador de +(n) AFLP, se pueden utilizar uno o más +(n+q) iniciadores como Secuencia de Detección, que incorporan (parte de) la región constante del iniciador del +(n) AFLP así como los (n) nucleótidos selectivos del iniciador original, con (q) nucleótido(s)
25 adicionales añadidos al extremo 3' (siendo n usualmente 0-6, siendo q usualmente 1-10).

Preferiblemente, tal Secuencia de Detección con base en un iniciador del AFLP contiene un total de 5-15 nucleótidos, preferiblemente 7-12 nucleótidos selectivos, esto es, en el extremo 3' de la secuencia que corresponde a la región constante del iniciador del AFLP. Las combinaciones especialmente adecuadas del iniciador del AFLP y la Secuencia de Detección son un iniciador de +4 a +6 del AFLP para la amplificación, combinadas con una Secuencia de Detección
30 de +7 a +12 en la etapa b) de la invención. Ya se pueden obtener buenos resultados (esto es sensibilidad y selectividad) utilizando un iniciador +6 del AFLP en combinación con una Secuencia de Detección correspondiente +7.

Como se mencionó anteriormente, las Secuencias de Detección se enlazan preferiblemente a un soporte sólido, más preferiblemente a fin de formar una disposición. Tal disposición comprenderá generalmente al menos 10, más específicamente al menos 100, más preferiblemente al menos 1000 Secuencias de Detección diferentes. Para una
40 “disposición de alta densidad” o “microdisposición”, el número total de Secuencias de Detección puede estar en el rango de 1000-100.000 por cm² de área superficial.

Las Secuencias de Detección se enlazarán generalmente al portador de tal manera que cada Secuencia de Detección
45 está unida a, y corresponde con, una parte específica distinta del portador, a fin de formar un área independientemente detectable sobre el portador, tal como una mancha o banda. Esto hace posible “leer” la disposición por medio de un escaneo (esto es, en forma visual o de otra forma) de las áreas a las cuales está unida cada Secuencia de Detección (esto es, una secuencia correspondiente a un marcador de interés).

Preferiblemente, las Secuencias de Detección se enlazan al portador de acuerdo con un patrón predeterminado distribuido en forma regular, en el cual por ejemplo se pueden agrupar todas las Secuencias de Detección (esto es, que corresponden a marcadores relacionados), esto es en una o más líneas, columnas, filas, cuadrados, rectángulos, etc.,
50 preferiblemente en una forma “direccionable”. Esto facilita adicionalmente el análisis de la disposición.

La densidad de las diferentes Secuencias de Detección estará generalmente en el rango de 1-100.000 Secuencias de Detección diferentes/cm², usualmente 5-50.000 Secuencias de Detección/cm², generalmente entre 10-10.000 Secuencias de Detección/cm².

Una disposición de la invención puede contener (también) conjuntos de Secuencias de Detección que corresponden
60 a marcadores indicativos para diferentes rasgos (esto es, genéticamente no relacionados) o propiedades, y tal disposición puede ser utilizada para analizar a un individuo (genoma) por la presencia o ausencia de todas estas propiedades simultáneamente. Sin embargo, las Secuencias de Detección usualmente corresponderán a marcadores dentro de un “conjunto para obtención del genotipo”, esto es de marcadores como los que pueden estar presentes en individuos que pertenecen a la misma familia, género o especie preferida, esto es, a fin de proveer -por ejemplo- una “disposición de maíz”, una “disposición de tomate”, una “disposición de trigo”, etc.

En una modalidad, las Secuencias de Detección presentes en la disposición corresponderán a marcadores del AFLP que son representativos de diferentes especies, variedades, variedades cultivadas, líneas o razas de la misma especie.

ES 2 298 139 T3

Una disposición de la invención puede contener también Secuencias de Detección que corresponden a marcadores que son representativos de un cierto estado genético de un individuo, tal como la presencia o ausencia de un estado de enfermedad, esto es, de oncogenes y de enfermedades determinadas genéticamente.

5 Aunque preferiblemente cada Secuencia de Detección sobre la disposición corresponderá a una banda polimórfica de interés (esto es, un marcador), la presencia sobre la disposición de algunas Secuencias de Detección menos o no informativas (por ejemplo, que corresponden a bandas no polimórficas o a marcadores que son muy abundantes para proveer información útil) no está excluida. Sin embargo, estas usualmente constituirán menos del 50%, preferible-
10 mente menos del 30%, más preferiblemente menos del 10% de todas las Secuencias de Detección presentes sobre la disposición. También se incluye que algunas o la mayoría de las Secuencias de Detección pueden ser informativas para una aplicación específica o genoma, pero no para otro. Sin embargo, preferiblemente 95-100% de todas las Secuencias de Detección corresponderán a, o serán representativas de un marcador del AFLP.

15 El soporte sólido (esto es, el portador) para la disposición puede ser cualquier material sólido al cual se pueden unir secuencias de ácido nucleico, incluyendo materiales tejidos y no tejidos porosos, fibrosos, así como materiales compuestos. También, se pueden utilizar materiales semisólidos tales como geles o matrices (por ejemplo como se utiliza en cromatografía), aunque esto no es lo preferido.

20 Los portadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos elaborados de plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales con base en sílice, vidrio funcionalizado, silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, membranas, nylon, fibras naturales tales como seda, lana y algodón, y materiales poliméricos tales como poliestireno, polietilén glicol tetraftalato, acetato de polivinilo, cloruro de polivinilo, polivinil pirrolidona, poliacrilonitrilo, polimetil metacrilato, politetrafluoroetileno, butil caucho, caucho estirenobutadieno, caucho natural, polietileno, poli-
25 propileno, (poli)tetrafluoroetileno, (poli)vinilideno fluoruro, policarbonato y polimetilpenteno. Otros materiales de soporte adecuados son mencionados por ejemplo en US-A-5.427.779, WO 97/22720, WO 97/43450, WO 97/31256, WO 97/27317 y EP 0 799 897.

30 Preferiblemente, el portador tendrá una forma esencialmente rectangular, plana, con las Secuencias de Detección enlazadas a una superficie del mismo. Sin embargo, cualquier otra forma bi o tridimensional adecuada puede ser utilizada también, tal como un disco, una esfera o cuentas, o materiales o estructuras que permitan que un medio líquido que contiene la muestra sea analizado para pasar o fluir a través del portador, tal como columnas, tubos o capilares, así como estructuras (macro)porosas, tipo tejido o tipo membrana, incluidos los dispositivos genosensores con flujo a través suyo mencionados en WO97/22720.

35 El tamaño de la disposición, así como las áreas individuales correspondientes a cada una de la diferentes Secuencias de Detección, pueden variar, dependiendo de la cantidad total de Secuencias de detección, así como del método pretendido para analizar la disposición.

40 Para una disposición que va a ser inspeccionada visualmente, la disposición total y las áreas separadas sobre la misma pueden ser de un tamaño tal que pueden ser observadas y distinguidas a simple vista o a través de un microscopio, esto es en el rango de 1 a 12 cm² para la disposición total, y de 0,01-1 cm² para las áreas individuales.

45 Las disposiciones que son analizadas utilizando otros tipos de equipos para escaneo (usualmente automatizados) pueden ser de menor tamaño y está preferiblemente en la forma de microdisposiciones o disposiciones de alta densidad, en el rango de 0,01-12 cm² par la disposición total, y de 0,0001-1 cm² para las áreas individuales. Esto permite que la hibridación se lleve a cabo en un volumen pequeño sobre una muestra pequeña, o inclusive el uso de técnicas de flujo completo.

50 Las Secuencias de Detección se pueden enlazar al portador en cualquier forma ya conocida, y la técnica específica utilizada dependerá principalmente del portador utilizado. El enlazamiento será en el extremo 5', o en alguna otra parte sobre las Secuencias de Detección, según sea apropiado, pero preferiblemente no en el extremo 3', ya que éste va a ser extendido durante la reacción de extensión del iniciador.

55 Preferiblemente, las Secuencias de Detección serán enlazadas en forma covalente a la disposición, esto es por medio de una técnica química adecuada. Para este propósito, se pueden modificar las Secuencias de Detección y/o el portador para portar uno o más grupos o funcionalidades para unir la Secuencia de Detección a la disposición. Por ejemplo, la superficie del portador puede ser activada para portar uno o más grupos tales como carboxi, amino, hidroxí, etc.

60 Los métodos adecuados para unir las Secuencias de Detección al portador serán claros para la persona entrenada. En general, se puede utilizar cualquier método para unir un ácido nucleico a un soporte sólido, incluyendo los métodos descritos en USA-5.427.779; US-A-4.973.493; US-A-4.979.959; US-A-5.002.582; US-A-5.217.492; US-A-5.525.041; US-A-5.263.992; WO 97/46313 y WO 97/22720, así como las referencias citadas allí.

65 Como ejemplo de una unión covalente, el acoplamiento puede proceder utilizando grupos fotoreactivos tales como la N-oxi-succinimida en la cual o bien se produce la derivatización de la Secuencia de Ácido Nucleico enlazada a la disposición con un grupo fotoreactivo y unido a la superficie, o se trata primero la superficie con un grupo

fotoreactivo, seguido por la aplicación de la Secuencia de Detección, por ejemplo en forma modificada en el amino N-terminal. Se suministra un protocolo adecuado, siguiendo el método general descrito en Amos y colaboradores, Surface Modification of Polymers by Photochemical Immobilization, The 17th Annual Meeting of the Society of Biomaterials, Mayo de 1991, Scottsdale AZ, en WO 97/46313.

Otras técnicas de enlazamiento covalente involucran el uso de los grupos 3'-aminopropanol o química epoxisilano-amina, por ejemplo como se describe en WO 97/22720.

Un ejemplo de una técnica de enlazamiento fuerte pero no covalente involucra la unión de una Secuencia de Detección biotinilada sobre un portador recubierto con estreptavidina.

Con el propósito de crear áreas direccionables, pequeñas, distintas de cada una de las Secuencias de Detección sobre la Disposición, se pueden utilizar técnicas de enmascaramiento o técnicas conocidas de microdispensación, por ejemplo como se describe en WO 97/46313 y WO 97/22720.

También, se pueden sintetizar Secuencias de Detección *in situ* sobre la disposición utilizando técnicas de síntesis del ácido nucleico en fase sólida, nuevamente como se describe en la referencia anterior.

Después de la unión de las Secuencias de Detección al portador, la disposición estará generalmente lista para uso.

En la etapa a) de la invención, una o más Secuencias de Detección (o la disposición de las Secuencias de Detección) se ponen en contacto con la muestra (esto es, mezcla de fragmentos de restricción) para ser analizadas bajo condiciones de hibridación ya conocidas. Una persona capacitada pueden seleccionar las condiciones de hibridación adecuadas (esto es, amortiguadores utilizados, concentración de la sal, temperatura, duración), con base en la experiencia u opcionalmente después de algunos experimentos preliminares. Estas condiciones pueden variar, dependiendo de factores tales como el tamaño de las Secuencias de Detección, el contenido por CG de las Secuencias de Detección y si la Secuencia de Detección o la Secuencia Objetivo se enlazan a una disposición como se describe más adelante.

Las condiciones adecuadas de hibridación son descritas por ejemplo en Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory manual, (1989) 2nd. Ed. Cold Spring Harbour, N.Y.; Berger y Kimmel, "Guide to Molecular Cloning Techniques", "Methods in Enzymology", (1987), Volumen 152, Academic Press Inc., San Diego, CA; Young y Davis (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80: 1194; Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24, Hybridization with Nucleic Acid Probes, P. Thijssen, ed., Elsevier, N.Y. (1993), así como WO 97/43450. EP-A-0 799 897, WO 97/27317, WO 92/10092, WO 95/1195, WO 97/22720 y US-A-5.424.186 y generalmente pueden comprender temperaturas entre 25-70°C, preferiblemente 35-65°C, una duración entre 1 minuto y 30 horas, preferiblemente aproximadamente 15 minutos a 2 horas, y el uso como amortiguador adecuado, tal como un amortiguador Tris.

Las condiciones de hibridación se escogen preferiblemente de tal manera que cada Secuencia de Detección formará únicamente un híbrido (dúplex) con una Secuencia Objetivo con la cual la Secuencia de Detección es esencialmente complementaria como se definió anteriormente, si tal Secuencia Objetivo está presente, y de lo contrario no formará ningún híbrido.

Las condiciones de hibridación especialmente preferidas son aquellas ya conocidas para la extensión del iniciador, tal como las condiciones de extensión del iniciador utilizadas en las técnicas de minisequenciación, esto es, como se describe en WO 90/09455, WO 91/02087, WO 91/13075, WO 92/15712 y EP 0 123 513. Esto tiene la ventaja de que tanto la etapa a) como la etapa b) anteriores pueden ser llevadas a cabo bajo las mismas "condiciones de extensión del iniciador", esto es, en una reacción única, utilizando el mismo amortiguador, etc., opcionalmente bajo ciclos repetidos de temperatura.

Cuando la mezcla de fragmentos de restricción se pone en contacto con una Secuencia de Detección, y está presente una Secuencia Objetivo para dicha Secuencia de Detección, se formará un híbrido entre la Secuencia Objetivo y la Secuencia de Detección. Dicho híbrido debe ser tal que -esto es, la Secuencia de Detección se debe diseñar para ser complementaria con tal Secuencia Objetivo- existe al menos un nucleótido desapareado de la Secuencia Objetivo directamente adyacente al extremo 3' de la Secuencia de Detección.

Durante la etapa b) del método de la invención, al menos una posición correspondiente a dicho(s) nucleótido(s) desapareado(s) en la Secuencia Objetivo se "rellena" al menos con un nucleótido, por medio del alargamiento de la Secuencia de Detección, en la cual la Secuencia Objetivo sirve como molde para una reacción de extensión. Por lo tanto, si la Secuencia Objetivo que corresponde a la Secuencia específica de Detección no está presente, no se formará un híbrido, y dicha Secuencia de Detección no se extenderá, mostrando que la Secuencia Objetivo no estaba presente en la mezcla de partida.

En la etapa b), la Secuencia de Detección se extiende preferiblemente a lo sumo con cinco, preferiblemente a lo sumo con tres, y lo más preferible únicamente con un nucleótido.

Preferiblemente, el nucleótido utilizado en la etapa b) para extender la Secuencia de Detección (o al menos uno de los nucleótidos utilizados para el mismo) es un nucleótido o análogo de nucleótido que puede ser detectado en

ES 2 298 139 T3

una forma ya conocida, por ejemplo por medio de una marca detectable, y tal nucleótido es denominado como un “Nucleótido Detectable”. Se entiende que el término “Nucleótido Detectable” también incorpora la extensión de la Secuencia de Detección con diferentes nucleótidos, al menos uno de los cuales está marcado o de todas formas puede ser detectado en una forma ya conocida.

5

Los marcadores adecuados para uso en el Nucleótido Detectable se describen por ejemplo en WO 97/27317, WO 97/22720, WO 97/43450, EP 0 799 897, WO 97/31256, WO 97/27317 y WO 98/08083 e incluyen marcadores fluorescentes, marcadores fosforescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, marcadores químicos, marcadores bioquímicos tales como enzimas, marcadores biológicos tales como biotina/estreptavidina, radioisótopos, marcadores de resonancia o de espín, colides metálicos tales como oro, cuentas magnéticas, cromógenos, tintas, y marcadores similares.

10

En particular, se pueden utilizar las técnicas de marcación y/o los nucleótidos marcados ya conocidos para uso en minisequenciación, tal como aquellas mencionadas en WO 90/09455, WO 91/02087, WO 91/13075, WO 92/15712 y/o EP 0 123 513.

15

Además, se pueden utilizar los marcadores así llamados “indirectos”, que se unen a la Secuencia Objetivo/Secuencia de Detección después de hibridación, nuevamente como para el ejemplo descrito en WO 97/27317.

20

Además de ser proveído con un marcador detectable, el Nucleótido Detectable es preferiblemente tal que -opcionalmente junto con los componentes adicionales de la mezcla de reacción y/o las condiciones utilizadas para la extensión de la Secuencia de Detección- la extensión de la Secuencia de Detección termina después de que el Nucleótido Detectable ha sido añadido a la Secuencia de Detección. Para este propósito, se pueden utilizar nucleótidos de terminación de cadena y/o condiciones de terminación de cadena, nuevamente como las ya conocidas para uso en minisequenciación, por ejemplo a partir de WO 90/09455, WO 91/02087, WO 91/13075, WO 92/15712 y/o EP 0 123 513. También se puede utilizar una combinación de un Nucleótido Detectable y un nucleótido de terminación, siempre que el Nucleótido Detectable se construya dentro de la Secuencia de Detección antes de que se termine la extensión de la Secuencia de Detección.

25

30

Como ejemplos no limitantes de los nucleótidos de terminación, se pueden utilizar trifosfatos de desoxirribonucleósido (dNTP), trifosfatos de didesoxirribonucleósido (ddNTP) o tionucleótidos, todos proveídos con marcadores adecuados como se describió anteriormente. Estos incluyen dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dITP, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP.

35

Las condiciones para la extensión de la Secuencia de Detección con el Nucleótido Detectable pueden incluir todas las condiciones ya conocidas para la extensión de un oligonucleótido o iniciador hibridado a un molde de ácido nucleico, por ejemplo como se describe en el arte para minisequenciación, tal como en WO 90/09455, WO 91/02087, WO 91/13075, WO 92/15712 y/o EP 0 123 513. Estas incluyen el uso de una polimerasa tal como la AND polimerasa de *E. coli*, el fragmento Klenow, la ADN polimerasa T7 de bacteriófago, la ADN polimerasa T4 de bacteriófago, la Taq ADN polimerasa y la AMV transcriptasa, en un amortiguador adecuado, tal como un amortiguador acuoso que contiene sales de Mg, a una temperatura de 20-80°C, preferiblemente 30-70°C.

40

45

De acuerdo a una modalidad de la invención, la mezcla utilizada en la etapa b) para extender la Secuencia de Detección contiene únicamente un (tipo de) Nucleótido Detectable, esto es, uno o más Nucleótidos Detectables que son complementarios únicamente con uno entre A, T, C o G. Bajo estas condiciones, únicamente aquellas secuencias objetivo que: 1) pueden hibridar exitosamente con la Secuencia de Detección; y 2) tienen en su secuencia, sobre una posición directamente adyacente a la parte de la secuencia que hibrida con la Secuencia de Detección, un nucleótido complementario al Nucleótido Detectable, conducirá a la extensión de la Secuencia de Detección con el Nucleótido Detectable y por lo tanto a una señal positiva, indicativa de la presencia de dicha Secuencia Objetivo en la mezcla que va a ser analizada.

50

En esta forma, cuando se conoce el nucleótido desapareado de la Secuencia Objetivo directamente adyacente al extremo 3' de la Secuencia de Detección en el híbrido, el uso de un Nucleótido Detectable correspondiente a dicho nucleótido desapareado provee una selección adicional o confirmación de la identidad de la Secuencia Objetivo. Para mejorar la selectividad y/o la sensibilidad, dos o más nucleótidos conocidos adyacentes al extremo 3' de la Secuencia de Detección pueden ser “llenadas” con nucleótidos marcados (preferiblemente marcados en una forma distinguible), esto es, en un ciclo de etapas a) y b) o en varios ciclos.

55

60

De acuerdo con otra modalidad de la invención, la mezcla utilizada en la etapa b) para extender la Secuencia de Detección puede contener también dos, tres o cuatro Nucleótidos Detectables diferentes. Por “Nucleótido Detectable diferente” se entiende que cada Nucleótido Detectable es complementario a un nucleótido desapareado diferente A, T, G o C sobre la Secuencia Objetivo, y cada Nucleótido Detectable está marcado de tal forma que puede ser distinguido -esto es, utilizando una técnica de detección adecuada- a partir del(los) otro(s) Nucleótido(s) detectable(s) presente(s) en la reacción de extensión y/o en la Secuencia de Detección extendida, de modo que la extensión de la Secuencia de Detección con un Nucleótido Detectable específico pueda ser indicativa de la presencia de un nucleótido específico sobre la posición correspondiente de la Secuencia Objetivo.

65

ES 2 298 139 T3

Opcionalmente, después de la hibridación de la etapa a), y/o después de la reacción de extensión de la etapa b), cualquiera de los fragmentos de restricción no hibridados con una Secuencia de Detección, así como cualquier otra de las secuencias no deseadas, compuestos, o reactivos en exceso, pueden ser removidos, por ejemplo lavando la disposición.

5 Después de que la Secuencia de Detección en los dúplex de la Secuencia Objetivo/Secuencia de Detección ha sido extendida con el Nucleótido Detectable ("DN"), se analiza la mezcla resultante para determinar qué Secuencia de Detección ha sido extendida con un DN, utilizando una técnica de detección adecuada. Este análisis se puede llevar a cabo mientras la(s) Secuencia(s) de Detección están aún hibridadas con la(s) Secuencia(s) Objetivo correspondiente(s),
10 o puede(n) ser removida(s)/separada(s) de la(s) Secuencia(s) Objetivo de la(s) Secuencia(s) de Detección en una etapa separada antes de la detección y el análisis.

Cuando las Secuencias de Detección están en la forma de la disposición, se analiza la disposición para determinar cuáles áreas sobre la disposición (esto es, cuál(es) Secuencia(s) de Detección) muestran al Nucleótido Detectable.
15 Estas áreas generalmente serán detectadas como una señal positiva que indica la presencia del marcador pertinente en la muestra.

El análisis de la disposición se puede llevar a cabo en cualquier forma ya conocida, incluyendo técnicas ópticas, espectroscopía, técnicas químicas, técnicas bioquímicas, técnicas fotoquímicas, técnicas eléctricas, técnicas de dispersión de luz, técnicas colorimétricas, técnicas radiográficas, etc., dependiendo de la marca el Nucleótido Detectable. Las técnicas adecuadas se describen por ejemplo en WO 97/27317, WO 97/22720, WO 97/43450, EP 0 799 897, WO 97/31256, WO 97/27317 y WO 98/08083. Por ejemplo, se puede inspeccionar visualmente la disposición o por medio de microscopía (confocal); por medio de espectroscopía, utilizando una película fotográfica, detectores electrónicos o una cámara CCD; por medio colorimétrico o de un ensayo (bio)químico; o por medio de cualquier otro método
25 adecuado, para el cual se hace referencia nuevamente a WO 97/27317, WO 97/22720, WO 97/43450, EP 0 799 897, WO 97/31256, WO 97/27317 y WO 98/08083. También se puede utilizar un equipo para escaneo automatizado con base en tales técnicas.

Opcionalmente, se puede utilizar la intensidad relativa o la magnitud absoluta de una señal generada por un Nucleótido Detectable sobre un sitio específico en la disposición como una indicación relativa o una medida absoluta de la cantidad del fragmento correspondiente de la Secuencia Objetivo presente en la muestra original, como se describe por ejemplo en WO 98/08083.
30

El análisis de la disposición puede proveer como tal resultados útiles, esto es, mostrar la presencia o la ausencia de un marcador genético o un rasgo genético de interés, identificar a un individuo, o proveer otra información sobre el individuo analizado, tal como a cuál cepa, variedad, variedad cultivada o raza pertenece. También puede indicar directamente la presencia o la ausencia de un estado de enfermedad.
35

Opcionalmente, también se pueden procesar adicionalmente los datos obtenidos a partir de la "lectura" de la disposición, esto es, por medio de la comparación con referencias, con resultados anteriores o con una base de datos, utilizando opcionalmente algoritmos computacionales.
40

Convenientemente, el método y la disposición de la invención pueden ser utilizados para reemplazar un análisis convencional de huella digital/autorradiografía en el AFLP. Este aspecto de la invención comprende las etapas (a)-(e) del método general del AFLP descrito anteriormente, en el cual la etapa (e) se lleva a cabo por medio de la reacción de extensión/alargamiento de las etapas a) a c) anteriores.
45

Comparada con la huella digital/autorradiografía convencionales, el uso del método y de la disposición de la invención puede ser más rápido, y se podrían detectar diferentes marcadores que requerirían de la generación de diferentes huellas digitales separadas sobre una disposición única. Todo esto hace que el método y las disposiciones de la invención sean especialmente adecuados para una evaluación selectiva de rutina y/o de alto rendimiento, por ejemplo en la reproducción de plantas.
50

También, se puede suministrar convenientemente la disposición de la invención como un kit de partes que incluye a la disposición y a otros componentes para uso con la disposición, tal como amortiguadores y de hibridación, amortiguadores de extensión, polimerasa, nucleótidos marcados, contenedores/empaques y manuales, así como componentes para los kits ya conocidos del AFLP. La disposición de la invención puede también estar en la forma de un dispositivo portátil tal como una varilla medidora.
55

La disposición de la invención se puede utilizar para analizar cualquier clase de secuencia de ácido nucleico o mezcla de secuencias de ácido nucleico, incluyendo pero sin limitarse a secuencias derivadas de plantas, secuencias derivadas de animales, secuencias derivadas de humanos, secuencias microbianas, secuencias de levadura, secuencias de hongos y de algas, y secuencias virales, incluyendo ADN genómico, ADNc, genes estructurales, secuencias reguladoras y/o partes de los mismos. Antes de utilizar el método de la invención, se restringen éstos ácidos nucleicos de partida, utilizando más preferiblemente las mismas enzimas de restricción utilizadas en la generación de las secuencias a partir de las cuales se derivaron(ó) la(s) Secuencia(s) de Detección, proveyendo por lo tanto una mezcla de fragmentos de restricción que puede ser utilizada directamente en la etapa a) anterior.
60
65

También, en una modalidad altamente preferida de la invención, en el análisis de una mezcla de fragmentos de restricción que se sospecha que contiene al menos una Secuencia Objetivo, se amplifica la mezcla restringida antes de ponerla en contacto con la(s) Secuencia(s) de Detección en la etapa a) anterior. Preferiblemente, dicha amplificación se hace por medio de "AFLP", por medio del cual en este contexto quiere decir más generalmente que el ADN de partida es cortado utilizando al menos una enzima de restricción y luego amplificado utilizando adaptadores e iniciadores. Esto conduce a una reducción de la complejidad de la muestra, produciendo menos ruido de fondo. Dicha amplificación (AFLP) puede involucrar o no el uso de iniciadores selectivos del AFLP. El análisis de alto rendimiento de los marcadores del AFLP se puede lograr particularmente cuando las Secuencias Objetivo son generadas utilizando menos nucleósidos selectivos que los utilizados para la detección de los mismos marcadores del AFLP por medio de PAGE.

En principio, el método y las disposiciones de la invención se pueden aplicar a, y se pueden utilizar para, cualquier propósito para el cual se puede utilizar y/o identificar un marcador polimórfico. Esto incluye, pero no se limita a, todos los usos descritos en el estado del arte para los marcadores polimórficos las técnicas conocidas de huellas digitales de ADN, obtención de un genotipo, perfilado e identificación de ADN. El método y las disposiciones de la invención son desde luego especialmente adecuadas en aplicaciones para las cuales se puede utilizar y/o identificar un marcador del AFLP, incluyendo aquellas mencionadas anteriormente y en EP-A-0 534 858 y en las solicitudes europeas que también están pendientes de trámite EP 0 976 835 y EP 0 974 672.

Los campos posibles de uso son por ejemplo en reproducción animal y de plantas, identificación de una variedad o de una variedad cultivada, medicina diagnóstica, diagnóstico de enfermedades en plantas y animales, identificación de enfermedades heredadas genéticamente en humanos, análisis de relación familiar, ciencias forenses, trasplante de órganos, clasificación viral y microbiana tal como el análisis múltiple para cepas de enfermedades infecciosas; así como el estudio de la herencia genética, expresión génica, mutaciones, oncogenes y/o resistencia a las drogas; o para detección de ARNm.

Como ya se mencionó anteriormente, en estas aplicaciones, se contempla que las disposiciones de la invención puedan ser desarrolladas para que porten Secuencias de Detección representativas para la mayoría o incluso para todos los marcadores de interés para una recopilación del genotipo específico, tal como para una especie específica. Otras disposiciones de la invención pueden contener Secuencias de Detección que son representativas para la mayoría o para todos los marcadores necesarios para clasificar a un individuo dentro de una recopilación del genotipo, esto es, como perteneciendo a una cierta especie, subespecie, variedad, variedad de cultivo, raza, cepa o línea, o para estudiar la herencia de un rasgo genético o propiedad. También, una disposición de la invención puede contener Secuencias de Detección representativas de marcadores que son indicativas de la presencia, la ausencia o el estado de una enfermedad o trastorno determinado genéticamente o influenciado genéticamente, incluyendo cáncer, oncogenes y mutaciones oncogénicas. Tal disposición puede ser utilizada entonces para propósitos de diagnóstico.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con resultados y/o con datos que pueden ser obtenidos por medio de análisis de una mezcla de fragmentos de restricción con el método de la invención. Estos resultados o datos pueden estar por ejemplo en la forma de una imagen, de una puntuación, de datos digitales o análogos, o en otra forma adecuada, y pueden opcionalmente ser almacenados en un portador adecuado de datos, incluyendo papel, película fotográfica, un disco de archivos de computador, una base de datos, etc. Estos datos pueden ser como los obtenidos directamente a partir del análisis o la puntuación de la disposición, o pueden haber sido procesados adicionalmente.

Se ilustrará ahora adicionalmente la invención por medio de la siguiente Parte Experimental no limitante, así como por medio de las figuras anexas, que muestran:

Fig. 1: la detección de dos fragmentos polimórficos 243 y 335 en el molde del AFLP +3+3 (fig. 1A) y +6+6 (fig. 1B) (de ejemplo 3). +3+3 implica que se utilizó una reacción +3+3 del AFLP como molde para la reacción de extensión del iniciador. +6+6 implica que se utilizó una reacción +6+6 del AFLP como molde para la reacción de extensión del iniciador. A implica que se ofreció dATP en la reacción de extensión del iniciador; C implica que se ofreció dCTP en la reacción de extensión del iniciador. 1 a 16 se refiere a los números de las muestras. + implica que ocurrió la extensión del iniciador, - implica que no ocurrió la extensión del iniciador.

Fig. 2: la detección de dos fragmentos polimórficos 243 y 335 utilizando los ddNTP marcados en forma fluorescente (FAM ddCTP y JOE ddATP) en moldes de complejidad decreciente para el fragmento 243 generado con combinaciones de iniciador +3+3, +4+3, +3+4, +4+4, +6+4, +6+5, +6+6 y para el fragmento de 335 con las combinaciones de iniciador +3+3, +3+4, +4+6, +6+6. Las imágenes se produjeron sobre un secuenciador de ADN ABI Prism 377. Las reacciones de extensión del iniciador se llevaron a cabo sobre tres muestras: dos muestras teniendo el fragmento y una muestra sin tener el fragmento en el orden +, -, +.

Fig. 3: la detección de los fragmentos 243 (Fig. 3A) y 335 (Fig. 3B) del AFLP polimórfico utilizando los ddNTP marcados en forma fluorescente (FAM ddCTP y JOE ddATP) y los iniciadores de la etapa de detección en los cuales han sido reemplazados algunos nucleósidos por medio de residuos de inosina (I). Los moldes eran de complejidad decreciente, generados respectivamente con combinaciones de iniciador +3+3, +3+4, +6+4, +6+6. Las reacciones de extensión del iniciador se realizaron sobre dos muestras: una muestra tiene el fragmento y una muestra no tiene el fragmento en el orden +, -.

ES 2 298 139 T3

Fig. 4: la detección del fragmento 243 del AFLP polimérico generada con combinaciones del iniciador +3+3 del AFLP EcoAAC/MseCAA en el molde ds del AFLP. Se unieron los iniciadores de la etapa de detección a placas de vidrio. La etapa de extensión del iniciador se llevó a cabo por medio de ciclos de temperatura en un tubo de PCR. + implica que ocurrió la extensión del iniciador, - implica que no ocurrió la extensión del iniciador (ver ejemplo 6).

Fig. 5: la huella digital del AFLP generada con combinaciones del iniciador con números crecientes de nucleósidos selectivos, (respectivamente +2+3, +3+3, +4+3, +3+4, +4+4, +6+4, +4+6, +6+6, +6+3) para paneles de 4 muestras: una muestra no tiene al fragmento y tres muestras tienen al fragmento en el orden (-, +, +, +). Las extensiones del iniciador se escogieron para generar la banda polimórfica 149 como se indica con una flecha.

Fig. 5B: la detección del fragmento polimórfico 149 de la figura 5A sobre el molde generado con combinaciones de iniciador +4+4 y +6+4. Los ensayos de extensión del iniciador se llevaron a cabo sobre 6 individuos de arroz no teniendo tres muestras al fragmento y tres muestras teniendo al fragmento en el orden (-, +, +, +, -) con los 4 ddNTP (A, C, G, T) como se indicó. Únicamente ocurrió una reacción positiva si se extendió el iniciador con ddGTP.

Fig. 6: la huella digital del AFLP generada con combinaciones del iniciador con números crecientes de nucleósidos selectivos, para paneles de 4 individuos y partiendo con el molde amplificado +2+3. Las combinaciones del iniciador se escogieron para generar las bandas polimórficas (Marcador 1 y 2 y 3) como se indicó. Las flechas en la parte superior indican complejidad máxima de la reacción del AFLP a partir del cual el marcador indicado podría ser detectado aún por medio de minisequenciación (límite de detección).

Fig. 7 los ensayos de minisequenciación sobre el ADN ds con un número creciente de ciclos de PCR sobre 3 individuos negativos (que no tienen el fragmento objetivo) y un individuo positivo (que tiene el fragmento objetivo). La reacción sobre 4 individuos muestra que se incrementa la señal cuando se incrementa el número de ciclos de PCR.

Fig. 8: la minisequenciación sobre placas de vidrio: en cada pozo se colocaron iniciadores en concentraciones crecientes de 300, 30 y 3 pmol, respectivamente. La minisequenciación ocurrió con concentraciones crecientes de 0,05; 0,5; 5 y 50 pmoles del molde ss en los pozos 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

Fig. 9: la visita esquemática de conjunto del método de la invención. La Fig. 9a describe el enlazamiento de un oligonucleótido a un chip por cada marcador del AFLP que va a ser detectado. A continuación, se observa la hibridación de una mezcla de reacción del AFLP en la Fig. 9b. La Fig. 9c describe el desempeño de una reacción de minisequenciación y la remoción del exceso de marcador por medio de lavado lo que resulta en un chip listo para escaneo y detección de los marcadores del AFLP, como se ilustra en la Fig. 9d.

Fig. 10: la imagen de la reacción de minisequenciación del Ejemplo 8, escaneada durante 180 segundos en el FITC y el canal Cy-3 utilizando un escáner de corrimiento de microarreglos Gentac 1000.

Fig. 11: la imagen de la reacción de minisequenciación del Ejemplo 9. Se visualizaron los patrones utilizando un sistema analizador de imágenes sobre fósforo modelo BAS-2000 de Fuji.

Parte experimental

Ejemplo 1

Protocolos generales

Se prepararon los moldes del AFLP de acuerdo con procedimientos estándar (Vos y colaboradores, 1995 Nucleic Acids Research, vol. 23, no. 21: 4407-4414; Zabeau y Vos; Solicitud de patente Europea, EP 0534858), utilizando *EcoRI* y *MseI* como la combinación de enzimas. Las reacciones del AFLP fueron precedidas por amplificaciones previas con un nucleósido selectivo sobre cada iniciador. Las reacciones del AFLP se llevaron a cabo con el número de nucleósidos selectivos sobre cada iniciador como se indica por ejemplo con +3+3 que implica a los 3 nucleósidos selectivos sobre cada iniciador, el primer número relacionado con el iniciador del *EcoRI*, el segundo número relacionado con el iniciador del *MseI*.

Para el análisis de secuencia, se cortaron fragmentos del AFLP a partir de un gel de poliacrilamida seco, amplificado nuevamente con un iniciador que tiene la secuencia del iniciador inverso M13 extendida con la secuencia de la parte constante del iniciador del *EcoRI* del AFLP y un iniciador del *MseI* del AFLP sin nucleósidos selectivos y se secuenciaron directamente los fragmentos nuevamente amplificados a partir del iniciador inverso M13. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo utilizando el kit de secuenciación terminador de coloración adquirido de Perkin-Elmer y fueron analizadas sobre un secuenciador ABI 377. Posteriormente, se diseñaron los iniciadores de la etapa de detección. El análisis de secuencia también reveló la naturaleza del dNTP o del ddNTP a ser añadido para la extensión del iniciador.

Cuando se utilizaron las reacciones del AFLP como molde para las reacciones de extensión del iniciador, las reacciones del AFLP se llevaron a cabo sin iniciadores marcados en forma radiactiva o en forma fluorescente y con 75 ng de ambos iniciadores en un volumen de 50 μ L.

ES 2 298 139 T3

La reacción de extensión del iniciador sobre ADN ss se llevó a cabo de acuerdo con Syvänen y colaboradores (Syvänen y colaboradores, 1990 Genomics 8: 684-692; Syvänen y colaboradores, 1993 Am.J.Hum.Genet. 52: 46-59) con las siguientes modificaciones. Se utilizaron 10 a 25 μL de mezcla de reacción del AFLP para una reacción de extensión del iniciador. Las reacciones del AFLP se llevaron a cabo utilizando un iniciador biotinilado (“bio-iniciador”) y un iniciador estándar y se recogieron los productos del AFLP biotinilado sobre cuentas magnéticas recubiertas con estreptavidina (cuentas Dyna, Dynal, Noruega) o en pozos en placa de microtitulación recubiertos con estreptavidina (Labsystems, Helsinki, Finlandia). Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de extensión del iniciador ya sea sobre 1) la hebra biotinilada (“bio-hebra”) que permaneció enlazada a las cuentas/pozos de la placa de microtitulación después de la desnaturalización con NaOH ó 2) la no bio-hebra que podía ser separada de la bio-hebra por medio de ebullición y pipeteo del sobrenadante. Esto se llevó a cabo después de la purificación de los fragmentos del AFLP por medio de la adición de fosfatasa alcalina de camarón y exonucleasa I para librarse de cualquier residuo de iniciador y de los dNTP; a 50 μL de la reacción del AFLP se le añadieron 50 μL de lo siguiente: 4 μL de fosfatasa alcalina de camarón (American Life Science, Cleveland, Ohio), 2 μL de exonucleasa I (Amersham, Pharmacia, Biotech) I, 5 μL de amortiguador de fosfatasa alcalina de camarón, y agua hasta 50 μL . Se incubó durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se inactivaron las enzimas a 95°C (Chen y colaboradores, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 94, 10756-10761).

La reacción de extensión del iniciador sobre la bio-hebra se hizo en Tris-HCl 10 mM, pH 9,5, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, Tween-20 al 0,002%, 2 μL de iniciador de detección 5 μM , 0,3 μL de ddNTP marcado con ³³P (Amersham), 3,2 unidades de ThermoSequenase y agua hasta un volumen total de 50 μL . Se incubó la reacción durante 10 min a 50°C, se lavaron los pozos/cuentas y se liberaron los productos de minisequenciación de las cuentas por medio de desnaturalización en 20 μL de colorante formamida (formamida al 80% con 10 mg/ml de Azul dextrano) a 94°C, se colocaron sobre papel Whatman y se expusieron a placas para imágenes sobre fósforo de Fuji durante 16 horas. Se visualizan los patrones utilizando un sistema analizador de imágenes sobre fósforo BAS-2000 de Fuji (Fuji Photo Film Company Ltd., Japón).

La reacción de minisequenciación sobre la no bio-hebra se llevó a cabo en la misma forma descrita anteriormente, sin embargo, las reacciones de extensión del iniciador se llevaron a cabo sobre placas de vidrio con iniciadores modificados unidos a ellas (véase el dibujo esquemático no limitante de la Figura 9). Se añadieron los fragmentos del AFLP de las que no son bio-hebras a la mezcla de reacción. El recubrimiento de las placas de vidrio y el enlazamiento de los iniciadores se llevó a cabo como lo describen Guo y colaboradores (Guo y colaboradores, 1994 Nucleic Acids Research vol. 22, no. 24: 5456-5465.). Se colocaron manualmente 1 μL de iniciadores. Se modificaron en amino 5' y (T) 15 5' los iniciadores de la etapa de detección. Se lavaron las placas y se las expuso a placas para imágenes sobre fósforo de Fuji durante 16 horas. Se visualizan los patrones utilizando un sistema analizador de imágenes sobre fósforo BAS-2000 de Fuji (Fuji Photo Film Company Ltd., Japón).

La reacción de extensión del iniciador sobre ADN ds se llevó a cabo de acuerdo con Syvänen y colaboradores (1990, 1993) con las siguientes adaptaciones. Se llevaron a cabo las reacciones del AFLP y se las trató con fosfatasa alcalina de camarón y exonucleasa I para librarse de cualquier residuo de iniciador y de los dNTP (Chen y colaboradores, 1997). Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de extensión del iniciador en 50 μL en Tris-HCl 10 mM pH 9,5, KCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, Tween-20 al 0,002%, 2 μL de iniciador de detección modificado 5 μM , 0,3 μL de ddNTP marcado con ³³P (Amersham), 3,2 unidades de ThermoSequenase. El perfil de la PCR consistió de 35 ciclos durante 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C (Chen y colaboradores, 1997). Las reacciones de extensión del iniciador se llevaron a cabo sobre placas de vidrio con los iniciadores unidos a ellas en tubos para PCR. El recubrimiento de las placas de vidrio y el enlazamiento de los iniciadores se llevó a cabo como lo describen Guo y colaboradores, (1994). Se colocaron manualmente 1 μL de iniciadores. Se modificaron en amino 5' y (T) 15 5' los iniciadores de la etapa de detección.

Se lavaron las placas y se las expuso a placas para imágenes sobre fósforo de Fuji durante 16 horas. Se visualizan los patrones utilizando un sistema analizador de imágenes sobre fósforo BAS-2000 de Fuji (Fuji Photo Film Company Ltd., Japón).

Ejemplo 2

55 *Oligosíntesis*

Los oligonucleótidos se sintetizaron de acuerdo con procedimientos estándar, o fueron adquiridos a MWG-Biotech GmbH (Alemania).

60 Ejemplo 3

Detección de dos fragmentos del AFLP polimórfico en tomate

Este ejemplo ilustra la detección de dos fragmentos de AFLP polimórfico en tomate, 243 y 335, generados con combinaciones del iniciador del AFLP +3+3 bio-EcoAAC/MseCAA y bio-EcoACT/MseCAC, respectivamente, o combinaciones del iniciador del AFLP +6+6 bio-EcoAACCAC/MseCAACAG y bio-EcoACTTTT/MseCACGAA, respectivamente.

ES 2 298 139 T3

Las reacciones del AFLP se llevaron a cabo utilizando un iniciador del Eco biotinilado y un iniciador del Mse estándar y los productos del AFLP biotinilado fueron capturados en pozos de una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de extensión del iniciador sobre la bio-hebra como se describió anteriormente, utilizando sin embargo dNTP marcado con ^{32}P ($0,1 \mu\text{L}/\text{reacción}$; Amersham). Para el fragmento polimórfico 243 en el molde del AFLP +3+3 se analizaron 3 muestras que tienen el fragmento (1, 3, 4; Fig. 1A) y 1 muestra que no tiene el fragmento (2); Para el fragmento polimórfico 243 en el molde del AFLP +6+6 se analizaron 4 muestras que tienen el fragmento (9, 10, 11, 12; Fig. 1B); para el fragmento polimórfico 335 se analizaron 2 muestras que tienen el fragmento (13, 15) y 2 muestra que no tienen el fragmento (14, 16). Para el fragmento 243 se utilizó 1 iniciador de la etapa de detección, que tiene que ser extendido con una C; para el fragmento 335 se utilizó el iniciador 2 de la etapa de detección, que tiene que ser extendido con una A. Las reacciones se llevaron a cabo tanto con dATP como con dCTP. Se colocaron los productos de extensión sobre papel Whatman 3MM. Los resultados muestran que una reacción positiva únicamente se presenta si el fragmento del AFLP objetivo está presente y si los iniciadores de acuerdo con la información de la secuencia se extienden con el trifosfato del nucleósidos apropiado.

15 La secuencia de la región constante para los iniciadores de Eco fue (5'-3'):

GACTGCGTACCAATTC.

20 La secuencia de la región constante para los iniciadores de Mse fue (5'-3'):

GATGAGTCCTGAGTAA

25 Iniciadores del AFLP para generar el fragmento 243 (5'-3'):

Bio-Eco+3: EcoAAC

Mse+3: MseCAA

30 BioEco+6: EcoAACCAC

Mse+6: MseCAACAG

35 Iniciador 1 de la etapa de detección para detectar al fragmento 243 si se extiende con dCTP (5'-3'):

AGCAGTAGCAACCACTTCAGCC

40 Iniciadores del AFLP para generar el fragmento 335 (5'-3'):

Bio-Eco+3: EcoAAC

Mse+3: MseCAC

45 BioEco+6: EcoACTTTT

Mse+6: MseCACGAA

50 Iniciador 2 de la etapa de detección para detectar al fragmento 335 si se extiende con dATP:

ATCCGGCCAGTTATACC

55 Ejemplo 4

Detección del fragmento 243 y 335 del AFLP polimórfico utilizando los ddNTP marcados en forma fluorescente

Las reacciones del AFLP se llevaron a cabo con combinaciones de iniciador con números crecientes de nucleósidos selectivos, para paneles de 3 individuos (+, -, +). Las extensiones del iniciador del AFLP se escogieron para generar al fragmento 243 y al fragmento 335, respectivamente. Las reacciones del AFLP se llevaron a cabo utilizando un iniciador del EcoRI biotinilado y un iniciador estándar del MseI y los productos del AFLP biotinilado fueron capturados sobre cuentas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de extensión del iniciador sobre la bio-hebra como se describió anteriormente, utilizando sin embargo los ddNTP marcados en forma fluorescente ($0,1 \mu\text{L}/\text{reacción}$ Joe-ddATP, Joe-ddCTP, NEN, Boston, Estados Unidos de América). El iniciador de la etapa de detección y las extensiones fueron como en el ejemplo 3. Los productos de extensión fueron analizados sobre un gel de secuenciación de ABI. Los resultados muestran que una reacción positiva únicamente ocurre si está presente un fragmento del AFLP objetivo (Fig. 2).

ES 2 298 139 T3

Iniciadores del AFLP para generar al fragmento 243 (5'-3'):

Bio-Eco+3: EcoAAC

5 BioEco+4: EcoAACC

BioEco+6: EcoAACCAC

Mse+3: MseCAA

10 Mse+4: MseCAAC

Mse+5: MseCAACA

15 Mse+6: MseCAACAG

Iniciador 1 de la etapa de detección para detectar al fragmento 243 si se extiende con ddCTP (5'-3'):

20 AGCAGTAGCAACCACTTCAGCC

Iniciadores del AFLP para generar al fragmento 335 (5'-3'):

25 Bio-Eco+3: EcoACT

Bio-Eco+6: EcoACTTTT

Mse+3: MseCAC

30 Mse+4: MseCACG

Mse+6: MseCACGAA

35 Iniciador 2 de la etapa de detección para detectar al fragmento 335 si se extiende con ddATP (5'-3'):

ATCCGGCCAGTTATACC

40 Ejemplo 5

Detección de los fragmentos 243 y 335 del AFLP polimórfico utilizando los ddNTP marcados en forma fluorescente y los iniciadores de la etapa de detección en los cuales algunos nucleósidos han sido reemplazados por residuos de inosina

Las reacciones del AFLP se llevaron a cabo con combinaciones de iniciador con números crecientes de nucleósidos selectivos, para paneles de 2 individuos (+, -). Las extensiones del iniciador se escogieron para generar al fragmento 243 y al fragmento 335, respectivamente. Las reacciones del AFLP se llevaron a cabo utilizando un iniciador del Eco biotinilado y un iniciador estándar del Mse y los productos del AFLP biotinilado fueron capturados sobre cuentas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Dyna). Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de extensión del iniciador sobre la bio-hebra como se describió en el ejemplo 2, utilizando sin embargo tanto iniciadores estándar del AFLP como los iniciadores degenerados del AFLP en los cuales algunos nucleósidos selectivos habían sido reemplazados por inosina, como iniciadores de la etapa de detección. Los iniciadores de la etapa de detección para el fragmento 243 tuvieron que ser extendidos con una C, la etapa de detección del fragmento 335 tuvo que ser extendida con una A. Se utilizaron los ddNTP marcados en forma fluorescente (0,1 μ L/reacción Joe-ddATP, Fam-ddCTP, NEN, Boston, Estados Unidos de América). Los productos de extensión fueron analizados sobre un gel de secuenciación de ABI. Los resultados muestran que una reacción positiva únicamente ocurre si está presente un fragmento del AFLP objetivo y que los iniciadores estándar del AFLP puedan ser reemplazados por iniciadores en los cuales han sido reemplazados los nucleósidos por 1, 2 ó 3 residuos de inosina, respectivamente (Fig. 3A para el fragmento 243; Fig. 3B para el fragmento 335). Se introducen únicamente nucleósidos no selectivos en los iniciadores en posiciones que han sido fijadas en la reacción del AFLP utilizada como molde para la reacción de extensión del iniciador.

65

ES 2 298 139 T3

Iniciadores del AFLP para generar al fragmento 243 (5'-3'):

Bio-Eco+3: EcoAAC

5 BioEco+6: EcoAACCAC

Mse+3: MseCAA

Mse+4: MseCAAC

10

Mse+6: MseCAACAG

Iniciadores de la etapa de detección para detectar al fragmento 243 si se extiende con Fam ddCTP (5'-3' con):

15

Mse+6: MseCAACAG

Mse+6: MseIIICAG

20

Mse+6: MseIIACAG

Mse+6: MseIAACAG

25 Iniciadores del AFLP para generar al fragmento 335 (5'-3'):

Bio-Eco+3: EcoACT

Bio-Eco+6: EcoACTTTT

30

Mse+3: MseCAC

Mse+4: MseCACG

35

Mse+6: MseCACGAA

Iniciadores de la etapa de detección para detectar al fragmento 335 si se extiende con Joe-ddATP (5'-3'):

40

Mse+6: MseCACGAA

Mse+6: MseIIIGAA

Mse+6: MseIICGAA

45

Mse+6: MseIACGAA

Ejemplo 6

50

Detección del fragmento 243 del AFLP polimórfico generado con combinaciones del iniciador del AFLP +3+3 EcoAAC/MseCAA en el molde ds del AFLP

55 Se llevaron a cabo las reacciones del AFLP +3+3 como se describió en el ejemplo 3, sin embargo con iniciadores estándar del AFLP (no se utilizó un iniciador biotinilado).

60 Las reacciones de extensión del iniciador se llevaron a cabo como se describió para el ADN ds con ciclos de temperatura. Se analizaron 2 muestras que tiene al fragmento y 2 muestras que no tienen al fragmento; se utilizó al iniciador 1 modificado de la etapa de detección. Los resultados muestran que una reacción positiva se presenta únicamente si está presente el fragmento del AFLP objetivo (Fig. 4).

Iniciadores del AFLP para generar al fragmento 243 (5'-3'):

Eco+3: EcoAAC

65

Mse+3: MseCAA

ES 2 298 139 T3

Iniciador 1 modificado de la etapa de detección para detectar al fragmento 243 si se extiende con ddCTP (5'-3):

NH2-(T)15 AGCAGTAGCAACCACTTCAGCC

5 Ejemplo 7

Detección del fragmento 149 del AFLP polimérico en arroz, utilizando un iniciador +6 del AFLP como iniciador de la etapa de detección

10 Se generaron las huellas digitales del AFLP con combinaciones de iniciador con números crecientes de nucleósidos selectivos, para paneles de 4 individuos (-, +, +, +; Fig. 5A). Se escogieron las extensiones del iniciador para generar al fragmento 149 como se indicó. Las huellas digitales del AFLP muestran la complejidad de las reacciones del AFLP que dependen del número de nucleósidos selectivos.

15 Las reacciones del AFLP utilizadas como molde para las reacciones de extensión del iniciador fueron llevadas a cabo como se describe en el ejemplo 3 utilizando un iniciador del EcoRI biotinilado y un iniciador del MseI estándar y los productos del AFLP biotinilado fueron capturados en pozos de una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (Labsystems, Helsinki, Finlandia). Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de extensión del iniciador sobre la bio-hebra utilizando todos los cuatro ddNTP marcado con ³³P y utilizando un iniciador estándar +6 del AFLP, que tuvo que ser extendido con G. Se utilizó al iniciador del Mse CTAAAT como iniciador de la etapa de detección en las reacciones del +6+4 y +4+4 sobre 6 individuos con tres muestras que no tienen al fragmento y tres muestras que tienen al fragmento en el orden (-, +, -, +, +, -, Fig. 5B).

25 Los resultados muestran que una reacción positiva ocurre únicamente si el fragmento del AFLP objetivo está presente y si iniciadores de acuerdo con la información de la secuencia se extienden con el trifosfato del nucleósidos apropiado.

Iniciadores del AFLP para generar al fragmento 149 (5'-3'):

30 Eco+2: Eco-AA

Eco+3: Eco-AAC

(bio)-Eco+4: (bio)-Eco-AACC

35 (bio)-Eco+6: (bio)-Eco-AACCTT

Mse+3: Mse-CTA

40 Mse+4: Mse-CTAA

Mse+6: Mse-CTAAAT

45 Iniciador de la etapa de detección: Mse+6 (5'-3'):

Mse-CTAAAT

H. *Detección de los marcadores del AFLP por medio de minisequenciación*

50 Se exploró la minisequenciación como un método para detectar a los fragmentos del AFLP. La minisequenciación utilizando al molde del AFLP se puede aplicar como 1) un método para dirigir la sensibilidad de la minisequenciación ya que el número de fragmentos del molde se puede variar fácilmente; 2) un método no aleatorio para la detección del marcador del AFLP por medio del uso de información de secuencia determinada; 3) un método aleatorio para la detección de marcador por medio del uso de iniciadores extendidos del AFLP. Hasta ahora, se ha explorado la minisequenciación como un método para detectar fragmentos del AFLP utilizando información de secuencia predeterminada para el diseño de iniciadores de detección, que fueron o bien iniciadores extendidos del AFLP, o iniciadores internos de detección. A menudo los iniciadores +6 no detectan fragmentos únicos como se mostró por medio de la determinación de las secuencias +6 para el iniciador EcoRI así como para el iniciador MseI para todos los fragmentos en 2 huellas digitales generadas con un iniciador EcoRI +2 y un iniciador MseI +3. El número óptimo de nucleósidos selectivos añadidos a los iniciadores del AFLP cuando fueron utilizados como iniciadores de detección parece ser determinado.

I. *Sensibilidad de la detección de la minisequenciación de fragmentos del AFLP en un molde del AFLP*

65 Para determinar la sensibilidad de la minisequenciación sobre ADNss comparada con la sensibilidad de la detección en un gel estándar del AFLP, se llevaron a cabo reacciones del AFLP utilizando números crecientes de nucleósidos selectivos para los 3 marcadores del AFLP (Figs. 6 y 7). Se aplicó minisequenciación para detectar los 3 marcadores del AFLP siguiendo el protocolo que se describe para la minisequenciación sobre el molde ss utilizando la bio-hebra.

Se utilizaron iniciadores del AFLP +6 como iniciadores de detección. Se observó que la complejidad máxima del molde dependía del marcador que iba a ser detectado; para el marcador 1 este fue el molde amplificado +6+4; para el marcador 2 este fue +6+4; para el marcador 3 este fue el molde amplificado +2+3. Esto implica un límite de detección de 10^{10} moléculas, lo cual es menos sensible que lo que es reivindicado para la detección sobre microdisposiciones en estudios de expresión génica (10^6 moléculas).

J. Minisequenciación sobre ADNds

Para poder incrementar la complejidad del molde y para simplificar el protocolo de minisequenciación, se llevó a cabo la minisequenciación sobre un molde ds utilizando un perfil para el ciclo de la PCR de dos etapas: una etapa de desnaturalización seguida por la etapa de alargamiento del iniciador; de esta forma se puede reutilizar el molde cada ciclo y se incrementa la cantidad de señal generada por el iniciador alargado (Fig. 8). Esta adaptación del protocolo es una etapa ahorradora de tiempo ya que no existe la necesidad de elaborar un molde monocatenario antes de la reacción de minisequenciación. Los iniciadores de la detección fueron marcados con biotina para purificar fácilmente los productos de reacción de la minisequenciación como una alternativa para los iniciadores de detección marcados con amino sobre un soporte sólido.

K. Detección en fase sólida de los productos de minisequenciación sobre placas de vidrio

Se exploró un protocolo para el enlazamiento covalente de aminoiniciadores 5' al vidrio (Guo y colaboradores, 1994), ya que hasta ahora las reacciones de minisequenciación sobre vidrio no fueron exitosas debido a muchos antecedentes. Se revisó el enlazamiento del iniciador por medio de marcación radioactiva de iniciadores con un grupo amino interno. Se observó que ocurría el enlazamiento. En una reacción de minisequenciación utilizando un oligo ss de 60-mer como molde, se observó que siguiendo el protocolo para la minisequenciación ss sin bio-hebra, se detectaron productos de reacción que dependen de la cantidad de molde ofrecido y dependen de la cantidad de oligo unido a la placa.

Se llevó a cabo una minisequenciación utilizando un molde amplificado +3+3 y utilizando un iniciador interno de detección siguiendo el protocolo para minisequenciación sobre el molde ds en tiras de vidrio en un tubo para PCR y se observó que se obtenían productos específicos.

L. Conclusiones

Se mejoró el protocolo de minisequenciación por medio del uso de ADNds y llevando a cabo minisequenciación en una cantidad de ciclos para incrementar la sensibilidad de detección del marcador. Se puede llevar a cabo ahora la minisequenciación sobre placas de vidrio, que es una etapa importante hacia la detección múltiplex del marcador del AFLP y de otros marcadores sobre chips. La sensibilidad actual es similar a la sensibilidad de detección del marcador en AFLP utilizando geles de poliacrilamida. Se anticipa que por medio del uso de nuevas microdisposiciones y de tecnología de chip se puede mejorar la sensibilidad de la detección.

Ejemplo 8

El desarrollo de un sistema de detección del marcador fluorescente del AFLP

1. Descripción de materiales biológicos

Los materiales biológicos utilizados son las líneas de arroz IR20 y 6383.

2. Preparación del molde del AFLP de EcoRI/MseI

Se prepararon los moldes del AFLP utilizando las enzimas de restricción EcoRI y MseI y se llevaron a cabo reacciones previas de amplificación de acuerdo con procedimientos estándar de escritos por Vos y colaboradores, (Nucleic Acids Research 23: no 21, páginas 4407-4414, 1995; y la solicitud de patente EP0534858).

Se llevaron a cabo reacciones finales de amplificación selectiva a partir de una mezcla para amplificación previa +1/+1 diluida 20 veces utilizando un iniciador selectivo +2 de EcoRI en combinación con un iniciador +3 de MseI.

Nombre del marcador del AFLP	Tamaño de la combinación del Iniciador (pares de bases)	Línea Madre
1. 1A1	E11/M48	571 IR20
2. 1A8	E11/M48	264 IR20
3. 1A11	E11/M48	187 IR20
4. 1B1	E11/M48	154 IR20
5. 1G6	E11/M49	342 6383

ES 2 298 139 T3

Se cortaron los marcadores 1 a 5 del AFLP, se los amplificó nuevamente y se los clonó. Se amplificaron las colonias y se elaboraron los moldes del AFLP, todo de acuerdo con los procedimientos estándar. Las reacciones de amplificación previa se llevaron a cabo utilizando un iniciador +0 de EcoRI en combinación con un iniciador +0 de MseI biotilado. Se purificó el ADN con Fosfatasa Alcalina de Camarón y Exonucleasa I como se mencionó en el Ejemplo 1.

Las secuencias de los adaptadores, los iniciadores de amplificación previa del AFLP y los iniciadores de amplificación (AFLP selectivo) utilizados fueron los siguientes:

10 Adaptador MseI:

92A 18: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

15

92A19: 3'-TACTCAGGACTCAT-5'

Iniciador del AFLP biotilado +0 de MseI:

20

93E40: *5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'

Iniciador del AFLP de amplificación previa del MseI + I:

25

M01: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'

Iniciadores del AFLP de amplificación selectiva del MseI +3:

30

M48: 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'

M49: 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'

Adaptador de EcoRI:

35

91 M35: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

91M36: CATCTGACGCATGGTTAA-5'

40

Iniciador del AFLP de amplificación previa de EcoRI + 0:

E00L: 5'-GTAGACTGCGTACCAATTC-3'

45

Iniciador del AFLP de amplificación previa de EcoRI + 1:

E01: 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'

50

Iniciador del AFLP de amplificación selectiva de EcoRI +2:

E11:5'-GACTGCGTACCAATTCAA-3'

55

3. *Oligosíntesis*

Se adquirieron los iniciadores de detección de minisequenciación de oligonucleótidos a MWG- Biotech GmbH. Ellos fueron modificados en el amino 5' y tienen una cola poli T de 15 nucleótidos en el extremo 5'.

60 Las secuencias de los oligonucleótidos son las siguientes:

99f41:5'-(T)15TGGCTGGCAACGAGCGACA-3

99f42: 5'-(T)15TTCACCCGCCGGTTAGTTTC-3

65

99f43: 5'-(T)15ACTGTCCGCTCTCGCATTCA-3

99f44:5'-(T)15GATCACGACATCACGTTGCG-3

99f45: 5'-(T)15ATTGCGAGCCACATCGTTCC-3

99f46: 5'-(T)15GGCCTGAAACGCTGGGTTG-3

5 99f47: 5'-(T)15TTTTCTCGGCTTTTCTTTCT-3

4. La preparación de las placas

10 Se utilizaron y procesaron las placas activadas con enlace en 3D (SurModics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se imprimieron los iniciadores de detección de miniselección de oligonucleótidos utilizando una microdisposición genética de microsistemas QMS417 en una concentración de 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (± 100 pmol/ μL) en fosfato de sodio 150 mM pH 8,5.

5. Miniselección

15 La miniselección sobre reacciones del AFLP ss se llevó a cabo de acuerdo con Syvänen y colaboradores, (1990, 1993) con las siguientes modificaciones. Se recolectaron los productos del AFLP biotinilado sobre cuentas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynal). Posteriormente, se llevó a cabo una miniselección sobre la hebra no biotinilada que podría ser separada de la hebra biotinilada por medio de ebullición y pipeteo del sobrenadante. La reacción de miniselección se llevó a cabo con 20 μL de la reacción ss del marcador 1A1 del AFLP en Tris-HCl 10 mM pH 9,5, KCl 50 mM, MgCl_2 20 mM, Tween-20 al 0,02%, 2 μL de FAM-ddATP 0,01 mM, 4,5 unidades de TermoSequenasa y agua hasta un volumen total de 40 μL . Se incubó la reacción durante 20 min a 55°C. Se lavaron luego las placas en Tris 40 mM pH 8,8, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, Tween-20 al 0,1%. Se escanearon las placas en el FITC y se utilizó un canal Cy-3 para 180 segundos utilizando un escáner de corrimiento de microarreglos Gentac 25 1000 (Genomic Solutions). Se muestra la imagen en la Figura 10.

6. Resultados

La Figura 10 muestra una sección de la placa con oligonucleótidos impresos en la siguiente forma:

30

		DUPLO									
		1	3	5	7	9	1	3	5	7	9
35	B	cntrl*	99f41	99f42	99f43	99f44	cntrl*	99f41	99f42	99f43	99f44
	D		99f45	99f46	99f47	cntrl*	99f45	99f46	99f47	cntrl*	cntrl*

(cntrl*= control: para determinar que las posiciones de los oligonucleótidos fueran, un control oligo con un grupo Cy-3 en 5' y se incluyó un grupo interno amino sobre la disposición.

45 El oligonucleótido 99f41 puede ser extendido por medio de ddATP si se utiliza del marcador 1A1 del AFLP ss. Se observa una señal fuerte sobre la posición B3 donde está colocado el oligo 99f41 después de la extensión por medio de miniselección con FAM ddATP. En el duplo se observa también la señal fuerte. Las manchas en B1 y D9 son las manchas del control positivo.

7. Conclusión

50 Este ejemplo demuestra la detección específica de un marcador del AFLP por medio de miniselección sobre una disposición que contiene iniciadores de detección de miniselección para 7 marcadores diferentes del AFLP utilizando un fragmento único del marcador del AFLP ss.

Ejemplo 9

55 *El desarrollo de un sistema de detección del marcador radiactivo del AFLP sobre un microchip*

1. Miniselección

60 El material biológico, la preparación del molde, la Oligosíntesis y la preparación de las placas es según se describe en el Ejemplo 9. La miniselección sobre fragmentos del AFLP ss se llevó a cabo de acuerdo con Syvänen y colaboradores, (1990, 1993) con las siguientes modificaciones. Se recolectaron los productos del AFLP biotinilado sobre cuentas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynal). Posteriormente, se llevó a cabo una miniselección sobre la hebra no biotinilada que podría ser separada de la hebra biotinilada por medio de ebullición y pipeteo del sobrenadante.

65 La reacción de miniselección se llevó a cabo con 1,25 μL de la reacción ss del marcador 1A8 del AFLP, 1,25 μL de reacción del marcador 1A11, 1,25 μL de reacción del marcador 1B1 y 1,25 μL de reacción del marcador 1G6 en Tris-HCl 10 mM pH 9,5, KCl 50 mM, MgCl_2 20 mM, Tween-20 al 0,02%, 0,42 μL de ddATP marcado con ^{33}P

(Amersham), 4,5 unidades de ThermoSequenasa y agua hasta un volumen total de 40 μ L. Se incubó la reacción durante 20 min a 55°C. Se lavaron luego las placas en Tris 40 mM pH 8,8, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, Tween-20 al 0,1%. Se expusieron las placas a placas para imágenes sobre fósforo de Fuji durante 16 horas. Se visualizan los patrones utilizando un sistema analizador de imágenes sobre fósforo BAS-2000 de Fuji. Se observa la imagen de la reacción de minisequenciación en la Figura 11.

2. Resultados

La Figura 11 muestra una sección de la placa que contiene los mismos oligonucleótidos descritos en el Ejemplo 9. Se pueden extender los oligonucleótidos 99f42, 99f44 y 99f45 con ddATP si se utilizan respectivamente la reacción 1A8, 1A11 y 1B1 del AFLP ss. Se observan señales fuertes en la posición B5 donde está colocado el oligo 99f42, en la posición B9 donde está colocado el oligo 99f44 y en la posición D3 donde está colocado el oligo 99f45. En el duplo también se observan señales fuertes.

El molde 1G6 del AFLP ss tenía una señal fuerte sobre otra sección de la placa (no mostrada).

3. Conclusión

Este ejemplo demuestra la detección específica de los 3 marcadores del AFLP por medio de minisequenciación sobre una disposición que contiene a los iniciadores de detección de minisequenciación para 7 marcadores diferentes del AFLP utilizando una mezcla de 4 fragmentos diferentes del marcador del AFLP ss.

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 0534858 A1 [0009]
- WO 9727317 A [0010] [0010] [0051] [0066] [0073] [0073] [0075] [0085] [0085] [0085] [0085]
- WO 9722720 A [0010] [0051] [0052] [0058] [0060] [0062] [0066] [0073] [0085] [0085]
- WO 9743450 A [0010] [0051] [0066] [0073] [0085] [0085]
- EP 0799897 A [0010] [0051] [0066] [0073] [0085] [0085]
- EP 0785280 A [0010]
- WO 9731256 A [0010] [0051] [0073] [0085] [0085]
- WO 9808083 A [0010] [0073] [0085] [0085] [0086]
- WO 9325563 A [0010]
- WO 9631622 A [0010]
- WO 9905321 A [0010]
- WO 9009455 A [0011] [0068] [0074] [0076] [0078]
- WO 9102087 A [0011] [0068] [0074] [0076] [0078]
- WO 9113075 A [0011] [0068] [0074] [0076] [0078]
- WO 9215712 A [0011] [0068] [0074] [0076] [0078]
- EP 0123513 A [0011] [0068] [0074] [0076] [0078]
- EP 0534858 A [0015] [0018] [0018] [0032] [0094] [0099] [0125]
- EP 0976835 A [0018] [0094]
- EP 0974672 A [0018] [0038] [0094]

- WO 9830721 A [0020] [0021]
- EP 0721987 A [0032]
- 5 • US 5427779 A [0051] [0058]
- US 4973493 A [0058]
- US 4979959 A [0058]
- 10 • US 5002582 A [0058]
- US 5217492 A [0058]
- 15 • US 5525041 A [0058]
- US 5263992 A [0058]
- WO 9746313 A [0058] [0059] [0062]
- 20 • WO 9210092 A [0066]
- WO 951195 A [0066]
- 25 • US 5424186 A [0066]

Literatura citada en la descripción que no es de patente

- **SYVÄNEN**. *Human Mutation*, 1999, vol. 13, 1-10 [0011]
- 30 • **VOS** y colaboradores, *Nucleic Acid Research*, 1995, vol. 23 (21), 4407-4414 [0015]
- **SAMBROOK** y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory manual*. 1989 [0066]
- 35 • Guide to Molecular Cloning Techniques. **BERGER; KIMMEL**. *Methods in Enzymology. Academic Press Inc*, 1987, vol. 152 [0066]
- **YOUNG; DAVIS**. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*, 1983, vol. 80, 1194 [0066]
- 40 • Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Hybridization with Nucleic Acid Probes. *Elsevier*, 1993, vol. 24 [0066]
- **VOS** y colaboradores, *Nucleic Acids Research*, 1995, vol. 23 (21), 4407-4414 [0099] [0125]
- 45 • **SYVÄNEN** y colaboradores, *Genomics*, 1990, vol. 8, 684-692 [0102]
- **SYVÄNEN** y colaboradores, *Am.J.Hum.Genet.*, 1993, vol. 52, 46-59 [0102]
- 50 • **CHEN** y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 10756-10761 [0102]
- **GUO** y colaboradores, *Nucleic Acids Research*, 1994, vol. 22 (24), 5456-5465 [0104]

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para analizar una mezcla de redacción del AFLP por la presencia o la ausencia de fragmentos de restricción objetivo en una mezcla de fragmentos de restricción, utilizando secuencia de oligonucleótidos que son específicas cada una únicamente para un fragmento de restricción objetivo, dicho método comprendiendo las etapas de:

10 a) poner en contacto una mezcla de reacción del AFLP con al menos tres secuencias de oligonucleótidos bajo condiciones de hibridación, de tal manera que cuando están presentes los fragmentos de restricción objetivo, se forman híbridos entre los fragmentos de restricción objetivo y las secuencias de oligonucleótidos, de tal manera que los híbridos resultantes tengan al menos un nucleótido desapareado del fragmento de restricción objetivo directamente adyacente al extremo 3' de la secuencia del oligonucleótido;

15 b) añadir al menos un nucleótido marcado o un análogo de nucleótido, a la mezcla resultante de la etapa a), bajo condiciones adecuadas para la extensión de los oligonucleótidos, para que cuando dichos híbridos estén presentes se extienden los oligonucleótidos con el oligonucleótido marcado o el análogo de nucleótido;

20 c) detectar la presencia o la ausencia de cualquier híbrido con un nucleótido marcado añadido o análogo de nucleótido, y/o de cualquier secuencia de oligonucleótido con un nucleótido marcado añadido o análogo de nucleótido.

25 2. Método de acuerdo a la reivindicación 1, en donde cada uno de dichos oligonucleótidos tiene al menos un 90% de homología de secuencia con la parte del fragmento de restricción objetivo para la cual es específico el oligonucleótido.

30 3. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde durante la etapa b) se extienden las secuencias de oligonucleótido por medio de un nucleótido único marcado o análogo de nucleótido.

35 4. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde durante la etapa a), se pone en contacto la mezcla de reacción del AFLP simultáneamente al menos con 10, más preferiblemente al menos con 50, lo más preferible al menos con 100 secuencias diferentes de oligonucleótidos, en donde cada secuencia de oligonucleótido es específica únicamente para un fragmento de restricción objetivo.

40 5. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las secuencias de oligonucleótido tienen un tamaño aproximadamente 10 a 100 pares de bases, preferiblemente aproximadamente de 20 a 50 pares de bases, y opcionalmente contienen una "cola", tal como una secuencia poliT.

45 6. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las secuencias de oligonucleótido se inmovilizan sobre un soporte sólido, preferiblemente en la forma de una disposición.

50 7. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la mezcla de redacción del AFLP se obtiene/es obtenible por medio del ADN de restricción con al menos una, y preferiblemente con dos enzimas de restricción, y más preferiblemente con al menos una enzima de restricción cortadora rara y al menos una enzima de restricción frecuente, seguido opcionalmente por ligación del adaptador y amplificación de los tratamientos de restricción.

55 8. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde después de restricción, pero antes de la etapa a), se ha amplificado la mezcla de reacción del AFLP utilizando iniciadores del AFLP.

60 9. Método de acuerdo a la reivindicación 8, en donde la mezcla de reacción del AFLP ha sido amplificada utilizando iniciadores del AFLP que comprende uno o más nucleótidos selectivos en el extremo 3'.

65 10. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el fragmento de restricción objetivo corresponde a un marcador del AFLP.

11. Método de acuerdo a la reivindicación 1, en donde se utilizan los mismos amortiguadores de reacción, concentración de sal, temperatura y duración de la reacción para la hibridación de la etapa a) y para la extensión del oligonucleótido de la etapa b).

12. Método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la etapa b) se llevan a cabo poniendo en contacto a dichos híbridos con una mezcla de reacción que comprende un nucleótido marcado o análogo de nucleótido que es complementario únicamente con uno entre A, T, C o G.

Fig 1a

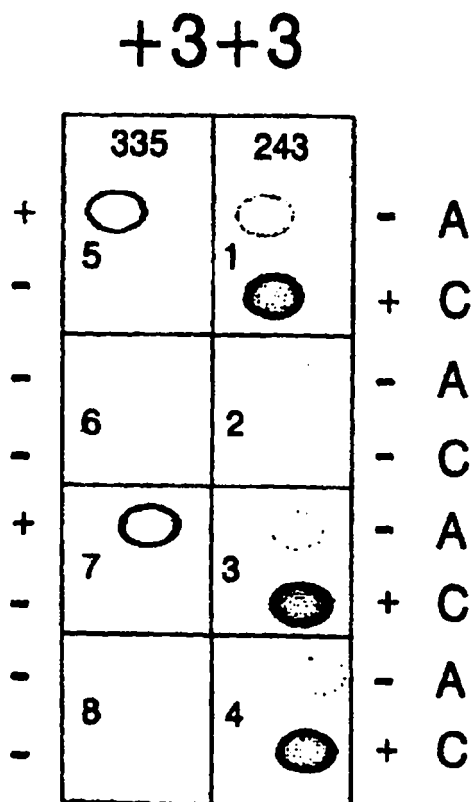


Fig 1b

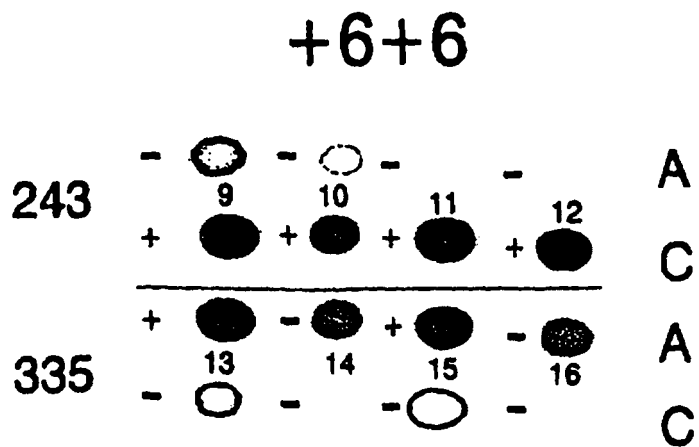


Fig 2

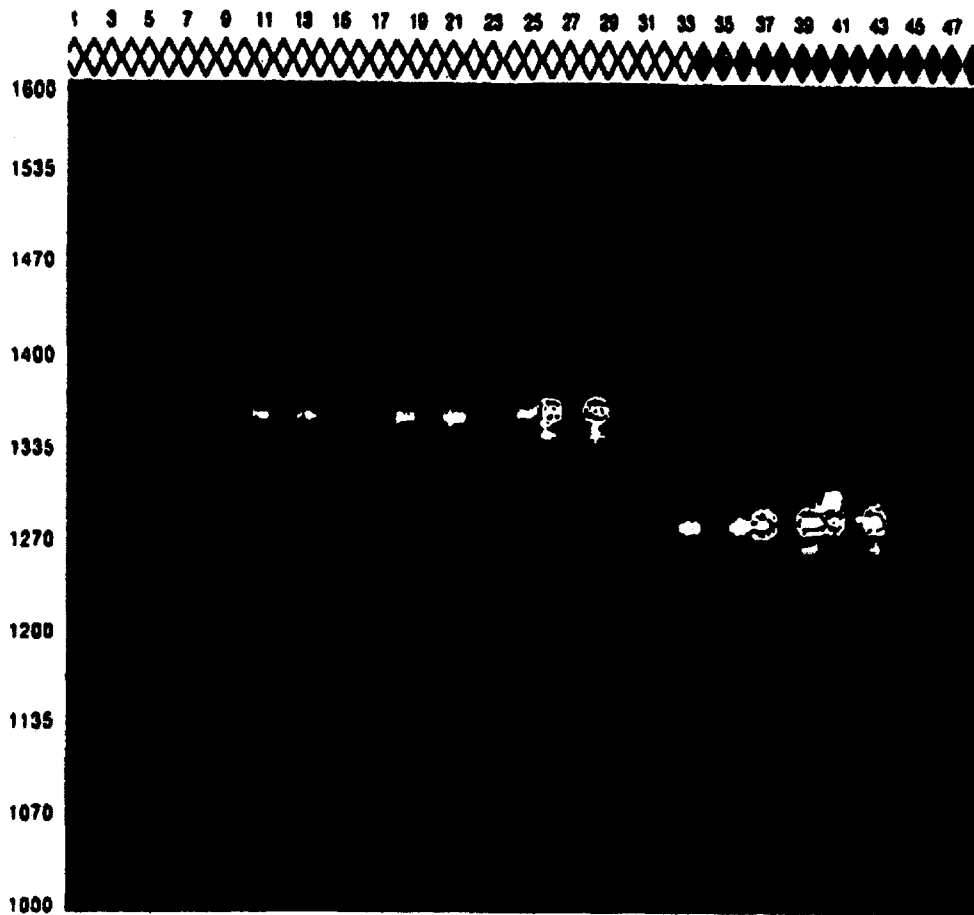


Fig 3a

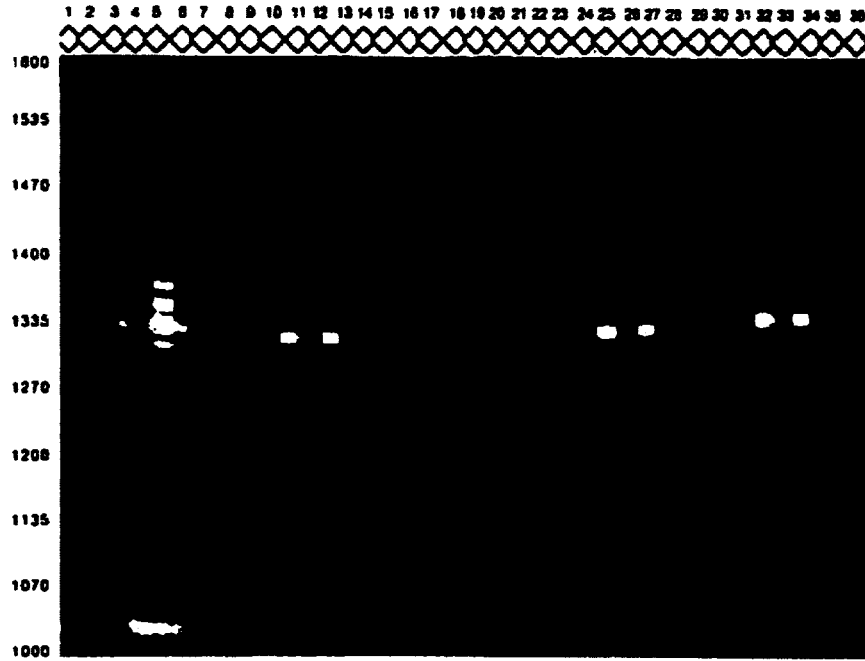


Fig 3b

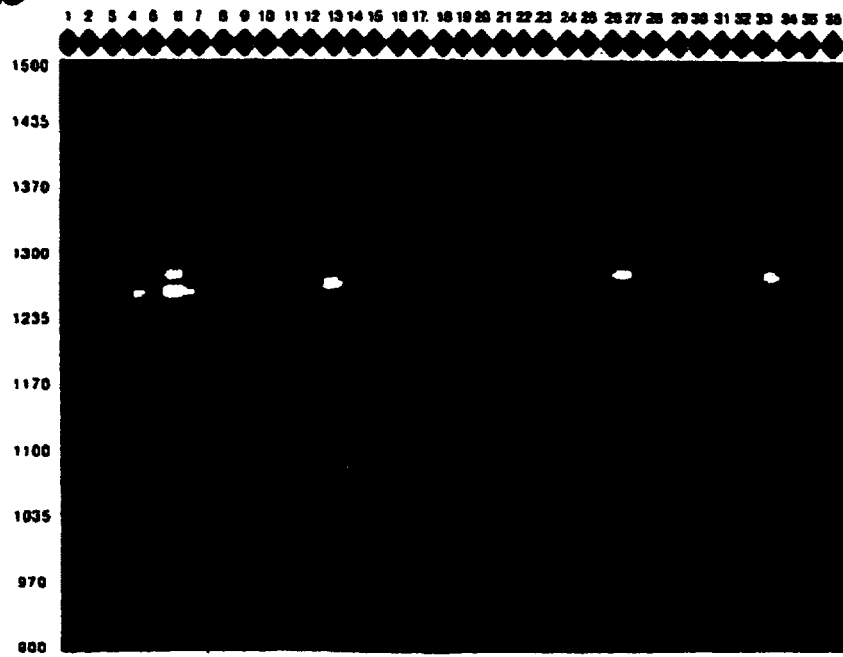


Fig 4

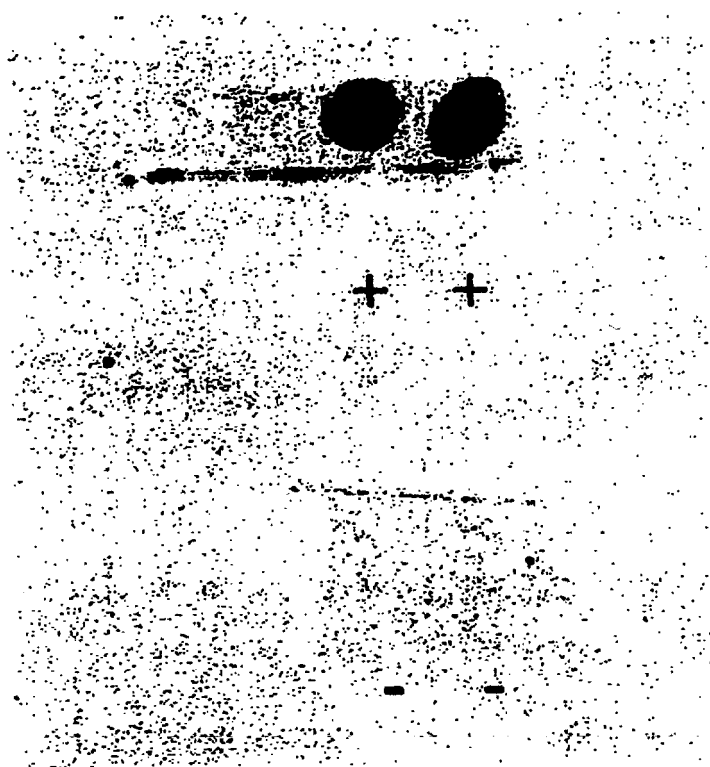


Fig 5b

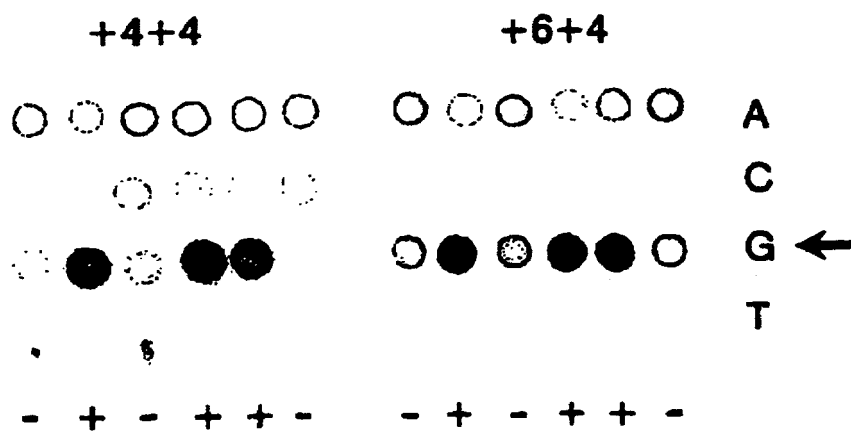


Fig 5a

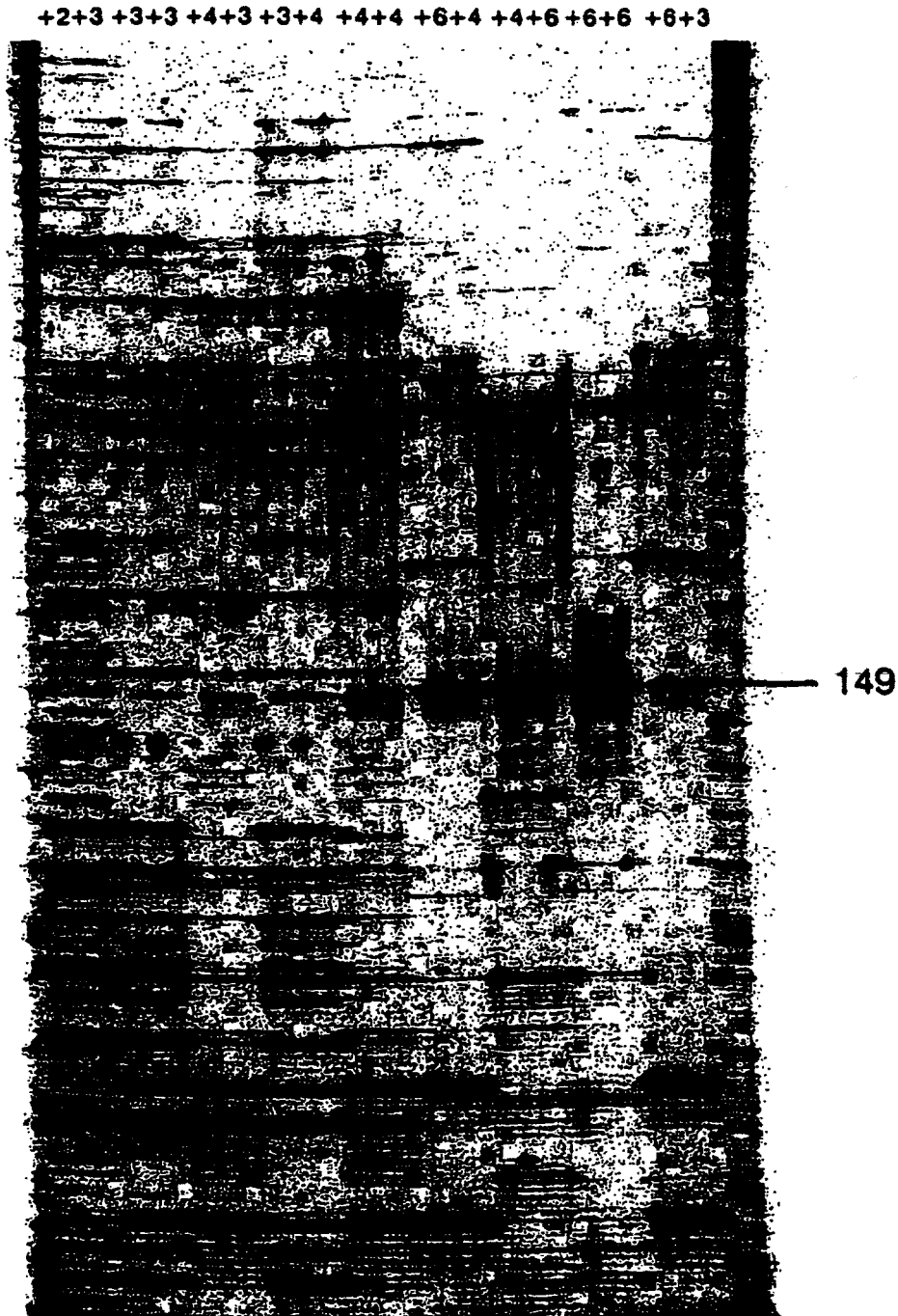


Fig 6

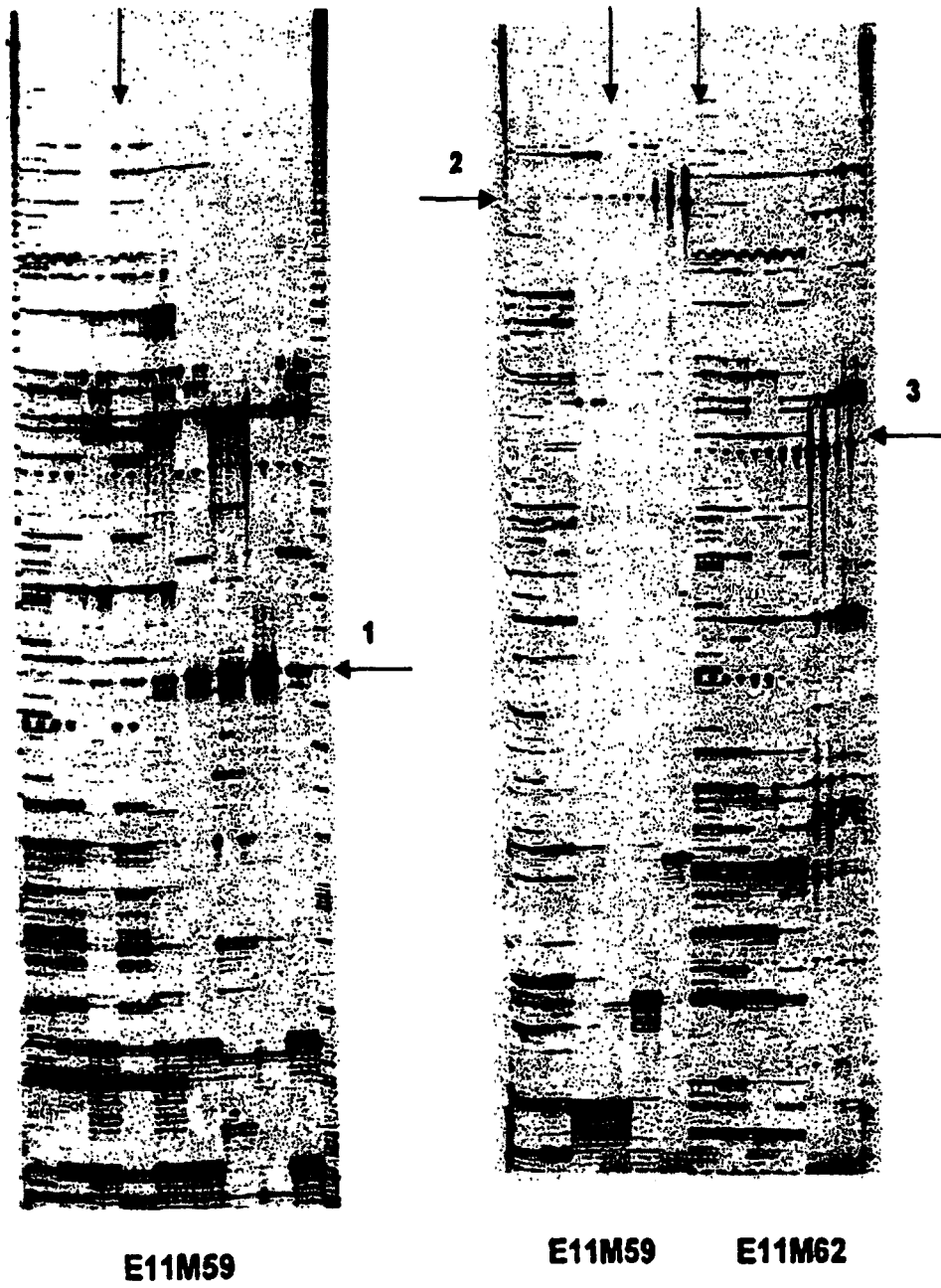


Fig 7

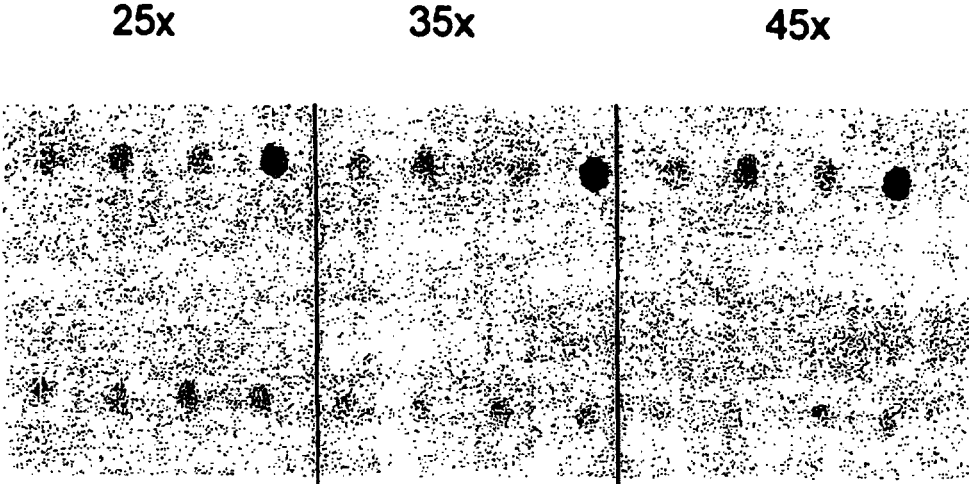


Fig 8

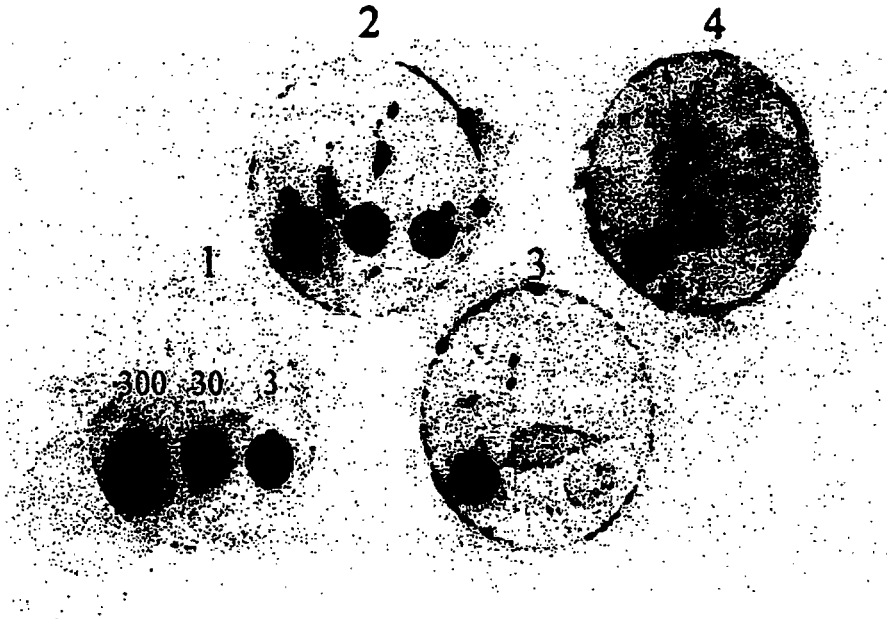


Fig 9

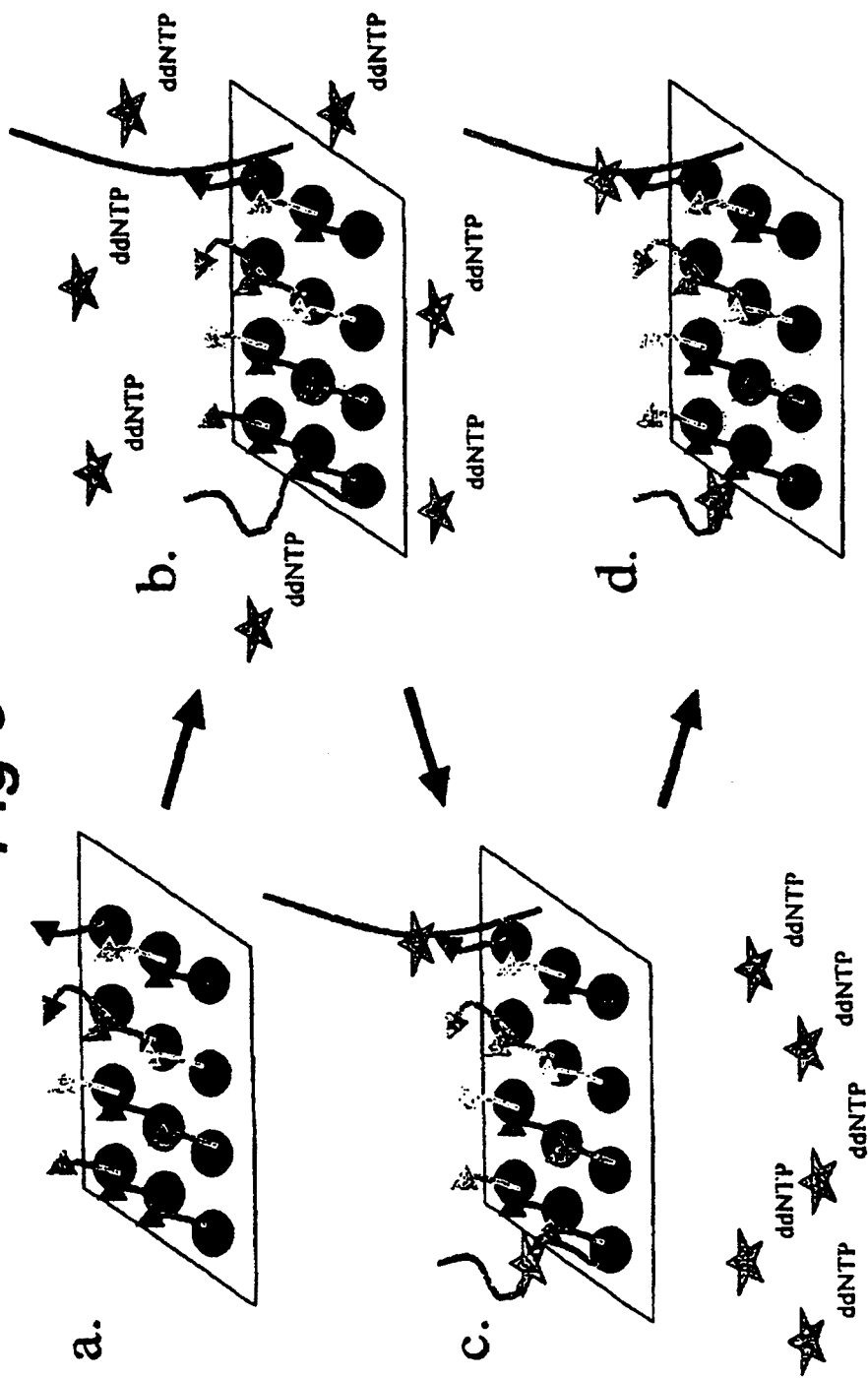
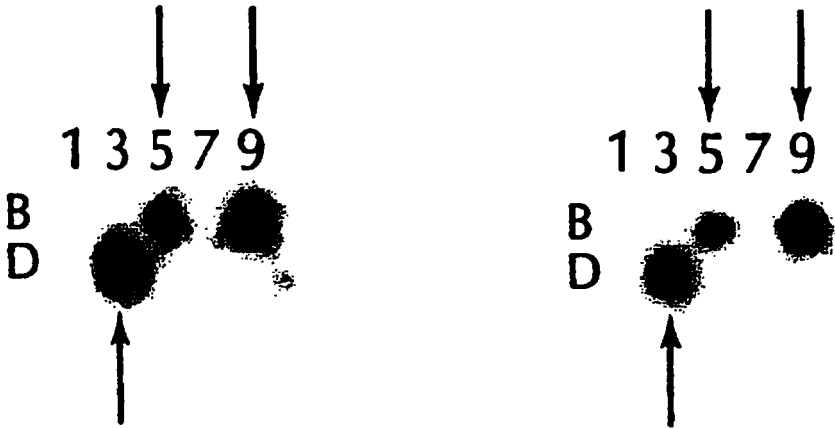


Fig 10



Fig 11



ES 2 298 139 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Keygene N.V.	
5	<120> Método para el análisis de mezclas de reacción del AFLP utilizando técnicas de extensión del iniciador	
	<130> BO 43583	
	<140> PCT	
	<141> 2000-04-10	
10	<160> 25	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
	<210> 1	
	<211> 16	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador	
	<400> 1	
25	gactgcgtac caattc	16
	<210> 2	
	<211> 16	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador	
35	<400> 2	
40	gatgagtcct gagtaa	16
	<210> 3	
	<211> 22	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador	
50	<400> 3	
	agcagtagca accactcag cc	22
55	<210> 4	
	<211> 17	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador	
65	<400> 4	
	atccggccag ttatacc	17

ES 2 298 139 T3

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador
10 <400> 5
agcagtagca accacttcag cc 22
15 <210> 6
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador
25 <400> 6
atccggccag ttatacc 17
30 <210> 7
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
35 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador
40 <400> 7
tagcagtagc aaccacttca gcc 23
45 <210> 8
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
50 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: adaptador
55 <400> 8
gacgatgagt cctgag 16
60 <210> 9
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
65 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: adaptador

ES 2 298 139 T3

	<400> 9	
	tactcaggac tcat	14
5	<210> 10	
	<211> 16	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador	
15	<400> 10	
	gatgagtcct gagtaa	16
20	<210> 11	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador	
30	<400> 11	
	gatgagtcct gagtaac	17
35	<210> 12	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador	
45	<400> 12	
	gatgagtcct gagtaaac	19
50	<210> 13	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador	
60	<400> 13	
	gatgagtcct gagtaacag	19
65	<210> 14	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 298 139 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: adaptador	
5	<400> 14	
	ctcgtagact gegtacc	17
10	<210> 15	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: adaptador	
	<400> 15	
20	aattggtacg cagtctac	18
	<210> 16	
25	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador	
	<400> 16	
35	gtagactgcg taccaattc	19
	<210> 17	
40	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador	
	<400> 17	
50	gactgcgtac caattca	17
	<210> 18	
	<211> 18	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: iniciador	
	<400> 18	
65	gactgcgtac caattcaa	18
	<210> 19	
	<211> 20	

ES 2 298 139 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido	
	<400> 19	
10	ttggctggca acgagcgaca	20
	<210> 20	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido	
	<400> 20	
25	ttcacccgc cggtagttt c	21
	<210> 21	
	<211> 21	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido	
35	<400> 21	
40	tactgtccgc tctcgattc a	21
	<210> 22	
	<211> 21	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido	
50	<400> 22	
55	tgatcacgac atcacgttgc g	21
	<210> 23	
	<211> 21	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido	
65	<400> 23	
	tattgcgagc cacatcgttc c	21

ES 2 298 139 T3

	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido	
10	<400> 24	
	tggcctgaaa cgctgggttg	20
15	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: oligonucleótido	
25	<400> 25	
	ttttctcgg cttttcttc t	21
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		