



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 301 246**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99944522 .4**

86 Fecha de presentación : **26.08.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1109935**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2001**

54 Título: **Visualización diferencial en dos colores como procedimiento para la detección de genes regulados.**

30 Prioridad: **07.09.1998 DE 198 40 731**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

73 Titular/es: **Sanofi-Aventis Deutschland GmbH**
Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt am Main, DE

72 Inventor/es: **Kozian, Detlef y**
Reuner, Birgit

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 301 246 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

Visualización diferencial en dos colores como procedimiento para la detección de genes regulados.

5 La invención se refiere a un nuevo procedimiento para el análisis de la composición de una muestra de ARNm y para el análisis de la expresión génica diferencial, utilizando dos cebadores marcados de diferente manera, así como a la utilización de la invención.

10 La visualización diferencial de pantalla de RNA (Differential Display: DD) es uno de los métodos más frecuentemente aplicados para la detección y el aislamiento de genes regulados (Liang, P. y Pardee, A. B. (1992) *Science* 257, 967-971; Liang y Pardee (1995) *Current Opinion in Immunology* 7, 274-280; McClelland *et al.* (1995) *Trends in Genetics* 11: 242-246). El método DDRT (Differential Display + Reverse Transcription (pantalla diferencial + transcripción inversa: DDRT) comprende, que en una primera etapa el ARN aislado se transcribe inversamente (transcripción inversa (RT)) utilizando un primer cebador, por lo que se prepara la primera cadena de un ADN complementario (ADNc) y éste, después, en una segunda etapa, utilizando el primer cebador y un segundo cebador se amplifica con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, a continuación, se analiza la composición de la muestra de ADNc amplificada, por ejemplo por apertura del ADNc amplificado en un gel. La detección puede tener lugar después, por ejemplo por hibridación con una muestra marcada o por marcación del ADNc amplificado, pero también porque la amplificación se lleva a cabo en presencia de nucleótidos marcados radiactivamente (generalmente ATPd marcado radiactivamente) o en presencia de un cebador marcado, el cual se ha marcado, por ejemplo, con un colorante fluorescente ("DDRT fluorescente") (Ito *et al.* (1994) *FEBS Letters* 351, 231-236; Ito and Sakaki ("Methods in Molecular Biology Vol. 85: Differential Display Methods and Protocols" (1997) págs. 37-44 Liang y Pardee editores, Human Press Inc. Totowa, NJ; Jones *et al.* (1997) *Biotechniques* 22, 536-543; Smith *et al.* (1997) *Biotechniques* 23, 274-279).

25 Si la reacción se lleva a cabo en presencia de nucleótidos marcados radiactivamente, entonces se marcan todos los ADNc amplificados (DDRT radioactivo; DDRT clásico). Si por el contrario se utiliza un cebador marcado (por ejemplo DDRT fluorescente), entonces por las posibles combinaciones del primer cebador marcado y del segundo cebador no marcado durante el PCR sólo se marca una parte de los ADNc amplificados, mientras que otra parte se queda sin marcar.

30 Para la RT se emplea el cebador primeramente marcado (aquí el cebador 1 es un oligo(dT)-cebador con dos nucleótidos más (M=A, C, G; N=A, C, G, T) en el extremo-3' ("5'-(T)₁₂-MN-3'" es (T)₁₂-MN)). En la siguiente PCR se emplea adicionalmente con este primer cebador un segundo cebador no marcado (aquí el cebador 2 es un oligonucleótido con una secuencia de 10 nucleótidos que presentan una secuencia casual ("10mero")), no obstante, el primer cebador se emplea habitualmente con doble cantidad de exceso. De esta manera se obtiene por lo regular una proporción relativamente elevada de ADNc amplificados, cuyos extremos-3' presentan la secuencia del primer cebador, y cuyos extremos-5' presentan la secuencia del segundo cebador (por ejemplo 5'-10mero ----- (T)₁₂-MN-3', simbolizando "-----" la secuencia de ADNc amplificada, situada entre las secuencias de los cebadores. Además de esto, se amplifican ADNc, en los cuales las secuencias de los cebadores se han intercambiado frente a 1) (en cuyos extremos-5' se encuentra la secuencia del cebador (T)₁₂-MN y en su extremo-3' la secuencia del cebador 10mero; (véase. 2)). Otros ADNc se amplifican o bien sólo a través del cebador-(T)₁₂-MN (véase. 3) o sólo a través del cebador-10mero (véase. 4). Por lo tanto, en el caso de utilizar dos cebadores distintos, por las posibles combinaciones de los cebadores en el DDRT se pueden amplificar los siguientes productos de reacción:

- 45 1) 5'-10mero----- (T)₁₂-MN-3'
 2) 5'-(T)₁₂-MN ----- 10mero-3'
 3) 5'-(T)₁₂-MN ----- (T)₁₂-MN-3'
 50 4) 5'-10mero -----10mero-3'

Debido al hecho de que en esta tanta de DDRT fluorescente sólo está marcado el primer cebador, en el subsiguiente análisis de los ADNc amplificados sólo se detectan aquellos ADNc, que fueron amplificados en al menos una dirección a través de primer cebador marcado, es decir los ADNc citados bajo 1), 2) y 3), mientras que por el contrario los ADNc, que sólo se amplifican con el segundo cebador ni se marcan ni se detectan (véase 4). Con ello, en comparación con un DDRT radioactivo, la complejidad de los productos detectados por PCR (ADNc) es menor. Por este motivo, con el DDRT fluorescente convencional no se captan aquellos genes regulados o, respectivamente, los ARNm correspondientes a ellos, los cuales sólo se amplifican con el segundo cebador. Por consiguiente, el número de genes regulados que se capta con el DDRT fluorescente convencional puede ser menor que el captado en el DDRT radioactivo.

Además, tanto con el DDRT radioactivo convencional como también con el DDRT fluorescente convencional, como se expone bajo 1) a 4), partiendo de un único ARNm no se amplifica en el PCR un producto de ADNc homogéneo sino que por las diferentes combinaciones de los cebadores se pueden amplificar varios ADNc, los cuales se diferencian en su longitud (esto sería visible, por ejemplo por separación en un gel). El que en el caso de diferentes ADNc amplificados se trate o no de productos de ADNc de un mismo gen regulado, lo indicaría solamente un análisis detallado (por ejemplo un análisis secuencial). Los DDRT convencionales no ofrecen la posibilidad de diferenciar entre los ADNc redundantes amplificados, marcados. En el DDRT radioactivo no se puede diferenciar entre 1) a 4).

ES 2 301 246 T3

En el DDRT fluorescente convencional no se puede diferenciar entre 1), 2) y 3), aunque exista una mayor probabilidad de que el fragmento visible de ADNc proceda de la región 3' de un gen, puesto que el cebador 3' está marcado con el colorante fluorescente.

5 Por consiguiente, por un lado la redundancia de los fragmentos de ADNc amplificados en el DDRT radioactivo convencional, la cual no se puede detectar o, respectivamente, sólo con una complejidad relativamente alta y, por otro lado, la menor complejidad del producto de ADNc amplificado en el DDRT fluorescente convencional en comparación con el DDRT radioactivo convencional representan, junto con el riesgo de no advertir determinados genes regulados, los problemas principales del método del DDRT convencional y, respectivamente, del DDRT fluorescente.

10 La invención en la que se fundamenta la presente solicitud pone a disposición un procedimiento, que puede ser utilizado para el análisis de muestras de ARN y especialmente para el análisis de genes regulados diferencialmente, no presentando este procedimiento las citadas desventajas.

15 La presente invención se refiere a un procedimiento para el análisis de una muestra de ARN, preferentemente una muestra de ARNm, en donde

a) partiendo de una muestra de ARN, preferentemente una muestra de ARNm utilizando un primer cebador, el cual eventualmente está marcado con un primer colorante, se prepara la primera cadena de una muestra de ADN complementario (muestra de ADNc),

b) se prepara la segunda cadena de esta muestra de ADNc utilizando un segundo cebador, el cual preferentemente está marcado con un segundo colorante,

25 c) la muestra de ADNc se amplifica utilizando el primer cebador que está marcado con un primer colorante y el segundo cebador, que está marcado con un segundo colorante, y

d) se analiza la composición de la muestra de ADNc amplificada y marcada.

30 La muestra de ARN contiene ARNm que se ha de analizar. En una forma de ejecución preferida de la invención se emplea en el procedimiento ARNm. Los ARN se pueden aislar por ejemplo con ayuda de conocidos procedimientos tales como la centrifugación con gradientes de densidad con CsCl₂ o la cromatografía en columna. Preferentemente, el ARN se aísla a partir de una célula o, respectivamente, de una colonia de células o, respectivamente, de un tejido. Eventualmente, se puede concentrar el ARNm a partir del ARN, por ejemplo por cromatografía a través de una columna de oligo(dT).

35 En el procedimiento se emplean un primer y un segundo cebador. El primer cebador es el cebador que se emplea para la transcripción inversa. El primer cebador se puede designar también como cebador 3', puesto que hibridiza con el ARNm y define el extremo 3' de la primera cadena del ADN complementario (ADNc). El segundo cebador se emplea para sintetizar la segunda cadena del ADNc. El segundo cebador se designa también como cebador 5', puesto que hibridiza con la primera cadena del ADNc y define el extremo 5' de la segunda cadena del ADNc.

40 El primer cebador y el segundo cebador están marcados eventualmente con un colorante. El primer cebador se emplea para la transcripción inversa (etapa a) del procedimiento) y para la subsiguiente amplificación del ADNc (etapa c) del procedimiento). El primer cebador, el cual se emplea para la RT o bien está marcado con un colorante o no está marcado con un colorante, lo último es el caso, por ejemplo, cuando la transcriptasa inversa utilizada no acepta el cebador marcado. En cualquier caso, el primer cebador está marcado cuando se emplea para la amplificación de ADNc. El primer cebador, el cual se emplea para la RT, y el primer cebador, el cual se emplea para la amplificación, tienen preferentemente la misma secuencia.

50 El segundo cebador, el cual se utiliza tanto para la síntesis de la segunda cadena del ADNc (etapa b) del procedimiento) como también para la amplificación del ADNc (etapa c) del procedimiento), está marcado preferentemente tanto durante la síntesis de la segunda cadena como también durante la amplificación. Preferentemente, en los dos casos, el segundo cebador tiene la misma secuencia. Preferentemente, la síntesis de la segunda cadena y la amplificación del ADNc son partes constituyentes de una reacción, de manera que el segundo cebador es idéntico.

55 En formas de ejecución preferidas de la invención el primer y segundo cebador son oligodesoxinucleótidos, constituidos por desoxiadenosina (dA) desoxiguanosina (dG), desoxiinosina (dI), desoxiuridina (dU), (desoxi-)timidina (dT) y desoxicidina (dC).

60 El primer y/o el segundo cebador pueden presentar una secuencia de bases (secuencia de adenina, guanina, citosina, timina; en lo sucesivo "secuencia"), la cual es complementaria a la o las secuencias de uno o varios ácidos nucleicos determinados. Un cebador, que es complementario de una determinada secuencia, puede hibridizar con un ácido nucleico que contenga esta secuencia complementaria o una secuencia, la cual se derive de esta secuencia complementaria (o sea que presente una cierta homología con esta secuencia complementaria). Por ejemplo, el primer cebador puede hibridizar preferentemente con el ARNm. Por extensión del cebador se crea la primera cadena del ADNc. Un cebador puede presentar también una secuencia que sea idéntica o, respectivamente, sensiblemente idéntica a la secuencia de un determinado ácido nucleico. Este cebador puede hibridizar después (bajo determinadas condiciones de reacción)

ES 2 301 246 T3

con un ácido nucleico que presente una secuencia complementaria a la del ácido nucleico determinado. Por ejemplo, la secuencia del segundo cebador se deriva de la secuencia del ARNm, es decir que la secuencia del segundo cebador puede ser idéntica o, respectivamente, sensiblemente idéntica a la secuencia del ARNm. Por eso, el segundo cebador puede hibridizar (bajo determinadas condiciones de reacción) con un ácido nucleico que presente una secuencia que sea complementaria a la secuencia del ARNm, por ejemplo con la primera cadena del ADNc.

Las condiciones de reacción bajo las cuales el primer y segundo cebador hibridizan con un ácido nucleico vienen determinadas preferentemente por condiciones de temperatura y/o de tampón. Las condiciones de temperatura se eligen preferentemente de tal modo, que los cebadores hibridicen específicamente con la secuencia complementaria del ácido nucleico, es decir que se produzcan predominantemente “correctos” emparejamientos de bases (A-T; G-C) y a ser posible pocos emparejamientos de bases defectuosos, es decir se elige a ser posible una temperatura de hibridación óptima (temperatura de annealing) (por ejemplo Sambrook *et al.* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Además de esto, se eligen determinadas concentraciones salinas, especialmente concentraciones de Mg^{2+} .

Un ácido nucleico, de cuya secuencia se deriva la secuencia del primer y/o segundo cebador (es decir de la cual éstas son complementarias o idénticas o, respectivamente, sensiblemente idénticas) puede ser, por ejemplo, un ADN, por ejemplo un ADNc, un gen o una parte de él o un ARN, preferentemente un ARNm.

El segundo cebador puede presentar una secuencia de bases casual, comprendiendo esto tanto los cebadores que presentan una secuencia completa casual, como también aquellos cebadores que presentan una secuencia parcialmente casual (casual, por ejemplo, en lo referente a una o varias bases). Las secuencias pueden ser casuales, pero pueden presentar al mismo tiempo una determinada relación de cada una de las bases, por ejemplo todas las bases pueden aparecer en igual relación, o una o varias bases se presentan en mayor o menos proporción. Especialmente, también se puede utilizar hipoxantina.

El segundo cebador puede presentar también una o varias secuencias de bases concretas. Esta(s) secuencia(s) concreta(s) se pueden seleccionar casualmente, es decir no se derivan de secuencias conocidas. Con tales cebadores se pueden identificar genes o, respectivamente, proteínas nuevas, no identificadas hasta el momento.

El segundo cebador puede presentar una secuencia de bases que se derive de secuencias conocidas, es decir que corresponden a secuencias total o parcialmente conocidas (es decir, que sea complementaria de estas secuencias o que sea idéntica o, respectivamente, esencialmente idéntica a éstas). Por ejemplo, un cebador puede presentar una secuencia, que presente una mayor o menor coincidencia con una determinada secuencia de consenso o, respectivamente, que sea correspondiente a esta. De esta manera se puede identificar, por ejemplo, la expresión diferencial de miembros conocidos y/o desconocidos de una determinada familia de genes/familia de proteínas.

El segundo cebador puede presentar una secuencia de bases que se derive de una determinada secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una secuencia consensual a nivel de aminoácido). En este caso, los cebadores pueden estar degenerados, es decir que en lo referente a una determinada secuencia de aminoácidos se tendrá en cuenta la degeneración del código genético; el cebador representa entonces una mezcla de moléculas de cebador, las cuales presentan una secuencia de aminoácidos diferente y tienen en cuenta todas las posibilidades de utilización del codón, para codificar la correspondiente secuencia de aminoácidos (cebador degenerado).

Preferentemente, la secuencia del segundo cebador presenta un punto de corte de restricción para una endonucleasa de restricción.

El segundo cebador puede presentar preferentemente una longitud de 8 a 20 nucleótidos para garantizar una hibridación a ser posible específica. Sin embargo, la longitud se elige de forma correspondiente a las respectivas secuencias del cebador y/o a las condiciones de reacción. La longitud y secuencia del primer y segundo cebador se eligen independientemente uno de otro.

El primer y/o el segundo cebador pueden contener también una secuencia que no sean necesarias para la hibridación o, respectivamente, que no contribuyan a la hibridación. Estas otras secuencias, por ejemplo pueden posibilitar o, respectivamente, facilitar la ulterior caracterización o, respectivamente, utilización de los ADNc amplificados. Preferentemente, estas otras secuencias se localizan en el extremo 5' del cebador. Por ejemplo, el cebador puede contener una secuencia que facilite una subsiguiente secuenciación, por ejemplo una secuencia M13 y/o una secuencia que facilite la preparación de una sonda marcada (por ejemplo para la hibridación de Northern-Blots, Southern-Blots y/o para la hibridación *in situ*), por ejemplo una secuencia promotora T7, una secuencia promotora T3 o una secuencia promotora SP6.

En la primera etapa del procedimiento se transcribe inversamente ARNm, preparándose la primera cadena de un ADNc (etapa a) del procedimiento). Para la RT se emplea un primer cebador, el cual eventualmente está marcado con un colorante. Preferentemente, el primer cebador presenta una secuencia oligo(dT) (“(T)_x”, indicando “X” el número de radicales timidina) que hibridizan con el rabo poli (A) de cada uno de los ARNm y de esta manera puede suministrar un extremo 3'-OH libre para la reacción de la polimerasa. La secuencia oligo(dT) es preferentemente una secuencia de 10-20 radicales timidina (X = 10-20), de modo particularmente preferido es una secuencia de 12 radicales timidina (X = 12) o, respectivamente, 15 radicales timidina (X=15).

ES 2 301 246 T3

En una forma de ejecución particularmente preferida, la secuencia del primer cebador presenta en el extremo 3' de la secuencia oligo-(dT) al menos un nucleótido más, pero preferentemente dos nucleótidos, los cuales no pertenecen a la secuencia oligo(dT), es decir que el primer nucleótido, que se conecta en el extremo 3' de la secuencia oligo(dT) es diferente de la timidina. Preferentemente, el primer cebador representa una mezcla de moléculas de cebador, las cuales se diferencian en la secuencia de los nucleótidos que no pertenecen a la secuencia oligo(dT). Por ejemplo, el primer cebador puede presentar la secuencia 5'-(T)_xMN-3', en donde M representa A (base adenina), C (base citosina) o G (base guanina) y "N" representa A, C, G o T (base timina). Por ejemplo, puede ser X=12 o 15:

SEQ ID NO: 1: 5'- TTTTTTTTTTTTMMN -3' (5' - (T)₁₂-MN-3'''),

SEQ ID NO: 2: 5'- TTTTTTTTTTTTMMN -3' (5' - (T)₁₅-MN-3''').

en donde

"M" es A, C o G, y

"N" es A, C, G o T.

El primer cebador representa preferentemente una mezcla de diferentes cebadores, los cuales se diferencian en la secuencia que no pertenece a la secuencia oligo(dT).

5'-T_(x)MN-3' puede ser una mezcla de moléculas de cebador con las secuencias:

5'-T_(x)AN-3'

5'-T_(x)CN-3'

5'-T_(x)GN-3'

con N=A,C,G.

Preferentemente, 5'-T_(x)MN-3' es una mezcla de moléculas de cebador con las secuencias:

5'-T_(x)MA-3''

5'-T_(x)MC-3'

5'-T_(x)MG-3'

5'-T_(x)MT-3'

con M=A,C,G,

en donde las posibles bases A, C y G están uniformemente representadas en la mezcla; por ejemplo 5'-(T)_xMN-3' es una mezcla de moléculas de cebador con las secuencias: 5'-(T)_xAG, 5'-(T)_xCG, 5'-(T)_xGG, respectivamente, 5'-(T)_xAT, 5'-(T)_xCT, 5'-(T)_xGT etc.. De esta manera se pueden poner a disposición cebadores para la amplificación de diferentes ARNm de secuencia desconocida. Al mismo tiempo se garantiza que los cebadores hibridizan preferentemente con el extremo 3' de la secuencia complementaria (en la cola poli(A) del ARNm).

Para la RT se utiliza preferentemente una ADN-polimerasa dependiente del ARN, por ejemplo la enzima transcriptasa inversa u otra polimerasa dependiente del ADN con actividad de transcriptasa inversa, por ejemplo una polimerasa correspondiente estable a la temperatura, la cual después se puede utilizar también para la amplificación subsiguiente de ADNc (etapa c) del procedimiento). En una forma de ejecución preferida de la invención la síntesis de los dos cordones del ADNc es componente de la etapa de procedimiento para la amplificación de ADNc, siendo la etapa de procedimiento para la amplificación de ADNc preferentemente una reacción PCR.

La transcripción inversa se puede llevar a cabo, por ejemplo, a 37°C - 50°C, preferentemente a 40°C - 45°C y, de modo particularmente preferido a 42°C. Se utiliza preferentemente una temperatura de hibridación que haga posible una hibridación específica del primer cebador (a ser posible pocos emparejamientos de bases defectuosos) y la cual garantice una actividad de la polimerasa suficientemente elevada y con la cual se puedan obtener productos transcritos a ser posible completos.

La segunda cadena del ADNc se sintetiza utilizando un segundo cebador, el cual preferentemente está marcado. El segundo cebador presenta preferentemente una longitud de al menos 6 nucleótidos (6 meros), de modo particularmente preferido una longitud de 10 (10meros) a 20 nucleótidos (20meros). En una forma de ejecución particular de la invención el segundo cebador presenta una longitud de 13 nucleótidos ("13meros"). La secuencia del segundo cebador puede ser, por ejemplo, "(N)_x", siendo "X" 6-20 y "N", independientemente entre sí, es A, C, G o T.

ES 2 301 246 T3

En el caso del primer y segundo cebador se trata preferentemente de oligonucleótidos sintéticos, los cuales, por ejemplo, se pueden adquirir comercialmente o se sintetizan sobre una fase sólida con ayuda de un procedimiento conocido (por ejemplo el procedimiento de la fósforoamida según Caruthers *et al.* (1983) Tetrahedron Letters 24, 245). Los cebadores están constituidos preferentemente por los nucleótidos desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxiinosina, desoxicitidina y desoxitimidina.

En una forma de ejecución particularmente preferida del procedimiento de la invención, la síntesis de la segunda cadena del ADNc ya es parte componente de la reacción de PCR, y se sintetiza bajo las condiciones de reacción bajo las cuales se lleva a cabo la PCR.

Preferentemente, el primer y segundo cebador están marcados de forma diferente. En principio, se puede utilizar cualquier tipo de marcación, por ejemplo un cebador se puede acoplar a digoxigenina o biotina, de modo que una molécula de ADNc amplificada con ayuda de este cebador se puede detectar, por ejemplo, con un anticuerpo o, respectivamente, enzima correspondiente, o un cebador puede estar acoplado a un compuesto químico, el cual permita la reacción de un sustrato después de su adición, por ejemplo el sistema Atto-Phos (JBL Scientific, San Luis Obispo, CA, USA) o un sustrato ECF (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland).

No obstante, se prefiere particularmente la marcación del primer y/o segundo cebador con colorantes fluorescentes. Preferentemente, el primer cebador se marca con un primer colorante fluorescente y el segundo cebador con un segundo colorante fluorescente. El primer y el segundo colorante fluorescente se eligen preferentemente de modo que sea posible una clara distinción de los dos colorantes fluorescentes utilizados. En este caso, la univocidad del resultado, es decir la diferencia detectable de los motivos de marcación individuales de cada uno de los ADNc depende tanto de los colorantes fluorescentes utilizados como también de la sensibilidad del procedimiento analítico. Por lo regular, para la evaluación se utilizan procedimientos analíticos apoyados por ordenador. Por ejemplo, los colorantes fluorescentes se pueden seleccionar de tal modo que las longitudes de onda de excitación y/o las longitudes de onda de emisión, detectables, del primer y del segundo colorante fluorescente se diferencien en 200 nm o más, por ejemplo en 250 nm, 300 nm, 350 nm, 400 nm.

Ejemplos de colorantes fluorescentes a los que se pueden acoplar el primer y/o segundo cebador son Cy2, Cy3, Cy5, FAM, 6-FAM (6-carboxi-fluoresceína (azul)), FITC (isotiocianato de fluoresceína), fluoresceína, HEX (4, 5, 2', 4', 5', 7'-hexacloro-6-carboxifluoresceína (verde)), 5-IAF, TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina (amarillo)), TET (4, 7, 2', 7'-tetracloro-6-carboxifluoresceína), XRITC (isotiocianato de rodamina-X), ROX (6-carboxirodamina (rojo)), Alexa488, Alexa532, Alexa546, Alexa594, TexasRed y Lisamina.

Por ejemplo, son posibles las siguientes combinaciones:

Cebador 1 marcado con Cy5 y cebador 2 marcado con Alexa488; cebador 1 marcado con Cy5 y cebador 2 marcado con FITC; cebador 1 marcado con Cy5 y cebador 2 marcado con FAM; cebador 1 marcado con Cy5 y cebador 2 marcado con Cy2; cebador 1 marcado con Cy5 y cebador 2 marcado con Cy3; cebador 1 marcado con fluoresceína y cebador 2 marcado con Texas Red; cebador 1 marcado con fluoresceína y cebador 2 marcado con Lisamina; cebador 1 marcado con fluoresceína y cebador 2 marcado con ROX; cebador 1 marcado con fluoresceína-Cy3; cebador 1 marcado con Alexa 594 y cebador 2 marcado con Alexa488; cebador 1 marcado con Alexa568 y cebador 2 marcado con Alexa488; cebador 1 marcado con Alexa546 y cebador 2 marcado con Alexa488; cebador 1 marcado con Alexa532 y cebador 2 marcado con Alexa488; cebador 1 marcado con Texas Red y cebador 2 marcado con Alexa 488; cebador 1 marcado con ROX y cebador 2 marcado con Alexa488; cebador 1 marcado con Alexa488 y cebador 2 marcado con Lisamina; cebador 1 marcado con Alexa488 y cebador 2 marcado con Cy3; cebador 1 marcado con Alexa488 y cebador 2 marcado con ROX. Naturalmente también son posibles las correspondientes combinaciones de cebadores, en las cuales los colorantes fluorescentes utilizados para la marcación están intercambiados en relación con el cebador 1 y el cebador 2 frente a los ejemplos expuestos anteriormente.

Preferentemente, los colorantes fluorescentes se acoplan al extremo 5' del cebador (oligonucleótido). En el caso de un cebador oligo(dT) en el extremo 5' anterior al colorante fluorescente puede estar localizado otro nucleótido más, diferente a timidina, por ejemplo una guanosina. Además de esto, un colorante fluorescente también se puede acoplar al oligonucleótido a través de una base. Eventualmente, un colorante fluorescente se puede acoplar también al primer cebador y/o segundo cebador a través de un adecuado enlazador.

Ejemplos de cebadores marcados, los cuales se pueden utilizar como primer y/o segundo cebador son:

5'-CY5-G(T)₁₅MN -3', 5'-CY2-G(T)₁₅MN -3', 5'-CY3-G(T)₁₅MN -3',
5'-FAM-G(T)₁₅MN -3', 5'-6'-FAM-G(T)₁₅MN -3', 5'-FITC-G(T)₁₅MN -3',
5'-fluoresceína-G(T)₁₅MN -3', 5'-HEX-G(T)₁₅MN -3', 5'-5-IAF-G(T)₁₅MN -3',
5'-TAMRA-G(T)₁₅MN -3', 5'-TET-G(T)₁₅MN -3', 5'-XRITC-G(T)₁₅MN -3',
5'-ROX-G(T)₁₅MN -3', 5'-Alexa488-G(T)₁₅MN -3', 5'-Alexa532-G(T)₁₅MN -3',

ES 2 301 246 T3

5'-Alexa546-G(T)₁₅MN-3', 5'-Alexa594-G(T)₁₅MN-3',

5'-TexasRed-G(T)₁₅MN-3', 5'-Lisamina-G(T)₁₅MN-3' (los cebadores citados hasta ahora se utilizan preferentemente como primeros cebadores), 5'-CY5-(N)₁₃-3',

5'-CY2-(N)₁₃-3', 5'-CY3-(N)₁₃-3', 5'-FAM-(N)₁₃-3', 5'-6-FAM-(N)₁₃-3',

5'-FITC-(N)₁₃-3', 5'-fluoresceína-(N)₁₃-3', 5'-HEX-(N)₁₃-3', 5'-5-IAF-(N)₁₃-3',

5'-TAMRA-(N)₁₃-3', 5'-TET-(N)₁₃-3', 5'-XRITC-(N)₁₃-3', 5'-ROX-(N)₁₃-3',

5'-Alexa488-(N)₁₃-3', 5'-Alexa532-(N)₁₃-3', 5'-Alexa546-(N)₁₃-3', 5'-Alexa594-(N)₁₃-3', 5'-TexasRed-(N)₁₃-3' y 5'-Lisamina-(N)₁₃-3' (estos cebadores se utilizan preferentemente como segundos cebadores),

en donde

“M” es A, C o G, y

“N” es A, C, G o T.

En el caso de la marcación del primer y/o del segundo cebador con un colorante fluorescente hay que tener cuidado de que las longitudes de onda de excitación se encuentren lo suficientemente separadas para poder determinar después de la excitación en base a qué longitud de onda se pudo observar una emisión. Una buena combinación es, por ejemplo, una marcación Cy5 (excitación a 650 nm) por ejemplo del primer cebador (por ejemplo de un cebador TX-MN) y una marcación basada en una fluoresceína (excitación a 490 nm) del segundo cebador. La utilización de dos cebadores marcados de diferente manera permite una opinión unívoca sobre la composición del cebador de un ADNc(s) amplificado, detectado, por ejemplo en el gel.

Si, por ejemplo, sólo se observa una emisión a 650 nm, entonces el ADNc fue amplificado con el cebador marcado con Cy5, este ADNc posee al menos en un extremo el primer cebador (por ejemplo el cebador (T)_x-MN). Si se observa una emisión en una longitud de onda de emisión de 490 nm, entonces en al menos un extremo el ADNc va provisto con el segundo cebador. Si un determinado ADNc amplificado (en el gel) sólo emite a una longitud de onda de excitación, entonces en la amplificación sólo fue amplificado el ADNc con un cebador y, ciertamente, aquel que fue amplificado con un colorante fluorescente que emite en la correspondiente longitud de onda de excitación. Cuando un determinado ADNc amplificado (en el gel), emite en dos longitudes de onda de excitación, entonces este ADNc fue amplificado utilizando el primer y/o segundo cebador.

La amplificación (preferentemente PCR) se lleva a cabo utilizando una ADN-polimerasa, preferentemente una ADN polimerasa dependiente del ADN, tratándose de modo particularmente preferido de una ADN-polimerasa estable a la temperatura, por ejemplo una Taq-polimerasa, VENT-polimerasa, AmpliTaq polimerasa, AmpliTaq Gold polimerasa, entre otras. La PCR se lleva a cabo aplicando un perfil de temperaturas, el cual permite una amplificación del ADNc, preferentemente exponencial. Para ello se puede utilizar, por ejemplo, el ciclo de temperaturas indicado en el Ejemplo 1. Preferentemente, se realizan 30-40 o más ciclos.

A continuación de esto se analiza el ADNc amplificado y marcado. El ADNc amplificado se puede separar, por ejemplo, en un gel, en el que se localizan en diferentes bandas los ADNc amplificados que se diferencian en su longitud. El análisis ulterior de tales bandas puede tener lugar, por ejemplo, en escáneres, los cuales excitan el colorante fluorescente en una longitud de onda dada (la cual depende del colorante fluorescente utilizado en cada caso) y/o que pueden detectar la luz que se emite en el caso de una reacción química de un sustrato quimioluminiscente. La luz fluorescente emitida se puede evaluar después, por ejemplo con un programa de ordenador correspondiente, y se puede recomponer en una imagen sobre gel (como se conoce, por ejemplo, de autoradiografías). Como escáner se pueden utilizar, por ejemplo, los Scanner Fluorimager 575, Fluorimager SI, Fluorimager (Molecular Dynamics, Krefeld), Strom (Molecular Dynamics), FLA-2000 (Fuji, Tokio, Japón), FMBioll (Hitachi, a través de Biozym Diagnostic GmbH, Hess. Oldendorf), Fluor-S-Multimager y Molecular Imager FX (BioRad, Munich).

En el procedimiento se emplea especialmente ARNm (también “muestra de ARNm”), el cual se aísla a partir de una célula. Por lo regular, una muestra de este tipo es una muestra heterogénea de ARNm (es decir, contiene una mezcla de los ARNm existentes en esa célula en el momento del aislamiento del ARN). Esta muestra heterogénea de ARNm representa por lo regular los genes expresados por una determinada célula en un determinado momento y bajo determinadas condiciones, es decir la composición de la muestra de ARNm depende por ejemplo del tipo de célula, del estado diferencial, del ciclo celular y/o de del tratamiento previo de la célula, etc.

Una forma de ejecución preferida de la invención se refiere al análisis de una muestra heterogénea de ARNm, en el que

a) partiendo de una muestra heterogénea de ARNm utilizando un primer cebador, el cual eventualmente está marcado con un primer colorante, se prepara la primera cadena de una muestra de ADN complementario (muestra heterogénea de ADNc),

ES 2 301 246 T3

b) se prepara la segunda cadena de esta muestra heterogénea de ADNc utilizando un segundo cebador, el cual preferentemente está marcado con un segundo colorante,

5 c) la muestra heterogénea de ADNc se amplifica utilizando el primer cebador, el cual está marcado con un primer colorante (“primer cebador marcado”) y el segundo cebador, el cual está marcado con un segundo colorante (“segundo cebador marcado”), y

d) se analiza la composición de la muestra heterogénea de ADNc, amplificada y marcada.

10 En el caso de los genes expresados por una determinada célula en un determinado momento son particularmente interesantes, los que se expresan diferencialmente o, respectivamente, regulados. Aquí es especialmente interesante el análisis comparativo de genes expresados diferencialmente. Una forma de ejecución particular de la invención se refiere a un procedimiento correspondientemente análogo para el análisis comparativo de dos o más muestras heterogéneas de ARNm.

15

Una forma de ejecución particular de la invención se refiere a un procedimiento para el análisis comparativo de una primera muestra heterogénea de ARNm con una o varias muestras heterogéneas de ARNm posteriores, en el que

20 a) partiendo de dos o más muestras heterogéneas de ARNm por cada una de estas muestras de ARNm y utilizando un primer cebador, el cual eventualmente está marcado con un primer colorante, se prepara la respectiva primera cadena de una muestra heterogénea, complementaria de ADN (muestra heterogénea de ADNc),

25 b) después, para cada una de estas muestras se prepara la respectiva segunda cadena de la muestra heterogénea de ADNc utilizando un segundo cebador, el cual preferentemente está marcado con un segundo colorante,

c) cada una de las muestras heterogéneas de ADNc se amplifica utilizando el primer cebador marcado y el segundo cebador marcado, y

30 d) se analiza la composición de cada muestra heterogénea de ADNc, amplificada y marcada y se compara la composición de las muestras.

Otra forma de ejecución particular de la invención se refiere a un procedimiento, en el que

35

a) partiendo de dos o más muestras heterogéneas de ARNm por cada una de estas muestras de ARNm y utilizando un primer cebador, el cual eventualmente está marcado con un primer colorante, se prepara la respectiva primera cadena de una muestra heterogénea, complementaria de ADN (muestra heterogénea de ADNc),

40 b) después, para cada una de estas muestras se prepara la respectiva segunda cadena de la muestra heterogénea de ADNc utilizando un segundo cebador, el cual preferentemente está marcado con un segundo colorante,

c) cada una de las muestras heterogéneas de ADNc se amplifica utilizando el primer cebador marcado y el segundo cebador marcado, y

45

d) se analiza en qué o en cual de las muestras están contenidas o no moléculas individuales de ARNm.

A continuación de la amplificación del ADNc y, eventualmente, del análisis de la composición del ADNc se determina cuáles de los ADNc amplificados presentan qué tipo de composición de cebador, es decir cuáles de los ADNc fueron amplificados sólo con el primer cebador, cuáles fueron amplificados con el segundo cebador y cuáles fueron amplificados con el primer y el segundo cebador (pertenencia de los ADNc amplificados diferencialmente con respecto a los grupos 1)+2), 3) y 4)). La invención se refiere también a procedimientos más desarrollados, en los que en virtud de la composición del cebador de los ADNc amplificados se seleccionan determinados ADNc amplificados y eventualmente se siguen analizando y/o se siguen utilizando. Además de esto, la invención se refiere a procedimientos más desarrollados, en los que se analiza la distribución de la composición del cebador del conjunto de ADNc amplificados en relación a los grupos 1)-4).

55

Ejemplos de procedimientos más desarrollados son:

60

Un procedimiento para el análisis de una muestra de ARN, preferentemente una muestra de ARNm, en el que

65 a) partiendo de una muestra de ARN, preferentemente una muestra de ARNm utilizando un primer cebador, el cual eventualmente está marcado con un primer colorante, se prepara la primera cadena de una muestra de ADN complementario (muestra de ADNc),

b) se prepara la segunda cadena de esta muestra de ADNc utilizando un segundo cebador, el cual preferentemente está marcado con un segundo colorante,

ES 2 301 246 T3

c) la muestra de ADNc se amplifica utilizando el primer cebador que está marcado con un primer colorante y el segundo cebador, que está marcado con un segundo colorante, y

d) se analiza la composición de la muestra de ADNc amplificada y marcada, y

e) se determina la composición del cebador de los ADNc amplificados.

Un procedimiento para el análisis de una muestra de ARN, preferentemente una muestra de ARNm, en el que

a) partiendo de una muestra de ARN, preferentemente una muestra de ARNm utilizando un primer cebador, el cual eventualmente está marcado con un primer colorante, se prepara la primera cadena de una muestra de ADN complementario (muestra de ADNc),

b) se prepara la segunda cadena de esta muestra de ADNc utilizando un segundo cebador, el cual preferentemente está marcado con un segundo colorante,

c) la muestra de ADNc se amplifica utilizando el primer cebador que está marcado con un primer colorante y el segundo cebador, que está marcado con un segundo colorante, y

d) se analiza la composición de la muestra de ADNc amplificada y marcada,

e) se determina la composición del cebador de los ADNc amplificados, y

f) se seleccionan y se siguen analizando los ADNc con una determinada composición de cebador, preferentemente aquellos que contienen tanto el primer cebador como también el segundo.

Los ARN o, respectivamente, las muestras de ARNm que se utilizan para el análisis comparativo o, respectivamente, para el procedimiento, se pueden aislar, por ejemplo, a partir de diferentes células, cuyo tipo de expresión se ha de comparar entre sí. En este caso, se puede tratar, por ejemplo, de muestras de ARNm que proceden de diferentes células o, respectivamente, tipos de células, las cuales se diferencian en su estadio de diferenciación y/o de desarrollo o, respectivamente en el estadio de su ciclo celular o que tienen una historia previa diferente (por ejemplo diferentes condiciones de cultivo (por ejemplo pH, temperatura, composición), que fueron tratadas con principio activos farmacológicos o con sustancias potenciadoras/inhibidoras o, respectivamente desencadenantes de enfermedades (por ejemplo sustancias carcinógenas o mutagénicas) o que estuvieron expuestas a éstas (por ejemplo luz UV)...). Estas muestras de ARN o, respectivamente, ARNm se pueden comparar con muestras de ARN o, respectivamente, ARNm que no fueron expuestas a estas sustancias o no en esta medida. Las muestras de ARN o, respectivamente, ARNm se pueden aislar a partir de determinados tejidos. Por ejemplo, se pueden analizar comparativamente tejido sano en comparación con tejido patológico, tejido joven en comparación con tejido viejo, tejido tratado en comparación con tejido no tratado, tejido inducido en comparación con tejido no inducido, tejido de diferentes estadios de desarrollo y/o del ciclo celular y/o de diferenciación, representando tejido en este caso tejido, órgano, tipo de célula, células de cultivo, células de una línea celular, células de un individuo.

El procedimiento se puede emplear para el análisis de expresiones génicas diferenciales (de un tejido o de una célula). El procedimiento se puede utilizar especialmente para el análisis comparativo de la expresión génica diferencial (de dos o más tejidos o, respectivamente, células).

El procedimiento se puede utilizar para la identificación y/o caracterización de principios activos farmacológicos. El procedimiento se puede utilizar, además, para la identificación y/o caracterización de genes diana o, respectivamente, proteínas diana. Tales genes diana o, respectivamente, proteínas diana son especialmente genes o, respectivamente, proteínas a las que se atribuye una función (a ser posible específica) en la prevención, en el origen y/o progresión o, respectivamente, curación de una enfermedad, en el proceso de diferenciación, por ejemplo de la diferenciación celular (eventualmente antes o después de la inducción) y/o en el proceso de diferenciación de una enfermedad, en el ciclo celular o, respectivamente, en el control del ciclo celular y/o del desarrollo celular, por ejemplo en el proceso de envejecimiento celular.

En contraposición con el DDRT radiactivo convencional, el procedimiento, resulta ventajoso, puesto que la utilización de nucleótidos marcados radiactivamente o, respectivamente, de cebadores marcados radiactivamente puede ser reemplazada por la utilización de cebadores marcados fluorescentemente. En contraposición con los conocidos DDRT fluorescentes, en el nuevo procedimiento aquí descrito (variante DDRT) se marcan cada ADNc amplificado por la utilización de dos cebadores marcados de diferente manera, preferentemente con colorantes fluorescentes con diferentes espectros de excitación. De esta manera, en el caso de una evaluación correspondiente, es posible la detección de cada ADNc marcado, amplificado, es decir que la complejidad de los DNc amplificados se mantiene y es detectable (los productos 1), 2), 3), y 4) son detectables; por ejemplo, se mantiene la complejidad de las bandas en el gel). Además de esto, son posibles opiniones unívocas sobre la composición del cebador de un ADNc marcado y amplificado (es decir, es posible la clasificación con respecto a 1), 2), 3) y 4)). Por ello, en virtud de la composición de su cebador, es posible seleccionar los ADNc que deben seguir analizándose, por ejemplo ADNc amplificados que realmente proceden de

ES 2 301 246 T3

la región 3' de la secuencia génica. Por ello, con este procedimiento que se basa en la utilización de dos cebadores marcados de diferente manera se puede reducir la complejidad para aislar, en ciertas condiciones, ADNc redundantes y analizarlos. A pesar de ello, todos los DNAc amplificados se captan al mismo tiempo, como en el DDRT radiactivo convencional, y se pueden analizar, una propiedad que no se presenta en el DDRT fluorescente convencional.

5 Objeto de la invención es también un equipo (kit) para ensayos para llevar a cabo el procedimiento.

Ejemplos

10 Las enzimas utilizadas proceden de Gibco BRL/Life Technologies (Karlsruhe, Alemania) (Reverse Transkriptase y Taq Polymerase) y Promega (Heidelberg) (RNAsin).

Termociclador: Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Weiterstadt).

15 Ejemplo 1

Transcripción inversa

20 Tanda de reacción: 1 μ l de ARN (100 ng-1 μ g de ARN completo o, respectivamente, 1 ng-10 ng de ARN-poli-A/ARNm), 1 μ l de cebador 1 (10 μ M de cebador 1, por ejemplo (T)_x-MA-3' o Cy5-(T)_xMA-3', con M=A,C,G y X=11-15), 8 μ l de H₂O (exento de nucleasa). La tanda de reacción se incubó durante 5 minutos a 70°C y, después, sobre hielo.

25 Después se añadieron 5 veces 4 μ l de tampón RT (Gibco BRL), 2 μ l de DTT [0,1 M], 1 μ l de transcriptasa inversa SuperScript [200U/ μ l] (Gibco BRL), 1 μ l de ARNsin [40U/ μ l] y 2 μ l de dNTP [250 μ M].

La transcripción inversa se llevó a cabo durante 60 min a 37°-50°C y después se desactivó la enzima a 70°C (10 min).

30 Ejemplo 2

PCR

35 A 2 μ l de la tanda de RT del ejemplo 1 se añadieron 10 veces 2 μ l de tampón PCR (Gibco BRL), 0,9 μ l de detergente W-1 [1%] (Gibco BRL), 0,75 μ l de MgCl₂ [50 mM] (Gibco BRL), 1,6 μ l de dNTP [250 μ M], 0,5 μ l de polimerasa Taq de ADN [5U/ μ l] (Gibco BRL), en cada caso 1 μ l de cebador 1 y cebador 2 ([10 μ M]; por ejemplo Cy5-T7-(T)_x-MA-3' como cebador 1 (siendo "T7" un corte de la secuencia del promotor T7) y fluoresceína-(N)_x con X=10-25 y N= A, C, G, T), 10,25 μ l de H₂O.

40 El PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

5 minutos a 94°C

40 veces: 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 40°C-60°C, 1 minuto a 72°C

45 7 minutos a 72°C.

50 Después de finalizar el PCR la tanda de reacción se conserva a 4°C y después se separa sobre un gel de secuenciación (poliacrilamida 5%; urea 8M).

55 Los ADNc amplificados y marcados se pueden detectar por ejemplo con un scanner, que se excita con una longitud de onda de 430 +/- 30 nm (para fluoresceína: longitud de onda de excitación 490 nm, longitud de onda de emisión 520 nm) y 635 +/- 5 nm (para Cy5: longitud de onda de excitación 650 nm, longitud de onda de emisión 675 nm). Un ejemplo de ello es el Molecular Dynamics Storm Imager.

60

65

ES 2 301 246 T3

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el análisis de una muestra de ARN, en el que

5 a) partiendo de una muestra de ARN se prepara la primera cadena de una muestra complementaria de ADN (muestra ADNc) utilizando un primer cebador, el cual eventualmente está marcado con un primer colorante,

10 b) se prepara la segunda cadena de esta muestra de ADNc utilizando un segundo cebador, el cual preferentemente está marcado con un segundo colorante,

c) se amplifica la muestra de ADNc utilizando un primer cebador, el cual es secuencialmente idéntico al primer cebador de la etapa a), y el cual está marcado con un primer colorante, y un segundo cebador, el cual es secuencialmente idéntico al segundo cebador de la etapa c), y el cual está marcado con un segundo colorante, y

15 d) se analiza la composición de la muestra de ADNc amplificada y marcada.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el primer cebador contiene una secuencia oligo(dT).

20 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la secuencia oligo(dT) del primer cebador se compone de al menos 10 nucleótidos de timidina.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el primer cebador en el extremo 3' de la secuencia oligo(dT) contiene al menos dos nucleótidos más, los cuales no pertenecen a la secuencia oligo(dT).

25 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el primer cebador representa una mezcla heterogénea de moléculas de cebador, las cuales se diferencian en la posición M o N de la secuencia de los nucleótidos que no pertenecen a la secuencia oligo(dT).

30 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el segundo cebador tiene una longitud de al menos 6 nucleótidos.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el primer y segundo colorante son colorantes fluorescentes diferentes.

35 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los colorantes fluorescentes se seleccionan a partir de los colorantes fluorescentes Cy2, Cy3, Cy5, FAM, 6-FAM, FITC, fluoresceína, HEX, 5-IAF, TAMRA, TET, XRITC, ROX, Alexa488, Alexa532, Alexa546, Alexa594, TexasRed y Lisamina.

40 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que junto con una primera muestra de ARN se analizan comparativamente, de manera análoga, una o varias muestras más de ARN.

10. Utilización de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9 para el análisis de la expresión génica diferencial.

45 11. Utilización de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9 para la identificación y/o caracterización de principios activos farmacológicos.

50 12. Utilización de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9 para la identificación de genes diana.

50

55

60

65

ES 2 301 246 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) DATOS GENERALES:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH
 - (B) CALLE: -
 - (C) LUGAR: Frankfurt
 - 10 (D) ESTADO FEDERADO: -
 - (E) PAÍS: Alemania
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 65926
 - 15 (G) TELÉFONO: 069-305-7072
 - (H) TELEFAX: 069-35-7175
 - (I) TELEX: -
- 20 (ii) DESIGNACIÓN DE LA INVENCION: Pantalla diferencial en dos colores como procedimiento para detectar genes regulados
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
- 25 (iv) VERSIÓN LEGIBLE DEL ORDENADOR:
- (A) SOPORTE DE DATOS: disquete
 - (B) ORDENADOR: compatible con PC IBM
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - 30 (D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) DATOS REFERENTES A SEQ ID NO:1:

- 35 (i) CARACTERÍSTICA DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 14 pares de bases
 - (B) TIPO: nucleótido
 - 40 (C) FORMA DE CADENA: cadena individual
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: genoma de DNA
- 45 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: exón
 - (B) POSICIÓN:1..14
 - (D) OTROS DATOS:/nota= "M = A, C, G; N = A, C, G, T"
- 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

TTTTTTTTTT TTMN

14

55 (2) DATOS REFERENTES A SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERÍSTICA DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 17 pares de bases
 - 60 (B) TIPO: nucleótido
 - (C) FORMA DE CADENA: cadena individual
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: genoma de DNA
- (ix) CARACTERÍSTICA:

ES 2 301 246 T3

(A) NOMBRE/CLAVE: exón

(B) POSICIÓN:1..17

(D) OTROS DATOS:/nota= "M = A, C, G; N = A, C, G, T"

5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

TTTTTTTTTT TTTTMMN

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65