



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 963**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01991710 .3**

96 Fecha de presentación : **22.12.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1392856**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2004**

54 Título: **Procedimiento para la amplificación simultánea de varias secuencias en una reacción PCR y su marcaje.**

30 Prioridad: **22.12.2000 DE 100 65 814**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.05.2009

73 Titular/es: **Epigenomics AG.
Kleine Präsidentenstrasse 1
10178 Berlin, DE**

72 Inventor/es: **Distler, Jürgen;
Berlin, Kurt y
Olek, Alexander**

74 Agente: **Capitán García, Nuria**

ES 2 319 963 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la amplificación simultánea de varias secuencias en una reacción PCR y su marcaje.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a la preparación especialmente eficiente de productos amplificados marcados complejos en una reacción PCR. Estos productos amplificados pueden analizarse a continuación respecto a su secuencia mediante distintos procedimientos. Es especialmente adecuado el procedimiento para el análisis de patrones de metilación de citosina en muestras de ADN.

Estado de la técnica

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un procedimiento con el que puede amplificarse selectivamente en principio cualquier ADN. Este procedimiento comprende el uso de una preparación mayoritariamente de dos oligonucleótidos de secuencia predeterminada, los denominados cebadores, que hibridan con sus cadenas de ADN complementario y definen los límites de la secuencia a amplificar.

Los oligonucleótidos inician la síntesis de ADN, que se cataliza mediante una ADN polimerasa termoestable. Cada ronda de síntesis se separa típicamente mediante una etapa de fusión y reasociación. Esto permite amplificar una secuencia de ADN dada varios cientos de veces en menos de una hora.

Por la sencillez y reproducibilidad de estas reacciones, la PCR ha alcanzado una amplia aceptación. Por ejemplo, se usa la PCR para el diagnóstico de disfunciones hereditarias y cuando se sospechan enfermedades.

Sin embargo, se lleva a cabo a menudo también una amplificación de una muestra dada sólo para multiplicar el material para un análisis posterior. La muestra a analizar se amplifica en este caso en primer lugar, a partir de ADN genómico o, por ejemplo, ARNm aislado. La mayoría de veces, es necesario marcar al menos uno de los cebadores, por ejemplo, con un colorante de fluorescencia, para poder identificar el fragmento en los experimentos siguientes.

Representa una variante especialmente sencilla y económica para la aplicación de un marcaje al producto amplificado el procedimiento de usar cebadores que tienen dos dominios. Uno hibrida específicamente con la región a amplificar, mientras que el otro sólo tiene la función de hibridar con un oligonucleótido marcado. Este oligonucleótido puede ser siempre el mismo para distintas amplificaciones, si se usa siempre el mismo dominio del cebador apropiado para el marcaje. Particularmente en marcajes caros, es una solución económica. Por ejemplo, se utilizan para esta reacción tres oligonucleótidos distintos, un cebador de codificación específico de secuencia con cola M13(-21), un cebador inverso específico de secuencia y un oligonucleótido marcado con fluorescencia universal M13(-21) (Schuelke *et al.*, "An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments" 2: 18, 2000), que se une a la cola M13(-21) del cebador de codificación.

Este ADN amplificado se emplea para la identificación de mutaciones y polimorfismos. Como procedimiento analítico para ello se tienen en cuenta, por ejemplo, la reacción de extensión de cebador, secuenciación según Sanger o, por ejemplo, digestión de restricción y posterior análisis, por ejemplo en geles de agarosa.

Para el análisis del ADN, se toma como referencia a menudo mediante el análisis de la secuencia de bases la relación de bases de ADN de citosina a 5-metilcitosina, o se analiza la metilación en posiciones de citosina individuales.

La 5-metilcitosina es la base modificada covalentemente más frecuente en el ADN de células eucarióticas. Desempeña un papel, por ejemplo, en la regulación de la transcripción, en la imprimación genética y en la tumorigénesis. La identificación de 5-metilcitosina como componente de información genética es por tanto de considerable interés. Sin embargo, las posiciones de 5-metilcitosina no pueden identificarse mediante secuenciación, ya que la 5-metilcitosina presenta el mismo comportamiento de apareamiento de bases que la citosina. Además, en una amplificación por PCR, se pierde la completamente la información epigenética que porta la 5-metilcitosina.

Un procedimiento para el análisis de 5-metilcitosina en ADN relativamente nuevo y por ahora muy frecuentemente aplicado se basa en la reacción específica de bisulfito con citosina, que se transforma en uracilo después de hidrólisis alcalina posterior, el cual se corresponde con la timidina en su comportamiento de apareamiento de bases. La 5-metilcitosina en cambio no se modifica en estas condiciones. Por tanto, el ADN original se transforma de modo que la metilcitosina, que originalmente no puede diferenciarse por su comportamiento de hibridación de la citosina, puede identificarse ahora mediante técnicas de biología molecular "normales" como la única citosina restante, por ejemplo mediante amplificación e hibridación o secuenciación. Todas estas técnicas se basan en el apareamiento de bases, que ahora se explota totalmente. El estado de la técnica, en lo que se refiere a la sensibilidad, se define mediante un procedimiento que incluye el ADN a analizar en una matriz de agarosa que reduce la difusión y renaturalización del ADN (el bisulfito reacciona sólo con ADN monocatenario) y sustituye todas las etapas de precipitación y purificación por una diálisis rápida (Olek A, Oswald J, Walter J. "A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis". *Nucleic Acids Res.* 15 de diciembre de 1996; 24 (24): 5064-6). Con este procedimiento, pueden analizarse células individuales, lo que demuestra el potencial del procedimiento. Sin embargo, se analizan hasta ahora sólo regiones individuales de hasta aproximadamente 3.000 pares de bases de longitud, no siendo posible un análisis

ES 2 319 963 T3

global en células de miles de posibles análisis de metilación. Sin embargo, este procedimiento tampoco puede analizar fiablemente fragmentos muy pequeños de cantidades de muestra bajas. Éstos se pierden en la matriz a pesar de la prevención de la difusión.

- 5 Puede deducirse una visión general sobre las posibilidades conocidas adicionales de detectar 5-metilcitosina a partir del siguiente artículo de revisión: Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H. "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes". *Nucleic Acids Res.* 15 de mayo de 1998; 26 (10): 2255-64.

10 La técnica del bisulfito se emplea hasta ahora sólo en investigación con pocas excepciones (por ejemplo, Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B. "A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus". *Eur. J. Hum. Genet.* marzo-abril de 1997; 5(2): 94-8). Sin embargo, se amplifican siempre trozos específicos cortos de un gen conocido mediante un tratamiento con bisulfito y se secuencian completamente (Olek A, Walter J. "The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint". *Nat. Genet.* noviembre de 1997; 17(3): 275-6) o se detectan posiciones de citosina individuales mediante una "reacción de extensión de cebador" (Gonzalzo ML, Jones PA. "Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)". *Nucleic Acids Res.* 15 de junio de 1997; 25(12): 2529-31, patente WO 9500669) o una escisión enzimática (Xiong Z, Laird PW. "COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay". *Nucleic Acids Res.* 15 de junio de 1997; 25(12): 2532-4). Además, se ha descrito también la detección mediante hibridación (Olek *et al.*, documento WO 99 28498).

20 Son otras publicaciones que se ocupan de la aplicación de la técnica del bisulfito para la detección de la metilación en genes individuales:

25 Grigg G, Clark S. "Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA". *Bioessays.* junio de 1994; 16(6): 431-6, 431; Zeschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W. "Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method". *Hum. Mol. Genet.* marzo de 1997; 6(3): 387-95; Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W. "Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing". *Nucleic Acids Res.* 25 de febrero de 1994; 22(4): 695-6; Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. "Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines". *Gene.* 19 de mayo de 1995; 157 (1-2): 261-4; documentos WO 97 46705, WO 95 15373 y WO 45560.

35 Para el análisis de los productos de PCR, deben dotarse estos, por ejemplo, con un marcaje de fluorescencia o marcaje radiactivo. Estos marcajes pueden aplicarse a los cebadores o a los nucleótidos. Es especialmente adecuado para los marcajes de fluorescencia la aplicación sencilla de colorantes Cy3 y Cy5 a los extremos 5' de los cebadores respectivos. Además, se tienen en cuenta como colorantes de fluorescencia 6-carboxifluorescina (FAM), hexacloro-6-carboxifluorescina (HEX), 6-carboxi-x-rodamina (ROX) o tetracloro-6-carboxifluorescina (TET). Estos colorantes sin embargo son comparativamente caros.

40 Para el análisis de genes en que el alelo mutado o el polimorfismo están bien caracterizados, es muchas veces suficiente la amplificación de regiones definidas individuales del ADN. Sin embargo, cuando se analizan genes indefinidos, son necesarias la mayoría de las veces una pluralidad de reacciones PCR para identificar deleciones o alteraciones críticas de bases. Es aún más complicado el establecimiento de una PCR multiplexada, en la que se usan un cebador de codificación y una pluralidad de cebadores inversos para amplificar segmentos génicos definidos.

50 Aunque la temperatura de asociación y la concentración de cebador pueden calcularse hasta un grado conocido, deben determinarse experimentalmente en general las condiciones para cada reacción multiplexada individual. Ya que la probabilidad de una reacción inicial no específica aumenta con cada cebador adicional, en la mayoría de casos las condiciones deben modificarse con la adición de cebador adicional. Además, se multiplican los artefactos que se generan por la competencia de recursos, por ejemplo, por el cebador en la PCR multiplexada. Esto desemboca en que los rendimientos de fragmentos amplificados irregularmente aumentan con cada ciclo.

55 Por las dificultades mencionadas, el desarrollo de un nuevo ensayo de diagnóstico puede ser muy trabajoso y costoso.

60 Weighardt *et al.* (*PCR Methods and App.* 3: 77, 1993) describen el uso de oligonucleótidos alargados en 5' para PCR. Este procedimiento de amplificación comprende como rasgo característico la asociación y reacción de alargamiento de cebador separadas para cada cebador individual, lo que no es practicable en un contexto multiplexado.

65 Como se ha mostrado, es actualmente estado de la técnica tratar las muestras de ADN con bisulfito para la identificación de metilación de citosina y llevar a cabo a continuación amplificaciones sencillas. Falta sin embargo un procedimiento que permita llevar a cabo una amplificación en dos etapas especialmente específica usando cebadores con dos dominios que procure al mismo tiempo de forma especialmente específica una pluralidad de fragmentos y que además resuelva el problema de que deban utilizarse normalmente una pluralidad de cebadores marcados y correspondientemente caros para dicha amplificación compleja.

Fijación del objetivo

5 Debe procurarse un procedimiento que evite las desventajas del estado de la técnica. Debe procurarse por un lado una PCR en dos etapas muy específica con alta multiplexabilidad que además resuelva el problema de los marcajes costosos. El procedimiento debe ser especialmente adecuado para la detección de metilación de citosina en muestras de ADN.

Descripción

10 Se describe un procedimiento para la amplificación de ácidos nucleicos.

15 Los ácidos nucleicos se obtienen de forma especialmente preferida a partir de una muestra de ADN genómico, comprendiendo las fuentes de ADN, por ejemplo, líneas celulares, sangre, esputo, heces, orina, fluido cerebroespinal, tejidos embebidos en parafina, por ejemplo, tejidos de ojos, intestino, riñones, cerebro, corazón, próstata, pulmones, mama o hígado, portaobjetos histológicos y todas las posibles combinaciones de las mismas.

20 Se embebe la muestra de ácido nucleico al inicio de forma especialmente preferida en agarosa y se hace reaccionar con una solución de bisulfito (= disulfito, hidrogenosulfito), con lo que la 5-metilcitosina permanece intacta y la citosina se transforma en uracilo u otra base similar al uracilo en comportamiento de apareamiento de bases. En este tratamiento químico, está presente un reactivo desnaturalizador de dúplex de ADN y/o un captador de radicales.

25 Ya que en el genoma humano únicamente aprox. un 3% de las bases de citosina se presentan metiladas, el ADN tratado con bisulfito contiene en su mayor parte las bases A, G, T y U, es decir, respecto a su comportamiento de apareamiento de bases sólo 3 bases (A, G y T), ya que U y T muestran el mismo comportamiento de apareamiento.

30 Se hibridan entonces los segmentos a amplificar con al menos dos oligonucleótidos cebadores que presentan dos dominios, de los cuales el dominio específico de secuencia que se encuentra en el extremo 3' hibrida con el segmento a amplificar, mientras que el dominio genérico que se encuentra en el extremo 5' no hibrida. En la siguiente etapa, se lleva a cabo una primera reacción de amplificación mediante una polimerasa. En una etapa adicional, hibrida con el producto amplificado un oligonucleótido cebador marcado que hibrida con el dominio genérico del primer cebador. Preferiblemente, se lleva a cabo una segunda amplificación con una reacción de la polimerasa.

Para la amplificación, se usa de forma especialmente preferida una ADN polimerasa termorresistente.

35 En caso de amplificar ADN tratado con bisulfito, esto conduce entonces a fragmentos de ADN que se caracterizan porque la cadena (+) posee la composición de bases A, T y G y su cadena (-) complementaria la composición A, T y C. De esto se deduce que en la cadena (+) o (-) no están presentes simultáneamente nunca o raramente las nucleobases C y G. Mediante esta propiedad del ADN tratado con bisulfito y sus productos de amplificación, es posible preparar cebadores que no proporcionen productos de PCR inespecíficos con ADN molde con bisulfito y puedan usarse así como oligonucleótidos de marcaje empleables en general o sondas de detección para productos amplificados por PCR de ADN tratado con bisulfito.

45 Es requisito para ello que, para la amplificación de ADN tratado con bisulfito, se diseñen cebadores específicos de gen de tipo 1 y 2, que además de un dominio específico de gen poseen un dominio genérico. Estos dominios cebadores genéricos posibilitan el marcaje de los fragmentos de ADN con los oligonucleótidos de marcaje empleables en general (tipo M1 y tipo M2) o su detección con los oligonucleótidos de marcaje empleables en general (tipo M1 y tipo M2) mediante procedimiento de hibridación. Para la amplificación de genes específicos o varios genes en una PCR multiplexada, son necesarios al menos dos cebadores, un cebador de tipo 1 y un segundo de tipo 2 (véase a continuación). Con estos cebadores, se amplifican los correspondientes fragmentos de ADN.

50

(Esquema pasa a página siguiente)

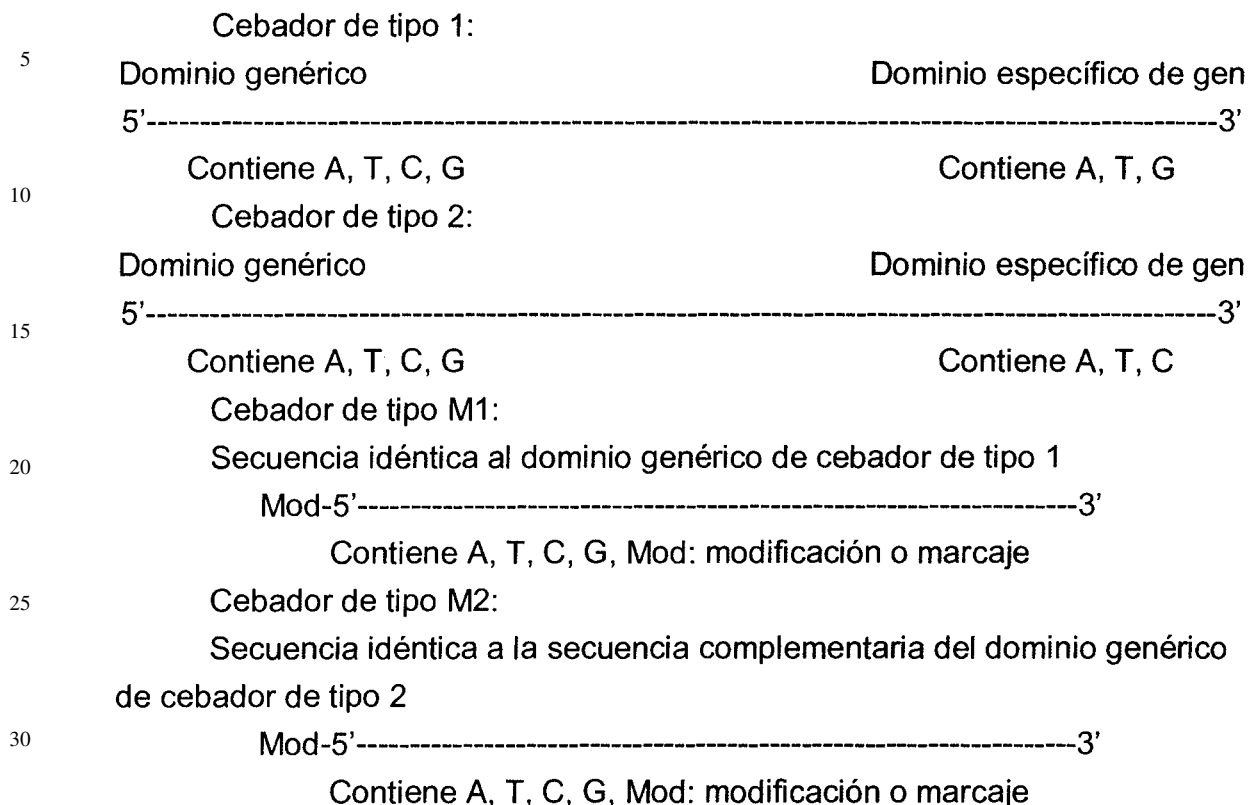
55

60

65

ES 2 319 963 T3

Estructura y propiedades de los cebadores



35 Preferiblemente, el dominio genérico del cebador de tipo 1 y 2 contiene una secuencia que está compuesta por A, C, G y T.

40 Los dominios específicos de gen son, como ya indica el nombre, específicos de uno o varios fragmentos génicos (e). En el caso de cebador específico de secuencia de tipo 1, la secuencia está compuesta por bases A, T y G, en el caso de cebador específico de secuencia de tipo 2, por bases A, T y C.

45 En una segunda reacción de PCR con un par de cebadores genéricos de tipo M1 y M2, se reamplifican simultáneamente este gen o un número cualquiera de genes que provienen de reacciones PCR con pares cebadores (de tipo 1 y tipo 2), en la que todos los cebadores de tipo 1 y los cebadores de tipo 2 poseen dominios genéricos idénticos (ejemplos 2 y 3). Los dominios genéricos de cebadores de tipo 1 y 2 se diseñan de modo que los correspondientes cebadores de marcaje genéricos (de tipo M1 y tipo M2) produzcan en una reacción PCR los menores productos de PCR inespecífica posibles con el ADN molde con bisulfito usado. Las reacciones PCR pueden llevarse a cabo secuencialmente o mediante la selección adecuada de los cebadores específicos de gen y genéricos, así como la práctica de PCR simultánea en una reacción denominada de un recipiente.

50 Los cebadores genéricos de tipo M1 y M2 pueden usarse también, mediante procedimientos de hibridación, para la detección de productos amplificados por PCR que se producen con cebadores de tipo 1 y tipo 2 y, por ejemplo, se han inmovilizado sobre matrices de ADN, membranas de nitrocelulosa, PVDF u otras superficies sólidas.

55 Los segmentos amplificados que provienen de fragmentos de PCR con cebadores que presentan dos dominios pueden inmovilizarse sobre fases sólidas. Esto sucede mediante reacciones químicas (por ejemplo, mediante la introducción de una función 5'-amino) o mediante hibridación con otro de los oligonucleótidos inmovilizados sobre la fase sólida. Los productos amplificados pueden detectarse a este respecto mediante el cebador genérico marcado de tipo M1/M2. Son preferiblemente identificables los marcajes aplicados a productos amplificados en cada posición de la fase sólida en que se encuentra una secuencia de oligonucleótido.

60 En caso de no usar como cebadores genéricos oligómeros de ADN sino oligómeros de PNA de tipo M1 y M2, pueden identificarse y cuantificarse productos amplificados por PCR que se producen con cebadores de tipo 1 y tipo 2, también en MALDI-TOF.

65 En el marcaje de cebador oligonucleotídico, se trata preferiblemente de colorantes de fluorescencia con distintos espectros de emisión (por ejemplo, Cy3, Cy5, FAM, HEX, TET o ROX) o combinaciones de colorantes de fluorescencia en el caso de cebadores marcados con colorante de fluorescencia por transferencia de energía. Los marcajes

ES 2 319 963 T3

5 pueden ser preferiblemente radionucleidos o preferiblemente marcajes de masas desprendibles que se detectan en un espectrómetro de masas. Preferiblemente, pueden usarse también para el marcaje moléculas que producen una señal sólo en otra reacción química. Se prefieren las moléculas usadas para el marcaje en sitios definidos unidos a una fase sólida para inmovilizar los productos de PCR mediante una PCR en fase sólida, que provienen de una reacción PCR, y cebadores de dominio.

Los fragmentos de PCR están dispuestos preferiblemente sobre la fase sólida en forma de una cuadrícula rectangular o hexagonal.

10 Finalmente, se analiza el producto amplificado respecto a su secuencia.

La modificación de ADN descrita se realiza mediante el empleo de pares de cebadores idénticos con una modificación específica de fragmento igual, es decir, que todos los marcajes son idénticos y proporcionan la misma reacción específica. Mediante estas simplificaciones, pueden ahorrarse costes considerables, ya que particularmente los colorantes o marcadores de masas originan grandes costes.

20 El procedimiento se usa preferiblemente para el diagnóstico y/o pronóstico de eventos desventajosos para pacientes o individuos, en el que estos eventos desventajosos pertenecen al menos a una de las siguientes categorías: efectos indeseados de medicamentos, cánceres, disfunciones, lesiones o enfermedades del SNC, síntomas de agresión o alteraciones del comportamiento, consecuencias clínicas, psicológicas y sociales de lesiones cerebrales, alteraciones psicóticas y alteraciones de la personalidad, demencia y/o síndromes asociados, enfermedad, disfunción y lesión cardiovascular, disfunción, lesión o enfermedad del tracto gastrointestinal, disfunción, lesión o enfermedad del sistema respiratorio, lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia, disfunción, lesión o enfermedad del cuerpo como anomalía en el proceso de desarrollo, disfunción, lesión o enfermedad de la piel, de músculos, del tejido conectivo o de huesos, disfunción, lesión o enfermedad endocrina y metabólica, dolores de cabeza o disfunción sexual.

El procedimiento se usa de forma especialmente preferida para la diferenciación de tipos celulares o tejidos o para el análisis de la diferenciación celular.

30 Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1

Diseño y estructura de cebadores específicos de gen y modulares

35 A partir de los genes OAT (acceso ep30056) y MDR1 (acceso X58723), se han determinado respectivamente las secuencias presentes después de tratamiento con bisulfito. Basándose en estas secuencias de ADN pretratadas químicamente (véase el apéndice), se han preparado los siguientes dominios de cebador específicos de gen y analizado con software de análisis obtenible comercialmente para excluir los intervalos de secuencia autocomplementarios o intercomplementarios en las secuencias de cebador (véanse las Tablas 1 y 2). Estas secuencias se han hecho reaccionar con los cebadores de PCR no modulares OAT-fp, OAT-rp, MDR-fp y MDR-rp y se ha ensayado su función en reacciones PCR. Las combinaciones de cebadores OAT y MDR1 proporcionaban con su uso en reacciones PCR (véase el ejemplo 2) con ADN con bisulfito, preparado según procedimientos publicados (Olek *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 1996, 24, 5064-5066) los productos esperados de 479 nt y 633 nt (véase la Tabla 1). Como secuencia para el dominio de cebador genérico, se seleccionaron gen1-f, correspondiente a la secuencia del cebador de secuenciación universal M13 y gen2-f (Tabla 2), así como gen-r correspondiente al cebador de secuenciación M13 inverso. Los cebadores no modulares correspondientes basados en estas secuencias no mostraban en la reacción PCR con ADN con bisulfito a distintas condiciones de reacción, con las combinaciones de pares cebadores gen1-fp, genrp, así como gen2-fp y gen-rp, ningún producto de PCR observable.

50 Los cebadores modulares para la amplificación de intervalos génicos OAT y MDR1 se deducen de la fusión de secuencias genéricas con los correspondientes dominios específicos de gen, para obtener los cebadores modulares OAT-f1mp, OAT-f2mp, OAT-rmp, MDR-f1mp, MDR-f2mp y MDR-rmp (Tabla 3).

55 TABLA 1

Dominios cebadores específicos de gen y genéricos

60	Gen	Cebador de codificación	Cebador inverso	Fragmento de PCR
	OAT	OAT-f	OAT-r	479 nt
	MDR1	MDR-f	MDR-r	633 nt
65	Genérico	gen 1-f gen 2-f	gen-r	

ES 2 319 963 T3

TABLA 2

Secuencias cebadoras no modulares

5	OAT-fp OAT-rp	TTTGGAGGTGGATTTAGAGGTATAATTAA AAACRTCACACTACAACCTTAAAACTAA
10	MDR-fp MDR-rp	TAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAG TAAAACTATCCCATAATAACTCCCAAC
15	gen1-fp gen2-rp gen-rp	GTAAAACGACGGCCAGT GTAAAACCAGGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGAC
20	gen1-fp5 gen2-rp5 gen-rp5	Cy5-GTAAAACGACGGCCAGT Cy5-GTAAAACCAGGGCCAGT Cy5-CAGGAAACAGCTATGAC

TABLA 3

Cebadores modulares

	Nombre	Secuencia
		Dominio genérico – dominio específico de gen
35	OAT-f1mp OAT-f2mp OAT-rmp	GTAAAACGACGGCCAGT-TTGGAGGTGGATTTAGAGGTATAATTAA GTAAAACCAGGGCCAGT-TTGGAGGTGGATTTAGAGGTATAATTAA CAGGAAACAGCTATGAC-AAACRTCACACTACAACCTTAAAACTAA
40	MDR-f1mp MDR-f2mp MDR-rmp	GTAAAACGACGGCCAGT-TAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAG GTAAAACCAGGGCCAGT-TAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAG CAGGAAACAGCTATGAC-TAAAACTATCCCATAATAACTCCCAAC

Ejemplo 2

Amplificación específica de gen de OAT y MDR1 con cebadores modulares


La amplificación de los intervalos génicos OAT y MDR1 se realizó con Qiagen Hotstart-Polymerase correspondientemente a los datos del fabricante (Qiagen, Hilden) en un volumen de reacción de 20 μ l.

Preparación de reacción (general):

55	Bisulfito-ADN (10 ng)	1 μ l
	Tampón de reacción 10 x (Qiagen, Hilden)	2 μ l
	Mezcla de dNTP (10 mM cada uno)	2 μ l
60	Cebador 1 6,25 pmol	2 μ l
	Cebador 2 6,25 pmol	2 μ l
	Polimerasa (Qiagen, Hilden) (0,5 U)	0,5 μ l
65	Agua	11,5 μ l

ES 2 319 963 T3

Se llevó a cabo la reacción PCR en Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo) con el siguiente programa.

5	Programa:		
	15 min a 96 °C		
	60 s a 96°C		
10	30 s a 56-60°C		
	45 s a 72°C		
15	10 min a 72 °C		x 40

En la Tabla 4 se resumen las combinaciones de cebadores y temperaturas de asociación usadas para la amplificación de OAT y MDR1. Los productos amplificados por PCR producidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5% de agarosa en 0,5 x tampón TBE, Manniatis *et al.*). Para ello, se extrajeron 4 μ l de la preparación de PCR de la electroforesis en gel, el resultado se representa en la fig. 1.

TABLA 4

Combinaciones de cebadores de PCR

	Gen	Cebador 1	Cebador 2	Temp. de asociación	Carril en la Fig. 1
30	OAT	OAT-f1mp	OAT-rmp	55,6°C	A
	OAT	OAT-f2mp	OAT-rmp	55,6°C	B
35	MDR1	MDR-f1mp	MDR-rmp	59°C	C
	MDR1	MDR-f2mp	MDR-rmp	59°C	D

40 Ejemplo 3

Reamplificación de OAT y MDR1 con cebadores genéricos

Se realizó la reamplificación (= amplificación por marcaje) de los intervalos génicos OAT y MDR1 con Qiagen Hotstart-Polymerase correspondientemente a los datos del fabricante (Qiagen, Hilden) en un volumen de reacción de 20 μ l. A este respecto, se diluyeron los productos de PCR de la PCR específica de gen (véase el ejemplo 2, fig. 1) 1:1000 y se separaron o amplificaron conjuntamente en una reacción PCR. Como cebadores, se usaron los pares de cebadores modificados en el extremo 3' con el colorante de fluorescencia Cy5, gen1-fp5 y gen-rp5, así como gen2-fp5 y gen-rp5. Los resultados de esta amplificación por marcaje se representan en la fig. 2.

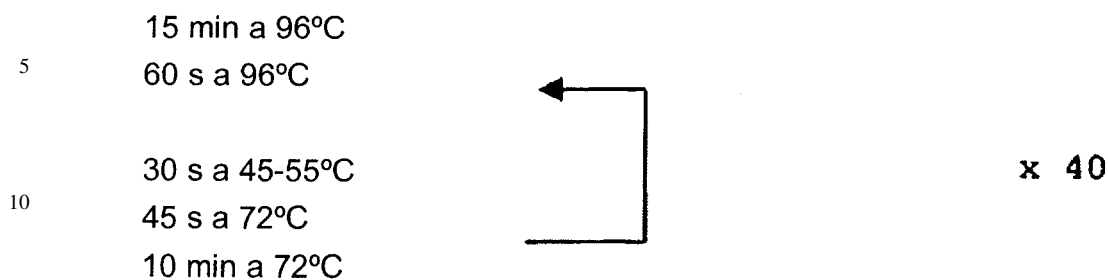
50 Preparación de reacción (general):

55	ADN molde	1 μ l
	Tampón de reacción 10x (Qiagen, Hilden)	2 μ l
	Mezcla de dNTP (10 mM cada uno)	2 μ l
	Par de cebadores (6,25 pmol cada cebador)	4 μ l
60	Polimerasa (Qiagen, Hilden) (0,5 U)	0,5 μ l
	Agua	11,5 μ l

65

ES 2 319 963 T3

La reacción PCR se llevó a cabo en Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo) con el siguiente programa:



Los productos amplificados de PCR producidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5% de agarosa en 0,5 x tampón TBE, Manniatis *et al.*). Para ello, se sometieron 4 μ l de preparación de PCR a electroforesis en gel, el resultado se representa en la fig. 2. En las condiciones dadas, podían amplificarse exitosamente tanto OAT como MDR1 con ambos pares de cebadores genéricos y, por tanto, modificarse idénticamente al mismo tiempo en una reacción PCR.

Ejemplo 4

Reamplificación con un cebador de dominios

Se creó a partir de ESR1 la secuencia con bisulfito. Basándose en esta secuencia de ADN (véase a continuación el producto de PCR ESR1), se prepararon los siguientes dominios de cebador específicos de gen y se analizaron con software de análisis obtenible comercialmente para excluir los intervalos de secuencia autocomplementarios o intercomplementarios en las secuencias de cebador (véase la Tabla 5). Se hicieron reaccionar estas secuencias en los cebadores de PCR modulares ER1-B-U-M13a, ER1-B-LM13b, ER1-B-UM13b, ER1-B-L-M13a, así como los cebadores de PCR no modulares ER1-B-U, ER1-B-L, y se ensayó su función en reacciones PCR. Los cebadores modulares para la amplificación de intervalos génicos de ESR1 se deducen de la fusión de las secuencias genéricas M13a y M13b con los dominios específicos de gen ER1-B-U y ER1-B-L (Tabla 5). Las combinaciones de cebadores ER1-B-L-M13b/ER1-B-L-M13a, ER1-B-U-M13a/ER1-B-L-M13a, ER1-B-L-M13b/ER1-B-U-M13b y ER1-B-U/ER1-B-L proporcionaban con su uso en reacciones PCR (véase la Fig. 3, carriles 1-4) con ADN tratado con bisulfito los productos esperados de 699 nt (cebador modular) y 665 nt (cebador no modular). Por el contrario, no se han obtenido productos de PCR cuando se ha utilizado ADN no tratado químicamente en la reacción PCR (véase la Fig. 3, carriles 5-8). La preparación de reacción PCR tenía la siguiente composición:

ADN (10 ng)	1 μ l
Tampón de reacción 10 x (Qiagen, Hilden)	2,5 μ l
Mezcla de dNTP (respectivamente 25 mM)	0,2 μ l
Cebador 1 12,5 pm	1 μ l
Cebador 2 12,5 pm	1 μ l
Polimerasa (Qiagen, Hilden) (0,5 U)	0,2 μ l
Agua	19,1 μ l

y se llevó a cabo mediante el siguiente programa de “ciclación”: 15 min a 96°C; 60 s a 96°C (x 40); 45 s a 55°C (x 40); 75 s a 72°C (x 40); 10 min a 72°C.

ES 2 319 963 T3

TABLA 5

Cebadores específicos de gen, modulares y genéricos para la amplificación de ESR1

5	Nombre	Secuencia
	A ER1-B-U-M13a	GTAAAACGACGGCCAGTAGGAGGGGGGAATTAATAGA
	B ER1-B-L-M13b	CAGGAAACAGCTATGACACAATAAAACCATCCCAAATAC
10	C ER1-B-U-M13b	CAGGAAACAGCTATGACAGGAGGGGGGAATTAATAGA
	D ER1-B-L-M13a	GTAAAACGACGGCCAGTACAATAAAACCATCCCAAATAC
	E ER1-B-U	AGGAGGGGGGAATTAATAGA
15	F ER1-B-L	ACAATAAAACCATCCCAAATAC
	G M13a	GTAAAACGACGGCCAGT
	H M13b	CAGGAAACAGCTATGAC

20 Los productos de PCR producidos con las combinaciones de cebadores ER1-B-L-M13b/ER1-B-L-M13a, ER1-B-U-M13a/ER1-B-L-M13a, ER1-B-LM13b/ER1-B-UM13b y ER1-B-U/ER1-B-L (véase la Fig. 3) se reamplificaron con Qiagen Hotstart-Polymerase correspondientemente a los datos del fabricante (Qiagen, Hilden) en un volumen de reacción de 25 μ l con el cebador M13a o M13b o una mezcla de estos cebadores. A este respecto, se diluyeron los productos de PCR de la reacción de PCR (véase la Fig. 3) 1:1000 y a continuación se amplificaron en reacciones PCR.

25 Preparación de reacción (general):

Con el uso de un cebador

30	ADN (fragmento de PCR diluido 1:1.000)	1 μ l
	Tampón de reacción 10x (Qiagen, Hilden)	2,5 μ l
	Mezcla de dNTP (respectivamente 25 mM)	0,2 μ l
35	Cebador 12,5 pmol	2 μ l
	Polimerasa (Qiagen, Hilden) (0,5 U)	0,2 μ l
40	Agua	19,1 μ l

Con el uso de un par de cebadores

45	ADN (fragmento de PCR diluido 1:1.000)	1 μ l
	Tampón de reacción 10x (Qiagen, Hilden)	2,5 μ l
	Mezcla de dNTP (respectivamente 25 mM)	0,2 μ l
50	Cebador 1 12,5 pmol/ μ l	2 μ l
	Cebador 2 12,5 pmol/ μ l	1 μ l
	Polimerasa (Qiagen, Hilden) (0,5 U)	0,2 μ l
55	Agua	19,1 μ l

Se llevó a cabo la reacción PCR en Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo) con el siguiente programa: 15 min a 96°C; 60 s a 96°C (x 40); 45 s a 55°C (x 40); 75 s a 72°C (x 40); 10 min a 72°C.

60 Las reamplificaciones proporcionaron los resultados esperados (véase la Fig. 4). Con la mezcla de cebadores genéricos M13a/M13b, podían reamplificarse las combinaciones de cebadores ER1-B-L-M13b/ER1-B-L-M13a, ER1-B-UM13a/ER1-B-L-M13a y ER1-B-L-M13b/ER1-B-U-M13b. Las reamplificaciones de los productos de PCR de las combinaciones de cebadores ER1-B-U-M13a/ER1-B-L-M13a podían llevarse a cabo también con el cebador M13a, 65 las de las combinaciones de cebadores ER1-B-L-M13b/ER1-B-U-M13b con el cebador M13b. El producto de PCR, obtenido con las combinaciones de cebadores no modulares ER1-B-U/ER1-B-L, no podía reamplificarse según lo esperado con ningún cebador genérico ni combinación de cebadores M13a/M13b (véase la Fig. 4: Análisis de los productos de PCR ESR1 en un gel de agarosa al 1,5% (Manniat *et al.*)).

ES 2 319 963 T3

Figura 3: Se analizaron respectivamente 4 μ l de reacciones PCR de las combinaciones de cebadores ER1-B-L-M13b/ER1-B-L-M13a (carriles 1,5), ER1-B-UM13a/ER1-B-L-M13a (carriles 2,6), ER1-B-L-M13b/ER1-B-U-M13b (carriles 3,7) y ER1-B-U/ER1-B-L (carriles 4,8) en ADN tratado con bisulfito (carriles 1-4) y ADN genómico no tratado (carriles 5-8). El carril M es un fragmento de ADN patrón de tamaño.

5

Producto PCR ESR1

10

```
AGGAGGGGGAATTAAATAGAAAGAGAGATAAATAGAGATATATCGGAGTTTGGTACG
GGGTATATAAGGTAGTATATTAGAGAAAGTCGGTTTTTGGATTTCGTTTTTCGCGTTT
ATTTTAAGTTTAGTTTTTTTTGGGTTATTTTTAGTAGATTTTCGTGCGTTTTTCGTTT
TTTGGTCGTGAAATTTAGTTTTTATTAGTAGCGACGATAAAGTAAAGTAAAGTTTAG
GGAAGTTGTTTTTTGGGATGTTTAAATCGAGTTGTGTTTGGAGTGATGTTAAGTTA
ATGTTAGGGTAAGGTAATAGTTTTTGGTCGTTTTTTAGTATTTTTGTAATGTATATG
AGTTCGGGAGATTAGTATTTAAAGTTGGAGGTTTCGGGAGTTTAGGAGTTGGCGGAGG
GCGTTCGTTTTGGGATTGTATTTGTTTTCGTCGGGTCGTTTCGGTTTTATCGGATTCG
TAGGTTTTCGGGGTAGGGTCGGGGTTAGAGTTCGCGTGTCGGCGGGATATGCGTTGC
GTCGTTTTTAATTTTCGGGTTGTGTTTTTTTTTTAGGTGGTTCGTCGGTTTTTGAGTT
TTTTGTTTTG]CGGGGATACGGTTTTGTATTTTGTTCGCGGTTACGGATTATGATTAT
GATTTTTTATATTAAAGTATTTGGGATGGTTTTATTGT
```

15

20

25

30

Figura 4: Análisis de la reamplificación de productos PCR ESR1 (véase la Fig. 4) en un gel de agarosa al 1,5% (Manniat *et al.*). Se analizó la reamplificación de los productos de PCR de las combinaciones de cebadores ER1-B-U/ER1-B-L (carriles 2, 7, 12), ER1-B-L-M13b/ER1-B-L-M13a (carriles 3, 8, 13), ER1-B-U-M13a/ER1-B-L-M13a (carriles 4, 8, 14) y ER1-B-L-M13b/ER1-B-U-M13b (carriles 5, 10, 15) con cebadores y combinaciones de cebadores genéricos. Se representan respectivamente 4 μ l de las reacciones PCR con las combinaciones de cebadores genéricos M13a/M13b (carriles 1-5), cebador genérico M13a (carriles 6-10) y cebador genérico M13b (carriles 11-15). El carril M es un fragmento de ADN patrón de tamaño.

35

40

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Amplificación específica de gen de OAT y MDR1.

45

M, marcador de tamaño,

A, amplificación de OAT (cebador: OAT-f1mp y OAT-rmp),

B, amplificación de OAT (cebador: OAT-f2mp y OAT-rmp),

50

C, amplificación de MDR1 (cebador: MDR-f1mp y MDR-rmp) y

D, amplificación de MDR1 (cebador: MDR-f2mp y MDR-rmp)

55

Figura 2: Reamplificación de fragmentos de OAT/Mdr1 del ejemplo 2 con cebadores genéricos.

M, marcador de tamaño,

60

A, MDR1 con cebadores gen1-fp5 y gen-rp;

B, OAT con cebadores gen1-fp5 y gen-rp;

C, MDR1 y OAT con cebadores gen1-fp5 y gen-rp;

65

D, MDR1 y OAT con cebadores gen2-fp5 y gen-rp.

ES 2 319 963 T3

Figura 3: Se analizaron respectivamente 4 μ l de reacciones PCR de las combinaciones de cebadores ER1-B-L-M13b/ER1-B-L-M13a (carriles 1,5), ER1-B-UM13a/ER1-B-L-M13a (carriles 2,6), ER1-B-L-M13b/ER1-B-U-M13b (carriles 3,7) y ER1-B-U/ER1-B-L (carriles 4,8) con ADN tratado con bisulfito (carriles 1-4) y ADN genómico no tratado (carriles 5-8).

5 El carril M es un fragmento de ADN patrón de tamaño.

10 Figura 4: Análisis de la reamplificación de productos PCR ESR1 (véase la Fig. 4) en un gel de agarosa al 1,5% (Manniatis *et al.*).

Apéndice

15 *Secuencias de OAT y MDR1 después de tratamiento con bisulfito*

Mdr1:

```

20      0  GTTAAGAATA AAATATATTA AGATAAGGAA AATTTGTAGT TAAGAATAGA AAAAAATTAT
      60  GGTTTTGAAG TATGAGTTAT TAAAGAAAG TGGAAATATT TTTAGATTAT GTAGTAAAAA
     120  ATAAAGTGAT TTTTTTTTTT TAAATTTATG TAATAAATTG ATAGGTAATA TGTGAAAGTT
     180  ATAGAATGTA GATTAGAGGA TATAATAAAT TTATTTTTTTT TATGTTTATA AGAAGTAAGA
25     240  AAAGTTTTGA TGTGAGITAG TATTGTTTTA TAATTTTGAA TTGTGTAGAT TGTACGTATT
     300  TTTTTTTAGT TTGAAGTAAA TAGTGGATAG GAAAAAATAT TAAATGTTGG TAGTAAATAT
     360  GGAAGGAAAT TATAATTAAT GTAATATGTT AAAATATGTT ATGTTTATTT TATTAATTTG
30     420  AATTAAAATG TAAGAATTTA AAATGTTTTG GAAAAATACG GGTATTGATT TGACGTTTGA
     480  AGTTTTTAAA TATTATATAT TTTGAAATAG TATTTGTATT TTGAAATATT TGTTTTTATA
     540  TATTTTTTAA AATTTTTTTT TTTTTTTATT TTATTTATTA TTAATAAAG GATGAATAGA
35     600  TGTAATTTAG AAATTGTTAA GTATGTTGAA GAAAGATTAT TGTAGAAAAA TTTTTTTTAG
     660  TTTTTTTAAA GGTGTTAGGA AGTAGAAAGG TGATATAGAA TTGGAGAGGT CGGAGTTTTT
     720  GTATTAATTG TATTAAATGC GAATTTTCGAG AAAATTTTTT TTAATACGT TTTGTAGTTA
40     780  TATGGATATG AAGATTTATG TGAATTTTGA AAGACGTGTT TATATAAGTT GAAATGTTTT
     840  TAATGATTTA GTTGATGCGC GTTTTTTTAT TTGTTTTTTT TAGAGAGGTG TAACGGAAGT
     900  TAGAATATTT TTTTGGAAA TTTAATTTGT TTCGTAGTTT TTCGAGGAAT TAGTATTTAG
45     960  TTAATTCGGG TCGGGAGTAG TTATTTGTGG TGAGGTTGAT TGGTTGGGTA GGAATAGCGT
    1020  CGGGGCGTGG GTTGTAGTATA GTCGTTTCGT TTTTTTTGTT ATAGGAAGTT TGAGTTTATT
    1080  CGAGTAGCGG TTTTTTTAAG TTTAAAGAAG TAGAGGTCGT TGTTCTGTTT TTTTAGGTTT
50    1140  TTTTATTAAA GTCGGAGTAT TTTTTTTTAA AATTTTACGT TTTGGTGGTC GTTTTAAGGA
    1200  GCGCGAGGTA GGGGTACGTA AAGTTGGGAG TTATTATGGG ATAGTTTTTA AGTGTTAGGT
    1260  TTTTAGATTT TTTGAATTTG GTTTTACGG GAGAAGGGTT TTTTGAGGCG TGGATAGTGT
55    1320  GAAGTTTTTT GGTAAAGTTA TGGGGATTAA GTGGGGTTAG ATTTAGATTT AGGAGTTTTT
    1380  GGAGTAGCGT TTAATCGTA GTGGTATTGG ATTATGTTGT TCGGAGCGCG TATAGTTCGC

```

60

65

ES 2 319 963 T3

1440 GCGGTGCGGG GATTTGTTTT TTGAGTTCGC GGGCGGTGGG TGGGAGGAAG TATCGTTCCG
 1500 GGCGATTGGA ATCGGGAGGG AGAATCGTAT TGGCGGCGGG TAAAGTTTAG AACCGTTGT
 5 1560 TAGATTTTTA ATTTTGTFFF CGTGGAGATG TTGGAGATTT CGCGTATAGG AAAGTTTTTG
 1620 TAGTGTTTAT CGCGGTTAGA GTAGTTGGGG TATTAACGGC GGGCGTTTTT TTTTATTGTT
 1680 TTTTGGTTTC GACGGGGGAT TAGAGTTAG TTTTATTTTT AGCGCGTTTG AGGTTTATGT
 10 1740 ATTTGGTTAA TGAGTTGCGG TTTTTTTTTA GGTCCGGGATG GATTTTGAAG GGGATCGTAA
 1800 TGGAGGAGTA AAGAAGAAGA ATTTTTTTAA ATTGAATAAT AAAAGGTAAT TAGTTTGTTF
 1860 TATTTTTATA GTTTATATAG TTGCGAGATT TGAGTAATTT ATTTTTAGTT TTTAGTTTTG
 15 1920 AAATAAATGA TATGTTGTTG TTTTAAATTA TTTTAAAGAA ACGTAAGTTA GTTTTTGGAA
 1980 TTAATATTTT TGTTTAGAGT AGAAGTTTGT TGGTTGAGTG GAGTATAGTA TATGATTTT
 2040 TTTTGTTTTT TTTGTTTTTT TTTTAAATGA TATATAATAT TTTATATATT TATGAAATGG
 2100 GGTATATGGA AGCGTTTTTT ATATGTTCCG AATGTGTAAT GATTAAGTTC GGGTATTTGA
 20 2160 AGGATATATT ATTTTAGSTA TATTTTATTT TTATGTGTTG ATAATATTTT AAGTTTTTTA
 2220 GTTATTTTGA AATATATAAT ATATTGTTAA TTGTAGTTAT TTTGTTTTGT TATCGAATAT
 2280 TGGAAATTTAT TTGTTTTATT TAATCGTTT TAGTTATTTA TTAATTTTTT TTTATTTTAT
 25 2340 TTTTTTATTT TTTTCGGTTT TTTTTTTTTA GTTTTGGTGT GTTTTTTTTT TAGTTTTTTT
 2400 GTTTTAGATA GGCGGATGTT TATATGTGTT TTTGTTTTAT GAATTTTTGT TTTTTAAGTG
 2460 GTGTTGGTTCG TTTATACGTG AGTTATATGT TGTGGTGTGAT TTGTTTTGTG GTTTAGGTTT
 30 2520 TTGTTTTCCG TAAATGGTTA TGTAATATC CGGTTTGTGG TTTGGTTGAT GAGATAGAAG
 2580 GTTAAAAGTA TATTTAGGTT GTTAATGGT AATAAATATT TGTATATAAT ATTGGTAATG
 2640 TAATTATATA GGGAAAATAA TTATTTAAAG TAAATTTTGA TTATGGTGT TTTGTTTTAT
 35 2700 AGAATATTTA AAATTTTTATT AAATAGATTT ATTGTTAGTA GTAAATTGTA AAATAGATTA
 2760 GTAAGTTTAA TAATATTAGA AATTGTAATG TAAATTATAA GATAAATTAG TTAATATAT
 2820 TAATATTATA AGAAATTAAG TTTTTTAGTG TAAGAGAAAA AATATAAATG TGGAAATTA
 40 2880 ATATATTTTT AAAAATAATG TTAAGTTTGA ATTAGAAATT TTAATATGAA TT

45 OAT:

1 GGTAGCGACG ATTTTTGGAG GTGGATTTAG AGGTATAATT AAGTCGCGCG GCGTATTAGG
 50 61 GTTTAAGGGT ATGGGGTTTT CGTAGTTGTG GTTGGGGTAG AGTTGGGGTT GTTTTTTTTT
 121 TTAGGAGTAT AGGCGGCGGT TTAGTTTTAC GTTTTTCGTT TTTAGTTATA TTCGGTTCGC
 181 GTAGTGGGGG GTTTAATAGA TTTTTTTTTT TCGGGTTTTA GTTTTTTCGT TAGTAAGGGC
 55 241 GGATAAGGAT TTTTTTCGTT TCGTTAGAGG AGGCGATCGA GGGGTTGAG TTTAGGTATA
 301 GGTCCGCGGG TTTAGGAGGC GCGAGGCGGA TCGAATTCGC GGGAGGAGTA AAGATTTTTG
 361 ATCGCGGTC GGAGGGCGGG GCGAGGACG GGATTTACGC GATTGGTATT TTGTTTTTCG
 60 421 TTTTAGTTAA TGAGCGGCGA GSGTGTTTTG GGGGCGGGGT AGAATTAGTT TTTAAGTTGT
 481 AGTGACGTTT CGGCGTTATT GTPGCGTTTT ATAGACGTCG CGTGTAATCG GTTGTTTTTA
 541 GCGGTTGTTA GGTATCGTTT GGGCGTCGTT GTTTTGGGGT TTTGGTTCGG GTTTGGTCCG
 65 601 AAACRTCACT ACAACTTAAA AACTAA

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la amplificación de ácidos nucleicos, **caracterizado** porque se realizan las siguientes etapas:
- 5 a) se hace reaccionar químicamente una muestra de ácido nucleico con un reactivo, con lo que la 5-metilcitosina permanece intacta y la citosina se transforma en uracilo o en otra base similar al uracilo en el comportamiento de apareamiento de bases;
- 10 b) hibridan los segmentos a amplificar con al menos dos oligonucleótidos cebadores que presentan dos dominios, de los cuales el dominio específico de secuencia que se encuentra en el extremo 3' hibrida con el segmento a amplificar, mientras que el dominio genérico que se encuentra en el extremo 5' no hibrida;
- 15 c) se lleva a cabo una primera reacción de amplificación mediante una polimerasa,
- d) hibrida con el producto amplificado un oligonucleótido cebador marcado, que hibrida con el dominio genérico del primer cebador y
- 20 e) se analiza el producto amplificado respecto a su secuencia, **caracterizado** además porque el dominio genérico del cebador contiene las nucleobases A, C, G y T, mientras que los dominios específicos de secuencia contienen sólo las bases A, T y C o sólo las bases A, T y G.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque después de la etapa d de la reivindicación 1 se realiza adicionalmente una segunda amplificación con una reacción de la polimerasa.
- 25 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque en el reactivo se trata de un bisulfito (= hidrogenosulfito, disulfito).
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el tratamiento químico se realiza después de embeber el ADN en agarosa.
- 30 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque en el tratamiento químico se añade un reactivo desnaturalizador de ADN dúplex y/o un captador de radicales.
- 35 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque en los marcajes de cebadores oligonucleotídicos se trata de colorantes de fluorescencia con distintos espectros de emisión (por ejemplo, Cy3, Cy5, FAM, HEX, TET o ROX) o de combinaciones de colorantes de fluorescencia en el caso de cebadores marcados con colorante de fluorescencia por transferencia de energía.
- 40 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque los marcajes son radionucleidos.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque los marcajes son marcajes de masas desprendibles que se detectan en un espectrómetro de masas.
- 45 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque para el marcaje se usan moléculas que producen una señal sólo en una reacción química adicional.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque para el marcaje se usan moléculas que se inmovilizan en sitios definidos en una fase sólida.
- 50 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque los fragmentos de PCR están dispuestos sobre una fase sólida en forma de una cuadrícula rectangular o hexagonal.
- 55 12. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque los marcajes aplicados a productos amplificados son identificables en cualquier posición de la fase sólida en la que se encuentre una secuencia oligonucleotídica.
- 60 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la amplificación usa una ADN polimerasa termorresistente.
14. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico se ha obtenido a partir de una muestra de ADN genómico, en el que las fuentes de ADN comprenden, por ejemplo, líneas celulares, sangre, esputo, heces, orina, fluido cerebroespinal, tejidos embebidos en parafina, por ejemplo, tejidos de ojos, intestino, riñones, cerebro, corazón, próstata, pulmones, mama o hígado, portaobjetos histológicos y todas las posibles combinaciones de los mismos.
- 65

ES 2 319 963 T3

15. Uso de un procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes para el diagnóstico y/o pronóstico de eventos desventajosos para pacientes o individuos, en el que estos eventos desventajosos pertenecen al menos a una de las siguientes categorías: efectos indeseados de medicamentos, cánceres, disfunciones, lesiones o enfermedades del SNC, síntomas de agresión o alteraciones de comportamiento, consecuencias clínicas, psicológicas y sociales de lesiones cerebrales, alteraciones psicóticas y alteraciones de la personalidad, demencia y/o síndromes asociados, enfermedad, disfunción y lesión cardiovascular, disfunción, lesión o enfermedad del tracto gastrointestinal, disfunción, lesión o enfermedad del sistema respiratorio, lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o reconvalecencia, disfunción, lesión o enfermedad del cuerpo como anomalía en el proceso de desarrollo, disfunción, lesión o enfermedad de la piel, de músculos, del tejido conectivo o de huesos, disfunción, lesión o enfermedad endocrina y metabólica, dolores de cabeza o disfunción sexual.

16. Uso de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15 para la diferenciación de tipos celulares o tejidos o para el análisis de la diferenciación celular.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

M A B C D

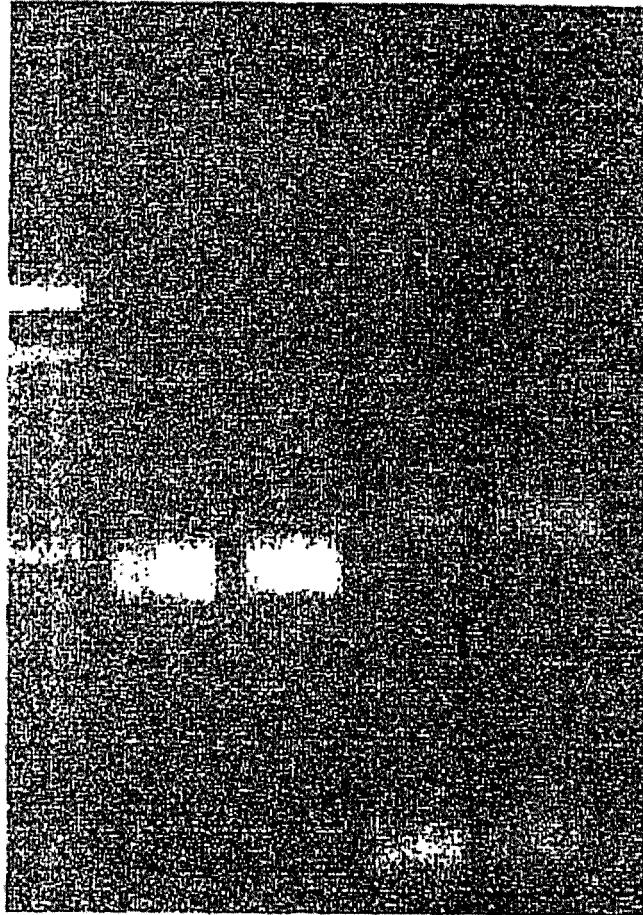


Figura 2

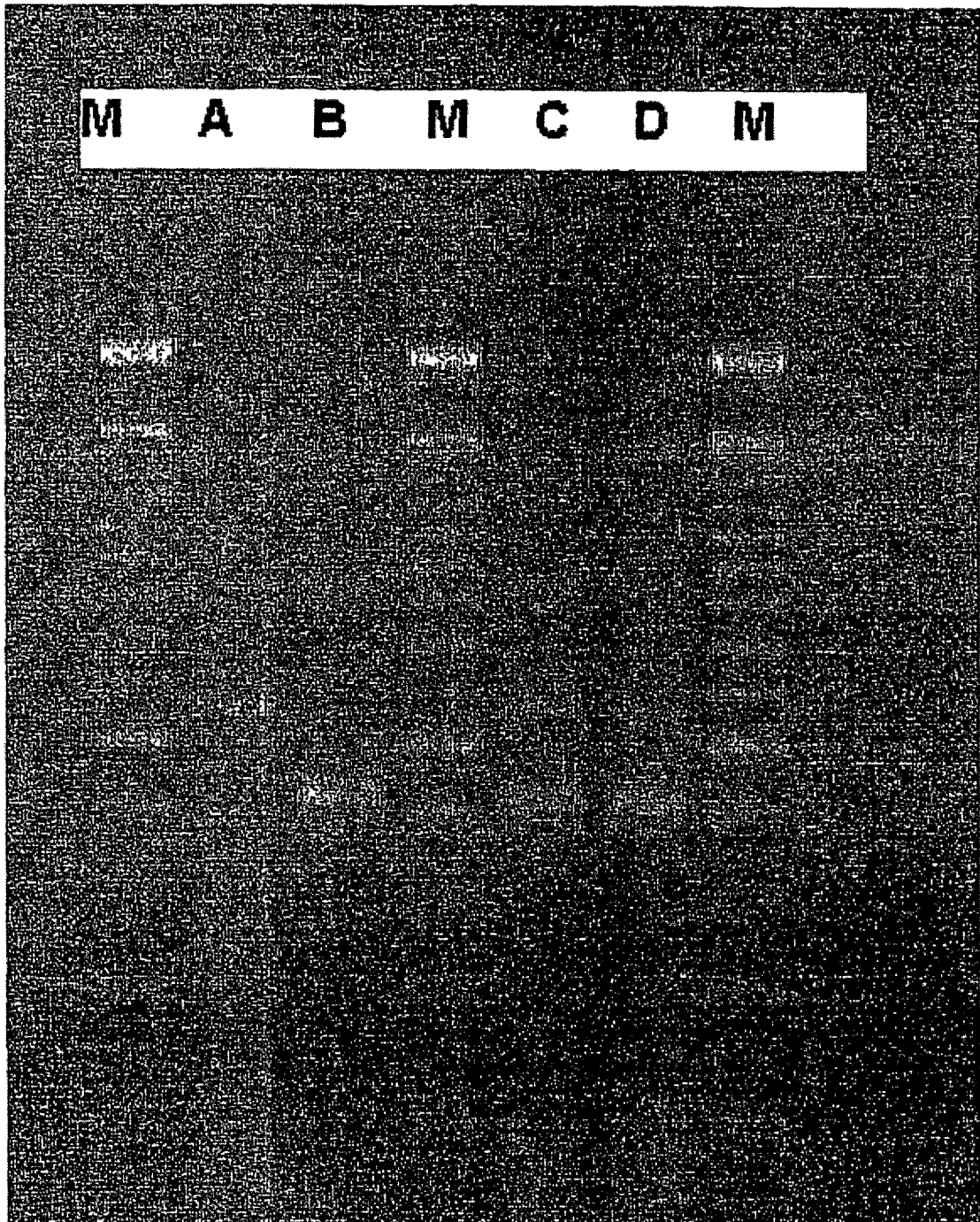


Figura 3



Figura 4

