



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 939**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01975189 .0**

96 Fecha de presentación : **06.09.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1366187**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2003**

54 Título: **Oligonucleótidos para marcar sondas oligonucleotídicas y proteínas.**

30 Prioridad: **15.09.2000 US 233177 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **VENTANA MEDICAL SYSTEMS, Inc.**
1910 Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755, US

72 Inventor/es: **Utermohlen, Joseph, G. y**
Connaughton, John

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

ES 2 317 939 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

Oligonucleótidos para marcar sondas oligonucleotídicas y proteínas.

5 1. Campo de la invención

Esta invención se refiere a sondas oligonucleotídicas y colecciones de sondas oligonucleotídicas para detectar o localizar dianas génicas de ácido nucleico dentro de una muestra celular o tisular. En particular, la invención se refiere a colecciones de oligosondas.

10 2. Antecedentes de la invención

El análisis *in situ* incluye hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. La hibridación *in situ* (ISH) emplea moléculas sonda de ADN o ARN marcadas que son anti-sentido para una secuencia génica diana o transcrito para detectar o localizar genes diana de ácido nucleico diana dentro de una muestra celular o tisular. Se ha demostrado que la ISH es una herramienta útil en varios campos biomédicos, incluyendo biología del desarrollo, biología celular, y biología molecular. La ISH se ha usado, por ejemplo, para diagnosticar trastornos genéticos, mapear genes, estudiar la expresión génica, y localizar sitios de expresión de genes diana.

Típicamente, la ISH se realiza exponiendo una muestra celular o tisular inmovilizada sobre un portaobjetos de vidrio a una sonda de ácido nucleico marcada que es capaz de hibridar específicamente con un gen diana dado en la muestra celular o tisular (*In Situ Hybridization: Medical Applications* (G. R. Coulton y J. de Belleruche, eds., Kluwer Academic Publishers, 1992); *In Situ Hybridization: In Neurobiology: Advances in Methodology* (J. H. Eberwine, K. L. Valentino, y J. D. Barchas, eds., Oxford University Press, 1994); *In Situ Hybridization: A Practical Approach* (D. G. Wilkinson, ed., Oxford University Press, 1992)). La hibridación de moléculas sonda marcadas con ácidos nucleicos en la muestra celular o tisular después puede detectarse usando, por ejemplo, métodos de detección directa basada en radiactividad, métodos de detección directa basada en fluorescencia, o métodos de detección indirecta basados en la unión de una proteína marcada con fluorescencia que se une a un hapteno tal como BrdU, nucleótidos marcados con digoxigenina o marcados con biotina incorporados en sondas. Los métodos basados en haptenos se han ampliado adicionalmente para que incluyan aquellas moléculas a unir por conjugados proteína-enzima de unión tales como conjugados anticuerpo-enzima y química de detección basada en colorimetría. Además, pueden analizarse varios genes diana simultáneamente exponiendo una muestra celular o tisular a una pluralidad de sondas de ácido nucleico que se ha marcado con una pluralidad de diferentes marcas de ácido nucleico. Por ejemplo, puede marcarse una pluralidad de sondas de ácido nucleico con una pluralidad de compuestos fluorescentes que tienen diferentes longitudes de onda de emisión, permitiendo de este modo el análisis multicolorado simultáneo a realizar en una única etapa sobre una única muestra celular o tisular diana.

Un problema significativo asociado con la incorporación de nucleótidos marcados en sondas oligonucleotídicas es que los restos de conjugación que se unen al nucleótido habitualmente impiden la formación de apareamiento de bases de Watson-Crick, afectando de este modo de forma negativa a la hibridación de la sonda con su diana. Esto se ha observado con el uso de marcadores unidos mediante nucleótidos citosina N4-sustituidos, a causa del impedimento estérico y el desplazamiento esperado al estado menos reactivo de una amina secundaria (como se observa con citosina N4 marcada), en comparación con el enlace G-C natural formado con una citosina no sustituida (una amina primaria). Cualquier pequeño cambio o interferencia con la unión G-C en un pequeño oligonucleótido (de 25 a 50 bases) puede reducir la capacidad de estos oligos de hibridar con la secuencia diana pretendida.

Sigue existiendo la necesidad en la técnica de desarrollar diseños de sondas adecuadas para incorporar nucleótidos marcados en sondas oligonucleotídicas. Se demuestra que unas pocas secuencias artificiales son alternativas viables para el marcaje de sondas y también funcionan tanto individualmente como en mezclas de sondas oligonucleotídicas complejas para detectar o localizar genes diana de ácido nucleico dentro de una muestra celular o tisular. El desarrollo de dichas secuencias genéricas y la estrategia de marcaje para colecciones de sondas tienen amplia aplicación en las técnicas médica, genética, y de biología molecular.

Esta interferencia debida a la química de marcaje y la rigurosidad y la cinética de hibridación se resuelve en este documento diseñando el oligo para que tenga al menos dos dominio funcionales distintos, un dominio o secuencia que sea específico de gen y esté implicado en la formación de pares de bases, y el segundo dominio que sea una secuencia artificial, no específica (con referencia al genoma de la muestra) comprendido de nucleótidos espaciados y el nucleótido marcado. Estos elementos se posicionan de tal modo que estos oligonucleótidos marcadores son más accesibles como haptenos para las proteínas de unión (inmunoglobulina(s) o avidina(s)) y por tanto no impiden el apareamiento de bases de Watson-Crick en el dominio específico de gen.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una nueva estrategia para incorporar un marcador en sondas oligonucleotídicas y colecciones de sondas oligonucleotídicas marcadas para detectar o localizar genes diana de ácido nucleico dentro de una muestra celular o tisular. En particular, la presente invención proporciona sondas oligonucleotídicas sintéticas caracterizadas en las reivindicaciones. La invención se refiere a secuencias no específicas de gen usando fórmulas de secuencia para hacer polímeros repetitivos de dichas secuencias que pueden incorporarse en colecciones de sondas

oligonucleotídicas para su uso en análisis de hibridación *in situ*. Además, el uso de polímeros oligonucleotídicos sintéticos marcados, basados en fórmulas de secuencia, cuando se conjugan con proteínas de unión, es decir inmunoglobulinas, es un proceso muy eficaz y controlado para marcar dichas proteínas usadas en análisis inmunohistoquímico. La presente invención proporciona colecciones o "cócteles" de sondas oligonucleotídicas para detectar o localizar genes diana de ácido nucleico específicos dentro de una muestra celular o tisular. El cóctel es útil para detectar el gen Kappa (SEC ID N° 1-16 inclusive).

La invención también se refiere a un conjunto de sondas para detectar el ARNm de cadena ligera de la inmunoglobulina Kappa o ARN heteronuclear correspondiente donde las sondas se seleccionan entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 401 a 416, inclusive.

Las realizaciones preferidas específicas de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de ciertas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra una estructura de sonda genérica del diseño de sonda de dos dominios. Este es el diseño de oligonucleótido usado para las sondas en los cócteles específicos de gen descritos en los siguientes ejemplos. Cada sonda está compuesta por dos dominios: un dominio de marcaje 5' y un dominio específico de gen diana 3'. El dominio de marcaje consta de esta secuencia específica (CTATTTT)_n, donde cada citosina puede estar marcada con un fluoróforo o un conjugado citosina-hapteno, siendo el hapteno fluoresceína en esta realización. Esta ilustración muestra específicamente las secuencias de ácido nucleico para las sondas 301 (SEC ID N° 55) y 302 (SEC ID N° 56), cada una de las cuales tiene dominios específicos del gen diana correspondientes a secuencias Alu repetitivas humanas y dominios de marcaje que tienen un hapteno fluoresceína.

La Figura 2 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de hibridación *in situ* (ISH) de tejido cutáneo humano usando una sonda que comprende el dominio de marcaje (sonda 330; SEC ID N° 58). La ausencia de una señal detectable indica que la fórmula de secuencia, (CTATTTT)_n, del dominio de marcaje común a los oligonucleótidos usados en estos ejemplos de ISH es no específica, y no reactiva en su capacidad de formar apareamientos de bases de Watson-Crick con secuencias de ácido nucleico humanas porque no hibridan.

La Figura 3 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido cutáneo humano usando una sonda que comprende el dominio de marcaje y un dominio específico de gen diana poli d(T) (sonda 320; SEC ID N° 57). La presencia de una señal detectable localizada en el citoplasma indica que esta sonda es capaz de hibridar específicamente con la región poliadenilada del ARN mensajero.

Las Figuras 4A-4B ilustran los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido cutáneo humano usando la sonda 320, donde la muestra tisular no se trató con ribonucleasa A antes de la hibridación *in situ* (A), o se trató con ribonucleasa A antes de la hibridación *in situ* (B). La disminución en la señal detectable en (B) indica que esta sonda hibrida específicamente con la región poliadenilada común al ARN mensajero.

Las Figuras 5A-5B ilustran los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido esplénico humano usando la sonda 320, donde la hibridación y el lavado riguroso se realizaron a temperatura ambiente (A), o a 37°C (B). Este resultado ilustra que la intensidad de color está relacionada con la rigurosidad de las condiciones de hibridación, indicando el color más intenso condiciones menos rigurosas.

La Figura 6 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de la línea celular Raji humana usando la sonda 320. Esto muestra que este diseño de sonda también es funcional con líneas celulares embebidas así como tejido embebido.

La Figura 7 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de la línea celular Raji humana usando una colección de sondas compuesta por las sondas 301 y 302.

La Figura 8 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de la línea celular HT humana usando una colección de sondas compuesta por las sondas 301 y 302.

La Figura 9 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de una línea celular de rata usando una colección de sondas compuesta por las sondas 301 y 302. La ausencia de una señal detectable indica que esta colección de sondas es específica para secuencias de ácido nucleico humanas.

La Figura 10 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de una línea celular HT humana negativa al virus Epstein-Barr (EBV) usando una sonda que tiene un dominio específico de gen diana correspondiente al ARN nuclear de EBER de EBV [SEC ID N° 51 a SEC ID N° 54].

La Figura 11 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido esplénico humano usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ADN nuclear de EBER 1 y 2 de EBV [SEC ID N° 51 a SEC ID N° 54].

La Figura 12 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido de amígdala humano usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARN nuclear de EBER 1 y 2 de EBV [SEC ID N° 51 a SEC ID N° 54].

Las Figuras 13A-13B ilustran los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido esplénico humano usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARN nuclear de EBER 1 y 2 de EBV [SEC ID N° 51 a SEC ID N° 54], donde la muestra tisular no se trató con ribonucleasa A antes de la hibridación *in situ* (A), o se trató con ribonucleasa A antes de la hibridación *in situ* (B). La disminución en la señal detectable en (B) indica que esta sonda hibrida específicamente con el ARN nuclear de EBER 1 y EBER 2 humano.

La Figura 14 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido de amígdala humano positivo a la cadena ligera kappa usando una sonda que tiene un dominio específico de gen diana correspondiente al ARNm de cadena ligera lambda de inmunoglobulina humana [SEC ID N° 15].

La Figura 15 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejidos de linfoma usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARNm de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana [SEC ID N° 2 - 4, SEC ID N° 7 - 12, SEC ID N° 14, 15]. El tejido de linfoma en (A) sobre-expresa la cadena ligera kappa y el tejido en (B) sobre-expresa la cadena ligera lambda. La ausencia de una señal detectable en (B) indica que la colección de sondas de cadena ligera kappa es específica para el ARNm de cadena ligera kappa.

La Figura 16 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido de amígdala humano positivo a la cadena ligera lambda usando una sonda que tiene un dominio específico de gen diana correspondiente al ARNm de la región variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina humana [SEC ID N° 19 a 29].

La Figura 17 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de una línea celular RPMI 8226 humana positiva a la cadena ligera lambda usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARNm de cadena ligera lambda de inmunoglobulina humana [SEC ID N° 19 a 29].

Las Figuras 18A-18B ilustran los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido esplénico humano usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARNm de cadena ligera lambda de inmunoglobulina humana [SEC ID N° 19 a 29]. El tejido en (A) sobre-expresa la cadena ligera lambda y el tejido en (B) sobre-expresa la cadena ligera kappa. La ausencia de una señal detectable en (B) indica que la colección de sondas de cadena ligera lambda es específica para el ARNm de cadena ligera lambda humana.

La Figura 19 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido pulmonar humano positivo a citomegalovirus (CMV) usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARN temprano inmediato de CMV [SEC ID N° 30 - 32, SEC ID N° 34 - 35, SEC ID N° 38, SEC ID N° 50]. [*célula infectada por CMV*]

La Figura 20 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de una línea celular 9G de rata en que la expresión del ARN temprano inmediato de CMV no se ha inducido por ciclohexamida usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARNm temprano inmediato de CMV [SEC ID N° 30 - 32, SEC ID N° 34 - 35, SEC ID N° 38, SEC ID N° 50].

Las Figuras 21A-21B ilustran los resultados obtenidos para el análisis de ISH de una línea celular 9G de rata en que la expresión del ARN temprano inmediato de CMV se ha inducido por ciclohexamida usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARN temprano inmediato de CMV [SEC ID N° 30 - 32, SEC ID N° 34 - 35, SEC ID N° 38, SEC ID N° 50]. El tejido en (A) se muestra a un aumento de 40X y el tejido en (B) se muestra a un aumento de 20X.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención proporciona sondas oligonucleotídicas y colecciones de sondas oligonucleotídicas para detectar o localizar genes diana de ácido nucleico dentro de una muestra celular o tisular. En particular, la invención se refiere a colecciones de sondas oligonucleotídicas para su uso en análisis de hibridación *in situ*.

Más específicamente, esta invención se refiere al uso de fórmulas de secuencia específicas para polímeros nucleotídicos o dominios marcadores para unir un resto detectable (un marcador) a sondas oligonucleotídicas o proteínas. La utilidad específica de estas secuencias o derivados de las mismas, es la característica inerte o no reactiva que no hibrida con ADN o ARN humano a un nivel detectable en condiciones de hibridación de rigurosidad convencional. Se demostró que estos dominios marcadores o polímeros eran secuencias genéricas útiles para la incorporación en sondas oligonucleotídicas para detectar secuencias específicas de gen dentro de muestras celulares o tisulares en análisis de hibridación *in situ*. Además, este conjunto inerte de secuencias es útil para unir un marcador a inmunoglobulinas u otras proteínas para detectar haptenos y antígenos en análisis inmunohistoquímicos.

Como se usa en este documento, los términos “sonda” o “sonda oligonucleotídica” se refieren a una molécula de ácido nucleico usada para detectar un gen diana de ácido nucleico complementario.

Como se usa en este documento, el término “hibridación” se refiere al proceso por el que secuencias de ácido nucleico complementarias se unen para formar una molécula de ácido nucleico bicatenaria. Marcando la molécula de ácido nucleico diana con, por ejemplo, una marca radiactiva o fluorescente, pueden detectarse las interacciones entre la sonda y los genes diana.

Las sondas oligonucleotídicas y las sondas oligonucleotídicas de las colecciones de la presente invención se sintetizan usando métodos convencionales. Véase, por ejemplo, *Methods in Molecular Biology*, Vol 20: *Protocols for Oligonucleotides and Analogs* 165-89 (S. Agrawal, ed., 1993); *Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach* 87-108 (F. Eckstein, ed., 1991).

En una realización preferida de la presente invención, las sondas oligonucleotídicas tienen dos dominios distintos: un dominio 5' (o de marcaje) y un dominio 3' (o diana específico de gen) (Véase la Figura 1A). En realizaciones más preferidas de la presente invención, la sonda oligonucleotídica tiene un dominio de marcaje que consta de la secuencia (CTATTTT)_n. También se muestran otras realizaciones en este documento, que incluyen una realización de triple dominio que tiene dos dominios de marcaje terminales, y un dominio diana específico de gen central. Específicamente, las SEC ID N° 125 - 126 representan este esquema de marcaje. Las sondas oligonucleotídicas de la presente invención se marcan de tal manera que la hibridación entre dichas sondas y ácidos nucleicos diana en una célula o tejido particular pueda detectarse. Los marcadores que son aceptables para su uso en análisis de hibridación *in situ* (ISH) son conocidas para los especialistas en la técnica. Dichos marcadores permiten interacciones entre las sondas y los genes diana a detectar usando, por ejemplo, métodos de detección directa basados en radiactividad, métodos de detección directa basados en fluorescencia, sondas marcadas con digoxigenina o marcadas con biotina acopladas con métodos de detección basados en fluorescencia, o sondas marcadas con digoxigenina o marcadas con biotina acopladas con métodos de detección basados en anticuerpos-enzimas. En realizaciones preferidas de la presente invención, las sondas oligonucleotídicas se marcan con fluoresceína. En realizaciones más preferidas de la presente invención, la sonda oligonucleotídica tiene un dominio de marcaje que consta de la secuencia (CTATTTT)_n, donde los nucleótidos de citosina pueden marcarse con un fluoróforo para detección directa, o un hapteno para detección indirecta. En cualquier caso, el conjugado de fluoresceína y nucleótido citosina, y la molécula de fluoresceína se unen en la posición N4 de la citosina a través de un enlace OBEA (Véase Mishra *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5.684.142). De acuerdo con la Patente de Estados Unidos N° 5.684.142, un enlace OBEA se basa en 2,2'-oxi-bis(etilamina). En una realización preferida, la densidad de fluoróforo unido al dominio marcador es al menos el 7 por ciento en moles, preferiblemente al menos el 10 por ciento en moles, y mucho más preferiblemente al menos el 16 por ciento en moles, cuando se mide frente al dominio marcador solamente. Por ejemplo, si se considera que la sonda 401 (una sonda de 2 dominios) comprende un dominio marcador de 30 bases incluyendo una CT 3' terminal donde la C también está marcada, el porcentaje molar es $5/30 = 16,7$ por ciento en moles de marcador. En la sonda global, el porcentaje molar es 8,3.

En algunas realizaciones de la presente invención, se analizan simultáneamente varios genes diana exponiendo una muestra celular o tisular a una pluralidad de sondas de ácido nucleico que se han marcado con una pluralidad de diferentes marcas de ácido nucleico. Por ejemplo, puede marcarse una pluralidad de sondas de ácido nucleico con una pluralidad de compuestos fluorescentes que tienen diferentes longitudes de onda de emisión, permitiendo de este modo realizar el análisis multicoloreado simultáneo en una única etapa sobre una única muestra celular o tisular diana.

Las sondas oligonucleotídicas y colecciones de sondas oligonucleotídicas de la presente invención pueden usarse en análisis de ISH para detectar o localizar genes diana de ácido nucleico dentro de una muestra celular o tisular. La ISH puede realizarse como se describe, por ejemplo, en *In Situ Hybridization: Medical Applications* (G. R. Coulton y J. de Belleruche, eds., Kluwer Academic Publishers, 1992); *In Situ Hybridization: In Neurobiology; Advances in Methodology* (J. H. Eberwine, K. L. Valentino, y J. D. Barchas, eds., Oxford University Press, 1994); o *In Situ Hybridization: A Practical Approach* (D. G. Wilkinson, ed., Oxford University Press, 1992)).

La realización preferida de las sondas y colecciones de sondas de la presente invención se entienden mejor por referencia a las Figuras 1-21 y los Ejemplos 1-2. Los siguientes Ejemplos son ilustrativos de realizaciones específicas de la invención, y diversos usos de las mismas. Se exponen solamente para propósitos explicatorios, y no deben adoptarse como limitantes de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de Colección de Sondas

Se diseñaron colecciones de sondas que constan de una pluralidad de sondas oligonucleotídicas de 55 a 60 bases de longitud del siguiente modo. En este Ejemplo, cada sonda oligonucleotídica tenía dos dominios distintos: un dominio 5' (o de marcaje) y un dominio 3' (o específico de gen diana) (Véase la Figura 1).

En esta realización, el dominio de marcaje consta de la secuencia (CTATTTT)_n, donde el nucleótido citosina representa un conjugado fluoresceína-nucleótido citosina y la molécula fluoresceína se une en la posición N4 de citosina a través de un enlace OBEA.

ES 2 317 939 T3

El dominio específico de gen diana consta de una secuencia de 25-30 bases que es complementaria a un gen diana de ácido nucleico específico. Se diseñaron sondas oligonucleotídicas que tenían dominios específicos de gen diana correspondientes a la región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana (Véase la Tabla 1; sondas oligonucleotídicas 401-416), la región variable de cadena ligera lambda de inmunoglobulina humana (sondas oligonucleotídicas 501-515), secuencias de citomegalovirus humano (CMV) (sondas oligonucleotídicas 221-241), secuencias de EBER (ARN temprano de Epstein-Barr) del virus Epstein-Barr (EBV) humano (sondas oligonucleotídicas 100A2, 100C2, 100A1, y 100B1), secuencias Alu repetitivas humanas (sondas oligonucleotídicas 301 y 302), y poli d(T) (sonda oligonucleotídica 320).

Ejemplo 2

Diseño de dominio marcador: sonda de secuencia repetitiva Alu

Se usaron cuatro sondas todas frente a la secuencia repetitiva humana Alu para evaluar el diseño del dominio marcador. Las sondas numeradas 301 (SEC ID N° 55), 301A (SEC ID N° 116), 301A2/2 (SEC ID N° 121), y 301A3/2 (SEC ID N° 122) se muestran en la Tabla 1.

Las cuatro sondas se evaluaron a las concentraciones de 100, 75, 50, y 25 ng/ml por ml de sonda en la reacción, respectivamente. Este análisis de hibridación se hizo manualmente, usando protocolos convencionales. La diana, la línea celular embebida en parafina MBA MD 468 (Oncor INFORM™ Portaobjetos de Control Her-2/neu, N° Cat. S8100, Nivel 1, disponibles en Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) era la muestra diana y se procesó retirando la parafina por métodos de xileno convencionales. El tejido se sometió a Proteasa 1 de Ventana durante 12 minutos a 50 grados C en forma de una dilución 1:2 con Tampón APK de Ventana. La reacción de hibridación se consiguió con la adición de diluyente de sonda en forma de 100 µl de sonda (formamida al 25%, sulfato de dextrano al 5%, 2X SSC, Triton al 1%) a un volumen residual de 100 µl de 2XSSC/Triton X-100. El portaobjetos se calentó a 85 grados C durante 5 minutos y después se incubó durante 1 h a 37 grados C. Siguieron lavados con SSC convencionales para retirar el exceso de sonda. Los híbridos se detectaron con un anticuerpo contra FITC. El anticuerpo de ratón se detectó de forma colorimétrica usando Detección Azul con Fosfatasa Alcalina Potenciada de Ventana (n° cat. 760-061). A menos que se indique otra cosa, todos los reactivos se obtuvieron de Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ. Los resultados se observaron por detección colorimétrica usando microscopía de campo claro.

Los resultados de estos experimentos fueron que la intensidad de señal era una función de la cantidad total de hapteno fluoresceína conjugado con la sonda y la señal era del diseño de dominio marcador específico. Cuando mayor es la cantidad de fluoresceína por molécula sonda, mayor es la señal observada. La comparación del diseño y la colocación de los haptenos en la sonda mostró que esto no era un factor en la intensidad de señal. Las dos sondas que contenían cinco fluoresceínas (301A3/2 (SEC ID N° 122) y 301 (SEC ID N° 55)) produjeron ambas una señal equivalente. Estas dos sondas produjeron mayor señal que la observada para 301A2/2, una sonda con un diseño de dominio marcador dividido con cuatro fluoresceínas. La sonda 301A2/2 produjo una señal mayor que la sonda 301A, una sonda con un diseño de dominio marcador único en el extremo 5' y con tres fluoresceínas.

Ejemplo 3

Diseño de Dominio Marcador: sondas de EBER

Este experimento comparó dos diseños y secuencias de dominio marcador para determinar si el mayor espaciado entre los haptenos fluoresceína mejora la producción de señal durante las etapas de detección de sondas durante el análisis de hibridación *in situ*.

El tejido usado era un tejido esplénico humano infectado con EBV fijado en sección embebida en parafina taponada con formalina neutra de 4 micrómetros de grosor colocada en portaobjetos de microscopio de vidrio más silano. Las secciones tisulares se desparafinaron en una máquina Ventana DISCOVER™, seguido de una digestión de 6 min. con Proteasa 1 de Ventana, a una temperatura de 37°C. La sonda se disolvió en diluyente de tampón de hibridación a una concentración de 50 ng/ml en forma de 100 µl aplicados a un volumen igual de 2 X SSC/Triton X-100 de volumen residual dejado sobre el portaobjetos después de prepararlo por el sistema de tinción por ISH automatizado de Ventana Medical Systems, Inc., Discovery. El diluyente de sonda se mezcló con el volumen residual sobre el portaobjetos durante 6 min. a 37°C, después la solución se calentó a 85°C y se mantuvo durante un total de 10 min. El portaobjetos después se llevó a una temperatura de 37°C y se mantuvo a esa temperatura durante 1 hora. Todas estas reacciones acuosas sobre el portaobjetos se hicieron sobre una película de LIQUID COVERSLIP™, para evitar las pérdidas por evaporación de agua durante el procesamiento. Cada portaobjetos después de la hibridación se lavó 3 veces con 2X SSC/solución Triton, con una incubación de 6 min. entre cada lavado, siendo el volumen del portaobjetos aproximadamente 300 µl (+/- 10% vol). Los híbridos se detectaron con un anticuerpo contra FITC. El anticuerpo de ratón se detectó colorimétricamente usando Detección Azul con Fosfatasa Alcalina Potenciada de Ventana (n° cat. 760-061).

Las dos sondas oligonucleotídicas usadas para este estudio eran las sondas 100A1 (SEC ID N° 53) y 100A32 (SEC ID N° 120). Las dos diferencias entre estas sondas eran la secuencia y estructura del dominio marcador. En la

sonda 100A1 el dominio marcador estaba 5' del dominio de gen diana, contenía 5 fluoresceínas unidas a restos de citosina mediante un enlazador OBEA, con la fórmula de secuencia de (CTATTTT)₄CT (SEC ID N° 58). El dominio marcador de la oligosonda 1002A32, era similar (SEC ID N° 125). Más allá de la diferente secuencia, la diferencia principal era que las citosinas marcadas con fluoresceína estaban espaciadas por 10 bases en comparación con el oligo 100A1 donde el espaciado de citosina estaba más cerca a 7 bases. El resultado de esta comparación deducido por análisis de valores H era que estos oligonucleótidos eran equivalentes en cuanto a la cantidad de señal generada sobre el portaobjetos. Los datos fueron que para 100A2, para las 368 células analizadas en un total de 3 campos, el valor H era 106, y para la sonda 1002A32 para las 345 células analizadas en tres campos, el valor H era 109. El valor H es un análisis espectro-gráfico hecho con microscopio que toma en consideración el valor de fondo a una proporción de señal sobre la sección tisular para producir una comparación relativa de señal específica de diana total sobre el portaobjetos. (Véase la referencia Giroud, F. Perrin C, y Simony Lafontaine, J.; Quantitative Immunocytochemistry and Immunohistochemistry. Third Conference of the European Society for Analytical Cellular Pathology, 1994; y AutoCyte Quic Immuno User's Manual, 1998, número de documento PA-029, Co AutoCyte Inc. Burlington NC 2721). Los histogramas y la hoja de valores indicaron que cada oligo era igual de eficaz para producir una señal colorimétrica. Esto indica que la posición del dominio marcador puede ser 3 prima o 5 prima a la secuencia de diana génica o la secuencia de diana génica puede posicionarse entre dos dominios marcadores.

Ejemplo 4

Hibridación In Situ

Las colecciones de sondas preparadas en el Ejemplo 1 se diluyeron primero en una solución compuesta por sulfato de dextrano al 20% (p/vol), formamida al 50% (vol/vol), 2X SSC, Tris-HCl 10 mM, EDTA 5 mM, y Brij-35 al 0,05%, a un pH final de 7,3. Las colecciones de sondas después se mezclaron con un volumen igual de una solución compuesta por 2X SSC y Triton X-100 al 0,05%.

Las muestras para el análisis de ISH se prepararon cortando muestras celulares o tisulares embebidas en parafina y fijadas en formalina en secciones de 4 µm y colocando las secciones sobre un portaobjetos de vidrio. El posterior procesamiento e ISH de las muestras se realizó en un dispositivo automatizado, tal como el Instrumento de Tinción ISH/IHC Automatizado DISCOVERY™ (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ) descrito en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos del mismo propietario que la presente y pendientes junto con la presente N° de Serie 60/076.198 y 09/259.240, ambas incorporadas en este documento por referencia. Para retirar la parafina de las muestras, los portaobjetos se sumergieron en una solución acuosa, se calentaron durante aproximadamente 20 minutos, y después se aclararon. El procedimiento de desparafinación automatizado se describe más completamente en los documentos de Estados Unidos N° de Serie 60/099.018, 09/259.240 ambos incorporados en este documento por referencia. Las muestras después se trataron con proteasa y los portaobjetos se calentaron a 85°C (para hibridación con genes diana de ARN) o 90-95°C (para hibridación con genes diana de ADN) durante 4 a 10 minutos.

Las reacciones de hibridación se realizaron típicamente en un tampón de hibridación compuesto por sulfato de dextrano al 10% (p/vol), formamida al 25% (vol/vol), 2X SSC, Tris 5 mM, EDTA 2,5 mM, Brij-35 al 0,025%, Triton X-100 al 0,25%, y entre 25 y 125 ng/ml de cada molécula sonda individual. Las reacciones de ISH se realizaron a entre 37°C y 54°C. Para ISH usando las colecciones de sondas descritas en el Ejemplo 1, las reacciones de hibridación se realizaron de forma óptima durante 1 h a 47°C (excepto para la sonda poli d(T), donde la reacción de hibridación se realizó de forma óptima a 37°C durante 1 h).

La hibridación de las moléculas de sonda marcadas con fluoresceína con un gen diana particular en la muestra se detectó usando una serie secuencial de proteínas de unión, es decir, detección de anticuerpo secundario. Sin embargo, es igualmente posible usar detección directa cuando se visualizan sondas unidas. En detección secundaria, primero, se añadió un anticuerpo monoclonal de ratón anti-fluoresceína dirigido contra la molécula de sonda marcada con fluoresceína a la muestra. Después, se añadió un anticuerpo de cabra policlonal marcado con biotina dirigido contra el anticuerpo de ratón a la muestra. Finalmente, las reacciones de hibridación se detectaron colorimétricamente usando un sustrato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitrozolol (BCIP/NBT). Esta técnica, llamada "detección de anticuerpo secundario" es rutinaria para los especialistas en la técnica. Los anticuerpos primarios y secundarios están disponibles en numerosos proveedores, incluyendo Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, que están optimizados para su uso en los sistemas de auto-tinción de Ventana (ES®, NexES®, DISCOVERY™, y BENCHMARK™).

Las Figuras 2-21 ilustran los resultados obtenidos para análisis de hibridación *in situ* de diversas líneas celulares o muestras tisulares usando las sondas descritas y reivindicadas en este documento que tienen el motivo estructural ilustrado en la Figura 1 o las colecciones de sondas compuestas por dichas sondas.

La Figura 1 ilustra una estructura de sonda genérica del diseño de sonda de dos dominios. Éste es el diseño de oligonucleótido usado para las sondas en los cócteles específicos de gen descritos en los siguientes ejemplos. Cada sonda está compuesta por dos dominios: un dominio de marcaje 5' y un dominio específico de gen diana 3'. El dominio de marcaje consta de esta secuencia específica (CTATTTT)_n, donde el nucleótido citosina es un conjugado citosina-hapteno, siendo el hapteno fluoresceína en esta realización. Esta ilustración muestra específicamente secuencias de ácido nucleico para las sondas 301 (SEC ID N° 55) y 302 (SEC ID N° 56), cada una de las cuales tiene dominios

específicos de gen diana correspondientes a las secuencias Alu repetitivas humanas y dominios de marcaje que tienen un hapteno de fluoresceína.

5 La Figura 2 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de hibridación *in situ* (ISH) de tejido cutáneo humano usando una sonda que comprende el dominio de marcaje (sonda 330; SEC ID N° 58). La ausencia de una señal detectable indica que la fórmula de secuencia, (CTATTTT)_n, del dominio de marcaje común a los oligonucleótidos usados en estos ejemplos de ISH es no específico, y no reactivo en su capacidad de formar apareamiento de bases de Watson-Crick con secuencias de ácido nucleico humanas porque no hibridan.

10 La Figura 3 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido cutáneo humano usando una sonda que comprende el dominio de marcaje y un dominio específico de gen diana poli d(T) (sonda 320; SEC ID N° 57). La presencia de una señal detectable localizada en el citoplasma indica que esta sonda es capaz de hibridar específicamente con la región poliadenilada del ARN mensajero.

15 Las Figuras 4A-4B ilustran los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido cutáneo humano usando la sonda 320, donde la muestra tisular no se trataba con ribonucleasa A antes de la hibridación *in situ* (A), o se trataba con ribonucleasa A antes de la hibridación *in situ* (B). La disminución en la señal detectable en (B) indica que esta sonda hibrida específicamente con una región poliadenilada común al ARN mensajero.

20 Las Figuras 5A-5B ilustran los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido esplénico humano usando la sonda 320, donde la hibridación y el lavado riguroso se realizaron a temperatura ambiente (A), o a 37°C (B). Este resultado ilustra que la intensidad de color está relacionada con la rigurosidad de las condiciones de hibridación, indicando el color más intenso condiciones menos rigurosas.

25 La Figura 6 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de la línea celular Raji humana usando la sonda 320. Esto muestra que este diseño de sonda también es funcional con líneas celulares embebidas así como tejido embebido.

30 La Figura 7 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de la línea celular Raji humana usando una colección de sondas compuesta por las sondas 301 y 302.

La Figura 8 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de la línea celular HT humana usando una colección de sondas compuesta por las sondas 301 y 302.

35 La Figura 9 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de una línea celular de rata usando una colección de sondas compuesta por las sondas 301 y 302. La ausencia de una señal detectable indica que esta colección de sondas es específica para secuencias de ácido nucleico humanas.

40 La Figura 10 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de una línea celular HT humana negativa al virus Epstein-Barr (EBV) usando una sonda que tiene un dominio específico de gen diana correspondiente al ARN nuclear de EBER de EBV [SEC ID N° 51 a SEC ID N° 54].

45 La Figura 11 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido esplénico humano usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARN nuclear de EBER 1 y 2 de EBV [SEC ID N° 51 a SEC ID N° 54].

50 La Figura 12 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido de amígdala humano usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARN nuclear de EBER 1 y 2 de EBV [SEC ID N° 51 a SEC ID N° 54].

55 Las Figuras 13A-13B ilustran los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido esplénico humano usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARN nuclear de EBER 1 y 2 de EBV [SEC ID N° 51 a SEC ID N° 54], donde la muestra tisular no se trató con ribonucleasa A antes de la hibridación *in situ* (A), o se trató con ribonucleasa A antes de la hibridación *in situ* (B). La disminución en la señal detectable en (B) indica que esta sonda hibrida específicamente con el ARN nuclear de EBER 1 y EBER 2 humano.

60 La Figura 14 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido de amígdala humano positivo a la cadena ligera kappa usando una sonda que tiene un dominio específico de gen diana correspondiente al ARNm de cadena ligera lambda de inmunoglobulina humana [SEC ID N° 15].

65 La Figura 15 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejidos de linfoma usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARNm de cadena ligera kappa de inmunoglobulina humana [SEC ID N° 2 - 4, SEC ID N° 7 - 12, SEC ID N° 14, 15]. El tejido de linfoma en (A) sobre-expresa la cadena ligera kappa y el tejido en (B) sobre-expresa la cadena ligera lambda. La ausencia de una señal detectable en (B) indica que la colección de sondas de cadena ligera kappa es específica para el ARNm de cadena ligera kappa.

La Figura 16 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido de amígdala humano positivo a la cadena ligera lambda usando una sonda que tiene un dominio específico de gen diana correspondiente al ARNm de la región variable de la cadena ligera lambda de inmunoglobulina humana [SEC ID N° 19 a 29].

La Figura 17 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de una línea celular RPMI 8226 humana positiva a la cadena ligera lambda usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARNm de cadena ligera lambda de inmunoglobulina humana [SEC ID N° 19 a 29].

Las Figuras 18A-18B ilustran los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido esplénico humano usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARNm de cadena ligera lambda de inmunoglobulina humana [SEC ID N° 19 a 29]. El tejido en (A) sobre-expresa la cadena ligera lambda y el tejido en (B) sobre-expresa la cadena ligera kappa. La ausencia de una señal detectable en (B) indica que la colección de sondas de cadena ligera lambda es específica para el ARNm de cadena ligera lambda humana.

La Figura 19 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de tejido pulmonar humano positivo a citomegalovirus (CMV) usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARN temprano inmediato de CMV [SEC ID N° 30 - 32, SEC ID N° 34 - 35, SEC ID N° 38, SEC ID N° 50]. La flecha indica la célula infectada por CMV.

La Figura 20 ilustra los resultados obtenidos para el análisis de ISH de una línea celular 9G de rata en que la expresión del ARN temprano inmediato de CMV no se ha inducido por ciclohexamida usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARN temprano inmediato de CMV [SEC ID N° 30 - 32, SEC ID N° 34 - 35, SEC ID N° 38, SEC ID N° 50].

Las Figuras 21A-21B ilustran los resultados obtenidos para el análisis de ISH de una línea celular 9G de rata en que la expresión del ARN temprano inmediato de CMV se ha inducido por ciclohexamida usando una colección de sondas compuesta por sondas que tienen dominios específicos de gen diana correspondientes al ARN temprano inmediato de CMV [SEC ID N° 30 - 32, SEC ID N° 34 - 35, SEC ID N° 38, SEC ID N° 50]. El tejido en (A) se muestra a un aumento de 40X y el tejido en (B) se muestra a un aumento de 20X.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1

ID Sonda	Secuencia	SEC ID
401	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>CCAGAGTAGCAGGAGCCCCAGGAGCTGAGC-3'</u>	1
402	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>GGATGGAGACTGGGTCAACTGGATGTACACA-3'</u>	2
403	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>GCAAGCGATGGTGACTCTGTCTCCTACAGC-3'</u>	3
404	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>TCTGTCCAGATCCACTGCCACTGAACCTT-3'</u>	4
405	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>GCAGCCACAGTTCGCTTCATCTGCACCTTG-3'</u>	5
406	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>TTTCAACTGCTCATCAGATGGCGGAAGAT-3'</u>	6
407	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>AAGTTATTCAGCAGGCACACAACAGAGGCA-3'</u>	7
408	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>GGCGTTATCCACCCTCCACTGTACTTTGGC-3'</u>	8
409	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>IAGGTGCTGTCCCTTGCTGTCCCTGCTCTGTG-3'</u>	9
410	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>GTAGTCTGCTTTTGCTCAGCGTCAGGGTGCT-3'</u>	10
411	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>GATGGGTGACTTCGCAGGCGGTAGACTTTTGT-3'</u>	11
412	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>CTCTCCCCCTGTTGAAGCTCTTTTGTGACGGG-3'</u>	12
413	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>TGGAAGTGAAGGAGCAGGTGGGGCCACTTCT-3'</u>	13
414	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>GAAAAGGGTCAAGAGGCCAAAGGATGGGAG-3'</u>	14
415	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>AGATGAGCTGGAGGACCGCAATAGGGGTAG-3'</u>	15
416	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>GCATAATTAAAGCCAAAGGAGGAGGAGGGGG-3'</u>	16
501	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>CCTGAGTGAGGAGGGGTGAGGAGCAGCAGAG-3'</u>	17
502	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>AGACCCAGACACGGAGGCGAGGCTGAGTCAG-3'</u>	18
503	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>TGTGGTCCAGTGCAGGAGATGGTGATCG-3'</u>	19
504	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>TAAATCATGATTTTGGGGGCTTTCCTGGG-3'</u>	20

505	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>IGTTGCCAGACITGGAGCCAGAGAAAGCGAT-3'</u>	21
506	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>AATAATCAGCCTCGTCCICAGCCTGGAGCC-3'</u>	22
507	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>GGTCCCTCCGCCGAAACACAGTGTAAC-3'</u>	23
508	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>TIATGAGACACACCAGTGTGGCCTTGTTGG-3'</u>	24
509	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>CTGCTCAGGCGTCAGGCTCAGATAGCTGCT-3'</u>	25
511	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>ATGCGTGACCTGGCAGCTGTAGCTTCTGTG-3'</u>	26
512	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>ATTCTGTAGGGGCCACTGTCTTCTCCACGG-3'</u>	27
513	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>CCTCCCTGGGATCCTGCAGCTCTAGTCTC-3'</u>	28
515	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>TGAGGGTTTATTGAGTGCAGGGAGAAAGGCG-3'</u>	29
221	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>GGAGGTCAAAACAGCGTGGATGGCG-3'</u>	30
222	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>GAGGCTGGATCGGTCCCGGTGTCCT-3'</u>	31
223	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>AATCCGCGTTCCAATGCCACCGTICC-3'</u>	32
224	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>TAAAACCTCGGGCCACTGGGGACGG-3'</u>	33
225	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>ACCCGAGATTCCGCTGGAGATCCCA-3'</u>	34
226	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>GAGCAAGGAGCTGCCGAGCGACCAT-3'</u>	35
227	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>ACACTGGTGGTGGTGGGCATCGTGC-3'</u>	36
228	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>TTCCAAATGCGTCAGCGGTGCAAAGC-3'</u>	37
229	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>AGCTGCCCTGCATCTTCTTCTGCCGC-3'</u>	38
230	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>CCCTCCACCGTTAACAGCACCGCAA-3'</u>	39
231	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>TTGGTCACGGGGTGCTCGGGGCCIAA-3'</u>	40
232	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>TCGGCCAACTCTGGAAACAGCGGGT-3'</u>	41
233	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT	<u>TCGGGGTCTCTCGTTGCAATCCTCGG-3'</u>	42

234	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>ATCTCGATGCCCCGCTCACATGCAA-3'</u>	43
235	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>TGCCGCCACCATGTCCACTCGAACCT-3'</u>	44
236	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>GTTAGCGGCGCCCTTGCTCACATCA-3'</u>	45
237	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>TGCAGATCTCCTCAATGCGGCGCTT-3'</u>	46
238	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>ICTCAGAGGATCGGCCCCCAGAAATG-3'</u>	47
239	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>CCTCATCTGACTCCTCGGCGATGGC-3'</u>	48
240	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>CGGGTACAGGGGACTCTGGGGGTGA-3'</u>	49
241	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>GGGTGGGTGCTCTTGGCTCCAGAGG-3'</u>	50
100A2	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>GACCTCGGGTCGGTAGCACCCGACT-3'</u>	51
100C2	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>GGAAGCCTCTCTTCTCCTCCCCCGG-3'</u>	52
100A1	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>CCACAGACACCGTCTCTACACCCCG-3'</u>	53
100B1	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>GGCTACAGCCACACACGCTCTCCTCC-3'</u>	54
301	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>CGAGGCGGGCGGATCACCTGAGGTC-3'</u>	55
302	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>CGGAGGCGGGAGGTTCAGTGAGGCC-3'</u>	56
320	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'</u>	57
301A	5'-CTATTTTCTATTTTCTTTT <u>CGAGGCGGGCGGATCACCTGAGGTC-3'</u>	116
302C	5'-CTATTTTCTATTTTCTTTT <u>CGGGAGGCGGGAGGTTCAGTGAGGCC-3'</u>	117
302A4	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>CGGGAGGCGGGAGGTTCAGTGAGGCC-3'</u>	118
302A3/2	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>CGGAGGCGGAGGTTCAGTGAGCC ACTATTTTATACTT-3'</u>	119
1002A32	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>GACCTCGGGTCGGTAGCACCCGCAC TACTATTTTATACTT-3'</u>	120
301A2/2	5'-CTATTTTCTT <u>CGAGGCGGGCGGATCACCTGAGGTC TTTCTTTTATCTT-3'</u>	121
301A3/2	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCT <u>CGAGGCGGGCGGATCACCTGAGGTC ACTATTTTATACTT-3'</u>	122

ES 2 317 939 T3

TABLA 2

Id Sonda	Secuencia	SEC ID
5	5'-CTATTTTCTATTTTCTTTT	123
	5'-CTATTTTATACTTTATATTTTCATATTTTATCT	124
10	330	5'-CTATTTTCTATTTTCTATTTTCTATTTTCT
	5'-CTATTTTATACTTTATATTTCT.....ACTATTTTATACTT-3	125
	5'-CTATTTTCTT.....TTCTTTTATCTT-3	126

Las Tablas 1 y 2, las Figuras y la Lista de Secuencias contienen ejemplos de acuerdo con la presente invención así como ejemplos de referencia.

REIVINDICACIONES

1. Una sonda oligonucleotídica sintética que comprende un primer dominio que tiene un dominio marcador compuesto por una secuencia no específica de gen de un polímero de la secuencia repetitiva (CTATTTT)_n, y un segundo dominio que comprende un dominio diana que tiene una secuencia diana específica de gen, donde el dominio marcador está marcado de forma detectable.
2. La sonda oligonucleotídica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el marcador es fluoresceína, unido al nitrógeno N4 de la(s) citosina(s) del dominio marcador a través de un enlazador OBEA.
3. La sonda oligonucleotídica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el marcador es un fluoróforo.
4. La sonda oligonucleotídica de acuerdo con la reivindicación 3, donde el fluoróforo está presente a una densidad de más del 7 por ciento en moles del dominio marcador.
5. La sonda oligonucleotídica de acuerdo con la reivindicación 1, donde al menos el 7 por ciento en moles de la(s) citosina(s) del dominio marcador están unidas a un resto detectable por un enlazador OBEA.
6. La sonda oligonucleotídica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el dominio marcador está localizado en el extremo 5' de la sonda oligonucleotídica, y la secuencia diana específica de gen está 3' al dominio marcador.
7. La sonda oligonucleotídica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el dominio marcador está localizado en el extremo 3' de la sonda oligonucleotídica, y la secuencia diana específica de gen está 5' al dominio marcador.
8. Una serie de sondas sintéticas para detectar el ARNm de cadena ligera de inmunoglobulina Kappa o el ARN heteronuclear correspondiente, donde las sondas se seleccionan entre el grupo compuesto por la SEC ID N° 1 a 16 inclusive.

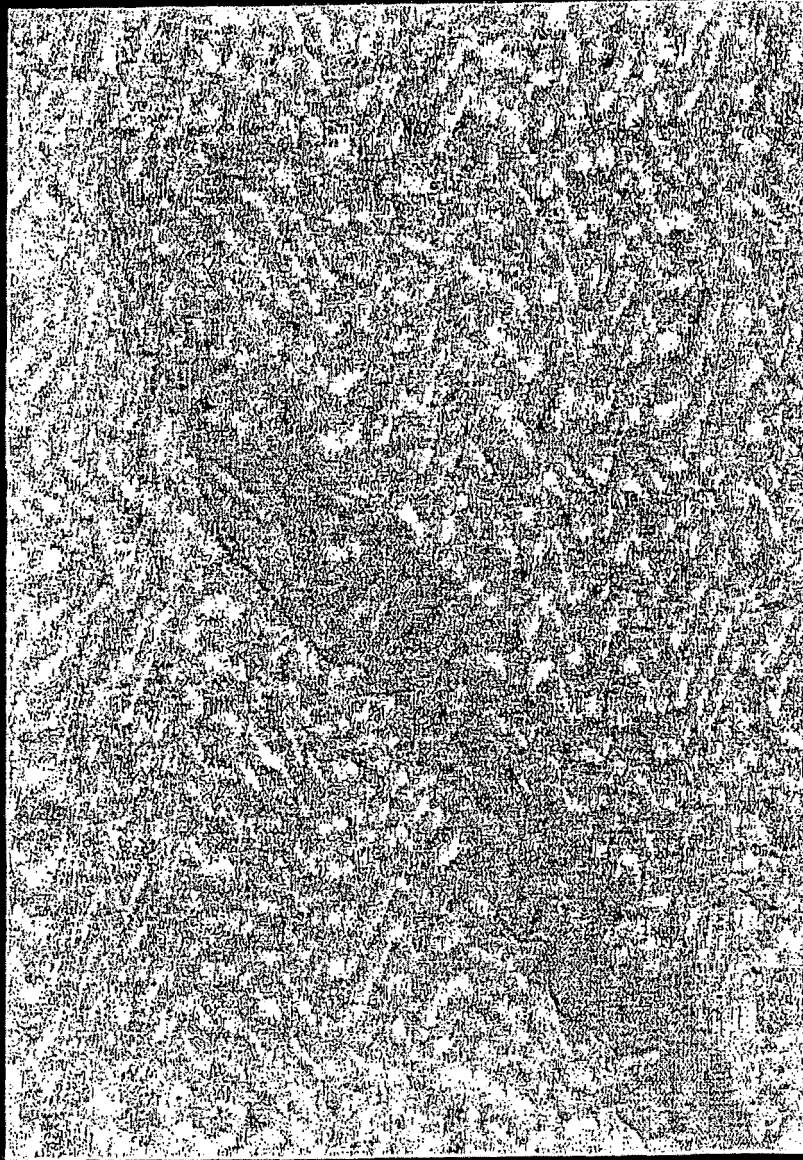
Diseño de Sonda Oligonucleotídica

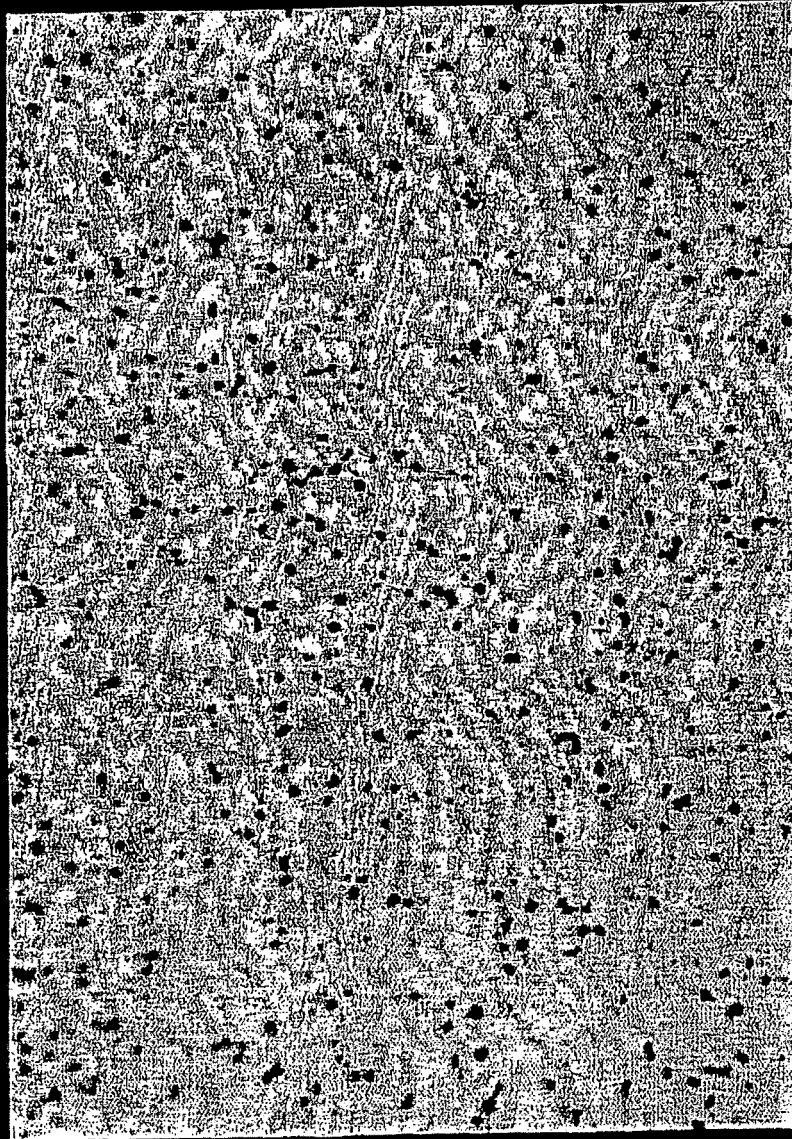
Región de Detección Señal Común Región de Detección Diana Única

Alu301 5'-CTATTTTCTATTTCATTTTCATTTTCTCGAGGGGGCGGATCACCTGAGGTC-3'

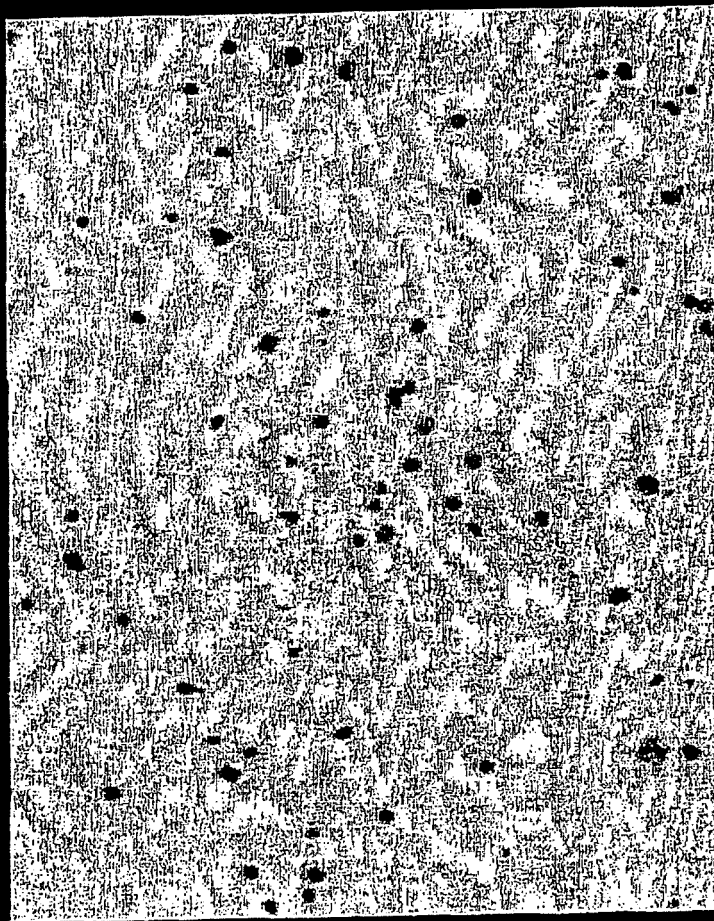
Alu302 5'-CTATTTCATATTTCTATTTTCTAATTTCCTCGGAGGGCGAGGTTGCAGTGACCC-3'

ES 2 317 939 T3

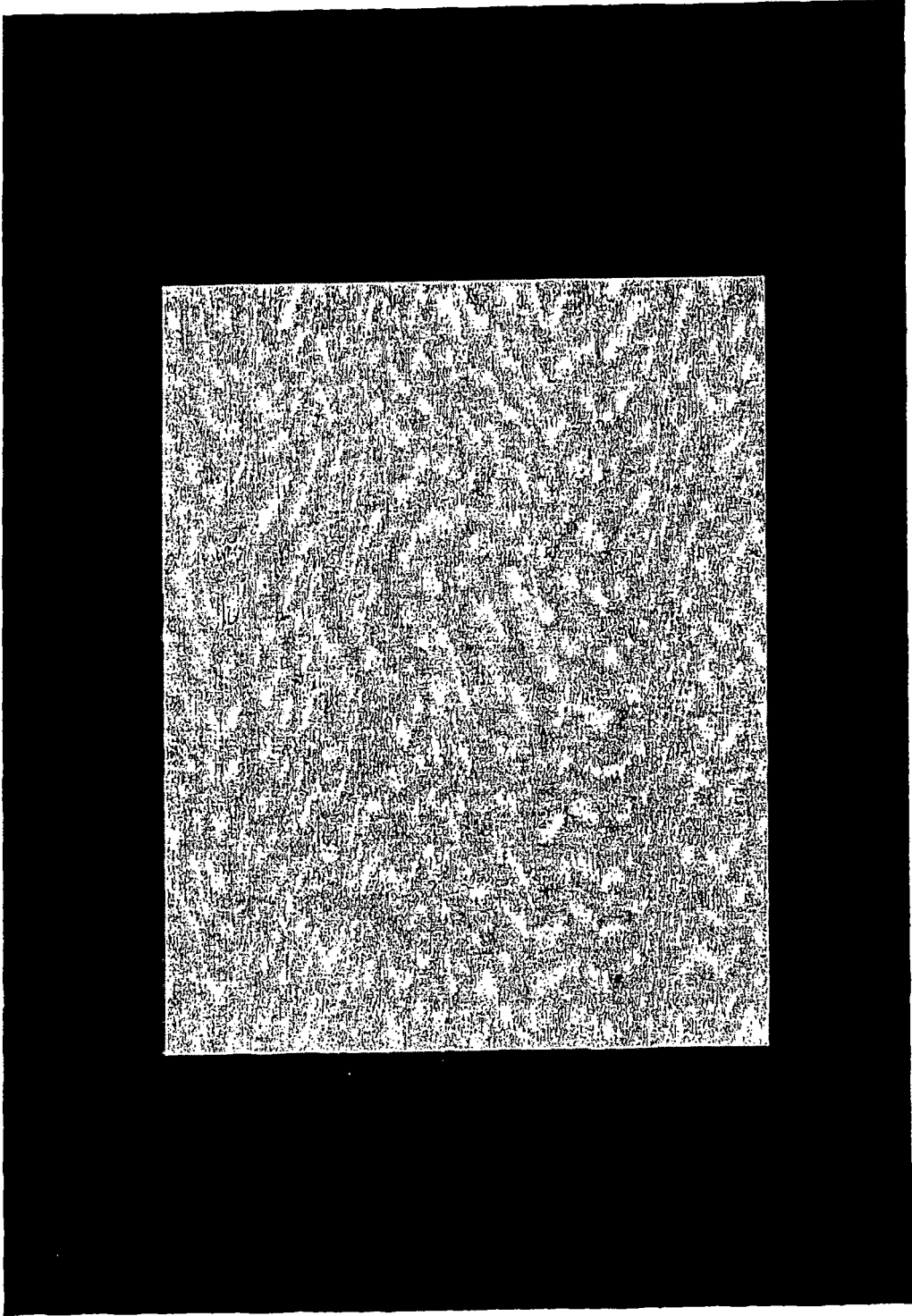




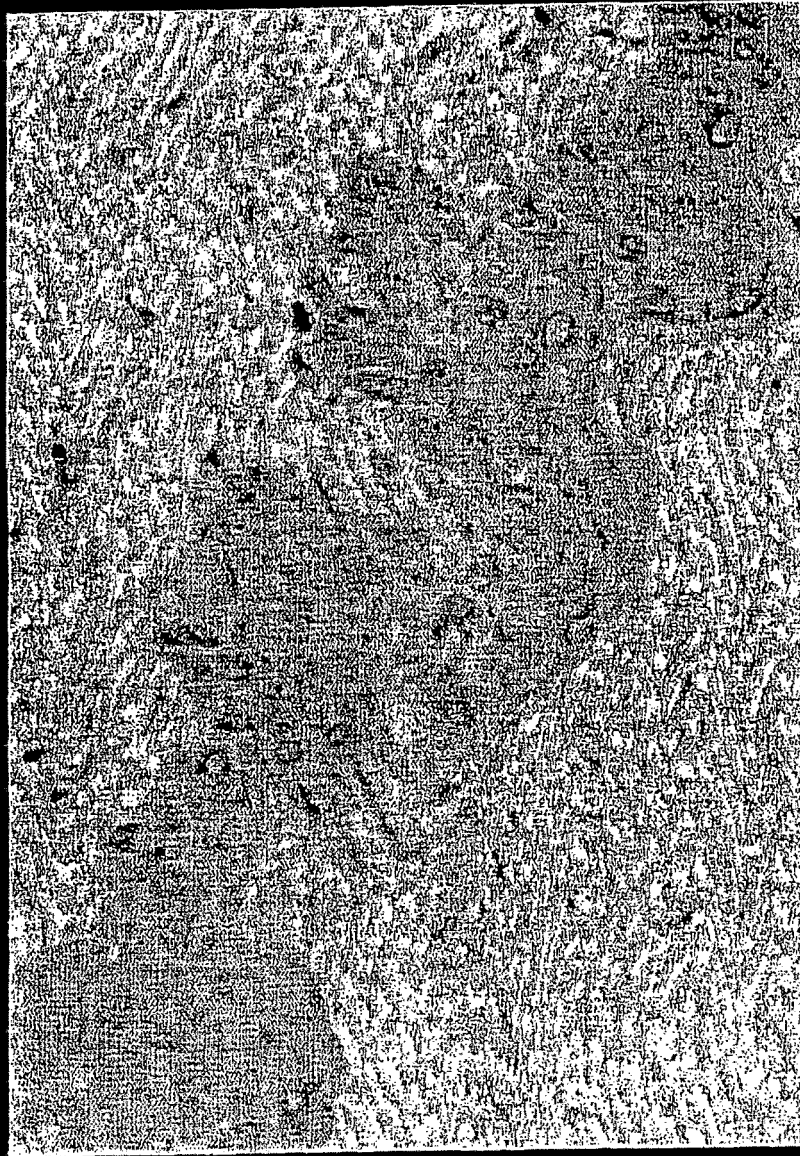
ES 2 317 939 T3



ES 2 317 939 T3



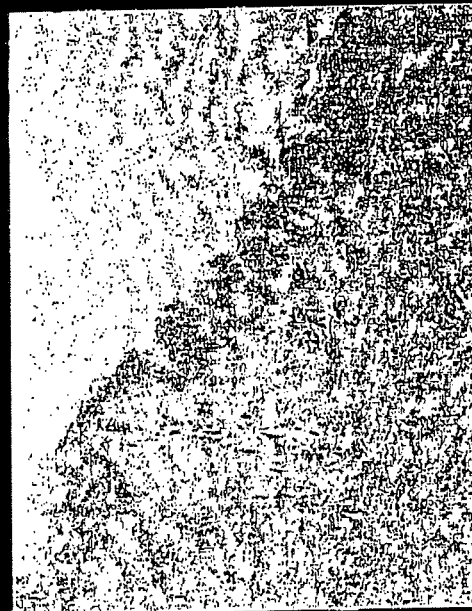
ES 2 317 939 T3



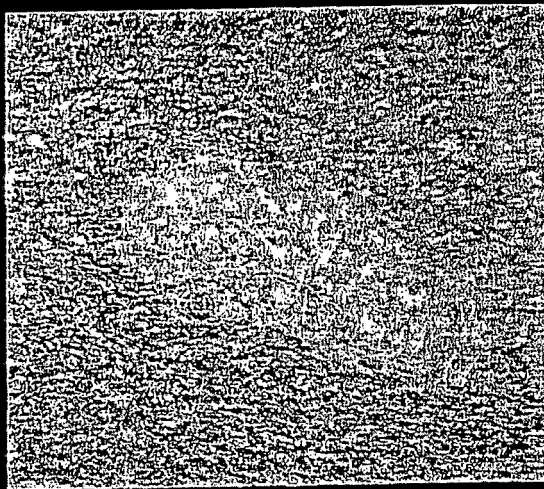
Más RNasa



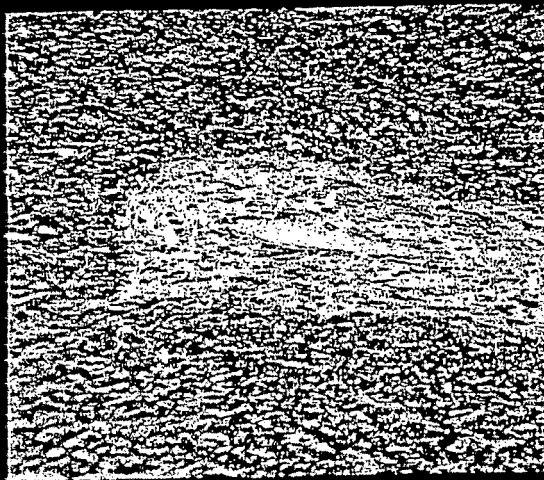
Menos RNasa



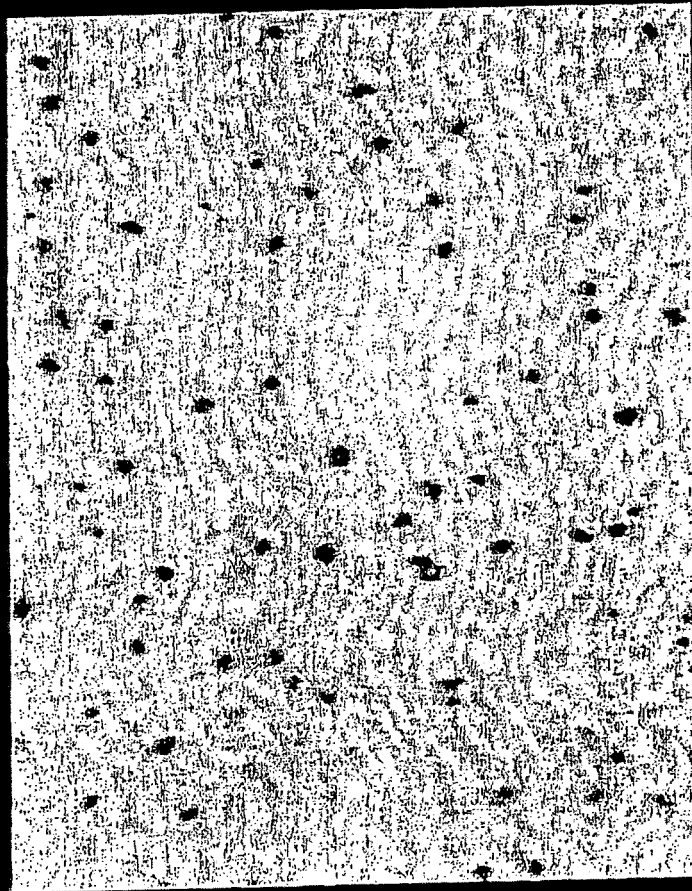
37/37



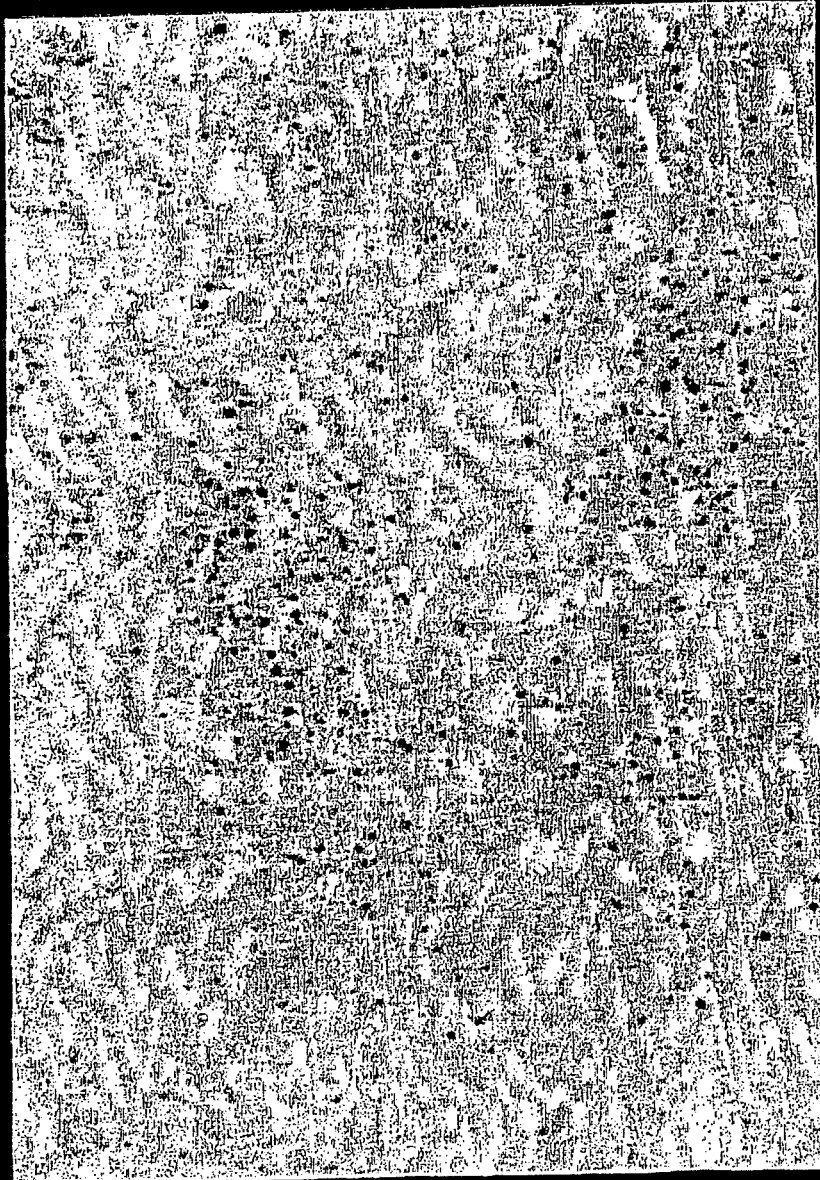
RT/RT



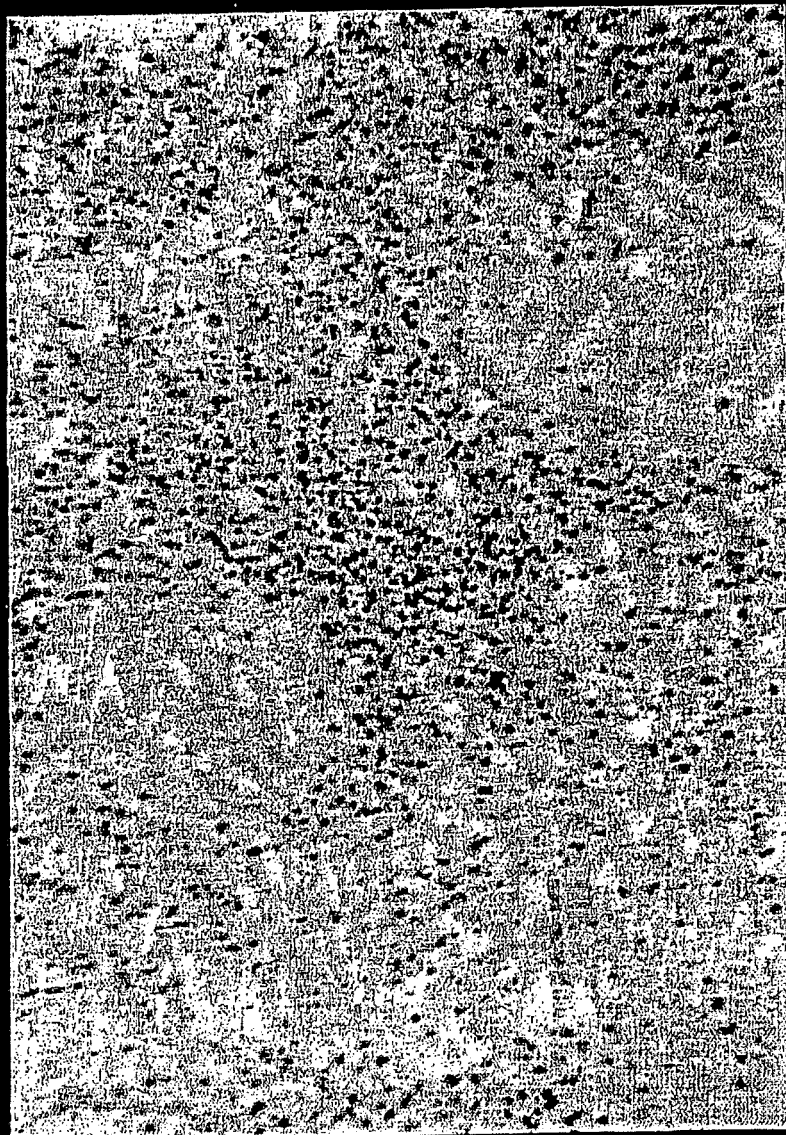
ES 2 317 939 T3



ES 2 317 939 T3



ES 2 317 939 T3



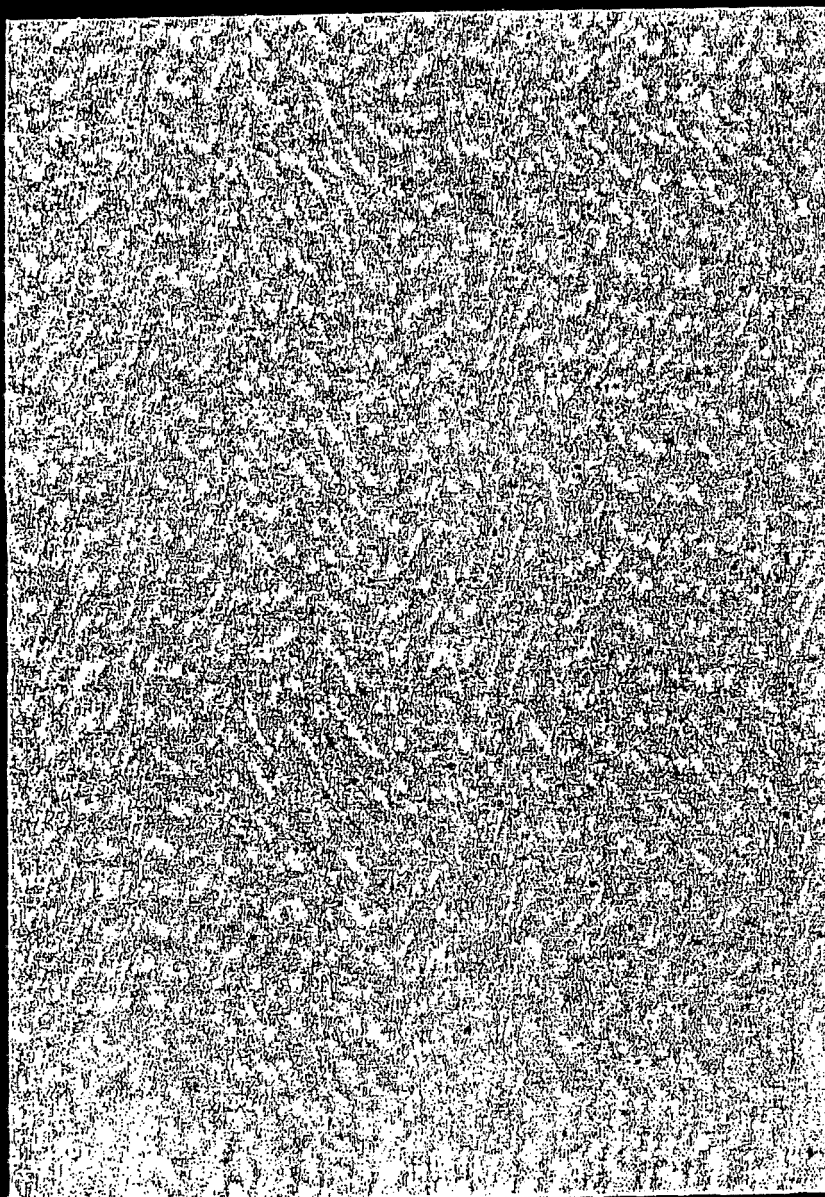
Más RNasa



Menos RNasa

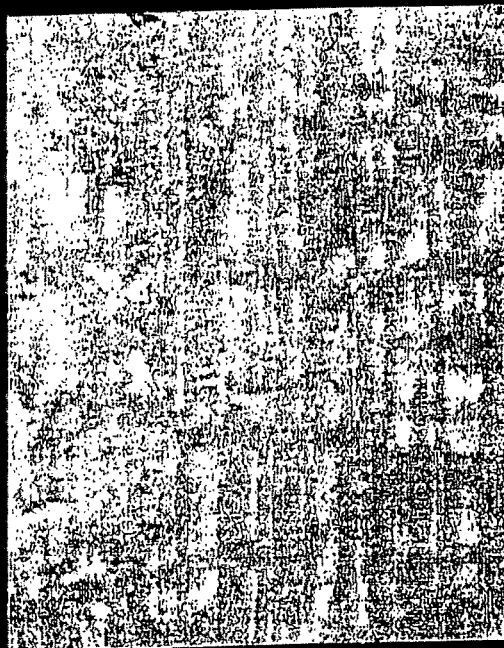


ES 2 317 939 T3

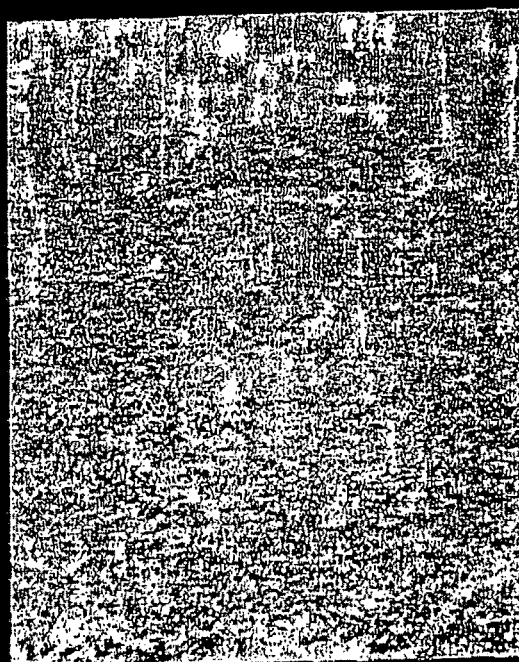




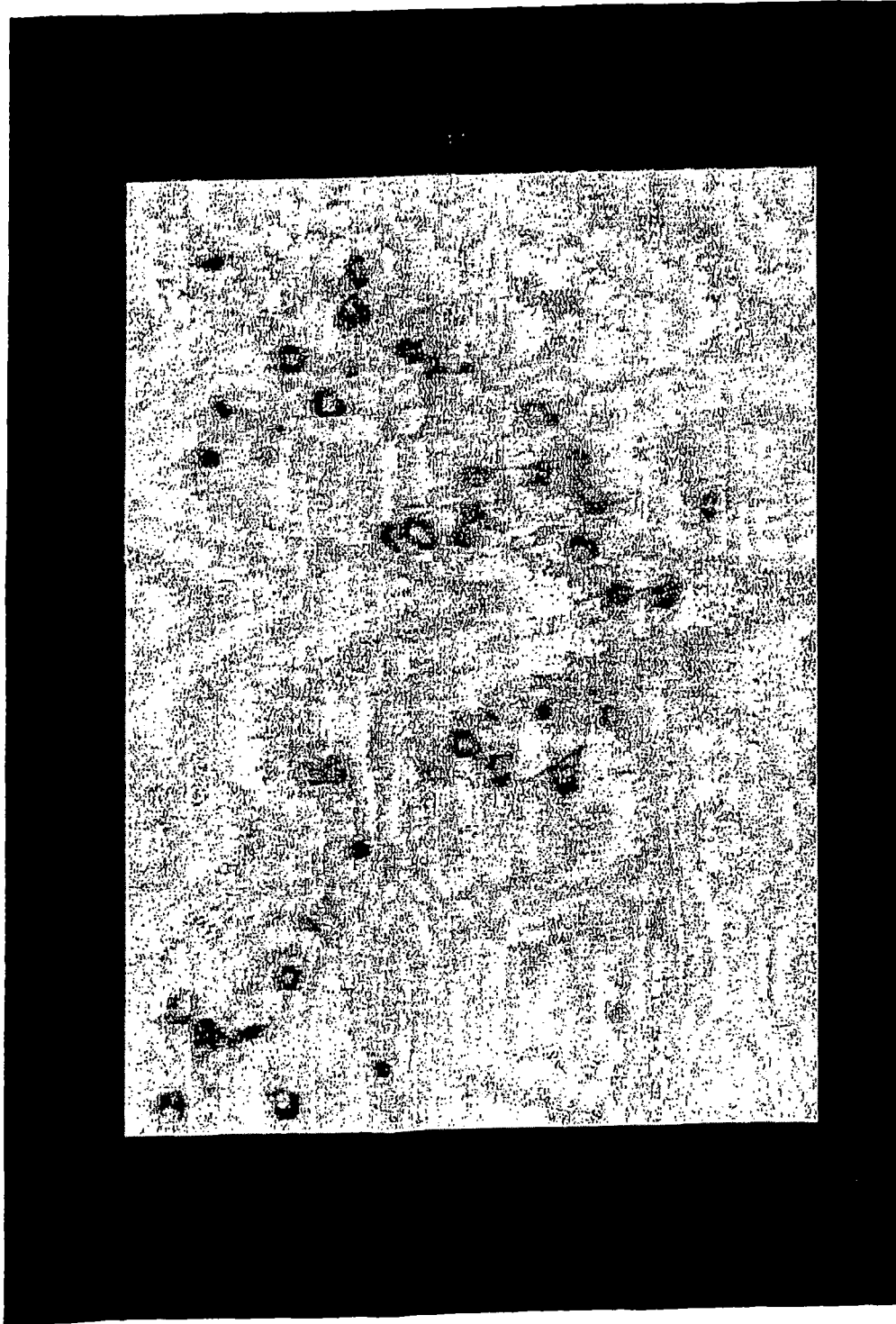
Kappa sobre tejido Lambda+



Kappa sobre tejido Kappa+



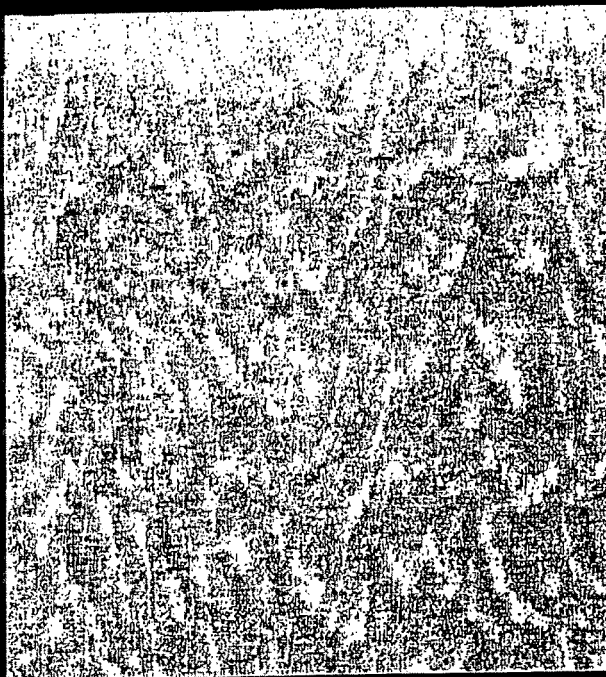
ES 2 317 939 T3



ES 2 317 939 T3



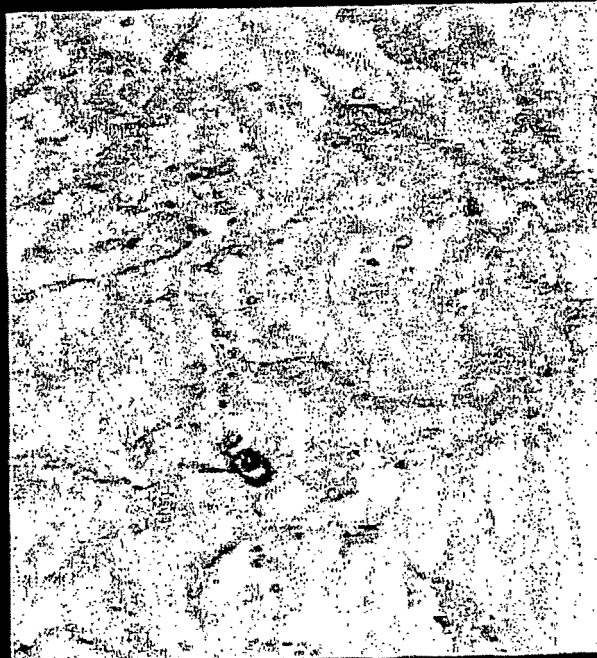
Lambda sobre tejido Kappa+

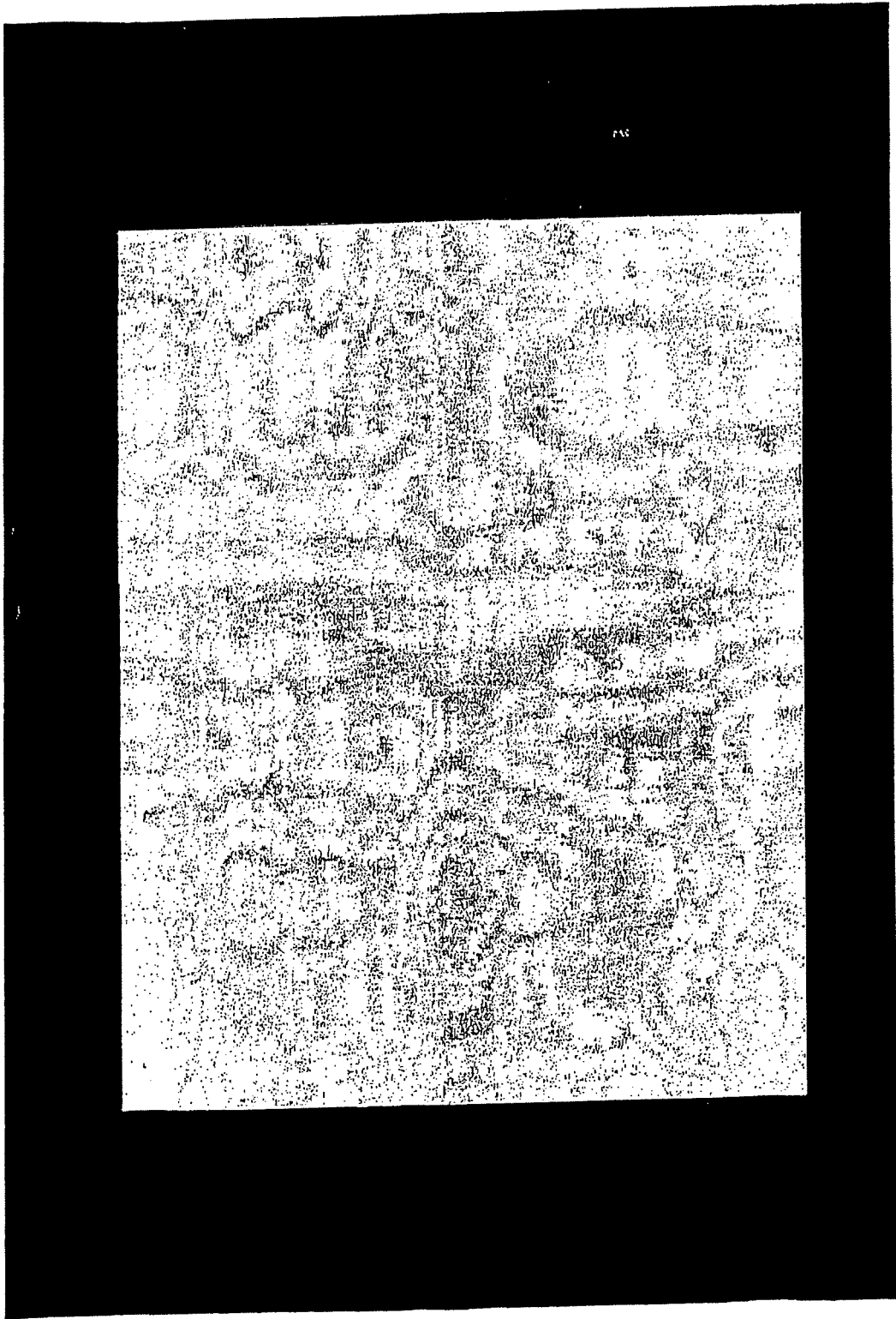


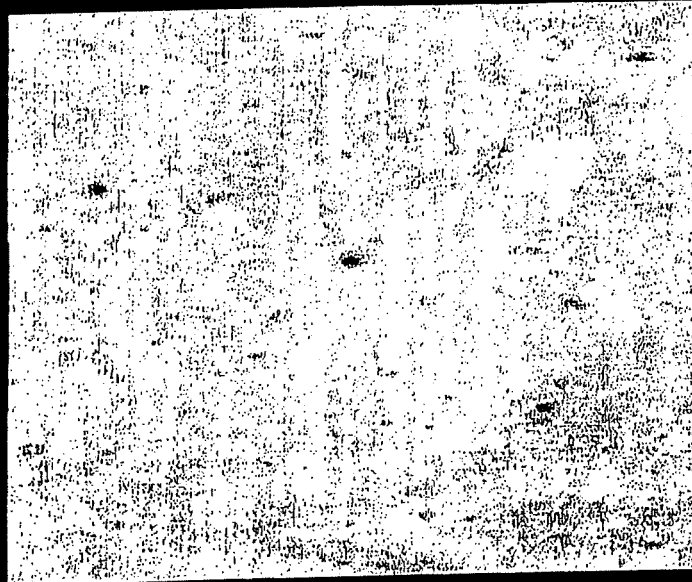
Lambda sobre tejido Lambda+



ES 2 317 939 T3







ES 2 317 939 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Utermohlen, Joseph
<110> Connaughton, John
5
<120> Fórmula de secuencia oligonucleotídica para marcar Sondas Oligonucleotídicas y Proteínas para Análisis *In Situ*
10
<130> 355/001/PCT
<140>
<141> 06-09-2001
15
<150> 60/233.177
<151> 15-09-2000
<160> 126
20
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
25
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
30
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
35
<400> 1
ctattttcta ttttctattt tctattttct ccagagtagc aggagcccca ggagctgagc 60
<210> 2
40
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
45
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
50
<400> 2
ctattttcta ttttctattt tctattttct ggatggagac tgggtcaact ggatgtcaca 60
<210> 3
55
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
60
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
65
<400> 3
ctattttcta ttttctattt tctattttct gcaagcgatg gtgactctgt ctctacagc 60
<210> 4
<211> 60

ES 2 317 939 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 4

10 ctattttcta ttcttattt tctattttct tctgtcccag atccactgcc actgaacctt 60

<210> 5

<211> 60

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 5

25 ctattttcta ttcttattt tctattttct gcagccacag ttcgcttcat ctgcacctg 60

<210> 6

<211> 60

<212> ADN

30

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 6

40 ctattttcta ttcttattt tctattttct ttcaactgc tcatcagatg gcgggaagat 60

<210> 7

<211> 60

<212> ADN

45

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

50

<400> 7

ctattttcta ttcttattt tctattttct aagtattca gcaggcacac aacagaggca 60

55

<210> 8

<211> 60

<212> ADN

60

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

65

ES 2 317 939 T3

<400> 8
 ctattttcta ttttctattt tctattttct ggcgttatcc acctccact gtactttggc 60
 5 <210> 9
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 15 <400> 9
 ctattttcta ttttctattt tctattttct taggtgctgt ccttgctgtc ctgctctgtg 60
 20 <210> 10
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 30 <400> 10
 ctattttcta ttttctattt tctattttct gtagtctgct ttgctcagcg tcaggggtgct 60
 <210> 11
 35 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 45 <400> 11
 ctattttcta ttttctattt tctattttct gatgggtgac ttgcagggcg tagactttgt 60
 <210> 12
 50 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 12
 60 ctattttcta ttttctattt tctattttct ctctcccctg ttgaagctct ttgtgacggg 60
 <210> 13
 65 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 317 939 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

5 <400>13

ctattttcta ttttctattt tctattttct tggaactgag gaggcaggtgg gggcacttct 60

<210> 14

10 <211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

20 <400> 14

ctattttcta ttttctattt tctattttct gaaaaagggt cagaggccaa aggatgggag 60

<210> 15

25 <211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

35 <400> 15

ctattttcta ttttctattt tctattttct agatgagctg gaggaccgca ataggggtag 60

<210> 16

40 <211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 16

50 ctattttcta ttttctattt tctattttct gcataattaa agccaaggag gaggaggggg 60

<210> 17

55 <211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 17

65 ctattttcta ttttctattt tctattttct cctgagtgag gagggtgagg agcagcagag 60

<210> 18

ES 2 317 939 T3

<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

10 <400> 18
ctattttcta ttttctattt tctattttct agaccagac acggaggcag gctgagtcag 60

<210> 19
15 <211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

25 <400> 19
ctattttcta ttttctattt tctattttct tgttggttcc agtcaggag atggtgatcg 60

<210> 20
30 <211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

40 <400> 20
ctattttcta ttttctattt tctattttct taaatcatga tttgggggc ttgcctggg 60

<210> 21
45 <211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

55 <400> 21
ctattttcta ttttctattt tctattttct tgttgccaga ctggagcca gagaagcgat 60

<210> 22
60 <211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

ES 2 317 939 T3

<400> 22

ctattttcta ttttctattt tctattttct aataatcagc ctcgtcctca gcctggagcc 60

5 <210> 23

<211> 60

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

15 <400> 23

ctattttcta ttttctattt tctattttct ggtccctccg ccgaaaacca cagtgttaact 60

20 <210> 24

<211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

30 <400> 24

ctattttcta ttttctattt tctattttct ttatgagaca caccagtgtg gccttgttgg 60

35 <210> 25

<211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

45 <400> 25

ctattttcta ttttctattt tctattttct ctgctcaggc gtcaggctca gatagctgct 60

50 <210> 26

<211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

60 <400> 26

ctattttcta ttttctattt tctattttct atgcgtgacc tggcagctgt agcttctgtg 60

65 <210> 27

<211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 317 939 T3

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

5 <400> 27
 ctattttcta ttttctattt tctattttct attctgtagg ggccactgtc ttctccacgg 60

10 <210> 28
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

20 <400> 28
 ctattttcta ttttctattt tctattttct cctcccctgg gatcctgcag ctctagtctc 60

25 <210> 29
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

35 <400> 29
 ctattttcta ttttctattt tctattttct tgagggttta ttgagtgcag ggagaagggc 60

40 <210> 30
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

50 <400> 30
 ctattttcta ttttctattt tctattttct ggagggtcaaa acagcgtgga tggcgc 55

55 <210> 31
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

65 <400> 31
 ctattttcta ttttctattt tctattttct gaggctggat cggccccggt gtctt 55

<210> 32

ES 2 317 939 T3

<211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 10 <400> 32
 ctattttcta ttttctattt tctattttct aatccgcgtt ccaatgcaccgttcc 55
 <210> 33
 15 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 25 <400> 33
 ctattttcta ttttctattt tctattttct taaaaactgc gggcactggg gacgg 55
 <210> 34
 30 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 40 <400> 34
 ctattttcta ttttctattt tctattttct acccgagatt cgcgtaggaga tccca 55
 <210> 35
 45 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 55 <400> 35
 ctattttcta ttttctattt tctattttct gagcaaggag ctgccgagcg accat 55
 <210> 36
 60 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

ES 2 317 939 T3

	<400> 36	
	ctattttcta ttttctattt tctattttct acactgggtg tggtagggcat cgtgc	55
5	<210> 37	
	<211> 55	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica	
15	<400> 37	
	ctattttcta ttttctattt tctattttct ttccaaatgc gtcagcggtg caagc	55
20	<210> 38	
	<211> 55	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica	
30	<400> 38	
	ctattttcta ttttctattt tctattttct agctgcctgc atcttcttct gccgc	55
	<210> 39	
35	<211> 55	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica	
45	<400> 39	
	ctattttcta ttttctattt tctattttct ccttccaccg ttaacagcac cgcaa	55
	<210> 40	
50	<211> 55	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica	
	<400> 40	
60	ctattttcta ttttctattt tctattttct ttggtcacgg gtgtctcggg cctaa	55
	<210> 41	
65	<211> 55	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 317 939 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

5 <400> 41

ctattttcta ttttctattt tctattttct tcggccaact ctggaaacag cgggt 55

<210> 42

10 <211> 55

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

20 <400> 42

ctattttcta ttttctattt tctattttct tcgggggtct cggtgcaatc ctgg 55

<210> 43

25 <211> 55

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 43

35 ctattttcta ttttctattt tctattttct atctcgatgc cccgctcaca tgcaa 55

<210> 44

40 <211> 55

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 44

50 ctattttcta ttttctattt tctattttct tgccgcacca tgtccactcg aacct 55

<210> 45

<211> 55

55 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 45

65 ctattttcta ttttctattt tctattttct gtagcggcg cccttgctca catca 55

<210> 46

ES 2 317 939 T3

<211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 10 <400> 46
 ctattttcta ttttctattt tctattttct tgcagatctc ctcaatgcgg cgctt 55
 15 <210> 47
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 25 <400> 47
 ctattttcta ttttctattt tctattttct tctcagagga tcggccccca gaatg 55
 30 <210> 48
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 40 <400> 48
 ctattttcta ttttctattt tctattttct cctcatctga ctctcggcg atggc 55
 45 <210> 49
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 55 <400> 49
 ctattttcta ttttctattt tctattttct cgggtacagg ggactctggg ggtga 55
 60 <210> 50
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

ES 2 317 939 T3

<400> 50

ctatattcta ttcttattt tctattttct gggtaggtgc tctgcctcc agagg 55

5 <210> 51

<211> 55

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

15 <400> 51

ctatattcta ttcttattt tctattttct gacctgggt cggtagcacc gcact 55

20 <210> 52

<211> 55

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

30 <400> 52

ctatattcta ttcttattt tctattttct ggaagcctct cttctcctcc cccgg 55

35 <210> 53

<211> 55

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

45 <400> 53

ctatattcta ttcttattt tctattttct ccacagacac cgtctcacc acccg 55

50 <210> 54

<211> 56

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

60 <400> 54

ctatattcta ttcttattt tctattttct ggctacagcc acacacgtct cctccc 56

<210> 55

65 <211> 55

<212> ADN

ES 2 317 939 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 55

10 ctattttcta ttttctattt tctattttct cgaggcgggc ggatcacctg aggtc 55

<210> 56

<211> 55

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 56

25 ctattttcta ttttctattt tctattttct cgggaggcgg aggttgcagt gagcc 55

<210> 57

<211> 60

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 57

40 ctattttcta ttttctattt tctattttct tttttttt tttttttt tttttttt 60

<210> 58

<211> 30

<212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

50 <400> 58

ctattttcta ttttctattt tctattttct 30

55 <210> 59

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

65 <400> 59

ccagagtagc aggagcccca ggagctgagc 30

ES 2 317 939 T3

<210> 60
 <211> 30
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 10 <400> 60
 ggatggagac tgggtcaact ggatgtcaca 30
 15 <210> 61
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 25 <400> 61
 gcaagcgatg gtgactctgt ctctacagc 30
 30 <210> 62
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 40 <400> 62
 tctgtcccag atccactgcc actgaacctt 30
 45 <210> 63
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 55 <400> 63
 gcagccacag ttcgcttcac ctgcaccttg 30
 60 <210> 64
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

ES 2 317 939 T3

<400> 64
 ttcaactgc tcatcagatg gcggaagat 30
 5 <210> 65
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 15 <400> 65
 aagttattca gcaggcacac aacagaggca 30
 20 <210> 66
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 30 <400> 66
 ggcgttatcc accttcact gtactttggc 30
 <210> 67
 35 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 67
 45 taggtgctgt ccttgctgtc ctgctctgtg 30
 <210> 68
 <211> 30
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 68
 60 gtagtctgct ttgctcagcg tcagggtgct 30
 <210> 69
 <211> 30
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 317 939 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

5 <400> 69

gatgggtgac ttcgcaggcg tagactttgt 30

<210> 70

10 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 70

20 ctctcccctg ttgaagctct ttgtgacggg 30

<210> 71

<211> 30

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 71

35 tggaactgag gagcagggtgg gggcacttct 30

<210> 72

<211> 30

40 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 72

50 gaaaaagggt cagaggccaa aggatgggag 30

<210> 73

<211> 30

55 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 73

65 agatgagctg gaggaccgca ataggggtag 30

<210> 74

<211> 30

ES 2 317 939 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 74

10 **gcataattaa agccaaggag gaggaggggg 30**

<210> 75
 <211> 30

15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 75

25 **cctgagtgag gagggtgagg agcagcagag 30**

<210> 76
 <211> 30

30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 76

40 **agaccagac acggaggcag gctgagtcag 30**

<210> 77
 <211> 30

45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 77

55 **tgttggttcc agtgcaggag atggtgatcg 30**

<210> 78
 <211> 30

60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

65

ES 2 317 939 T3

<400> 78

taaatacatga tttgggggc ttgcctggg 30

5 <210> 79

<211> 30

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

15 <400> 79

tggtgccaga ctggagcca gagaagcgat 30

20 <210> 80

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

30 <400> 80

aataatcagc ctctctca gcctggagcc 30

<210> 81

35 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

45 <400> 81

ggtcctccg ccgaaaacca cagtgtact 30

<210> 82

50 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 82

60 ttatgagaca caccagtgtg gcctgttg 30

<210> 83

65 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 317 939 T3

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

5 <400> 83
 ctgctcaggc gtcaggctca gatagctgct 30
 <210> 84
 10 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

20 <400> 84
 atgcgtgacc tggcagctgt agcttctgtg 30
 <210> 85
 25 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

35 <400> 85
 attctgtagg ggccactgtc ttctccacgg 30
 <210> 86
 <211> 30
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

50 <400> 86
 cctcccctgg gatcctgcag ctctagtctc 30
 <210> 87
 <211> 30
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

65 <400> 87
 tgagggttta ttgagtgcag ggagaagggc 30
 <210> 88
 <211> 25

ES 2 317 939 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 88

10 ggaggtcaaa acagcgtgga tggcg 25

<210> 89

<211> 25

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 89

25 gaggctggat cggccccggt gtctt 25

<210> 90

<211> 25

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 90

40 aatccgcgtt ccaatgcacc gtcc 25

<210> 91

<211> 25

<212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 91

55 taaaaactgc gggcactggg gacgg 25

<210> 92

<211> 25

<212> ADN

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

ES 2 317 939 T3

<400> 92
 acccgagatt cgcgtggaga tccca 25
 5 <210> 93
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 15 <400> 93
 gagcaaggag ctgccgagcg accat 25
 20 <210> 94
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 30 <400> 94
 acactggtgg tggtaggc cgtgc 25
 <210> 95
 35 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 45 <400> 95
 ttccaaatgc gtcagcggtg caagc 25
 <210> 96
 50 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 96
 60 agctgcctgc atcttcttct gccgc 25
 <210> 97
 <211> 25
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 317 939 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

5 <400> 97

ccctccaccg ttaacagcac cgcaa 25

<210> 98

10 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

20 <400> 98

ttggtcacgg gtgtctcggg cctaa 25

<210> 99

25 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 99

35 tcggccaact ctggaaacag cgggt 25

<210> 100

40 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 100

50 tcgggggtct cgttgcaatc ctcgg 25

<210> 101

<211> 25

55 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 101

65 atctcgatgc cccgctcaca tgcaa 25

<210> 102

ES 2 317 939 T3

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 10 <400> 102
 tgccgcacca tgtccactcg aacct 25
 15 <210> 103
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 25 <400> 103
 gttagcggcg cccttgctca catca 25
 <210> 104
 30 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 104
 40 <210> 105
 tgcagatctc ctcaatgcgg cgctt 25
 <211> 25
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 105
 55 <210> 106
 tctcagagga tcggcccccga gaatg 25
 <211> 25
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

ES 2 317 939 T3

<400> 106

cctcatctga ctctcggcg atggc 25

5 <210> 107

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

15 <400> 107

cgggtacagg ggactctggg ggtga 25

20 <210> 108

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

30 <400> 108

gggtgggtgc tctgcctcc agagg 25

<210> 109

35 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 109

45

gacctcgggt cggtagcacc gcact 25

<210> 110

50 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 110

60

ggaagcctct cttctcctcc cccgg 25

<210> 111

<211> 25

65 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 317 939 T3

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 5 <400> 111
 ccacagacac cgtcctcacc acccg 25
 <210> 112
 10 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 112
 20 <210> 113
 ggctacagcc acacacgtct cctccc 26
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 113
 35 <210> 114
 cgaggcgggc ggatcacctg aggtc 25
 <211> 25
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 114
 50 <210> 115
 cgggaggcgg aggttgcaat gagcc 25
 <211> 30
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 <400> 115
 tttttttt tttttttt tttttttt 30
 65 <210> 116
 <211>

ES 2 317 939 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 116

10 CTATTTTCTATTTTCTTTT CGAGGCGGGCGGATCACCTGAGGTC 46

<210> 117

<211>

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 117

25 CTATTTTCTATTTTCTTTT CGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCC 46

<210> 118

<211>

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 118

40 CTATTTTATACTTTATATTTTCATATTTTATCT
CGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCC 57

<210> 119

45 <211>

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 119

55 CTATTTTATATTTATATTTCT CGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCC
ACTATTTTATACTT 61

<210> 120

60 <211>

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

ES 2 317 939 T3

<400> 120
 CTATTTTATACTTTATATTTCT GACCTCGGGTCGGTAGCACCGCAC
 5 TACTATTTTATACTT 62
 <210> 121
 <211>
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 15 <400> 121
 CTATTTTCTT CGAGGCGGGCGGATCACCTGAGGTC TTCTTTTATCTT 49
 20 <210> 122
 <211>
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 30 <400> 122
 CTATTTTATACTTTATATTTCT CGAGGCGGGCGGATCACCTC3AGGTC
 35 ACTATTTTATACTT 61
 <210> 123
 <211>
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 45 <400> 123
 CTATTTTCTATTTTCTTTT 21
 50 <210> 124
 <211>
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica
 60 <400> 124
 CTATTTTATACTTTATATTTTCATATTTTATCT 32
 65 <210> 125
 <211>
 <212> ADN

ES 2 317 939 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 125

10 CTATTTTATACTTTATATTT ACTATTTTATACTT 61

<210> 126

<211>

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Sonda oligonucleotídica

<400> 126

25 CTATTTTCT TCTTTTATCTT 49

30

35

40

45

50

55

60

65