



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.** 04-97182

54. **TÍTULO** Análisis rápido de variaciones en un genoma

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** C12A 1/68

71. **SOLICITANTE** Langen, Inc.

DOMICILIO MD, Estados Unidos de América

74. **APODERADO** Alicia Ibarrida Ricourt
I.P. 33.215
Código 231

22. **BOGOTÁ, D. C.,** 29 set 2004

PETITORIO



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación: 84097182 00000000 Folios: 291
 Fecha (MM): 2004-09-29 16:36:47
 Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACT 411 PRESENTIN
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: RAVGEN, INC.
 Dirección: 9241 Rumsey Road Columbia, MD
 21045, Estados Unidos de América
 Nacionalidad o Domicilio: MD, Estados Unidos
 de América.
 Lugar de Constitución:
 Teléfono: 3284270 Fax: 8089701
 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
 C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE
 Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
 Bogotá- Colombia
 Teléfono: 3284270 Fax: 8089701
 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
 C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.880.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: DHALLAN, Ravinder.
 Dirección: 8013 Thornley Court Bethesda, MD 20817.
 Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/USO3/06376 Fecha: 28/02/03

Publicación Internacional No. WO 03/074740 A1 Fecha: 12/09/03

⑥

Título (54) "ANALISIS RAPIDO DE VARIACIONES EN UN GENOMA"

⑦

Clasificación Internacional (51) C12Q 1/68

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

01-03-2002

60/360,232

US

11-03-2002

10/093,618

US

08-05-2002

60/378,354

⑨

Comprobante de Pago No. 04- 74,987

Fecha: Septiembre 22 de 2004

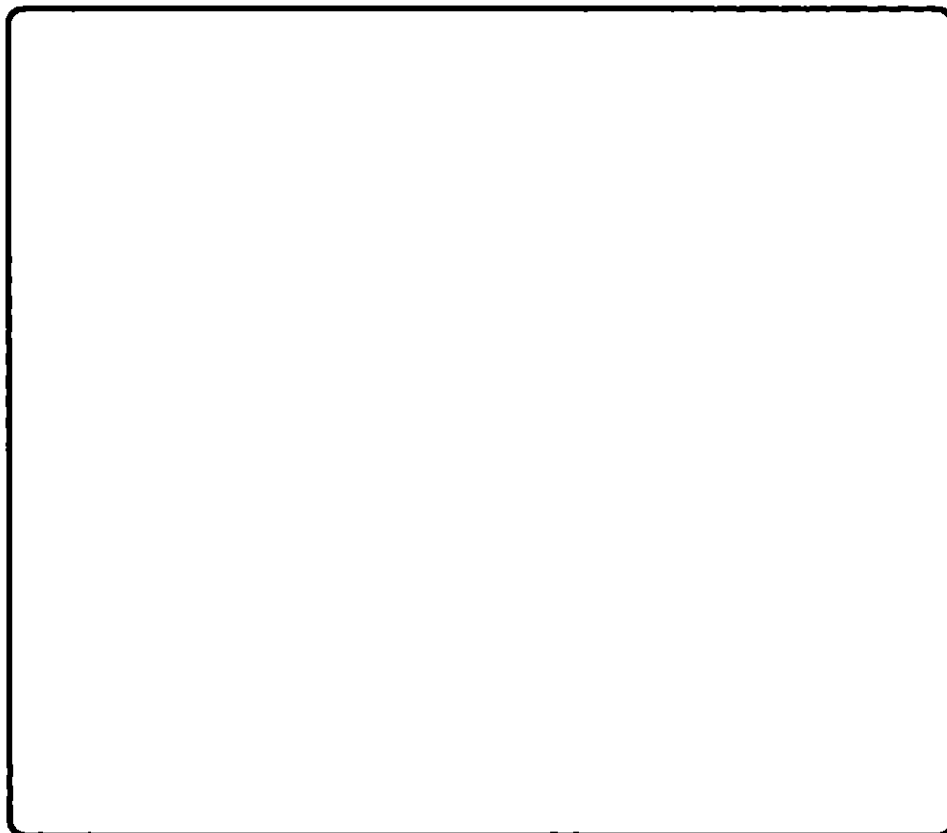
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción, Capítulo Reivindicatorio como fue originalmente presentado en fase internacional con su traducción, Notificación Registro de Cambio con su traducción, Notificación de recibo de la solicitud por la Autoridad Competente de Examen Preliminar Internacional y Anexo explicativo de modificaciones a las reivindicaciones.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA

FIRMA:

C.C.39.690.713 Usaquén

T.P. 53.215

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 04097102 00000000 Folios: 291
Fecha (AMD): 2004-09-29 16:56:47
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FRASE INICI 411 PRESENTAR
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 890174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 74,987
FECHA : SEPTIEMBRE 22 DE 2004

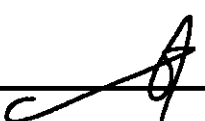
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	24385999	22/09/2004	18,196,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. FENITISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50003-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	422,000.00

SOM: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____


RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Se retiraron los 3 q's publicaron
extra y toyas
Elt
2004-10-22

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL		Solicitud Internacional No. PCT/US03/06376
A. CLASIFICACION DE MATERIA IPC(7): C12Q 1/68; C07H 21/02, 21/04 US CL: 435/6; 536/23, 1 y 24.3 Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI		
B. CAMPOS BUSCADOS Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación) U.S.: 435/6; 536/ 23, 1 y 24.3 Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados) Por favor ver continuación de la hoja		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Cita de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A, P	US 2003/0082576 A1 (JONES et al) 1 de mayo de 2003 (01.05.2003), ver documento completo	1-67
A	KWOK, P.Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphism. Annual Review of Genomics and Human Genetics. 2001, vol.2, páginas 235-258, ver completo	1-67
A	SHI, M.M. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. Clinical Chemistry, 2001, vol. 47, No.2, páginas 164-172, ver el documento completo	1-67
A, P	US 6,475,736 B1 (STANTON) 05 de noviembre de 2002 (05.11.2002) ver documento completo.1	1-67
☒ En el recuadro C se enumeran más documentos. ☐ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.		
* Categorías especiales de documentos citados: 'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular 'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional 'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica) 'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada 'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención 'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo 'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica 'Z' documento miembro de la misma familia de patentes		
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 26 de junio de 2003 (26.06.2003)		Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 17 de julio de 2003
Nombre y dirección del correo de ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Fax No. (703) 305-3230		Funcionario autorizado Ethan Whisenant, Ph.D. Teléfono No. (703) 308-0196

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.

PCT/US 03/06376

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X — A	US 5,831,065 A (BRENNER) 3 de noviembre de 1998 (03.11.1998) ver el documento completo pero ver especialmente las figuras.	60 1-59 y 61-67

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US03/06376

Continuación de B. Campos Buscados Item 3:
USPATFULL y EUROPATFULL vía EAST; CApius, Medline vía STN
Términos de la búsqueda: Genotipo\$ y SNP\$ y/o Polimorfismo de Nucleótido Sencillo \$ y alelo\$; Tipo II
y/o endonucleasa de restricción Tipo II \$ y/o enzima\$, y completa o completa y secuencia\$.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/06376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) C12Q 1/68;C07H 21/02, 21/04
US CL 435/6- 536/ 23.1 and 24.3

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. 435/6 536/ 23.1 and 24.3

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A P	US 2003/0082576 A1 (JONES et al) 01 May 2003 (01.05.2003) see the entire document.	1-67
A	KWOK, P Y Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms Annual Review of Genomics and Human Genetics 2001 Vol 2, pages 235-258, see the entire	1-67
A	SHI M.M Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. Clinical Chemistry 2001 Vol 47 No.3 pages 164-172, see the entire document.	1-67
A P	US 6 475 736 B1 (STANTON) 05 November 2002 (05.11.2002) see the entire document.	1-67



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

Special categories of cited documents.

A	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

26 June 2003 (26.06.2003)

Date of mailing of the international search report

17 JUL 2003

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Galerie Bell-Harris for
Ethien Whitehead Ph.D.

Telephone No (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/06376

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — A	US 5 831,065 A (BRENNER) 03 November 1998 (03.11 1998) see the entire document but note especially the figures.	60 1-59 and 61-67

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/06376

Continuation of B FIELDS SEARCHED Item 3
USPATFULL and EUROPATFULL via EAST Capins, Medline via STN

search terms Genotyp\$ and SNP\$ and/or Single Nucleotide Polymorphism\$ and allele\$ TypeIIa and/ or Type IIa restriction
endonuclease\$ and/or enzyme\$ and fill in or fill-in and sequence\$

SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional

12 de Septiembre de 2003 (12.09.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 03/074740 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12Q 1/68,
C07H 21/02, 21/04

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US03/06376

(22) Fecha de Registro Internacional: 28 de Febrero de 2003
(28.02.2003)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
60/360,232 1 de marzo de 2002 (01.03.2002) US
10/093,618 11 de marzo de 2002 (11.03.2002) US
60/378,354 8 de mayo de 2002 (08.05.2002) US

(71) Solicitante y

(72) Inventor: DHALLAN, Ravinder [US/US]; 8013 Thornley
Court, Bethesda, MD 20817 (US).

(74) Agentes: WITT, Eric et al.; Morrison & Foerster LLP,
755 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304-1018 (US).

(81) Estados Designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (regional): Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicando:

-- Con reporte de Búsqueda Internacional
— antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: ANALISIS RAPIDO DE VARIACIONES EN UN GENOMA

(57) Resumen: La invención proporciona un método útil para determinar la secuencia de un gran número de sitios de interés en cromosomas sencillos o múltiples. El método emplea un oligonucleótido plantilla que contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, tal que la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés. La proyección 5' es usada como un template para incorporar nucleótidos, los cuales pueden ser detectados. El método es especialmente favorable para el análisis de grandes números de secuencias, tal como polimorfismos de nucleótidos sencillos, de una muestra de ácido nucleico.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 September 2003 (12 09.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/074740 A1

(51) International Patent Classification⁷ C12Q 1/68
C07H 21/02 21/04

(21) International Application Number PCT/US03/06376

(22) International Filing Date 28 February 2003 (28 02 2003)

(25) Filing Language English

(26) Publication Language English

(30) Priority Data
60/360,232 1 March 2002 (01.03.2002) US
10/093,618 11 March 2002 (11.03.2002) US
60/378,354 8 May 2002 (08.05.2002) US

(71) Applicant and
(72) Inventor DHALLAN Ravinder [US/US] 8013 Thorn
ley Court, Bethesda, MD 20817 (US)

(74) Agents WITT Eric et al Morrison & Foerster LLP 755
Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304-1018 (US)

(81) Designated States (national) AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) Designated States (regional) ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI,
SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

RECEIVED

SEP 26 2003

Morrison & Foerster LLP
Palo Alto

(54) Title RAPID ANALYSIS OF VARIATIONS IN A GENOME

(57) Abstract The invention provides a method useful for determining the sequence of large numbers of loci of interest on a single or multiple chromosomes. The method utilizes an oligonucleotide primer that contains a recognition site for a restriction enzyme such that digestion with the restriction enzyme generates a 5' overhang containing the locus of interest. The 5' overhang is used as a template to incorporate nucleotides which can be detected. The method is especially amenable to the analysis of large numbers of sequences, such as single nucleotide polymorphisms from one sample of nucleic acid.

PCT

De la OFICINA INTERNACIONAL

**NOTIFICACION DE REGISTRO
DE UN CAMBIO**

(Regla 92 bis. 1 del PCT e
Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Fecha de envío por correo (día/mes/año)
3 de junio de 2004 (03.06.2004)

Para:

WITT, Eric
Morrison & Foerster LLP
755 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304-1018
Estados Unidos de América

Archivo de referencia del solicitante o agente
543312000340

NOTIFICACION IMPORTANTE

Solicitud Internacional No.

PCT/US2003/006376

Fecha de registro internacional (día/mes/año)

28 de febrero de 2003 (28.02.2003)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante ☐ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común

Nombre y Dirección

País de Nacionalidad

País de Residencia

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☒ la persona ☐ el nombre ☐ la dirección ☐ la nacionalidad ☐ la residencia

Nombre y Dirección

País de Nacionalidad
US

País de Residencia
US

RAVGEN, INC
9241 Rumsey Road
Columbia, MD 21045
Estados Unidos de América

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

La persona en la casilla 2 ha sido registrada como solicitante para todos los estados designados excepto U.S
DHALLAN, Ravinder, S. permanece como inventor para todos los estados designados y solicitante únicamente para U.S

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina que recibe ☐ las Oficinas designadas relacionadas
☐ la Autoridad de Búsqueda Internacional ☒ las Oficinas seleccionadas relacionadas
☒ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ☐ otros:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Funcionario autorizado
Elisabeth KÖNIG (Fax 3388970)

Facsímile No. (41-22) 338.89.70

Teléfono No. (41-22) 338 8748

Forma PCT/IB/306 (marzo 1994)

006282501

PATENT COOPERATION TREATY

12

RECEIVED

JUN 09 2004

Morrison & Foerster, LLP
Palo Alto

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WITT, Eric
Morrison & Foerster LLP
755 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304-1018
United States of AmericaNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 03 June 2004 (03.06.2004)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 543312000340	
International application No. PCT/US2003/006376	International filing date (day/month/year) 28 February 2003 (28.02.2003)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant- ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

RAVGEN, INC.
9241 Rumsey Road
Columbia, MD 21045
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

The person in Box 2 has been recorded as applicant for all designated states except US.
DHALLAN, Ravinder, S. remains inventor for all designated states and applicant for US only.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

NO DOCKETING REQUIRED

REVIEWED BY DOCKETING

INITIALS

TR

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.89.70

Authorized officer

Elisabeth KÖNIG (Fax 338 8970)

Telephone No. (41-22) 338 8748

**CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE
ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE
INTERNACIONAL JUNTO CON SU
TRADUCCION**

LO QUE SE REIVINDICA ES

1 Un método para determinar una secuencia de un sitio de interés dicho método comprende

(a) replicar una región de ADN que comprende un sitio de interés de un template polinucleótido usando una primera y una segunda plantillas en donde la segunda plantilla contiene una secuencia que genera un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción de manera tal que esa digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés

(b) digenr el ADN con la enzima de restricción que distingue el sitio de reconocimiento generado por la segunda plantilla para crear un fragmento de ADN

(c) incorporar un nucleótido en el ADN digendo de (b) usando la proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template y

(d) determinar la secuencia del sitio de interés designando la secuencia del ADN de (c)

2 Un método para determinar una secuencia de un sitio de interés dicho método comprende

(a) amplificar un sitio de interés en un template ADN que usa una primera y segunda plantillas en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción de tal modo que esa digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés

- (b) digenr el ADN amplificado con la enzima de restricción que distingue el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla
- (c) incorporar un nucleótido en el ADN digendo de (b) usando la proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template y
- (d) determinar la secuencia del sitio de interés determinando la secuencia del ADN de (c)

3 El método de la reivindicación 2 en donde el template de ADN se obtiene de una fuente seleccionada de entre un grupo consistente de bacteria hongo virus protozoano planta animal y humano

4 El método de la reivindicación 2 en donde el template ADN se obtiene de una fuente humana

5 El método de la reivindicación 2 en donde el template ADN se obtiene de una muestra seleccionada entre el grupo consistente de célula tejido sangre suero plasma orna fluido espinal fluido linfático semen secreción vaginal fluido ascítico saliva secreción mucosa fluido peritoneal matena fecal o exudados corporales

6 El método de la reivindicación 2 en donde la amplificación en (a) comprende la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

7 El método de la reivindicación 2 en donde la enzima de restricción fragmenta ADN en el sitio del reconocimiento

8. El método de la reivindicación 7, en donde la región 5' de la segunda plantilla no recoca a la plantilla ADN.

9. El método de la reivindicación 7, en donde la región 5' de la primera plantilla no recoca al template ADN.

10. El método de la reivindicación 7, en donde la enzima de restricción se selecciona de entre un grupo consistente de BsaJ I, Bsk I, Dde I, EcoN I, Fnu4H I, y HinfI.

11. El método de la reivindicación 2, en donde la enzima de restricción fragmenta ADN a una distancia del sitio de reconocimiento.

12. El método de la reivindicación 11, en donde una región 5' de la segunda plantilla no recoca al template ADN.

13. El método de la reivindicación 11, en donde la región 5' de la primera plantilla no recoca al template ADN.

14. El método de la reivindicación 12, en donde una longitud de recocido de la región 3' de la segunda plantilla, se selecciona entre un grupo consistente de 25-20, 20-15, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, y menos de 4 bases.

15. El método de la reivindicación 2, en donde la temperatura de recocido para el ciclo 1 de PCR es cercano a la temperatura de fusión de la porción de la región 3' de la segunda plantilla que recoce al template ADN.

16. El método de la reivindicación 15, en donde una temperatura de recocido para el ciclo 2 de PCR está cercana a la temperatura de fusión de la porción de la región 3' de la primera plantilla que recoce al template ADN.

17. El método de la reivindicación 16, en donde una temperatura de recocido para los ciclos restantes de PCR es cercana a la temperatura de fusión de la segunda plantilla completa.

18. El método de la reivindicación 2, en donde el terminal 3' de la segunda plantilla es adyacente al sitio de interés.

19. El método de la reivindicación 11, en donde el sitio de reconocimiento es para una enzima de restricción Tipo IIS.

20. El método de la reivindicación 19, en donde la enzima de restricción del Tipo IIS se selecciona de entre un grupo consistente de: Alw I, Alw26 I, Bbs I, Bbv I, BceA I, Bmr I, Bsa I, Bst71 I, BsmA I, BsmB I, BsmF I, BspM I, Ear I, Fau I, Fok I, Hga I, Ple I, Sap I, SSfaN I, y Sthi32 I.

21. El método de la reivindicación 19, en donde la enzima de restricción Tipo IIS, es BceA I o BsmF I.

22. El método de la reivindicación 2, en donde la primera plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, que es diferente del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción en la segunda plantilla.

23. El método de la reivindicación 22, además comprende la digestión del ADN de (c) con una enzima de restricción, que reconoce el sitio de reconocimiento en la primera plantilla.

24. El método de la reivindicación 2, en donde la primera o segunda plantilla contiene un marcador en el terminal 5'.

25. El método de la reivindicación 2, en donde la primera plantilla contiene un marcador en el terminal 5'.

26. El método de la reivindicación 27, en donde el marcador se usa para separar el ADN amplificado del template ADN.

27. El método de la reivindicación 26, en donde el marcador se usa para separar el ADN amplificado que contiene el nucleótido incorporado, del ADN amplificado que no contiene el nucleótido incorporado.

28. El método de la reivindicación 24, en donde la marcador se selecciona de entre el grupo consistente de: radioisótopo, molécula reportero

fluorescente, molécula reportero químico luminiscente, anticuerpo, fragmento del anticuerpo, hapteno, biotina, derivado de biotina, fotobiotina, iminobiotina, digoxigenina, avidina, enzima, acridinio, azúcar, enzima, apoenzima, oligonucleótido homopolimérico, hormona, medio ferromagnético, medio paramagnético, medio diamagnético, medio fosforescente, medio luminiscente, medio electro químico luminiscente, medio cromático, medio de una resonancia perceptible de giro de electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica o conductibilidad eléctrica, y combinaciones de ellos.

29. El método de la reivindicación 24, en donde el marcador es biotina.

30. El método de la reivindicación 29, en donde el marcador de biotina se usa para separar ADN amplificado, del template ADN usando una matriz de estreptavidina.

31. El método de la reivindicación 30, en donde la matriz de estreptavidina es recubierta en los pozos de una placa de microtitulación.

32. El método de la reivindicación 2, en donde la incorporación de un nucleótido en (c) es mediante una polimerasa de ADN seleccionada de entre un grupo que consiste de: E. coli polimerasa de ADN, fragmento Klenow de E. coli polimerasa I de ADN, polimerasa T7 de ADN, polimerasa T4 de ADN, polimerasa Taq, polimerasa Pfu de ADN, polimerasa y secuenasa Vent de ADN.

33. El método de la reivindicación 2, en donde la incorporación de un nucleótido en (c) comprende la incorporación de un nucleótido marcado.

34. El método de la reivindicación 2, en donde la incorporación de un nucleótido en (c) comprende además la incorporación de un nucleótido no marcado.

35. El método de la reivindicación 33, en donde el nucleótido marcado se selecciona de entre un grupo consistente de un dideoxinucleótido y un deoxinucleótido.

36. El método de la reivindicación 33, en donde el nucleótido marcado se marca con una molécula seleccionada de entre un grupo consistente de molécula radiactiva, molécula fluorescente, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, hapteno, hidrato de carbono, biotina, derivado de biotina, medio fosforescente, medio luminiscente, medio electro químico luminiscente, medio cromático, medio que tienen una resonancia perceptible de giro de electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica o conductibilidad eléctrica.

37. El método de la reivindicación 33, en donde el nucleótido marcado se marca con una molécula fluorescente.

38. El método de la reivindicación 37, comprendiendo además la incorporación de un nucleótido no marcado.

39. El método de la reivindicación 2, en donde la determinación de la secuencia del sitio de interés en (d) comprende la detección del nucleótido.

40. El método de la reivindicación 33, en donde la determinación de la secuencia del sitio de interés en (d) comprende la detección del nucleótido marcado.

41. El método de la reivindicación 40, en donde la detección es mediante un método seleccionado de entre un grupo consistente de electrofóresis en gel, electrofóresis en gel poliacrilamida, detección de fluorescencia, secuenciación, ELISA, espectrometría de masa, fluorometría, hibridación, microconjunto, y absorción de Southern.

42. El método de la reivindicación 40, en donde el método de detección es la secuenciación de ADN.

43. El método de la reivindicación 40, en donde el método de detección es la detección de fluorescencia.

44. El método de la reivindicación 2, en donde el sitio de interés es sospechoso de contener un solo polimorfismo del nucleótido o mutación.

45. El método de la reivindicación 2, en donde el método se usa para determinar concurrentemente las secuencias de sitios múltiples de interés.

46. El método de la reivindicación 45, en donde el template ADN comprende los sitios múltiples de un solo cromosoma.

47. El método de la reivindicación 45, en donde el template ADN comprende los sitios múltiples de cromosomas diferentes.

48. El método de la reivindicación 45, en donde los sitios de interés en el template ADN, se amplifican en una reacción.

49. El método de la reivindicación 45, en donde cada uno de los sitios de interés en la plantilla ADN, se amplifica en una reacción separada.

50. El método de la reivindicación 49, en donde el ADN amplificado se agrupa previo a la digestión del ADN amplificado.

51. El método de la reivindicación 45, en donde cada ADN marcado en (c) conteniendo un sitio de interés, es separado previo a (d).

52. El método de la reivindicación 45, en donde por lo menos uno de los sitios de interés es sospechoso de contener un solo polimorfismo nucleótido o una mutación.

53. Un método para determinar una secuencia de un sitio de interés, dicho método comprende:

- (a) amplificar un sitio de interés en un template ADN usando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene una porción de un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, en donde se genera un sitio de reconocimiento completo para la enzima de restricción ante la amplificación del template ADN, tal que esa digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés;
- (b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio completo de reconocimiento generado por la segunda plantilla y el template ADN;
- (c) incorporar un nucleótido en el ADN digerido de (b) usando la proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template; y precisar la secuencia del sitio de interés, determinando la secuencia del ADN de(c).

54. El método de la reivindicación 52, en donde la región 3' de la segunda plantilla contiene una desigualdad con el template ADN.

55. El método de la reivindicación 53, en donde la desigualdad ocurre en las últimas 1, 2 o 3 bases de la región 3'.

56. Un método para determinar una secuencia de un sitio de interés, dicho método comprende:

- (a) amplificar un sitio de interés en un template ADN utilizando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que fragmenta ADN a una distancia del sitio de reconocimiento; y la digestión con la enzima de restricción

genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés, y en donde la primera plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, que es diferente del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción en la segunda plantilla y contiene un marcador en el terminal 5';

(b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que distingue el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla;

(c) incorporar un nucleótido marcado en el ADN digerido de (b) usando la proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template;

(d) digerir el ADN de (c) con la enzima de restricción que distingue el sitio del reconocimiento en la primera plantilla; y

(e) determinar la secuencia del sitio de interés, determinando la secuencia del ADN digerido de (d) que contiene el nucleótido marcado.

57. Un método para determinar una secuencia de un sitio de interés, dicho método comprende:

(a) amplificar un sitio de interés en un template ADN utilizando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que fragmenta ADN a una distancia del sitio de reconocimiento; y la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés, en donde la primera plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, que es diferente del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción en la segunda plantilla, y contiene un marcador en el terminal 5', en donde la temperatura de recocido durante el ciclo 1 de PCR es cercano a la temperatura de fusión de la porción de la región 3' de la segunda plantilla que recoce al

templete ADN, la temperatura de recocido durante el ciclo 2 de PCR es cercano a la temperatura de fusión de las porciones de la región 3' de la primer plantilla que recoce al templete ADN, y la temperatura derecocido durante los ciclos restantes es cercana a la temperatura de fusión de la segunda plantilla completa;

(b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que precisa el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla;

(c) incorporar un nucleótido marcado en el ADN digerido de (b) usando la proyección 5' que contiene el sitio de interés como un templete;

(d) digerir el ADN de (c) con la enzima de restricción que distingue el sitio de reconocimiento en la primera plantilla; y

(e) señalar la secuencia del sitio de interés determinando la secuencia del ADN digerido de (d) conteniendo el nucleótido marcado.

58. El método de la reivindicación 56, en donde el marcador se usa para separar el ADN amplificado del templete ADN.

59. Un equipo (kit) para el uso en cualquiera de los métodos de la reivindicaciones 1 a 58 que consta de un conjunto de plantillas utilizadas en el método, en donde la segunda plantilla contiene una secuencia que genera un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, tal que la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés, y un conjunto de instrucciones.

60. Un fragmento de ADN que contiene un sitio de interés para ser secuenciado y un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, en donde la digestión con la enzima de restricción crea una proyección 5' en el fragmento de ADN, y en donde el sitio de interés y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción están en relación entre sí de manera tal que esa digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés.

61. Un método para determinar una secuencia de alelos de un sitio de interés, dicho método comprende:

(a) amplificar los alelos de un sitio de interés en un template ADN que usa una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, de manera tal, que esa digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés;

(b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que distingue el sitio del reconocimiento en la segunda plantilla;

(c) incorporar nucleótidos en el ADN digerido de (b), en donde

(i) un nucleótido que termina el alargamiento, y es complementario al sitio de interés de un alelo, es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo, y

(ii) un nucleótido complementario al sitio de interés de un alelo diferente es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo diferente, y dicho nucleótido terminador que es complementario a un nucleótido en la proyección 5' de dicho alelo diferente, es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo diferente;

(d) determinar la secuencia de los alelos de un sitio de interés, determinando la secuencia del ADN de (c).

62. Un método para determinar una secuencia de alelos de un sitio de interés, dicho método comprende:

(a) amplificar un sitio de interés en un template ADN utilizando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene una porción de un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, en donde un sitio de reconocimiento completo para la enzima de restricción se genera ante la amplificación del template ADN, de modo que tal digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés;

(b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que distingue el sitio de reconocimiento completo, generado por la segunda plantilla y el template ADN;

(c) incorporar nucleótidos en el ADN digerido de (b), en donde

(i) un nucleótido que termina el alargamiento, y es complementario al sitio de interés de un alelo, es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo; y

(ii) un nucleótido complementario al sitio de interés de un alelo diferente es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo diferente, y dicho nucleótido de terminación, el cual es complementario a un nucleótido en la proyección 5' de dicho alelo diferente, es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo diferente; determinando la secuencia del sitio de interés mediante la determinación de la secuencia del ADN de (c).

63. Un método para determinar una secuencia de alelos de un sitio de interés, dicho método comprende:

- (a) amplificar un sitio de interés en un template ADN que usa una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que fragmenta ADN a una distancia del sitio de reconocimiento y la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés, y en donde la primera plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que es diferente del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción en la segunda plantilla y contiene un marcador en el terminal 5';
- (b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que identifica el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla;
- (c) incorporar el nucleótido en el ADN digerido de (b), en donde
 - (i) un nucleótido marcado que termina el alargamiento, y es complementario al sitio de interés de un alelo, es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo, y
 - (ii) un nucleótido complementario al sitio de interés de un alelo diferente, es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo diferente, y dicho nucleótido de terminación, el cual es complementario a un nucleótido en la proyección 5' de dicho alelo diferente, es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo diferente;
- (d) digerir el ADN de (c) con la enzima de restricción que distingue el sitio de reconocimiento en la primer plantilla; y
- (e) determinar la secuencia de los alelos de un sitio de interés, determinando la secuencia del ADN digerido de (d) conteniendo el nucleótido marcado.

64. Un método para determinar una secuencia de los alelos de un sitio de interés, dicho método comprende:

(a) amplificar un sitio de interés en un template ADN que usa una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que fragmenta ADN a una distancia del sitio de reconocimiento sitio y la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés, en donde la primera plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que es diferente del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción en la segunda plantilla, y contiene una marcador el terminal 5', y en donde la temperatura de recocido durante el ciclo 1 de PCR se halla alrededor de la temperatura de fusión de la porción de la región 3' de la segunda plantilla que recoce a la plantilla ADN, la temperatura de recocido durante el ciclo 2 de PCR está alrededor de la temperatura de fusión de la porción de la región 3' de la primera plantilla que recoce al template ADN, y la temperatura del recocido para PCR de los ciclos restante está cercana a la temperatura de fusión de la segunda plantilla completa;

(b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que distingue el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla;

(c) incorporar nucleótidos en el ADN digerido de (b), en donde:

(i) un nucleótido marcado que termina el alargamiento, y es complementario al sitio de interés de un alelo, es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo, y

(ii) un nucleótido complementario al sitio de interés de un alelo diferente es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo diferente, y dicho

nucleótido terminante que es complementario a un nucleótido en la proyección 5' de dicho alelo diferente, es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo diferente;

(d) digerir el ADN de (c) con la enzima de la restricción que distingue el sitio de reconocimiento en la primera plantilla; y

(e) determinar la secuencia de los alelos de un sitio de interés, determinando la secuencia del ADN digerido de (d) conteniendo los nucleótidos marcados.

65. El método de la reivindicación 61, en donde dicho método se usa para determinar la secuencia de un alelo mutante en la presencia de un alelo normal.

66. El método de la reivindicación 65, en donde el alelo mutante y el alelo normal están presentes en una relación seleccionada de entre un grupo consistente de:

1: 1, 1:2, 1:3, 1:4,, 1:6-1:10, 1:11-1:20, 1:21-1:30, 1:31-1:40, 1:41-1:50, 1:51-1:60, 1:61-1:70, 1:71-1:80, 1:81-1:90, 1:91-1:100, 1:101-1:200, 1:250, 1:251-1:300, 1:301-1:400, .01-1:500, 1:501-1:600, 1:601-1:700, 1:701-1:800, 1:801-1:900, 1:901-1:1000, 001-1:2000, 1:2001-1:3000, 1:3001-1:4000, 1:4001-1:5000, 1:5001-1:6000, ;001-1:7000, 1:7001-1:8000, 1:8001-1:9000, 1:9001-1:10,000; 1:10,001; 1:20.000, 1:20.001-1:30.000, 1:30.001-1:40.000, 1:40.001-1:50.000, y superiores a 1 :50.000.

67. El método de la reivindicación 65, en donde dicho alelo mutante proviene de un gen seleccionado de entre un grupo consistente de:BRCA1,

BRCA2, MSH6, MSH2, MLH1, RET, PTEN, ATM, H-RAS, p53, ELAC2, CDH1, APC, AR, PMS2, MLH3, CYP1A1, GSTP1, GSTM1, AXIN2, CYP19, MET, NAT1, CDKN2A, NQO1, *trc8*, *RAD51*, PMS1, *TGFB2*, VHL, MC4R, POMC, NROB2, UCP2, PCSK1, PPARG, ADRB2, UCP3, *glur1*, *cart*, SORBS1, LEP, LEPR, SIM1, *TNF*, IL-6, IL-1, IL-2, IL-3, IL1A, *TAP2*, *THPO*, *THRB*, NBS1, RBM15, LIF, MPL, RUNX1, Her-2, receptor glucocorticoide, receptor estrógeno, receptor tiroide, p21, p7, K-RAS, N-RAS, proteína retinoblastoma, gen Wiskott-Aldrich (*WAS*), Factor V Leiden, Factor II (protrombina), reductasa tetrahidrofolato de metileno, fibrosis quística, receptor LDL, receptor HDL, gen superóxido de dismutasa, y gen SHOX.

WHAT IS CLAIMED IS

1 A method for determining a sequence of a locus of interest, said method comprising

- (a) replicating a region of DNA comprising a locus of interest from a template polynucleotide by using a first and a second primer, wherein the second primer contains a sequence that generates a recognition site for a restriction enzyme such that digestion with the restriction enzyme generates a 5' overhang containing the locus of interest,
- (b) digesting the DNA with the restriction enzyme that recognizes the recognition site generated by the second primer to create a DNA fragment
- (c) incorporating a nucleotide into the digested DNA of (b) by using the 5' overhang containing the locus of interest as a template, and
- (d) determining the sequence of the locus of interest by determining the sequence of the DNA of (c)

2 A method for determining a sequence of a locus of interest, said method comprising

- (a) amplifying a locus of interest on a template DNA using a first and second primers wherein the second primer contains a recognition site for a restriction enzyme such that digestion with the restriction enzyme generates a 5' overhang containing the locus of interest,
- (b) digesting the amplified DNA with the restriction enzyme that recognizes the recognition site on the second primer
- (c) incorporating a nucleotide into the digested DNA of (b) by using the 5' overhang containing the locus of interest as a template, and
- (d) determining the sequence of the locus of interest by determining the sequence of the DNA of (c)

3. The method of claim 2, wherein the template DNA is obtained from a source selected from the group consisting of a bacterium, fungus, virus, protozoan, plant, animal and human.

4. The method of claim 2, wherein the template DNA is obtained from a human source.

5. The method of claim 2, wherein the template DNA is obtained from a sample selected from the group consisting of a cell, tissue, blood, serum, plasma, urine, spinal fluid, lymphatic fluid, semen, vaginal secretion, ascitic fluid, saliva, mucosa secretion, peritoneal fluid, fecal matter, or body exudates.

6. The method of claim 2, wherein the amplification in (a) comprises polymerase chain reaction (PCR).

7. The method of claim 2, wherein the restriction enzyme cuts DNA at the recognition site.

8. The method of claim 7, wherein a 5' region of the second primer does not anneal to the template DNA.

9. The method of claim 7, wherein a 5' region of the first primer does not anneal to the template DNA.

10. The method of claim 7, wherein the restriction enzyme is selected from the group consisting of BsaI, BskI, DdeI, EcoNI, Fnu4HI, and HinfI.

11. The method of claim 2, wherein the restriction enzyme cuts DNA at a distance from the recognition site.

12. The method of claim 11, wherein a 5' region of the second primer does not anneal to the template DNA.
13. The method of claim 11, wherein a 5' region of the first primer does not anneal to the template DNA.
14. The method of claim 12, wherein an annealing length of the 3' region of the second primer is selected from the group consisting of 25-20, 20-15, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, and less than 4 bases.
15. The method of claim 2, wherein an annealing temperature for cycle 1 of PCR is about the melting temperature of the portion of the 3' region of the second primer that anneals to the template DNA.
16. The method of claim 15, wherein an annealing temperature for cycle 2 of PCR is about the melting temperature of the portion of the 3' region of the first primer that anneals to the template DNA.
17. The method of claim 16, wherein an annealing temperature for the remaining cycles of PCR is at about the melting temperature of the entire second primer.
18. The method of claim 2, wherein the 3' end of the second primer is adjacent to the locus of interest.
19. The method of claim 11, wherein the recognition site is for a Type IIS restriction enzyme.
20. The method of claim 19, wherein the Type IIS restriction enzyme is selected from the group consisting of: Alw I, Alw26 I, Bbs I, Bbv I, BceA I,

Bmr I, Bsa I, Bst71 I, BsmA I, BsmB I, BsmF I, BspM I, Ear I, Fau I, Fok I, Hga I, Pfl I, Sap I, SsfNI, and SthI32 I.

21. The method of claim 19, wherein the Type IIS restriction enzyme is BceA I or BsmF I.

22. The method of claim 2, wherein the first primer contains a recognition site for a restriction enzyme that is different from the recognition site for the restriction enzyme on the second primer.

23. The method of claim 22, further comprising digesting the DNA of (c) with a restriction enzyme that recognizes the recognition site on the first primer.

24. The method of claim 2, wherein the first or second primer contains a tag at the 5' terminus.

25. The method of claim 2, wherein the first primer contains a tag at the 5' terminus.

26. The method of claim 27, wherein the tag is used to separate the amplified DNA from the template DNA.

27. The method of claim 26, wherein the tag is used to separate the amplified DNA containing the incorporated nucleotide from the amplified DNA that does not contain the incorporated nucleotide.

28. The method of claim 24, wherein the tag is selected from the group consisting of: radioisotope, fluorescent reporter molecule, chemiluminescent reporter molecule, antibody, antibody fragment, hapten, biotin, derivative of

biotin, photobiotin, iminobiotin, digoxigenin, avidin, enzyme, acridinium, sugar, enzyme, apoenzyme, homopolymeric oligonucleotide, hormone, ferromagnetic moiety, paramagnetic moiety, diamagnetic moiety, phosphorescent moiety, luminescent moiety, electrochemiluminescent moiety, chromatic moiety, moiety having a detectable electron spin resonance, electrical capacitance, dielectric constant or electrical conductivity, and combinations thereof.

29. The method of claim 24, wherein the tag is biotin.

30. The method of claim 29, wherein the biotin tag is used to separate amplified DNA from the template DNA using a streptavidin matrix.

31. The method of claim 30, wherein the streptavidin matrix is coated on wells of a microtiter plate.

32. The method of claim 2, wherein the incorporation of a nucleotide in (c) is by a DNA polymerase selected from the group consisting of E. coli DNA polymerase, Klenow fragment of E. coli DNA polymerase I, T7 DNA polymerase, T4 DNA polymerase, Taq polymerase, Pfu DNA polymerase, Vent DNA polymerase and sequenase.

33. The method of claim 2, wherein the incorporation of a nucleotide in (c) comprises incorporation of a labeled nucleotide.

34. The method of claim 2, wherein the incorporation of a nucleotide in (c) further comprises incorporation of an unlabeled nucleotide.

35. The method of claim 33, wherein the labeled nucleotide is selected from the group consisting of a dideoxynucleotide and deoxynucleotide.

36. The method of claim 33, wherein the labeled nucleotide is labeled with a molecule selected from the group consisting of radioactive molecule, fluorescent molecule, antibody, antibody fragment, hapten, carbohydrate, biotin, derivative of biotin, phosphorescent moiety, luminescent moiety, electrochemiluminescent moiety, chromatic moiety, and moiety having a detectable electron spin resonance, electrical capacitance, dielectric constant or electrical conductivity.

37. The method of claim 33, wherein the labeled nucleotide is labeled with a fluorescent molecule.

38. The method of claim 37, further comprising incorporation of an unlabeled nucleotide.

39. The method of claim 2, wherein the determination of the sequence of the locus of interest in (d) comprises detecting the nucleotide.

40. The method of claim 33, wherein the determination of the sequence of the locus of interest in (d) comprises detecting labeled nucleotide.

41. The method of claim 40, wherein the detection is by a method selected from the group consisting of gel electrophoresis, polyacrylamide gel electrophoresis, fluorescence detection, sequencing, ELISA, mass spectrometry, fluorometry, hybridization, microarray, and Southern Blot.

42. The method of claim 40, wherein the detection method is DNA sequencing.

43. The method of claim 40, wherein the detection method is fluorescence detection.

44. The method of claim 2, wherein the locus of interest is suspected of containing a single nucleotide polymorphism or mutation.

45. The method of claim 2, wherein the method is used for determining sequences of multiple loci of interest concurrently.

46. The method of claim 45, wherein the template DNA comprises multiple loci from a single chromosome.

47. The method of claim 45, wherein the template DNA comprises multiple loci from different chromosomes.

48. The method of claim 45, wherein the loci of interest on template DNA are amplified in one reaction.

49. The method of claim 45, wherein each of the loci of interest on template DNA is amplified in a separate reaction.

50. The method of claim 49, wherein the amplified DNA are pooled together prior to digestion of the amplified DNA.

51. The method of claim 45, wherein each of the labeled DNA in (c) containing a locus of interest is separated prior to (d).

52. The method of claim 45, wherein at least one of the loci of interest is suspected of containing a single nucleotide polymorphism or a mutation.

53. A method for determining a sequence of a locus of interest, said method comprising:

- (a) amplifying a locus of interest on a template DNA using a first and second primers, wherein the second primer contains a portion of a recognition site for a restriction enzyme, wherein a full recognition site for the restriction enzyme is generated upon amplification of the template DNA such that digestion with the restriction enzyme generates a 5' overhang containing the locus of interest;
 - (b) digesting the amplified DNA with the restriction enzyme that recognizes the full recognition site generated by the second primer and the template DNA;
 - (c) incorporating a nucleotide into the digested DNA of (b) by using the 5' overhang containing the locus of interest as a template; and
- determining the sequence of the locus of interest by determining the sequence of the DNA of (c).

54. The method of claim 52, wherein the 3' region of the second primer contains a mismatch with the template DNA.

55. The method of claim 53, wherein the mismatch occurs at the last 1, 2 or 3 bases at the 3' region.

56. A method for determining a sequence of a locus of interest, said method comprising:

- (a) amplifying a locus of interest on a template DNA using a first and second primers, wherein the second primer contains a recognition site for a restriction enzyme that cuts DNA at a distance from the recognition site and digestion with the restriction enzyme generates a 5' overhang containing the locus of interest, and wherein the first primer contains a recognition site for a restriction enzyme that is different from the recognition site for the restriction enzyme on the second primer and contains a tag at the 5' end;
- (b) digesting the amplified DNA with the restriction enzyme that recognizes the recognition site on the second primer;

- (c) incorporating a labeled nucleotide into the digested DNA of (b) by using the 5' overhang containing the locus of interest as a template;
- (d) digesting the DNA of (c) with the restriction enzyme that recognizes the recognition site on the first primer; and
- (e) determining the sequence of the locus of interest by determining the sequence of the digested DNA of (d) containing the labeled nucleotide.

57. A method for determining a sequence of a locus of interest, said method comprising:

- (a) amplifying a locus of interest on a template DNA using a first and second primers, wherein the second primer contains a recognition site for a restriction enzyme that cuts DNA at a distance from the recognition site and digestion with the restriction enzyme generates a 5' overhang containing the locus of interest, wherein the first primer contains a recognition site for a restriction enzyme that is different from the recognition site for the restriction enzyme on the second primer, and contains a tag at the 5' end, and wherein the annealing temperature for cycle 1 of PCR is at about the melting temperature of the portion of the 3' region of the second primer that anneals to the template DNA, the annealing temperature for cycle 2 of PCR is at about the melting temperature of the portions of the 3' region of the first primer that anneals to the template DNA, and the annealing temperature for the remaining cycles is at about the melting temperature of the entire second primer;
- (b) digesting the amplified DNA with the restriction enzyme that recognizes the recognition site on the second primer;
- (c) incorporating a labeled nucleotide into the digested DNA of (b) by using the 5' overhang containing the locus of interest as a template;
- (d) digesting the DNA of (c) with the restriction enzyme that recognizes the recognition site on the first primer; and
- (e) determining the sequence of the locus of interest by determining the sequence of the digested DNA of (d) containing the labeled nucleotide.

58 The method of claim 56, wherein the tag is used to separate the amplified DNA from the template DNA.

59 A kit for use in any of the methods of claims 1 to 58 comprising a set of primers used in the method, wherein the the second primer contains a sequence that generates a recognition site for a restriction enzyme such that digestion with the restriction enzyme generates a 5' overhang containing the locus of interest, and a set of instructions

60 A DNA fragment containing a locus of interest to be sequenced and a recognition site for a restriction enzyme, wherein digestion with the restriction enzyme creates a 5' overhang on the DNA fragment, and wherein the locus of interest and the restriction enzyme recognition site are in relationship to each other such that digestion with the restriction enzyme generates a 5' overhang containing the locus of interest.

61 A method for determining a sequence of alleles of a locus of interest, said method comprising

- (a) amplifying alleles of a locus of interest on a template DNA using a first and second primers, wherein the second primer contains a recognition site for a restriction enzyme such that digestion with the restriction enzyme generates a 5' overhang containing the locus of interest,
- (b) digesting the amplified DNA with the restriction enzyme that recognizes the recognition site on the second primer,
- (c) incorporating nucleotides into the digested DNA of (b), wherein
 - (i) a nucleotide that terminates elongation, and is complementary to the locus of interest of an allele is incorporated into the 5' overhang of said allele and

- (ii) a nucleotide complementary to the locus of interest of a different allele is incorporated into the 5' overhang of said different allele, and said terminating nucleotide, which is complementary to a nucleotide in the 5' overhang of said different allele, is incorporated into the 5' overhang of said different allele,
- (d) determining the sequence of the alleles of a locus of interest by determining the sequence of the DNA of (c)

62 A method for determining a sequence of alleles of a locus of interest, said method comprising

- (a) amplifying a locus of interest on a template DNA using a first and second primers, wherein the second primer contains a portion of a recognition site for a restriction enzyme, wherein a full recognition site for the restriction enzyme is generated upon amplification of the template DNA such that digestion with the restriction enzyme generates a 5' overhang containing the locus of interest,
- (b) digesting the amplified DNA with the restriction enzyme that recognizes the full recognition site generated by the second primer and the template DNA,
- (c) incorporating nucleotides into the digested DNA of (b), wherein
 - (i) a nucleotide that terminates elongation, and is complementary to the locus of interest of an allele, is incorporated into the 5' overhang of said allele, and
 - (ii) a nucleotide complementary to the locus of interest of a different allele is incorporated into the 5' overhang of said different allele, and said terminating nucleotide, which is complementary to a nucleotide in the 5' overhang of said different allele, is incorporated into the 5' overhang of said different allele,determining the sequence of the locus of interest by determining the sequence of the DNA of (c)

63 A method for determining a sequence of alleles of a locus of interest, said method comprising

- (a) amplifying a locus of interest on a template DNA using a first and second primers, wherein the second primer contains a recognition site for a restriction enzyme that cuts DNA at a distance from the recognition site and digestion with the restriction enzyme generates a 5' overhang containing the locus of interest, and wherein the first primer contains a recognition site for a restriction enzyme that is different from the recognition site for the restriction enzyme on the second primer and contains a tag at the 5' end,
- (b) digesting the amplified DNA with the restriction enzyme that recognizes the recognition site on the second primer;
- (c) incorporating nucleotides into the digested DNA of (b), wherein
 - (i) a labeled nucleotide that terminates elongation, and is complementary to the locus of interest of an allele, is incorporated into the 5' overhang of said allele, and
 - (ii) a nucleotide complementary to the locus of interest of a different allele is incorporated into the 5' overhang of said different allele, and said terminating nucleotide, which is complementary to a nucleotide in the 5' overhang of said different allele, is incorporated into the 5' overhang of said different allele,
- (d) digesting the DNA of (c) with the restriction enzyme that recognizes the recognition site on the first primer; and
- (e) determining the sequence of the alleles of a locus of interest by determining the sequence of the digested DNA of (d) containing the labeled nucleotide

64 A method for determining a sequence of alleles of a locus of interest said method comprising

- (a) amplifying a locus of interest on a template DNA using a first and second primers wherein the second primer contains a recognition site for a restriction

enzyme that cuts DNA at a distance from the recognition site and digestion with the restriction enzyme generates a 5' overhang containing the locus of interest, wherein the first primer contains a recognition site for a restriction enzyme that is different from the recognition site for the restriction enzyme on the second primer, and contains a tag at the 5' end, and wherein the annealing temperature for cycle 1 of PCR is at about the melting temperature of the portion of the 3' region of the second primer that anneals to the template DNA, the annealing temperature for cycle 2 of PCR is at about the melting temperature of the portion of the 3' region of the first primer that anneals to the template DNA, and the annealing temperature for the remaining cycles of PCR is at about the melting temperature of the entire second primer;

(b) digesting the amplified DNA with the restriction enzyme that recognizes the recognition site on the second primer;

(c) incorporating nucleotides into the digested DNA of (b), wherein

(i) a labeled nucleotide that terminates elongation, and is complementary to the locus of interest of an allele, is incorporated into the 5' overhang of said allele, and

(ii) a nucleotide complementary to the locus of interest of a different allele is incorporated into the 5' overhang of said different allele, and said terminating nucleotide, which is complementary to a nucleotide in the 5' overhang of said different allele, is incorporated into the 5' overhang of said different allele;

(d) digesting the DNA of (c) with the restriction enzyme that recognizes the recognition site on the first primer; and

(e) determining the sequence of the alleles of a locus of interest by determining the sequence of the digested DNA of (d) containing the labeled nucleotide.

65. The method of claim 61, wherein said method is used for determining the sequence of a mutant allele in the presence of normal allele.

66 The method of claim 65, wherein the mutant allele and normal allele are present in a ratio selected from the group consisting of 1 1, 1 2, 1 3, 1 4, 1 5, 1 6-1 10, 1 11-1 20, 1 21-1 30, 1 31-1 40, 1 41-1 50, 1 51-1 60, 1 61-1 70, 1 71-1 80, 1 81-1 90, 1 91 1 100, 1 101-1 200, 1 250, 1 251-1 300, 1 301-1 400, 1 401-1 500, 1 501-1 600, 1 601-1 700, 1 701-1 800, 1 801-1 900, 1 901-1 1000, 1 1001-1 2000, 1 2001-1 3000, 1 3001-1 4000, 1 4001-1 5000, 1 5001-1 6000, 1 6001-1 7000, 1 7001 1 8000, 1 8001-1 9000, 1 9001-1 10,000, 1 10,001-1 20,000, 1 20 001 1 30,000, 1 30,001-1 40,000, 1 40,001-1 50 000, and greater than 1 50,000

67 The method of claim 65, wherein said mutant allele is of a gene selected from the group consisting of BRCA1, BRCA2, MSH6, MSH2, MLH1, RET PTEN, ATM, H RAS p53, ELAC2, CDH1, APC, AR, PMS2, MLH3, CYP1A1 GSTP1, GSTM1 AXIN2, CYP19 MET NAT1, CDKN2A, NQO1 trc8 RAD51, PMS1, TGFBR2 VHL, MC4R, POMC, NROB2, UCP2, PCSK1, PPARG ADRB2, UCP3, glur1, cart, SORBS1, LEP, LEPR, SIM1, TNF, IL-6, IL-1, IL-2, IL-3, IL1A, TAP2, THPO, THRB NBS1, RBM15 LIF, MPL, RUNX1, Her-2, glucocorticoid receptor estrogen receptor, thyroid receptor, p21 p27, K-RAS, N-RAS, retinoblastoma protein, Wiskott Aldrich (WAS) gene Factor V Leiden, Factor II (prothrombin), methylene tetrahydrofolate reductase, cystic fibrosis, LDL receptor, HDL receptor, superoxide dismutase gene, and SHOX gene.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

ERIC H WITT
MORRISON & FORERSTER LLP
755 PAGE MILL ROAD
PALO ALTO CALIFORNIA 94304

RECEIVED

NOV 03 2003

Morrison & Forerster LLP
Palo Alto

NOTIFICATION OF RECEIPT
OF DEMAND BY COMPETENT INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

(PCT Rules 59.3(e) and 61.1(b) first sentence
and Administrative Instructions, Section 601(a))

Date of mailing
(day/month/year)

30 OCT 2003

Applicant's or agent's file reference

543312000340

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No

PCT/US03/08378

International filing date (day/month/year)

28 Feb 2003

Priority date (day/month/year)

01 Mar 2002

Applicant

DHALLAN RAVINDER S

- 1 The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority considers the following date as the date of receipt of the demand for international preliminary examination of the international application.

01 Oct 2003

- 2 That date of receipt is

- ☒ the actual date of receipt of the demand by this Authority (Rule 61.1(b)).
☐ the actual date of receipt of the demand on behalf of this Authority (Rule 59.3(e)).
☐ the date on which this Authority has, in response to the invitation to correct defects in the demand (Form PCT/IPEA/404), received the required corrections.

- 3 ☐ **ATTENTION** That date of receipt is **AFTER** the expiration of 19 months from the priority date. Consequently the election(s) made in the demand does (do) not have the effect of postponing the entry into the national phase until 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)). Therefore, the acts for entry into the national phase must be performed within 20 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 22). For details, see the PCT Applicant's Guide, Volume II

- ☐ (If applicable) This notification confirms the information given by telephone, facsimile transmission or in person on.

- 4 Only where paragraph 3 applies, a copy of this notification has been sent to the International Bureau

Name and mailing address of the IPEA/
Mail Stop PCT Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 703-305-3230

Form PCT/IPEA/402 (July 1998)

Authorized officer

Jeryl McDowell

Telephone No. 703-305-3639

DOCKETED

② 3

49

ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES

En ejercicio del derecho conferido por el Artículo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito informar a ese Despacho que el capítulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente Invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

ANÁLISIS RÁPIDO DE VARIACIONES EN UN GENOMA

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La invención proporciona un método útil para determinar la secuencia de un gran número de sitios de interés en cromosomas sencillos o múltiples. El método emplea un oligonucleotido plantilla que contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, tal que la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés. La proyección 5' es usada como un template para incorporar nucleótidos, los cuales pueden ser detectados. El método es especialmente favorable para el análisis de grandes números de secuencias, tal como polimorfismos de nucleótidos sencillos, de una muestra de ácido nucléico.

ANÁLISIS RÁPIDO DE VARIACIONES EN UN GENOMA

REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS

[0001] Esta aplicación reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente U.S. No. 10/093.618, registrada el 1 de marzo del año 2002, y las Solicitudes provisionales de Patente Nos. 60/360.232 y 60/378.354, registradas el 1, de marzo del año 2002, y el 8 de mayo del año 2002, respectivamente.

El contenido de estas solicitudes está por la presente aquí íntegramente incorporado, para referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

AREA DE LA INVENCION

[0002] La invención presente se enfoca a un método rápido para determinar la secuencia del ácido nucleico. El método es especialmente útil para el proceso de genotipo, y para la detección de uno, de diez, de cientos, de miles, de polimorfismos de nucleótidos sencillos (SNPs) o mutaciones en cromosomas sencillos o múltiples, y para la detección de anomalías cromosómicas, tal como truncamientos, transversiones, trisomías, y monosomías.

ANTECEDENTES

[0003] La variación de secuencia entre los individuos comprende un continuo desde las mutaciones de enfermedades fatales hasta polimorfismos neutros. Hay más de tres mil enfermedades genéticas actualmente conocidas

incluyendo la Distrofia Muscular Duchenne, la Enfermedad de Alzheimer, la Fibrosis Quística, y la Enfermedad de Huntington (D.N. Cooper y M. Krawczak, "Human Genome Mutations", BIOS Científic Publishers, Oxford (1993)) También, las secuencias particulares de ADN pueden predisponer a los individuos a una variedad de enfermedades como la obesidad, arteriosclerosis, y a varios tipos de cáncer, incluso del seno, la próstata, y el colon. Además, anomalías cromosómicas, como la trisomía 21 la cual resulta en el Síndrome de Down, trisomy 18, que resulta en el Síndrome de Edward, trisomía 13, la cual resulta en el Síndrome de Patau, monosomía X, la cual produce el Síndrome de Turner y otras aneuploidias sexuales, que se responsabilizan de una porción significativa de los defectos genéticos en los seres humanos recién nacidos.

El conocimiento de las mutaciones genéticas, anomalías cromosómicas, y variaciones en las secuencias del gen, tales como los polimorfismos de nucleótidos sencillos (SNPs), ayudará a entender, diagnosticar, prevenir, y tratar enfermedades.

[0004] Muy frecuentemente, la variación de la secuencia se observa en las diferencias longitudinales de elementos de secuencias repetidas, tales como minisatélites y microsatélites, como pequeñas inserciones o eliminaciones, y como sustituciones de bases individuales. Los polimorfismos de nucleótidos sencillos (SNPs) representan la forma más común de variación de secuencia; se ha estimado que tres millones de SNPs comunes con una frecuencia de población de más del 5% están presentes en el genoma humano. Pequeñas eliminaciones o inserciones que normalmente causan desfase de mutaciones, ocurren en promedio, una vez en cada 12 kilobases de ADN genómico (Wang,

D.G. *et al.*, *Science* 280: 1077-1082 (1998)). Un mapa genético que utiliza estos polimorfismos está desarrollándose como guía (<http://research.marshfieldclinic.org/genetics/>; dirección de internet a partir del 10 de enero del 2002).

[0005] La secuencia ácido nucleica del genoma humano se publicó en febrero, 2001, y proporciona un mapa genético de resolución sin precedentes, la cual contiene varios cientos de miles de marcadores de SNP, y una riqueza potencial de información sobre enfermedades humanas (Venter *et al.*, *Science* 291: 13 04-13 51 (2001); Consorcio International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* 409:860-921 (2001)). Sin embargo, la longitud del ADN contenido dentro de los cromosomas humanos totaliza sobre 3 mil millones de pares de bases, de manera que secuenciar el genoma de cada individuo es impráctico. Así, que es indispensable desarrollar métodos de alto rendimiento para determinar rápidamente la presencia de variantes alélicas de SNPs y puntos de mutaciones que predisponen o causan fenotipos de enfermedades. También se necesitan métodos eficaces para caracterizar polimorfismos funcionales que afectan la fisiología, la sicología, la audiolología, la oftalmología, la neurología, la respuesta a las medicinas, el metabolismo de la medicina, y las interacciones de la misma.

[0006]. Se usan ampliamente varias técnicas para analizar y detectar las variaciones genéticas, tales como la secuencia del ADN, la restricción de longitud de fragmento de polimorfismos (RFLP), ensayos de hibridación de ADN, incluso microformaciones ADN y análisis peptido de ácido nucléico, y la Prueba de Truncamiento de Proteína (PPT); todos los cuales tienen limitaciones. Aunque la secuenciación de ADN es el método más definitivo,

también es, la mayor parte del tiempo, demorado y costoso. A menudo, se analiza la secuencia codificadora entera de un gen aunque sólo un fragmento pequeño de la secuencia codificadora es de interés. En la mayoría de los casos, un número limitado de mutaciones en cualquier gen particular es responsable por la mayoría de fenotipos de la enfermedad.

[0007] Por ejemplo, el gen regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) está compuesto de 24 exones que se extienden sobre más de 250.000 pares de base (Rommens et al., Science 245:1059-1065 (1989); Riordan et al., Science 245:1066-73 (1989)). Actualmente, existen aproximadamente 200 mutaciones en el gen CFTR que están asociados con un estado de la enfermedad de Fibrosis Quística. Por consiguiente, sólo un porcentaje muy pequeño del marco de lectura para el gen CFTR, necesita ser analizado. Además, un total de 10 mutaciones constituye 75.1% de todos los casos conocidos de la enfermedad. La eliminación de un solo residuo de fenilalanina, F508, es responsable por el 66% de los casos de Fibrosis Quística en personas de origen Caucásico.

[0008] Las técnicas de hibridación, incluyendo la absorción de Suthern, Absorción de Ranura, Absorción de Punto, y micro conjuntos de ADN, son normalmente utilizados para detectar las variaciones genéticas (Molecular Clonning, Manual de Laboratorio Cold Spring Harbor Laboratory Press, Tercera Edición (2001). En un ensayo típico de hibridación, una secuencia desconocida del nucleótido ("el objetivo") se analiza con base en su afinidad por otro fragmento con una secuencia conocida del nucleótido ("la prueba"). Si los dos fragmentos hibridizan bajo "condiciones severas", se cree que las secuencias

son complementarias, y la secuencia del fragmento objetivo puede inferirse de la secuencia "la prueba".

[0009] Sin embargo, los resultados de un ensayo típico de hibridación son a menudo difíciles de interpretar. La ausencia o presencia de un signo de hibridación es dependiente de la definición de "condiciones severas". Puede usarse cualquier número de variables para aumentar o disminuir las condiciones de severidad, tales como la concentración salina, la presencia o ausencia de fragmentos de nucleótido competidor, el número de lavados realizados para remover la ligazón no-específica, y el tiempo y temperatura a las cuales se realizan las hibridaciones. Normalmente, las condiciones de hibridación deben ser optimizadas para cada fragmento nucleótido "objetivo" lo cual consume tiempo y es incoherente con un método de rendimiento alto. Un grado alto de variabilidad se observa a menudo en los ensayos de hibridación, así como también una proporción alta de positivos falsos. Típicamente, los ensayos de hibridación funcionan como un filtro para los probables candidatos, pero una confirmación positiva requiere el análisis de secuenciación ADN.

[0010] Varias técnicas para la detección de mutaciones han evolucionado con base en el principio del análisis de la hibridación. Por ejemplo, en el ensayo de extensión de la plantilla, la región que comprende el nucleótido de interés de ADN se amplifica mediante PCR, o cualquier otra técnica de amplificación conveniente. Después de la amplificación, una plantilla se hace híbrido a una secuencia del ácido nucleico objetivo, en el cual el último nucleótido del terminal 3' de la plantilla recocce inmediatamente a 5' a la posición del nucleótido en la secuencia objetivo que será analizada. La plantilla recocida es

extendida por un nucleótido trifosfato sencillo, marcado. El nucleótido incorporado es entonces detectado.

[0011] Existen varias limitaciones al ensayo de extensión de la plantilla. Primero, la región de interés debe ser amplificada antes de la extensión de la plantilla, lo cual aumenta el tiempo y costo del ensayo. Segundo, las plantillas de PCR y las dNTPs deben ser completamente removidas antes de la extensión de la plantilla, y los contaminantes residuales pueden interferir con los análisis apropiados de los resultados. Tercero, y el más restrictivo aspecto del ensayo, es que la plantilla es hibridizada al template de ADN lo cual requiere optimización de condiciones para cada plantilla y para cada secuencia que se analiza. Los ensayos de hibridación tienen un grado bajo de reproductibilidad, y un alto grado de ninguna especificidad.

[0012] El ensayo de afinidad del Acido Péptido Nucléico (PNA) es un derivado de ensayos de hibridación tradicional (Nielsen et al., Science 254:1497-1500 (1991); Egholm et al., J. Am. Chem. Soc. 114:1895-1897 (1992); James et al., Protein Science 3:1347-1350 (1994)). Los PNAs son remedos estructurales de ADN que siguen las normas de apareamiento de bases de Watson-Crick, y se usan en los ensayos normales de hibridación ADN. Los PNAs despliegan una especificidad mayor en los ensayos de hibridación debido a que una desigualdad de PNA/DNA es más desestabilizante que una desigualdad de DNA/DNA y los filamentos PNA/DNA forman enlaces más fuertes que filamentos los DNA/DNA complementarios.

Sin embargo, el análisis genético que todavía usa PNAs requiere un paso de hibridación laborioso, y como tal, está sujeto a un alto grado de ninguna especificidad y dificultad con la reproductibilidad.

[0013] Recientemente, se han desarrollado micro conjuntos de ADN para detectar variaciones genéticas y polimorfismos (Taton et al., *Science* 289:1757-60, 2000; Lockhart et al., *Nature* 405:827-836 (2000); Gerhold et al., *Trends in Biochemical Sciences* 24:168-73 (1999); Wallace, R.W., *Molecular Medicine Today* 3:384-89 (1997); Blanchard and Hood, *Nature Biotechnology* 149:1649 (1996)). Los microformaciones de ADN son fabricados por la robótica de gran velocidad, en substratas de vidrio o nylon, y contienen los fragmentos de ADN con identidades conocidas ("la prueba"). Los microformaciones se usan por emparejar fragmentos ADN conocidos y desconocidos ("el objetivo") con base en las reglas tradicionales de base-pareamiento. La ventaja de los microformaciones de ADN es que un chip de memoria puede proporcionar información simultáneamente sobre miles de genes. Sin embargo, los microformaciones de ADN todavía se basan en el principio de hibridación, y como tal, están sujetos a las desventajas discutidas anteriormente.

[0014] La Prueba de Truncamiento de Proteína (PTT) también es normalmente utilizada para detectar polimorfismos genéticos (Roest et al., *Human Molecular Genetics* 2:1719-1721, (1993); Van Der Luit et al., *Genomics* 20:1-4 (1994); Hogervorst et al., *Nature Genetics* 10: 208-212 (1995)). Típicamente, en la PTT, el gen de interés es amplificado de PCR, sujeto a transcripción/traducción in vitro, purificado, y analizado mediante electroforesis de gel poliacrilamido. La PTT es útil para revisar grandes porciones de secuencias de codificar y para detectar mutaciones que producen codones de detención, lo que disminuye significativamente el tamaño de la proteína esperada. Sin embargo, la PTT no

se diseña para detectar mutaciones que no alteran significativamente el tamaño de la proteína.

[0015] De manera, que todavía existe la necesidad de un método rápido para analizar ADN, sobre todo ADN genómico sospechoso de portar uno o más polimorfismos o mutaciones de nucleótidos sencillos.

RESUMEN BREVE DE LA INVENCION

[0016] La invención se refiere a un método para determinar una secuencia de una región de interés seleccionada, el método comprende,: (a) amplificar una región seleccionada en un template ADN utilizando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, de una manera tal que la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' la que contiene la región de interés seleccionada; (b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción la que reconoce el sitio del reconocimiento en la segunda plantilla; (c) incorporar un nucleótido en el ADN digerido de (b) mediante el uso de la proyección 5' que contiene la región seleccionada de interés como un template; y (d) determinar la secuencia de la región seleccionada mediante la determinación de la secuencia del ADN de (c).

[0017] La invención también se refiere a un método para determinar una secuencia de una región de interés seleccionada, dicho método comprende: (a) amplificar un sitio de interés seleccionada en un template ADN utilizando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene una porción de un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, en donde tras la amplificación del template ADN se genera un sitio de reconocimiento

pleno para la enzima de restricción, de manera que tal digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés; (b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio del reconocimiento pleno generado por la segunda plantilla y el template ADN; (c) incorporar un nucleótido en el ADN digerido de (b) usando la proyección 5' que contiene el sitio seleccionado de interés como un template; y determinar la secuencia del sitio seleccionado de interés mediante la determinación de la secuencia del ADN de (c).

[0018] la invención también se enfoca a un método para determinar una secuencia de un sitio seleccionado de interés, dicho método comprende: (a) reproducir una región de ADN que comprende un sitio seleccionado de interés de un template de polinucleótido utilizando una primera y una segunda plantilla, en donde la segunda plantilla contiene una secuencia que genera un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, de tal manera que esa digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés; (b) digerir la ADN con la enzima de restricción que reconoce el sitio del reconocimiento generado por la segunda plantilla, para crear un fragmento de ADN; (c) incorporando un nucleótido dentro del ADN digerido de (b) usando la proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template; y (d) determinar la secuencia del sitio de interés determinando la secuencia del ADN de (c).

[0019] La invención también se refiere a un fragmento de ADN que contiene un sitio de interés a ser secuenciado y un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, en donde la digestión con la enzima de restricción crea una proyección 5' en el fragmento de ADN, y en donde el sitio seleccionado de

interés y el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción están en relación entre sí de modo que la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés.

[0020] El template ADN puede obtenerse de cualquier fuente, incluyendo el ácido nucleico sintético, preferentemente de una bacteria, hongo, virus, planta, protozoo, fuente animal o humana. En una incorporación, el template ADN se obtiene de una fuente humana. En otra incorporación, el template de ADN se obtiene de una célula, tejido, muestra de sangre, muestra de suero, muestra de plasma, muestra de orina, fluido linfático, fluido espinal, semen, secreción vaginal, fluido ascítico, saliva, secreción de mucosa, fluido peritoneal, materia fecal o exudados corporales.

[0021] La región 3' de la primera y/o segunda plantilla puede contener una desigualdad con el template ADN. La desigualdad puede ocurrir pero no está limitada a las últimas 1,2, o 3 bases en el terminal 3'.

[0022] La enzima de restricción usada en la invención puede fragmentar ADN en el sitio de reconocimiento. La enzima de restricción puede ser pero no está limitada a Pfl I, Sau96 I, ScrF I, BsaJ I, Bssk I, Dde I, EcoN I, Fnu4H I, Hinf I, o Tth11 I.

Alternativamente, la enzima de restricción usada en la invención puede fragmentar ADN a una distancia de su sitio de reconocimiento.

[0023] En otra incorporación, la primera plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción. En una incorporación preferida, el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción es diferente del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción en la segunda plantilla. La invención

incluye digerir el ADN amplificado con una enzima de restricción que distingue el sitio de reconocimiento en la primera plantilla.

[0024] Preferentemente, el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla es para una enzima de restricción que fragmenta ADN a una distancia de su sitio de reconocimiento y genera una proyección 5', conteniendo el sitio seleccionado de interés. En una incorporación preferida, el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla es para una enzima de restricción Tipo IIS. La enzima de restricción Tipo IIS por ejemplo se selecciona del grupo que consta de: Alw I, Alw26 I, Bbs I, Bbv I, BceA I, Bmr I, Bsa I, Bst71 I, BsmA I, BsmB I, BsmF I, BspM I, Ear I, Fau I, Fok I, Hga I, Ple I, Sap I, SSfaN I, y SthI32 I, y preferentemente BceA I y BsmF I.

[0025] En una incorporación, la región 5' de la segunda plantilla no recoca al template ADN y/o la región 5' de la primera plantilla no recoca al template ADN. La longitud de recocido de la región 3' de la primera o segunda plantilla puede ser 25-20, 20-15, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, o inferior a 4 bases.

[0026] En una incorporación, la amplificación puede comprender la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En una incorporación posterior, la temperatura del recocido durante el ciclo 1 de la PCR puede estar alrededor de la temperatura de fusión de la región 3' de la segunda plantilla que recoca al template ADN. En otra incorporación, la temperatura del recocido durante el ciclo 2 de la PCR puede estar cercana a la temperatura de fusión de la región 3' de la primera plantilla que recoca al template ADN. En otra incorporación, la temperatura del recocido durante los ciclos restantes puede estar cercana a la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla.

[0027] En una incorporación, el terminal 3' de la segunda plantilla es adyacente al sitio de interés seleccionado.

[0028] La primera y/o segunda plantilla puede contener un marcador en el terminal 5'.

Preferentemente, la primer plantilla contiene una marcador en el terminal 5'. El marcador puede usarse para separar el ADN amplificado del template ADN. El marcador puede usarse para separar el ADN amplificado que contiene el nucleótido marcado del ADN amplificado que no contiene el nucleótido marcado. El marcador puede ser pero no está limitado a un radioisótopo, molécula reportera fluorescente, molécula reportera químluminsicente, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, hapteno, biotina, derivado de biotina, fotobiotina, iminobiotina, digoxigenina, avidina, enzima, acridinio, azúcar, enzima, apoenzima, oligonucleótido homopolimérico, hormona, mitad ferromagnética, mitad paramagnetica, mitad diamagnetica, mitad fosforescente, mitad luminiscente, mitad electroquímluminiscente, mitad cromática, mitad que contiene una resonancia perceptible de giro de electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica o conductibilidad eléctrica, o combinaciones de ellos. Preferentemente, el marcador es la biotina. El marcador de biotina se usa para separar ADN amplificado del template ADN usando una matriz estreptavidina. La matriz estreptavidina es recubierta sobre los pozos de una placa de microtitulación.

[0029] La incorporación de un nucleótido en el método de la invención es mediante una polimerasa de ADN que incluyen pero no se limita a polimerasa ADN *E. coli* , fragmento Klenow de polimerasa ADN I *E. coli.*, polimerasa ADN T5, polimerasa ADN T7, polimerasa ADN T 4, polimerasa Taq, polimerasa ADN

Pfu, polimerasa ADN Vent, bacteriófago 29, polimerasa ADN REDTaq™ Genómica, y sequenase.

[0030] La incorporación de un nucleótido puede comprender además el uso de una mezcla de nucleótidos marcados y sin marcar. Se pueden incorporar: un nucleótido, dos nucleótidos, tres nucleótidos, cuatro nucleótidos, cinco nucleótidos, o más de cinco. Puede incorporarse una combinación de nucleótidos marcados y sin marcar. Los nucleótidos marcados pueden ser pero no se limitan a un trifosfato dideoxynucleótido y trifosfato deoxynucleótido. Los nucleótido no marcados pueden ser pero se limitan a un trifosfato dideoxynucleótido y trifosfato deoxynucleótido. El nucleótido marcado se marca con una molécula; tal como, pero no limitado a una molécula radiactiva, molécula fluorescente, anticuerpo, fragmento del anticuerpo, hapteno, hidrato de carbono, biotina, y derivado de biotina, mitad fosforescente, mitad luminiscente, mitad electro-químico-luminiscente, mitad cromática, o mitad que contenga una resonancia perceptible de giro de electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica o conductibilidad eléctrica. Preferentemente, el nucleótido marcado se marca con una molécula fluorescente. La incorporación de un nucleótido marcado fluorescente además incluye el uso de una mezcla de nucleótidos fluorescentes y no marcados.

[0031] En una incorporación, la determinación de la secuencia del sitio de interés comprende la detección del nucleótido incorporado. En una incorporación, la detección es por un método como tal pero no limitado a electrofóresis gel, electrofóresis capilar, electrofóresis microcanal, electrofóresis gel poliacrilamido, detección fluorescente, secuenciación, ELISA, espectrometría de masa, tiempo de espectrometría de masa de vuelo,

espectrometría de masa cuadrupolo, espectrometría de masa de sector magnético, espectrometría de masa de sector eléctrico, fluorometría, espectrometría infrarroja, espectrometría ultravioleta, amperometría potenciométrica, hibridación, tal como el Secado del sur, o microconjunto. En una incorporación preferida, la detección es mediante la detección por fluorescencia.

[0032] En una incorporación preferida, el sitio de interés es sospechoso de contener un polimorfismo de nucleótido sencillo o mutación. El método puede usarse para determinar sucesiones de sitios múltiples de interés concurrentemente. El template ADN puede comprender sitios múltiples de un solo cromosoma. El template ADN puede comprender sitios múltiples de cromosomas diferentes. Los sitios de interés en el template ADN pueden amplificarse en una reacción. Alternativamente, cada uno de los sitios de interés en el template ADN puede amplificarse en una reacción separada. El ADN amplificado puede agruparse antes de la digestión del ADN amplificado. Cada ADN marcado que contiene un sitio de interés puede separarse antes de determinar la secuencia del sitio seleccionado de interés. En una incorporación, por lo menos uno de los sitios de interés es sospechoso de contener un polimorfismo de nucleótido sencillo o una mutación.

[0033] En otra incorporación, el método de la invención puede usarse para determinar las secuencias de sitios múltiples de interés de un solo individuo o de múltiples individuos. También, el método de la invención puede usarse para determinar la secuencia de un solo sitio de interés de múltiples individuos.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[0034] FIG. 1A. Un diagrama esquemático que representa una molécula ADN de doble cadena. Un par de plantillas, pintadas como flechas inclinadas, flancos del área seleccionada de interés, representado como un símbolo triangular en la base N14. El sitio seleccionado de interés puede ser un polimorfismo de nucleótido sencillo, punto de mutación, inserción, eliminación, translocation, etc. Cada plantilla contiene un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción aproximadamente 10 bp del terminal de los 5', terminal registrado como la región "a" en la primera plantilla y como la región "d" en la segunda plantilla. El sitio de reconocimiento de restricción "a" puede ser para cualquier tipo de enzima de restricción, pero el sitio de reconocimiento "d" es para una enzima de restricción que fragmenta "n" nucleótidos fuera de su sitio de reconocimiento y permite una proyección 5' y una suspensión 3' al final. Ejemplos de tales enzimas incluyen pero no se limitan a BceA I y BsmF I. La proyección 5' sirve como un template para la incorporación de un nucleótido en el final de la suspensión 3'.

[0035] La primera plantilla se muestra modificada con la biotina en el terminal 5' para ayudar en la purificación. La secuencia del terminal 3' de las plantillas es tal que las plantillas recocen a una distancia deseada anterior y posterior al sitio seleccionado de interés. La segunda plantilla recoce cerca del sitio seleccionado de interés; el sitio del recocido que se señala como la región "c", se diseña tal que el terminal 3' de la segunda plantilla recoce una base fuera del sitio seleccionado de interés. La segunda plantilla puede reconocer cualquier distancia del sitio seleccionado de interés, con tal que la digestión con la

enzima de restricción que reconoce la región "d" en este plantilla genere una proyección 5' que contiene el sitio seleccionado de interés.

[0036] El sitio de recocido de la primera plantilla, que se exhibe como la región "b", es de aproximadamente 20 bases.

[0037] FIG 1B. Un diagrama esquemático que muestra los pasos del recocido y la extensión del primer ciclo de amplificación por la PCR. El primer ciclo de amplificación se ha realizado alrededor de la temperatura de fusión de la región 3', la cual recoce al template ADN, de la segunda plantilla, registrada como la región "c", y en este ejemplo es 13 pares de bases. A esta temperatura, ambos: las primeras y segundas plantillas recocen a sus respectivas cadenas complementarias y empieza la extensión, señalada por las líneas punteadas. En este primer ciclo, la segunda plantilla se extiende y copia la región b donde la primera plantilla puede recocer en el próximo ciclo.

[0038] FIG. 1C. Un diagrama esquemático que muestra los pasos de recocido y extensión posteriores a la desnaturalización en el segundo ciclo de amplificación de PCR. El segundo ciclo de amplificación es realizado a una temperatura de recocido superior (TM2) que está sobre el punto de fusión de los 20 bp de la región 3' de la primera plantilla que recoce el template ADN, mostrado como la región "b". Por consiguiente a TM2, la primera plantilla que es complementaria a la región b puede enlazar al ADN que se copió en el primer ciclo de la reacción. Sin embargo, a TM2 la segunda plantilla no puede recocer al template original ADN o al ADN que se copió en el primer ciclo de la reacción porque la temperatura del recocido es demasiado alta. La segunda plantilla puede recocer a 13 bases en el template original de ADN pero TM2 es calculado alrededor de la temperatura de fusión de 20 bases.

[0039] FIG. 1D. Un diagrama esquemático que muestra las reacciones de recocido y extensión después de la desnaturalización durante el tercer ciclo de amplificación. En este ciclo la temperatura del recocido, TM3, está sobre la temperatura de fusión de la segunda plantilla entera, incluso las regiones "c" y "d". La longitud de las regiones "c" + "d" es aproximadamente 27-33 bp de longitud, y así TM3 es significativamente más alto que TM1 y TM2. A este TM más alto, la segunda plantilla, que contiene las regiones c y d recoce al ADN copiado generado en el ciclo 2.

FIG 1E. Un diagrama esquemático que muestra las reacciones de recocido y extensión durante los ciclos restantes de amplificación. La temperatura del recocido durante los ciclos restantes es TM3, la cual está sobre la temperatura de fusión de la segunda plantilla completa. A TM3, la segunda plantilla enlaza a los templates que contienen las regiones c' y d' y la primera plantilla enlaza a los templates que contienen las regiones a' y b. Elevando sucesivamente la temperatura del recocido en cada ciclo durante los primeros tres ciclos de TM1 a TM2 a TM3, la amplificación no específica es significativamente reducida.

[0041] FIG. 1F. Un diagrama esquemático que muestra el sitio de interés amplificado seleccionado ligado a una matriz sólida.

[0042] FIG. 1G. Un diagrama esquemático que exhibe el ADN ligado, amplificado, después de la digestión con una enzima de restricción que reconoce "d" El terminal descendente es liberado en el sobrenadante, y puede removerse lavando con cualquier búfer apropiado. El terminal ascendente que contiene el sitio de interés seleccionado permanece ligado a la matriz sólida.

[0043] FIG. 1H. Un diagrama esquemático que muestra el ADN ligado, amplificado, después de "rellenar" con un ddNTP marcado. Una polimerasa

ADN se usa para "rellenar" la base (N'_{14}) que es complementaria al sitio de interés seleccionado (N_{14}). En este ejemplo, sólo los ddNTPs están presentes en esta reacción, de tal manera que sólo el sitio de interés seleccionado o SNP de interés está relleno.

[0044] FIG. 11. Un diagrama esquemático que muestra ADN marcado, ligado, después de la digestión con la enzima de restricción "a." El ADN marcado se libera dentro del sobrenadante que puede coleccionarse para identificar la base que estaba incorporada.

[0045] FIG. 2. Diagrama esquemático que muestra los templates ADN de doble cadena con "N" números de áreas de interés y "n" números de pares de plantilla, x_1, x_1 a x_n, y_n , específicamente recocido de modo tal que una plantilla flanquea cada sitio de interés. Las primeras plantillas están biotinilados en el terminal 5', señalados con *, y contienen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción, "a" que se reconoce mediante cualquier tipo de enzima de restricción. Las segundas plantillas contienen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción "d", donde "d" es un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que fragmenta ADN a una distancia de su sitio de reconocimiento, y genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés seleccionado y un terminal suspendido 3'. Las segundas plantillas adyacentes recocen los sitios respectivos de interés seleccionados. La posición exacta del sitio de la enzima de restricción "d" en las segundas plantillas se diseña de modo tal que digiriendo el producto de la PCR de cada sitio de interés seleccionado, con la enzima de restricción "d", genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés y un terminal de receso 3'. Los sitios de recocido de las primeras plantillas son aproximadamente 20 bases de longitud y se

seleccionan de tal manera que cada sucesivo primera plantilla está más adelante, lejos de su respectiva segunda plantilla. Por ejemplo, si el sitio 1 de los terminales 3' de las primeras y segundas plantillas están Z par de bases aparte, entonces el sitio 2, de los terminales 3' las primeras y segundas plantillas están $Z + K$ par de bases aparte, dónde $K = 1, 2, 3$ o más de tres bases. Las plantillas para el sitio N son $Z_{n-1} + K$ par de bases aparte. El propósito de hacer cada sucesiva primera plantilla más aparte de sus respectivas segundas plantillas es tal que los fragmentos de restricción de "relleno" (generado después de la amplificación, purificación, digestión y marcado, como se describió en las figuras 1B-1I) difiera en tamaño y pueda resolverse, por ejemplo por electroforesis, para permitir la detección de cada sitio individual de interés.

[0046] FIG. 3. La amplificación de PCR de fragmentos de ADN que contienen SNPs que usan múltiples temperaturas de recocido. Se analizó una muestra que contiene plantillas genómicas de ADN procedentes de treinta y seis voluntarios humanos para los siguientes cuatro SNPs: SNP HC21S00340 (línea 1), número de identificación según asignación en la Base de datos cSNP Human Chromosome 21, localizada en cromosoma 21; SNP TSC 0095512 (línea 2), localizado en cromosoma 1; SNP TSC 0214366 (línea 3), localizado en cromosoma 1; y SNP TSC 0087315 (línea 4), localizado en cromosoma 1. Cada fragmento ADN conteniendo un SNP se amplificó mediante PCR utilizando tres protocolos diferentes de temperatura de recocido; en el presente documento denominado como: temperatura de recocimiento de baja severidad, temperatura de recocimiento de mediana severidad, y temperatura de recocimiento de alta severidad. Sin tener en cuenta el protocolo de temperatura

de recocido, cada fragmento de ADN conteniendo un SNP se amplificó durante 40 ciclos de PCR. El paso de desnaturalización para cada reacción de PCR se realizó durante 30 segundos a 95°C.

[0047] FIG. 3A. La fotografía de un gel que demuestra la amplificación de PCR de 4 fragmentos ADN conteniendo diferentes SNPs que usa el protocolo de temperatura de recocido de baja severidad.

[0048] FIG. 3B. La fotografía de una gel que demuestra la amplificación de PCR de 4 fragmentos ADN conteniendo diferentes SNPs que usa el protocolo de temperatura de recocido de mediana severidad.

[0049] FIG. 3C. La fotografía de una gel que demuestra la amplificación PCR de 4 fragmentos ADN conteniendo diferentes SNPs que usa el protocolo de temperatura de recocido de alta severidad.

[0050] FIG. 4A. Una muestra de la secuencia de ADN del SNP HC21S00027 (SEQ ID NOS:27 & 28), asignado por la base de datos de Human Chromosome 21 cSNP, localizado en el cromosoma 21. Una primera plantilla (SEQ ID NO:17) y una segunda plantilla (SEQ ID NO:18) fueron indicados anteriormente y más adelante, respectivamente, la secuencia de HC21S00027. La primera plantilla es biotinilada y contiene el sitio reconocimiento de la enzima de restricción para EcoRI. La segunda plantilla contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BsmF I y contiene 13 bases que recocen a la secuencia ADN. El SNP se indica por R (A/G) y r (T/C); complementario a R).

[0051] FIG.4B. Una representación de la secuencia ADN de SNP HC21S00027 (SEQ ID NOS:27 & 28), según lo asignado por la base de datos Human Chromosome 21 cSNP, localizada en cromosoma 21. Una primera plantilla (SEQ ID NO: 17) y una segunda plantilla (SEQ ID NO: 19) se indican anterior y

posteriormente, respectivamente, la secuencia of HC21 S00027. La primera plantilla es biotinilada y contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para EcoRI. La segunda plantilla contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BceA I y tiene 13 bases que reconocen a la secuencia ADN. El SNP se indica por R (A/G) y r (T/C; complementario a R).

[0052] FIG.4C. Una representación de la secuencia ADN de SNP TSC0095512 (SEQ ID NOS:29 & 30) de cromosoma 1. La primera plantilla (SEQ ID NO:11) y la segunda plantilla (SEQ ID NO:20) se indican anterior y posteriormente, respectivamente, la secuencia de TSC0095512. La primera plantilla es biotinilada y contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para EcoRI. La segunda plantilla contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BsmF I y tiene 13 bases que reconocen a la secuencia ADN. El SNP se indica por S (G/C) y s (C/G; complementario a S).

[0053] FIG.4D. Una representación de la secuencia ADN de SNP TSC0095512 (SEQ ID NOS:29 & 30) de cromosoma 1. La primera plantilla (SEQ ID NO: 11) y la segunda plantilla (SEQ ID NO:12) se indican anterior y posteriormente, respectivamente, la secuencia de TSC0095512. La primera plantilla es biotinilada y contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para EcoRI. La segunda plantilla contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BceA I y tiene 13 bases que reconocen a la secuencia ADN. El SNP se indica por S (G/C) y s (C/G; complementario a S).

[0054] FIGS.5A-5D. Un diagrama esquemático que indica las secuencias del nucleótido de SNP HC21S00027 (FIG. 5A (SEQ ID NOS:31 & 32) y FIG. 5B (SEQ ID NOS:31 & 33)), y SNP TSC0095512 (FIG. 5C (SEQ ID NOS:34 & 35))

y FIG. 5D (SEQ ID NOS:34 & 36)) después de la amplificación con las plantillas descritas en las figuras. 4A-4D. Se resaltan los sitios de restricción en la secuencia de la plantilla.

[0055] FIGS.6A-6D. Un diagrama esquemático que muestra las secuencias del nucleótido de cada fragmento ADN amplificado que contiene un SNP después de la digestión con la enzima de restricción Tipo IIS apropiada. FIG. 6A (SEQ ID NOS:31 & 32) y FIG. 6B (el SEQ ID NOS:31 & 33) representa los fragmentos de una secuencia ADN que contiene SNP HC21S00027 digeridos con las enzimas de restricción Tipo IIS BsmF I y BceA I, respectivamente. FIG. 6C (SEQ ID NOS:34 & 35) y FIG. 6D (SEQ ID NOS:34 & 36) representa fragmentos de una secuencia ADN que contiene SNP TSC0095512 digerido con las enzimas de restricción Tipo IIS BsmF I y BceA I, respectivamente.

[0056] FIGURAS. 7 A-7D. Un diagrama esquemático que registra la incorporación de un nucleótido fluorescentemente marcado que usa la proyección 5' del sitio SNP digerido como un template para "rellenar" en el terminal 3'. FIG. 7A (SEQ ID NOS:31, 37 & 41) y FIG. 7B (SEQ ID NOS:31, 37 & 39) muestra el sitio del SNP digerido de HC21S00027 con un ddNTP marcado incorporado (* R^{dd} = nucleótido dideoxi fluorescente). FIG. 7C (SEQ ID NOS:34 & 38) y FIG. 7D (SEQ ID NO:34) señala el sitio del SNP digerido de TSC0095512 con un ddNTP marcado incorporado (* S^{dd} = nucleótido dideoxi fluorescente). El uso de ddNTPs asegura que el receso 3' es extendido por un nucleótido, lo cual es complementario al nucleótido de interés o sitio SNP presente en la proyección 5'.

[0057] FIG.7E. Un diagrama esquemático que indica la incorporación de dNTPs y un ddNTP en la proyección 5' que contiene el sitio de SNP. El

fragmento de ADN que contiene SNP HC21S00007 se digirió con BsmF I lo que generó una proyección 5' de cuatro bases. El uso de una mezcla de dNTPs y ddNTPs permite al receso 3' ser extendido un nucleótido (un ddNTP es incorporado primero) (SEQ ID NOS:31, 37 & 41); dos nucleótidos (un dNTP es incorporado seguido por un ddNTP) (SEQ ID NOS:31, 39 & 41); tres nucleótidos (dos dNTPs son incorporados, seguidos por un ddNTP) (SEQ ID NOS:31, 40 & 41); o cuatro nucleótidos (tres dNTPs son incorporados, seguidos por un ddNTP) (SEQ ID NOS:31 & 41). Todos los cuatro productos pueden separarse por tamaño, y los nucleótidos incorporados, detectados (*R^{dd} = nucleótido dideoxi fluorescente). La detección del primer nucleótido que corresponde al SNP o región seleccionada y los próximos tres nucleótidos proporcionan un nivel adicional de control de calidad. El SNP se indica por R (A/G) y r (T/C) (complementario a R).

[0058] FIGS.8A-8D. El descargo del SNP "relleno" de de la matriz de apoyo sólida, es decir: los pozos cubiertos de estreptavidina. SNP HC21S00027 se muestra en FIG. 8A (SEQ ID NOS:31, 37 & 41) y FIG. 8B (SEQ ID NOS:31, 37 & 39), mientras que SNP TSC0095512 se muestra en FIG. 8C (SEQ ID NOS:34 & 38)and FIG. 8D (SEQ ID NO:34). El SNP "relleno" está libre en la solución, y puede detectarse.

[0059] FIG. 9A. Análisis de la secuencia de un fragmento de ADN que contiene SNP HC21S00027 digerido con BceAI. Se muestran cuatro reacciones "reellenos"; cada reacción contiene un nucleótido fluorescentemente marcado, ddGTP, ddATP, ddTTP, o ddCTP, y ddNTPs no marcados. Se indica la proyección 5' generada mediante la digestión con BceA I y los nucleótidos esperados en este sitio SNP.

[0060] FIG. 9B. Análisis de la secuencia de SNP TSC0095512. SNP TSC0095512 se amplificó con una segunda plantilla que contenía el sitio de reconocimiento para BcaA I, y en una reacción separada, con una segunda plantilla que contenía el sitio de reconocimiento para BsmF I. Se muestran cuatro reacciones de "relleno" para cada producto PCR; cada reacción contenía un nucleótido fluorescentemente marcado, ddGTP, ddATP, ddTTP, o ddCTP, y ddNTPs no marcados. Se indica la proyección 5' generada por la digestión con BcaA I y con BsmF y los nucleótidos esperados.

[0061] FIG. 9C. El análisis de la secuencia SNP TSC0264580 después de la amplificación con una segunda plantilla que contenía el sitio de reconocimiento para BsmF I. Se muestran cuatro reacciones "relleno"; cada reacción contenía un nucleótido fluorescentemente marcado, que era ddGTP, ddATP, ddTTP, o ddCTP y ddNTPs no marcados. Se muestran dos diferentes proyecciones 5': una representa las moléculas ADN que fueron fragmentadas 11 nucleótidos lejos en la cadena codificante y 15 nucleótidos lejos sobre la cadena no codificante y el otro representa las moléculas ADN que fueron fragmentadas 10 nucleótidos lejos en la cadena codificante y 14 nucleótidos en la cadena no codificante. Se indican también los nucleótidos esperados.

[0062] FIG. 9D. Análisis de la secuencia de SNP HC21S00027 amplificada con una segunda plantilla que contenía el sitio de reconocimiento para BsmF I. Una mezcla de ddNTPs marcados y dNTPs sin marcar fue utilizada para rellenar la proyección 5' generada por la digestión con BsmF I. Se representan dos diferentes proyecciones 5': una representa las moléculas de ADN que fueron fragmentadas 11 nucleótidos lejos en la cadena codificante y 15 nucleótidos en la cadena no codificante y el otro representa las moléculas de ADN que fueron

fragmentadas 10 nucleótidos lejos en la cadena codificante y 14 nucleótidos en la cadena no codificante. Se indican el nucleótido ascendente del SNP, el nucleótido en el sitio SNP (la muestra contenía los templates de ADN de 36 individuos; se esperaba ambos nucleótidos ser representados en la muestra), y los tres nucleótidos descendentes del SNP.

[0063] FIG. 10. Análisis de la secuencia de SNPs múltiple. SNPs HC21S00131, y HC21S00027 que se localizan en el cromosoma 21 y SNPs TSC0087315, SNP TSC0214366, SNP TSC0413944, y SNP TSC0095512 que están en el cromosoma 1, fueron amplificados en reacciones separadas de PCR con segundas plantillas que contenían un sitio de reconocimiento para BsmF 1. Las plantillas fueron diseñadas para que cada sitio de interés amplificado seleccionado, fuera de un tamaño diferente. Después de la amplificación, las reacciones se agruparon en una sola muestra, y efectuados en esa muestra, todos los pasos subsecuentes del método (como se describió en las FIGS. 1F-1I. Se indican cada SNP y los nucleótidos encontrados en cada SNP.

[0064] FIG. 11. Determinación de la secuencia de ambos alelos de SNPs TSC0837969, TSC0034767, TSC1130902, TSC0597888, TSC0195492, TSC0607185 utilizando un nucleótido fluorescentemente marcado. El ddGTP marcado se usó en presencia del dATP, el dCTP, el dTTP no marcados para rellenar la proyección generada por la digestión con BsmF I. El nucleótido que precede el sitio variable en la cadena que fue rellenada, no era guanina, y el nucleótido después del sitio variable en la cadena que fue rellena, no era guanina. El nucleótido dos bases después del sitio variable en la cadena que fue rellena, era guanina. Los alelos que contienen guanina en el sitio variable están rellenos con ddGTP marcado. Los alelos que no contienen guanina están

rellenos con dATP, dCTP, o dTTP, sin marcar, y la polimerasa continúa incorporando nucleótidos hasta que el ddGTP marcado está relleno en la posición 3 complementaria a la proyección.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0065] La presente invención proporciona un nuevo método para determinar rápidamente la secuencia del ADN, sobre todo a una región de interés o a múltiples regiones de interés. Las secuencias de cualquier número de objetivos ADN, desde uno hasta centenares o miles o más regiones de interés en cualquier template ADN o muestras de ácido nucleico pueden determinarse eficazmente, con precisión, y económicamente. El método es especialmente útil para la secuenciación rápida desde uno hasta decenas de miles o más de genes, regiones de genes, fragmentos de genes, polimorfismos de nucleótidos sencillos, y mutaciones en un solo cromosoma o en múltiples cromosomas.

[0066] La invención se enfoca a un método para determinar una secuencia de un sitio seleccionado de interés, el método comprende,: (a) amplificar un sitio seleccionado de interés en un template ADN utilizando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción de tal modo que esa digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio seleccionado de interés; (b) digerir del ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla; (c) incorporar un nucleótido en el ADN digerido de (b) usando la proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template; y (d) determinar la secuencia del sitio de interés seleccionado mediante la determinación de la secuencia del ADN de

(c). [0067] La invención también se enfoca a un método para determinar una secuencia de un sitio seleccionado de interés, dicho método comprende: (a) amplificar un sitio de interés seleccionado en un template ADN utilizando una primera y segunda plantillas, en donde la primera y/o segunda plantilla contiene una porción de un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, en donde se genera un sitio de reconocimiento completo para la enzima de restricción, ante la amplificación de el template ADN de manera que tal digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio seleccionado de interés; (b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio del reconocimiento completo generado por el segundo plantilla y el template ADN; (c) incorporar un nucleótido en el ADN digerido de (b) usando la proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template; y determinar la secuencia del sitio de interés seleccionado mediante la determinación de la secuencia del ADN de (c).

Template de ADN

[0068] Por "sitio de interés" se entiende una región seleccionada del ácido nucleico que está dentro de una región más grande del mismo. Un sitio de interés puede incluir pero no está limitado a 1-100, 1-50, 1-20, o 1-10 nucleótidos, preferentemente 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, o 1 nucleótido(s).

[0069] Como se usa en este documento: un "alelo" es una de varias formas alternas de un gen o regiones no-codificadas de ADN que ocupan la misma posición en un cromosoma. Los término alelo puede usarse para describir ADN de cualquier organismo que incluye pero no se limita a bacterias, virus,

hongos, protozoarios, moho, levaduras, plantas, humanos, no humanos, animales, y archaeobacteria.

[0070] Como se usa en el presente con respecto a los individuos, "alelo mutante" se refiere a alelos variantes que están asociados con un estado de enfermedad. Por ejemplo, las bacterias tienen típicamente una cadena grande de ADN. El término alelo con respecto a ADN bacteriano se refiere a la forma de un gen encontrado en una célula comparado con la forma del mismo gen en una célula bacteriana diferente, de la misma especie.

[0071] El alelo puede tener la secuencia idéntica o puede variar por un solo nucleótido o por más de un nucleótido. Con respecto a organismos que tienen dos copias de cada cromosoma, si ambos cromosomas tienen el mismo alelo, la condición se denomina homóciga. Si los alelos en los dos cromosomas son diferentes, la condición se denomina heteróciga. Por ejemplo, si el sitio de interés es SNP X en el cromosoma 1, y el cromosoma maternal contiene una adenina en SNP X (alelo A) y el cromosoma paternal contiene una guanina en SNP X (alelo G), el individuo es heterócigo en SNP X.

[0072] Como se usa en el presente documento, "secuencia" significa la identidad de, o determinar la identidad de (dependiendo si se utiliza como nombre o como verbo, respectivamente), un nucleótido o más de un nucleótido contiguo en un polinucleótido. En el caso de un nucleótido sencillo, por ejemplo, una "secuencia" SNP se usa como un nombre intercambiamente con "identidad" en el presente, y "secuencia" se usa intercambiamente como un verbo con "identifique" en el presente documento.

[0073] El término "template" se refiere en la invención, a cualquier molécula ácida nucleica que puede ser usada para amplificación. ARN o ADN que no es

naturalmente doble cadena, puede convertirse en una doble cadena ADN para ser usada como el template ADN. Cualquier ADN de doble cadena o preparación que contenga múltiples, diferentes moléculas de ADN, puede usarse como template ADN para amplificar un sitio o sitios de interés, contenido en el template ADN.

[0074] La fuente del ácido nucleico por obtener la plantilla ADN puede ser de cualquier fuente apropiada que incluye pero no se limita al ácido nucleico de cualquier organismo, ej., humano o no humano, ej., bacteria, virus, levadura, hongo, plantas, protozario, animal, muestras de tejidos de contenido ácido- nucleico, fluidos corporales (por ejemplo, sangre, suero, plasma, saliva, orina, lágrimas, semen, secreciones vaginales, fluido linfático, fluido cerebroespinal, o secreciones mucosas), materia fecal, células individuales o extractos de tales fuentes de que contengan ácido nucleico del mismo, y estructuras subcellulares como mitocondria o cloroplastos, usando bien los protocolos establecidos dentro de la técnica. El ácido nucleico también puede obtenerse del forense, la comida, de muestras arqueológicas, o inorgánicas sobre las cuales el ácido nucleico se ha depositado o se ha extraído. En una incorporación preferida, el ácido nucleico se ha obtenido de un humano o animal a ser examinado para la presencia de una o más secuencias genéticas que pueden ser el diagnóstico, o que predispone el sujeto a, una condición o enfermedad médica.

[0075] El ácido nucleico que será analizado puede ser cualquier ácido nucleico, por ejemplo, genómico, plásmido, cósmido, cromosomas artificiales de levadura, ADN artificial o manufacturado, incluyendo secuencias únicas de

ADN, y también ADN que ha sido transcrito inverso de una muestra de ARN, como cDNA. La secuencia de ARN puede ser determinada según la invención si es capaz de ser convertido en una forma de ADN de espiral doble para ser usada como template ADN.

[0076] Los términos "plantilla" y "plantilla oligonucleótida" son intercambiables cuando se usan para discutir un oligonucleótido que reconoce a un template y puede usarse para reconocer la síntesis de una copia de ese template.

[0077] ADN "Amplificado" es un ADN que se ha copiado una vez o múltiples veces, por ejemplo mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Cuando hay una cantidad grande de ADN disponible para ensayo, de tal manera que haya un número suficiente de copias del sitio de interés están ya presentes en la muestra a ser ensayada, puede no ser necesario "amplificar" el ADN del sitio de interés en un número aun más grande de réplicas de la copia. Más bien, simplemente puede bastar "copiar" una vez el template ADN usando una vez un conjunto apropiado de plantillas, como aquéllas que contienen estructuras horquilla, que permiten a la enzima de restricción el reconocimiento de sitios a ser doble encadenados.

[0078] "Copia" como en "ADN copiado" se refiere a ADN que se ha copiado una vez, o ADN que se ha amplificado en más de una copia.

[0079] En una incorporación, el ácido nucleico se amplifica directamente en la muestra original que contiene la fuente de ácido nucleico. No es esencial que el ácido nucleico se extraiga, se purifique o se aisle; sólo necesita ser proporcionado en una forma que sea capaz de ser amplificado. Antes de la amplificación no se requiere un paso de hibridación del ácido nucleico con las plantillas. Por ejemplo, la amplificación puede realizarse en una célula o una

muestra de lisata, usando bien los protocolos normales conocidos en la técnica. Puede usarse directamente el ADN que está sobre un apoyo sólido, en una preparación biológica establecida, o de otra manera en una composición que contiene sustancias no-ADN y que pueden amplificarse sin extraerse primero del apoyo sólido o preparación fija o sustancias no-ADN en la composición, sin la purificación extensa, con tal de que el ADN pueda reconocer con las plantillas apropiadas, y pueda copiarse, especialmente amplificado, y los productos copiados o amplificados puedan recuperarse y puedan utilizarse como se describe en el presente.

[0080] En una incorporación preferida, el ácido nucleico se extrae, se purifica o se aísla de materiales ácidos non-nucleicos que están en la muestra original, utilizando los métodos conocidos en la técnica; antes de la amplificación.

[0081] En otra incorporación, el ácido nucleico se extrae, purifica o aísla de la muestra original que contiene la fuente de ácido nucleico y antes de la amplificación, el ácido nucleico es fragmentado usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, que incluye pero no se limita a la digestión enzimática, fragmentación manual, y sonicación. Por ejemplo, el ADN puede digerirse con una o más enzimas de restricción que tienen un sitio de reconocimiento, y sobre todo un sitio de reconocimiento ocho o seis pares de bases que no están presentes en los sitios de interés.

Típicamente, el ADN puede fragmentarse a cualquier longitud deseada, incluyendo 50, 100, 250, 500, 1,000, 5,000, 10,000, 50,000 y 100,000 pares de base de longitud. En otra incorporación, el ADN es fragmentado a una longitud promedio de aproximadamente 1000 a 2000 pares de bases. Sin embargo, no es necesario que el ADN sea fragmentado.

[0082] Fragmentos de ADN que contiene sitios de interés pueden purificarse de los fragmentos de ADN que no contienen los sitios de interés, antes de la amplificación. La purificación puede hacerse usando plantillas que se usarán en la amplificación (vea el "Diseño de la Plantilla" más adelante) como ganchos para recuperar los fragmentos que contienen los sitios de interés, con base en la habilidad de tales plantillas de reconocer a los sitios de interés. En una incorporación preferida, son utilizadas las plantillas marcador-modificadas como por ejemplo las plantillas biotinaladas. También vea la sección "Purificación del ADN Amplificado" para marcadores adicionales.

[0083] Mediante la purificación de fragmentos ADN que contienen los sitios de interés, puede mejorarse la especificidad de la reacción de amplificación. Esto minimizará la amplificación de regiones no específicas de el template ADN. La purificación de los fragmentos de ADN también puede también permitir PCR múltiplex (Reacción de la Cadena Polimerasa) o amplificación de sitios múltiples de interés con la especificidad mejorada.

[0084] En una incorporación, la muestra de ácido nucleico se obtiene con un propósito predeterminado tal como determinar la secuencia en un sitio predeterminado o sitio de interés, utilizando el método de la invención. Por ejemplo, el ácido nucleico es obtenido con el propósito de identificar una o más condiciones o enfermedades a las cuales el sujeto puede estar predispuesto o puede estar en la necesidad de tratamiento, o para la presencia de cierto polimorfismo de nucleótido sencillo. En una incorporación alternativa, la muestra se obtiene para averiguar la presencia o ausencia de uno o más marcadores de secuencia ADN, la presencia de lo cual identificaría ese ADN

como perteneciente a un específico microorganismo bacteriano o fungal, o individual.

[0085] Los sitios de interés que van a ser secuenciados pueden seleccionarse exclusivamente con base en la secuencia. En los humanos, más de 1.42 millones de polimorfismos de nucleótido sencillos (SNPs) se han descrito (Nature 409:928-933.(2001); SNP Consortium LTD). En promedio, existe un SNP por cada 1.9 kb de genoma humano. Sin embargo, la distancia entre los sitios de necesidad de interés no necesitan ser considerados cuando se seleccionan los sitios de interés para ser secuenciados según la invención. Si se analiza más de un sitio de interés en el ADN genómico, los sitios seleccionados de interés pueden estar en el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes.

[0086] En una incorporación preferida, la longitud de la secuencia que se amplifica es preferentemente diferente para cada sitio de interés, de manera que los sitios de interés puedan ser separados por el tamaño.

[0087] De hecho, es una ventaja de la invención que no se utilicen las plantillas que copian una secuencia completa de genes. Más bien, el sitio copiado de interés es preferentemente sólo una parte pequeña del gen total. No existe ninguna ventaja al secuenciar el gen entero ya que esto puede aumentar costos y demorar los resultados. La secuenciación solamente de las bases deseadas o sitios de interés dentro del gen aumentan al máximo la eficacia global del método porque permite el número máximo de sitios de interés, ser determinados en la mínima cantidad de tiempo y también con el costo mínimo.

[0088] Debido a que un número grande de secuencias pueden analizarse juntas, el método de la invención es especialmente receptivo a la cribación en grande escala de una cantidad de muestras individuales.

[0089] Cualquier número de sitios de interés pueden analizarse, especialmente concurrentemente, usando el método de la invención. La muestra(s) puede analizarse concurrentemente para determinar la secuencia de un sitio de interés o de sitios múltiples de interés. Por ejemplo, los 10 o 20 sitios de mutación mayormente ocurrentes en un gen asociado a una enfermedad, pueden ser secuenciados para detectar la mayoría de los portadores de la enfermedad.

[0090] Alternativamente, 2,3,4,5,6,7,8,9,10-20,20-25,25-30,30-35,35-40, 40-45,45-50,50-100,100-250,250-500,500-1.000, 1.000-2.000, 2.000-3.000, 3.000-5.000, 5.000-10.000, 10.000-50.000 o más de 50.000 sitios de interés pueden analizarse al mismo tiempo cuando se desea una clasificación genética global. Tal clasificación genética global podría desearse cuando se usa el método de la invención para proporcionar una huella digital genética para identificar un cierto microorganismo o individuo o para la genotipia de SNP.

[0091] Los sitios múltiples de interés pueden ser los objetivos de organismos diferentes. Por ejemplo, una planta, un animal o sujeto humano en necesidad de tratamiento, pueden tener síntomas de infección por uno o más patógenos. Una muestra ácido nucléica tomada de tal planta, animal o sujeto humano, puede analizarse para la presencia de múltiples sospechados o posibles patógenos, al mismo tiempo mediante la determinación de la secuencia de sitios de interés, los que, si están presentes, serían el diagnóstico para ese patógeno. No sólo sería el hallazgo de tal secuencia un diagnóstico en el sujeto

que señalaría rápidamente la causa de tal condición, sino que también eliminaría otros patógenos no detectados. Tal clasificación puede usarse para evaluar el grado al cual un patógeno se ha extendido dentro de un organismo o ambiente. De una manera similar, el ácido nucleico de un individuo sospechoso de tener una enfermedad que es el resultado de una anomalía genética, puede analizarse para alguna o para todas las mutaciones conocidas que producen la enfermedad, o para una o más de las mutaciones más comunes.

[0092] El método de la invención puede usarse para supervisar la integridad de la naturaleza genética de un organismo. Por ejemplo: muestras de levadura pueden tomarse en varios momentos y de varios lotes en el proceso de fermentación, y su presencia o identidad comparada con la cadena deseada mediante el análisis rápido de sus sucesiones genómicas, como se provee en el presente.

[0093] El sitio de interés que será copiado puede estar dentro de una secuencia codificadora o fuera de de una secuencia codificadora. Preferentemente, uno o más sitios de interés que serán copiados están dentro de un gen. En una incorporación preferida, el template ADN que se copia es un sitio o sitios de interés que está dentro de un genómico que codifica secuencia, intron o exon. En una incorporación altamente preferida, se copian secuencias exon de ADN. Los sitios de interés pueden ser sitios dónde las mutaciones son conocidas por causar enfermedad o por predisponer a un estado de enfermedad. Los sitios de interés pueden ser sitios de polimorfismos de nucleótido sencillo. Alternativamente, los sitios de interés que serán copiados pueden ser fuera de la secuencia codificadora, por ejemplo, en un región

transcripcional regulatoria, y sobre todo una secuencia promotora, realizadora, o secuencia represora.

Diseño de la Plantilla

[0094] Las secuencias publicadas, incluso las secuencias de consenso, pueden usarse para diseñar o seleccionar plantillas para el uso en la amplificación de el template ADN. La selección de secuencias a ser usadas para la construcción de plantillas que flanquean un sitio de interés puede hacerse mediante el examen de la secuencia de los sitios de interés, o inmediatamente a éllo. La secuencia recientemente publicada del genoma humano proporciona una fuente de información de la cual diseñar plantillas para flanquear un sitio deseado de interés del gen humano.

[0095] Por "flanqueando" un sitio de interés se indica que las secuencias de las plantillas son tales que por lo menos una porción de la región 3' de un plantilla es complementaria a la cadena no codificante de la plantilla ADN y ascendente del sitio de interés (plantilla hacia adelante), y por lo menos una porción de la región 3' de la otra plantilla es complementaria a la cadena codificante de la plantilla ADN y del sitio descendente de interés (plantilla hacia atrás). Se intenta que una " plantilla par " indique un par de plantillas hacia delante y hacia atrás. Ambas plantillas de un plantilla par recocen de una manera que permiten extensión de los plantillas, de tal manera que la extensión resulta en la amplificación de la plantilla ADN en la región del sitio de interés.

[0096] Los plantillas pueden ser preparadas mediante una variedad de métodos que incluyen pero no se limitan a duplicar secuencias apropiadas y dirigir síntesis químicas usando los métodos conocido en la técnica (Narang et

al., Enzymol Methods. 68:90 (1979); Brown et al., Methods Enzymol. 68:109 (1979)). Las Plantillas también pueden obtenerse de fuentes comerciales como Operon Technologies, Amersham Pharmacia, Biotech, Sigma, y Life Technologies. Las plantillas de un par de plantillas pueden tener la misma longitud. Alternativamente, una de los plantillas del par de plantillas puede ser más largo que la otra plantilla del par de plantillas. Las plantillas pueden tener una temperatura de fusión idéntica. Las longitudes de las plantillas pueden extenderse o fragmentarse en los terminales 5' o 3' para producir plantillas con las temperaturas de fusión deseadas. En la incorporación preferida, las longitudes de recocimiento 3' de las plantillas, dentro de una plantilla par, difieren. También, la posición del recocido de cada plantilla par puede diseñarse de modo que la secuencia y la longitud de la plantilla rinda la temperatura de fusión deseada. La ecuación más simple para determinar la temperatura fusión de las plantillas más pequeñas de 25 pares de bases, es The Wallace Rule ($T_d = 2(A+T) + 4(G+C)$). También pueden usarse programas de Computadora para diseñar las plantillas, incluidos pero no limitados a Array Designer Software (Arrayit Inc.), Oligonucleotide Probe Sequence Design Software for Genetic Analysis (Olympus Optical Co.), NetPrimer, y DNAsis de Hitachi Software Engineering. La T_m (temperatura de fusión y recocido) de cada plantilla es calculada usando programas software como el Net Primer (programa gratis en

<http://premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>

(dirección internet desde el 13 de febrero, año 2002).

[0097] En otra incorporación, la temperatura del recocido de las plantillas puede ser recalculada y aumentada después de cualquier ciclo de

amplificación, incluida pero no limitada a ciclo 1,2,3,4,5, ciclos 6-10, ciclos 10-15, ciclos 15-20, ciclos 20-25, ciclos 25-30, ciclos 30-35, o ciclos 35-40. Después de los ciclos iniciales de amplificación 5', la mitad de las plantillas son incorporadas en los productos de cada sitios de interés, así la TM puede ser recalculada con base en ambas secuencias, en la mitad del 5' y la mitad del 3' de cada plantilla.

[0098] Por ejemplo, en la FIG. 1B, el primer ciclo de amplificación es realizado cerca de la temperatura de fusión de la región 3' de la segunda plantilla (región "c"): que recoce al template ADN que es 13 bases. Después del primer ciclo, la temperatura de recocido puede aumentarse a TM2 que está cerca de la temperatura de fusión de la región 3' de la primera plantilla (región "b' ") que recoce al template ADN. La segunda plantilla no puede enlazar al template original ADN porque sólo recoce a 13 bases en la el template original de ADN, y TM2 está cerca de la temperatura de fusión de aproximadamente 20 bases, lo cual es la región 3' de la primera plantilla (FIG. 1C). Sin embargo, la primera plantilla puede enlazar al ADN que se copió en el primer ciclo de la reacción. En el tercer ciclo, la temperatura de recocido se aumenta a TM3 que está alrededor de la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla ("c" y "d"). El template ADN producto del segundo ciclo de PCR contiene ambas regiones c' y d', y por consiguiente, la segunda plantilla puede recocer y puede extenderse a TM3 (FIG. 1D). Los ciclos restantes son ejecutados en TM3. La secuencia entera de la primera plantilla (a + b`) puede recocer a la plantilla del tercer ciclo de PCR, y se extiende (FIG. 1E). Aumentando la temperatura del recocido disminuirá el enlazamiento no específico y aumentará la especificidad de la reacción que es especialmente

útil si se amplifica un sitio de interés del ADN genómico humano que contiene 3x10⁹ pares de base.

[0099] El término "about" (alrededor) como se usa aquí, con respecto a las temperaturas de recocimiento, se usa para incluir las temperaturas dentro de 10 grados Celsius de las temperaturas declaradas.

[0100] En una incorporación, un par de plantillas se usa para cada sitio de interés. Sin embargo, pueden usarse múltiples pares de plantillas para cada sitio de interés.

[0101] En una incorporación, se diseñan las plantillas de modo tal que una o ambas plantillas del par de plantillas contenga la secuencia en la región 5' para una o más endonucleasas de restricción (enzima de restricción).

[0102] Como se usa aquí, con respecto a la posición a la que las enzimas de restricción digieren ADN, la cadena "codificante" (sense) es la cadena de lectura 5' a 3' en la dirección en que la que fragmenta la enzima de restricción.

Por ejemplo, BsmF I reconoce la secuencia siguiente:

5' GGGAC(N)₁₀ 3' (SEQ ID NO:1) o

3' CCCTG(N)₁₄ 5'

5' (N)₁₄GTCCC 3' (SEQ ID NO:2)

3' (N)₁₀CAGGG 5'

[0103] Por lo tanto, la cadena codificante es la que contiene la secuencia de "GGGAC" en cuanto lee 5' a 3' en la dirección de fragmentación de la enzima de restricción.

[0104] Como se usa aquí, con respecto a la posición a la que las enzimas de restricción digieren ADN, la cadena "no codificante" es la cadena de lectura 3' a 5' en la dirección de fragmentación de la enzima de restricción. Así, la cadena

no codificante es la cadena que contiene la secuencia del "ccctg" en cuanto lee 3' a 5.'

[0105] En la invención, una de las plantillas en un plantilla par, puede diseñarse de tal modo que contenga un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción para una enzima de restricción de modo que tal digestión con la enzima de restricción produzca un receso en el Terminal 3' y una proyección 5' que contenga el sitio de interés (aquí denominado una segunda plantilla"). Por ejemplo, la segunda plantilla de un par plantilla puede contener un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que no fragmenta ADN en el sitio de reconocimiento pero fragmenta "n" nucleótidos fuera del sitio del reconocimiento. "N" es una distancia desde el sitio de reconocimiento al sitio fragmentado por la enzima de restricción. Si la secuencia del reconocimiento es para la enzima de restricción BceA I, la enzima fragmentará diez (10) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la cadena codificante, y doce (12) nucleótidos fuera del sitio de reconocimiento en la cadena no codificante.

[0106] La región 3' y preferentemente la mitad 3' de las plantillas se diseña para reconocer a una secuencia que flanquea los sitios de interés (FIG. 1A). La segunda plantilla puede reconocer cualquier distancia desde el sitio de interés con tal que la digestión con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción en esta plantilla genere una proyección 5' que contenga el sitio de interés. La proyección 5' puede ser de cualquier tamaño, incluido pero no limitado a 1,2,3,4,5,6,7,8, y más de 8 bases.

[0107] En una incorporación preferida, el terminal 3' de la segunda plantilla puede reconocer 1,2,3,4,5,6, 7,8,9,10,11,12,13,14, o más de 14 bases del sitio de interés o al sitio de interés.

[0108] En una incorporación preferida, la segunda plantilla se diseña para reconocer más cerca al sitio de interés que la otra plantilla de un par de plantillas (la otra plantilla se denomina en el presente documento una "primera plantilla"). La segunda plantilla puede ser una plantilla hacia adelante o atrás y la primera plantilla puede ser una marcha hacia atrás o hacia adelante, respectivamente. Que la primera o la segunda plantilla pueda ser plantilla delantera o reversa, puede determinarse por cual diseño proporcionará los mejores resultados de secuenciación.

[0109] Por ejemplo, el plantilla que reconoce más cerca al sitio de interés puede contener un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I que fragmenta diez (10) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la cadena codificante y catorce (14) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la cadena no codificante. En este caso, la plantilla puede diseñarse para que el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción sea 13 bases, 12 bases, 10 bases o 11 bases desde el sitio de interés. Si el sitio de reconocimiento está 13 bases del sitio de interés, la digestión con BsmF I generará una proyección 5' (RXXX), en donde el sitio de interés (R) es el primer nucleótido en la proyección (leyendo 3' a 5'), y X es cualquier nucleótido. Si el sitio del reconocimiento está 12 bases del sitio de interés, la digestión con BsmF I generará una proyección 5' (XRXX), en donde el sitio de interés (R) es el segundo nucleótido en la proyección (leyendo 3' a 5'). Si el sitio del reconocimiento está 11 bases del sitio de interés, la digestión con BsmF I generará una proyección 5' la (XXRX), en donde el sitio de interés (R) es el tercer nucleótido en la proyección (leyendo 3' a 5'). La distancia entre el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción y el sitio de interés debe diseñarse para que la digestión con la enzima de

restricción genere una proyección 5' que contiene el sitio de interés. La distancia efectiva entre el sitio del reconocimiento y el sitio de interés variará dependiendo de la selección de la enzima de restricción.

[0110] En otra incorporación, la segunda plantilla que puede recocer más cerca al sitio de interés relacionado a la primer plantilla puede diseñarse para que la enzima de restricción que genera la proyección 5' contenga el sitio de interés, vea la misma secuencia al sitio de fragmentado, independiente del nucleótido en el sitio de interés. Por ejemplo: si la plantilla que recoce más cerca al sitio de interés se diseña para que el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I (5' GGGAC 3') sea trece bases del sitio de interés, la enzima de restricción fragmentará la cadena no codificante una base hacia arriba del sitio de interés. El nucleótido en el sitio de interés es adyacente al sitio fragmentado, y puede variar de molécula a molécula ADN. Si se desea que los nucleótidos adyacentes al sitio fragmentado sean idénticos, el plantilla puede diseñarse para que el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BsmF I esté doce bases fuera del sitio de interés. La digestión con BsmF I generará una proyección 5', en donde el sitio de interés está en la segunda posición de la proyección (leyendo 3' a 5') y no está más adyacente al sitio de fragmentado. Diseñando la plantilla para que el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción sea doce (12) bases del sitio de interés, permite a los nucleótidos adyacentes al sitio fragmentado ser los mismos, independiente del nucleótido en el sitio de interés. También, las plantillas que han sido diseñados para que el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción sea once (11) o diez (10) las bases desde el sitio de interés permitirán los nucleótidos

adyacentes al sitio fragmentado ser los mismos, independiente del nucleótido en el sitio de interés.

[0111] El terminal 3' de la primera plantilla (sea delantero o hacia atrás) puede diseñarse para recocer a una distancia escogida del sitio de interés. Preferentemente, para el ejemplo, esta distancia está entre 10-25, 25-50, 50-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000 y superior a 1000 bases fuera del sitio de interés. Los sitios del recocido de las primeras plantillas son escogidos tal que cada plantilla ascendente está sucesivamente más y más retirada de su respectiva plantilla descendente.

[0112] Por ejemplo, si al sitio de interés 1, los terminales 3' de la primera y segunda plantillas son Z bases aparte, entonces en el sitio de interés 2, los terminales 3' ascendentes y las plantillas descendentes están Z + K bases aparte, donde K = 1, 2, 3, 4, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800, 800-900, 900-1000, o superiores a 1000 bases (FIG. 2). El propósito de hacer que las plantillas ascendentes se retiren sucesivamente de sus respectivas plantillas descendentes es para que los productos de PCR de todos los sitios de interés, difieran en tamaño y pueden separarse, por ejemplo, en un gel de secuenciación. Esto permite el multiplexing agrupando los productos de PCR en pasos posteriores.

[0113] En una incorporación, la región 5' de la primera plantilla puede tener un sitio de reconocimiento para cualquier tipo de enzima de restricción. En una incorporación preferida, la primera plantilla tiene por lo menos un sitio de

reconocimiento de la enzima de restricción que es diferente del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción en la segunda plantilla. En otra incorporación preferida, la primera plantilla reconoce más allá del sitio de interés que la segunda plantilla.

[0114] En una incorporación preferida, la segunda plantilla contiene una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción para una enzima de restricción Tipo IIS que incluye pero no se limita a BcaA I y BsmF I, lo que produce una proyección 5' de dos bases y una proyección 3' de cuatro bases, respectivamente. Las enzimas de restricción del Tipo IIS son preferidas porque ellas reconocen las sucesiones de base asimétrica (no palíndromo como las enzimas del Tipo ortodoxo II). Las enzimas de restricción Tipo IIS fragmentan el ADN, en una posición específica que está fuera del sitio de reconocimiento, típicamente hasta 20 pares de bases fuera del sitio de reconocimiento. Estas propiedades hacen de las enzimas de restricción Tipo IIS, y de los sitios de reconocimiento de ellas, especialmente útiles en el método de la invención. Preferentemente, las enzimas de restricción Tipo IIS utilizadas en este método, dejan una proyección 5' y un receso 3'.

[0115] Es conocida una amplia variedad de enzimas de restricción Tipo IIS y tales enzimas han sido aisladas de bacterias, fago, archaeobacteria y virus de algas eucarióticas; y están comercialmente disponibles (Promega, Madison WI.; New England Biolabs, Beverly, MA.; Szybalski W. et al., Gene 100:13-16, (1991). Ejemplos de enzimas de restricción Tipo IIS que serían útiles en este método de invención, incluyen, pero no se limitan a las enzimas listadas en la Tabla I

TABLA I:
CLASES DE ENZIMAS DE RESTRICCION QUE
GENERAN UNA PROYECCION TERMINAL 5' Y UN
RECESO 3'

Enzima-Origen	Reconocimiento/ Sitio de escisión	Proveedor
Alw T - <i>Acinetobacter lwoffii</i>	GGATC(4/5)	NE Biolabs
Alw26 I - <i>Acinetobacter lwoffii</i>	GTCTC(1/5)	Promega
Bbs I - <i>Bacillus laterosporus</i>	GAAGAC(2/6)	NE Biolabs
Bbv 1 - <i>Bacillus brevis</i>	GCAGC(8/12)	NE Biolabs
BcaA I - <i>Bacillus cereus</i> 1315	ACGGC(12/14)	NE Biolabs
Bmr I - <i>Bacillus megaterium</i>	ACTGGG(5/4)	NE Biolabs
Bsa I - <i>Bacillus stearothermophilus</i> 6-55	GGTCTC(1/5)	NE Biolabs
Bst71 I - <i>Bacillus stearothermophilus</i> 71	GCAGC(8/12)	Promega
BsmA I - <i>Bacillus stearothermophilus</i> A664	GTCTC(1/5)	NE Biolabs
BsmB I - <i>Bacillus stearothermophilus</i> B61	CGTCTC(1/5)	NE Biolabs
BsmF I - <i>Bacillus stearothermophilus</i> F	GGGAC(10/14)	NE Biolabs
BspM I - <i>Bacillus species M</i>	ACCTGC(4/8)	NE Biolabs
Ear I - <i>Enterobacter aerogenes</i>	CTCTTC(1/4)	NE Biolabs
Fau I - <i>Flavobacterium aquatile</i>	CCCGC(4/6)	NE Biolabs
Fok I - <i>Flavobacterium okeonokoites</i>	GGATG(9/13)	NE Biolabs
Hga I - <i>Haemophilus gallinarum</i>	GACGC(5/10)	NE Biolabs
Ple I - <i>Pseudomonas lemoignei</i>	GAGTC(4/5)	NE Biolabs
Sap I - <i>Saccharopolyspora species</i>	GCTCTTC(1/4)	NE Biolabs
SfaN I - <i>Streptococcus faecalis</i> ND547	GCATC(5/9)	NE Biolabs
Sth132 I - <i>Streptococcus thermophilus</i> ST132	CCCG(4/8)	Sin proveedor comercial (Gen195:201- 206(1997))

[0116] En una incorporación, un plantilla par tiene secuencia en la región 5' de cada una de las plantillas que proveen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción que es único para una enzima de restricción.

[0117] En otra incorporación, una plantilla par tiene la secuencia en la región 5' de cada una de las plantillas que proporcionan un sitio de restricción que es reconocido por más de una enzima de restricción, y sobre todo para más de una enzima de restricción Tipo IIS. Por ejemplo, ciertas secuencias de consenso pueden reconocerse por más de una enzima. Por ejemplo, BsgI, Eco57I y BpmI todos reconocen el consenso 5' (G/C)TgnAG 3' y escisión 16 bp

lejos en la cadena no codificante y 14 bp lejos en la cadena codificante. Una plantilla que proporciona tal secuencia de consenso produciría un producto que tiene un sitio que puede reconocerse por cualquiera de las enzimas de restricción BsgI, Eco57I y BpmI.

[0118] Otras enzimas de restricción que fragmentan el ADN a una distancia del sitio de reconocimiento, y producen un terminal receso 3' y una proyección 5' incluyen enzimas de restricción Tipo III. Por ejemplo, la enzima de restricción EcoP15I reconoce la secuencia 5' CAGCAG 3' y escinde 25 bases descendentes en la cadena codificante y 27 bases descendentes en la cadena no codificante. Una persona de habilidad ordinaria en la técnica apreciará que continuamente están descubriéndose nuevas enzimas de restricción y pueden adoptarse prontamente para el uso sujeto de la invención.

[0119] En otra incorporación, la segunda plantilla puede contener una porción de la secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción, en donde el sitio del reconocimiento pleno para la enzima de restricción se genera ante la amplificación de el template ADN de manera que tal digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés. Por ejemplo, el sitio de reconocimiento para BsmF I es 5' GGGACN₁₀ 3'. La región 3' que recocce al template ADN de la segunda plantilla puede terminar con los nucleótidos "GGG", los que no tienen que ser complementarios con el template ADN. Si la región 3' de recocido es aproximadamente 10-20 bases, aun cuando las últimas tres bases no recosan, el plantilla se extenderá y, generará un sitio BsmF I.

Segunda plantilla: 5' GGAAATTCCATGATGCGTGGG (SEQ ID NO:3)

Plantilla ADN: 3' CCTTTAAOGTACTACOCAN₁N₂N₃TG 5'

5' OGAAATTCCATGATGCGT N₁N₂N₃AC 3' (SEQ ID NO:4)

[0120] La segunda plantilla puede diseñarse para recocer al template ADN, en donde las próximas dos bases del template ADN son timidina y guanina, de tal manera que una adenosina y citosina son incorporadas en el plantilla formando un sitio de reconocimiento para BsmF I, 5' GGGACN₁₀ 3'. La segunda plantilla puede ser diseñada para recocer de tal manera que la digestión con BsmF I genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés.

[0121] En otra incorporación, la segunda plantilla puede contener un sitio de reconocimiento entero o lleno para una enzima de restricción o una porción de un sitio de reconocimiento que genera un sitio del reconocimiento pleno en la amplificación del template ADN tal que esa digestión con una enzima de restricción que fragmenta al sitio de reconocimiento genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés. Por ejemplo, la enzima de restricción BsaJ I enlaza el siguiente sitio de reconocimiento: 5' C CN₁N₂GG 3'. La segunda plantilla puede diseñarse de tal manera que la región 3' de la plantilla termina con "C.C." El SNP de interés se representa por "N₁", y la secuencia de la plantilla descendente del SNP es "N₂CC."

Segunda plantilla 5' GGAAATTCCATGATGCGTACC (SEQ ID NO:5)

Plantilla ADN 3' CCTTTAAGGTACTACGCATGGN₁N₂CC 5'

5' GGAAATTCCATGATGCGTACCN₁N₂ GG 3'(SEQ ID NO:6)

[0122] Después de la digestión con BsaJ I, se generaría la proyección 5' de la secuencia siguiente:

5'C 3'

3' GGN₁,N₂C 5'

[0123] Si el nucleótido guanina no se reporta al sitio de interés, el terminal receso 3' puede rellenarse con citosina no marcada, la que es complementaria con el primero nucleótido en la proyección. Después de remover el exceso de citosina, pueden usarse los ddNTPs marcados para rellenar el próximo nucleótido, NI que representa el sitio de interés. Alternativamente si se informa que la guanina puede ser un nucleótido potencial al sitio de interés, pueden usarse nucleótidos marcados para detectar un nucleótido 3' del sitio de interés. Pueden usarse dCTP no marcados para "rellenar" seguido por un relleno con un nucleótido marcado, diferente de citosina. La citosina se incorporará hasta que alcance una base que no es complementaria. Si el sitio de interés contuviera una guanina, se rellenaría con el dCTP que permitiría la incorporación del nucleótido marcado.

Sin embargo, si el sitio de interés no contuviera una guanina, el nucleótido marcado no sería incorporado. Pueden usarse otras enzimas de restricción incluídas pero no limitadas a BssK I (5' CCNGG 3'), Dde I (5' C TNAG 3'), EcoN I (5' CCTNN NNNAGG 3') (SEQ ID NO:7), Fnu4H I (5' GC NGC 3') HinfI (5' G ANTC 3'), PfiF I (5' GACN NNGTC 3'), Sau96 I (5' G GNCC 3'), ScrF I (5' CC NGG 3'), y Tth111 I (5' GACN NNGTC 3').

[0124] No es necesario que la región 3' que recoce al template ADN de la segunda plantilla sea 100% complementaria al template ADN. Por ejemplo, los últimos 1,2, o 3 nucleótidos del terminal 3' de la segunda plantilla puede ser desigual con el template ADN. La región de la plantilla que recoce al template ADN fijará como objetivo la plantilla, y le permitirá extenderse. Aun cuando, si por ejemplo, los dos últimos nucleótidos no son complementarios a el template

ADN, la plantilla se extenderá y generará un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción.

Segunda plantilla: 5' GGAAATTCCATGATGCGTACC (SEQ ID NO:5)

Template ADN: 3' CCTTTAAGGTACTACGCATN_aN_bN₁N₂CC 5'

5' GGAAATTCCATGATGCGTAN_aN_bN₁N₂GG 3'(SEQ ID NO:8)

[0125] Después de la digestión con BsaJ I, se generaría una proyección 5' de la siguiente secuencia:



[0126] Si el nucleótido de citosina no es reportado al sitio de interés, la proyección 5, puede rellenarse con la citosina no marcada. El exceso de citosina puede enjuagarse, y llenarse con ddNTPs marcados. El primer nucleótido incorporado (N₁) corresponde al sitio de interés.

[0127] Alternativamente, es posible crear la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción usando la primera y segunda plantillas. El sitio de reconocimiento para cualquier enzima de restricción puede generarse, con tal que el sitio de reconocimiento contenga al menos un nucleótido variable. Las enzimas de restricción que reconocen los sitios que contienen por lo menos un nucleótido variable incluyen pero no se limitan a BssK I (5' CCNGG 3'), Dde I (5'C TNAG 3'), Econ I (5'CCTNN NNNAGG3') (SEQ ID NO:7), Fnu4H I (5'GC NGC 3'), HinfI (5'G ANTC 3') PfiF I (5' GACN NNGTC 3'), Sau96 I (5' G GNCC 3'), ScrF I (5' CC NGG 3'), y Tth111 I(5' GACN NNGTC 3'). En esta incorporación, la primera o segunda plantilla puede recocer más cerca al sitio

de interés o la primera o segunda plantilla puede reconocer a una distancia igual del sitio de interés. Las primeras y segundas plantillas pueden diseñarse para contener desigualdades con el template ADN en la región 3'; estas desigualdades crean el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción. El número de desigualdades que pueden tolerarse en el terminal 3' depende de la longitud de la plantilla, e incluye pero no se limita a 1,2, o más de 2 desigualdades. Por ejemplo, si el sitio de interés es representado por N_1 , una primera plantilla puede diseñarse para ser complementaria al template ADN, presentado mas adelante como la región "a". La región 3' de la primera plantilla termina con "CC" que no es complementario a el template ADN. La segunda plantilla se diseña para ser complementaria al template ADN que es presentado más adelante como la región "b". La región 3' de la segunda plantilla termina con "CC" que no es complementaria al template ADN.

Primera plantilla 5' a CC
 Template ADN 3' a' AAN₁N₂TT b' 5'
 5' a TTN₁ N₂AA b 3'
 CC b' 5' Segunda Plantilla

[0128] Después de una vuelta de amplificación se generarían los siguientes productos:

5' a CCN₁N₂AA b 3'

y

5' b' CCN₂N₁AA a 3',

[0129] En el segundo ciclo, las plantillas pueden reconocer a los templates que se generaron del primer ciclo de PCR:

5' a CCN₁N₂AA b 3'

CC b' 5'

CC a 5'

5' b' CCN₂N₁,AA a 3'

[0130] Después del segundo ciclo de PCR, se generarían los siguientes productos:

5' a CCN₁N₂GG b 3'

3' a GGN₁N₂CC b' 5'

[0131] Se genera el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BsaJ I, y después de la digestión con BsaJ I, es generada una proyección 5' que contiene el sitio de interés. El sitio de interés puede detectarse como se describe en detalle más adelante. Alternativamente, la región 3' de la primera y segunda plantillas pueden contener 1,2,3, o más de 3 desigualdades, seguidas por un nucleótido que es complementario al template ADN. Por ejemplo, la primera y segunda plantillas pueden usarse para crear un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoN I la cual enlaza la siguiente secuencia de ADN: 5' CCTNN NNNAGG 3'. Los últimos nucleótidos de cada plantilla serían "CCTN₁ o CCTN₁N₂." Los nucleótidos "CCT" no pueden ser o no ser complementarios al template ADN; sin embargo, N₁ y N₂ son los nucleótidos complementarios al template ADN. Esto permite a las plantillas recocer al template ADN después de las potenciales desigualdades, las cuales se usan para crear el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción.

[0132] En otra incorporación, una plantilla par tiene la secuencia en la región 5' de cada una de las plantillas que proporcionan dos o más sitios de restricción que son reconocidos por dos o más enzimas de restricción.

[0133] En una incorporación preferida, una plantilla par tiene diferentes sitios de reconocimiento de enzima de restricción en las regiones 5' , sobre todo terminales 5', de tal manera que se requiere una enzima de restricción diferente para separar cualquier secuencia no deseada. Por ejemplo, la primera plantilla para el sitio de interés "A" puede contener una secuencia reconocida por una enzima de restricción "X," la cual puede ser cualquier tipo de enzima de restricción y la segunda plantilla para el sitio de interés "A," el cual recoce más cerca al sitio de interés, puede contener la secuencia para una enzima de restricción "Y," la cual es una enzima de restricción Tipo IIS que fragmenta "n" nucleótidos y deja una proyección 5' y un receso 3'. La proyección 5' contiene el sitio de interés. Después de enlazar el ADN amplificado a los pozos cubiertos de estreptavidina, uno puede digerir con la enzima "Y," enjuagar, luego rellenar con nucleótidos marcados y enjuagar, y luego digerir con la enzima de restricción "X," la cual liberará el fragmento de ADN que contiene el sitio de interés de la matriz sólida. El sitio de interés puede analizarse detectando el nucleótido marcado que estaba "relleno" en el sitio de interés, por ejemplo el sitio SNP.

[0134] En otra incorporación, las segundas plantillas para los diferentes sitios de interés que están amplificándose según la invención, contienen la secuencia de reconocimiento en las regiones 5' para la misma enzima de restricción e igualmente todas las primeras plantillas también contienen el mismo sitio de reconocimiento de la enzima de restricción, que es una enzima diferente de la enzima que reconoce las segundas plantillas. La plantilla (o la plantilla hacia adelante o inverso) que recoce más cerca al sitio de interés contiene un sitio de reconocimiento para, por ejemplo, una enzima de restricción Tipo IIs.

[0135] En otra incorporación, las segundas plantillas para los sitios múltiples de interés que están amplificándose según la invención, contienen las secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción en las regiones 5' para las diferentes enzimas de restricción.

[0136] En otra incorporación, las primeras plantillas para los sitios múltiples de interés que están amplificándose según la invención, contiene las secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción en las regiones 5' para las diferentes enzimas de restricción.

[0137] Las secuencias de enzima de restricción múltiples proporcionan una oportunidad de influir en el orden en el cual sitios de interés agrupados son liberados del apoyo sólido. Por ejemplo, si 50 sitios de interés son amplificados, las primeras plantillas pueden tener un marcador al terminal 5' con el fin para ayudar en la purificación y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción, y las segundas plantillas pueden contener un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción tipo IIS. Por ejemplo, algunas de las primeras plantillas pueden tener un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para EcoR I, otras primeras plantillas pueden tener un sitio de reconocimiento para Pst I, y todavía otras primeras plantillas pueden tener un sitio de reconocimiento para BamH I. Después de la amplificación los sitios de interés, pueden enlazarse en las primeras plantillas a un apoyo sólido con la ayuda del marcador. Por realizar la digestión de restricción una enzima de restricción a la vez, uno puede liberar los sitios amplificados de interés consecutivamente. Si el primer digerido se ha realizado con EcoRI, los sitios amplificados de interés con las primeras plantillas que contienen el sitio de reconocimiento para EcoR I serán liberados y reunidos, mientras los otros sitios

de interés permanecen ligados al apoyo sólido. Los sitios amplificados de interés, pueden liberarse selectivamente del apoyo sólido digiriendo con una enzima de restricción a la vez. El uso de sitios diferentes de reconocimiento de la enzima de restricción en las primeras plantillas permite un número más grande de sitios de interés, ser amplificados en un solo tubo de reacción.

[0138] En una incorporación preferida, cualquier región 5' del sitio de digestión de la enzima de restricción de cada plantilla, puede modificarse con un grupo funcional que mantenga la manipulación de fragmentos, proceso, identificación, y/o purificación. Ejemplos de tales grupos funcionales, o marcadores, incluyen pero no se limitan a biotina, los derivados de biotina, hidratos de carbono, haptenos, tintes, moléculas radiactivas, anticuerpos, y fragmentos de anticuerpos, peptides, y moléculas inmunogénicas.

[0139]. En otra incorporación, el template ADN puede reproducirse una vez, sin ser amplificado más allá de una sola ronda de repetición. Esto es útil cuando hay una cantidad grande de ADN disponible para el análisis tal que un número grande de copias de los sitios de interés ya están presentes en la muestra, y no se necesitan copias posteriores. En esta incorporación, las plantillas se diseñan preferentemente para contener una estructura "horquilla" en la región 5, tal que la secuencia dobla hacia atrás y recoce a una secuencia interior a sí misma, de una manera complementaria. Cuando el template ADN sólo se reproduce una vez, la secuencia de ADN que comprende el sitio de reconocimiento sería una de cadena simple si no fuera por la estructura "horquilla."

Sin embargo, en la presencia de la estructura horquilla, esa región es efectivamente de doble cadena, proporcionando así una substrata de cadena doble para la actividad de las enzimas de restricción.

[0140] Hasta el punto que las condiciones de reacción sean compatibles, todas las plantillas pares pueden mezclarse juntas para analizar un sitio o sitios de interés de ADN, para el uso en el método de la invención. En una incorporación preferida todas las plantillas pares son mezclados con el template ADN en un solo vaso de reacción. Tal vaso de reacción puede ser, por ejemplo, un tubo de reacción, o un plato de microtitulación.

[0141] Alternativamente, para evitar la competencia por nucleótidos y para minimizar plantillas dímeros y dificultades con las temperaturas de recocido para las plantillas, cada sitio de interés o grupos pequeños de sitios de interés pueden amplificarse separadamente en tubos de reacción, , y posteriormente agrupar los productos, si se desea. Por ejemplo, las reacciones separadas pueden agruparse en un solo vaso de reacción antes de la digestión con la enzima de restricción que genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés o sitio de SNP y un receso 3'. Preferentemente, las plantillas de cada plantilla par están provistas en cantidades equimolares. También, especialmente, preferentemente, cada uno de las diferentes plantillas pares se proporcionan en cantidades equimolares a los otros pares que se están utilizando.

[0142] En otra incorporación, pueden usarse combinaciones de plantillas pares que permitan amplificación eficaz de sus sitios respectivos de interés (vea por ejemplo FIG. 2). Tales combinaciones pueden ser determinadas antes de usarse en el método de la invención. Pueden usarse placas multi-paredes y máquinas PCR para seleccionar plantillas pares que trabajen eficazmente entre si. Por ejemplo, máquinas gradientes PCR, como la máquina PCR Eppendorf Mastercycler® gradiente, puede usarse para seleccionar la temperatura de

recocido óptima para cada plantilla par. Plantillas pares que tengan propiedades similares pueden usarse juntas en un solo tubo de reacción.

[0143] En otra incorporación, un recipiente multi-muestra que incluye pero no se limita a 96-o más pozos, puede usarse para amplificar un sitio de interés simple con la misma plantilla par de múltiples muestras del template ADN, con condiciones óptimas de PCR para ese sitio de interés. Alternativamente, un recipiente separado multi-muestras puede usarse para la amplificación de cada sitio de interés y para agrupar los productos para cada muestra del template ADN. Por ejemplo, gen A de 96 muestras diferentes de ADN pueden amplificarse en un plato de microtitulación 1, gen B de 96 muestras diferentes de ADN pueden amplificarse en un plato de microtitulación 2, etc., y luego los productos de amplificación pueden agruparse.

[0144] El resultado de amplificar sitios múltiples de interés es una preparación que contiene productos representativos de PCR que tienen la secuencia de cada sitio de interés. Por ejemplo, si el ADN de un sólo individuo se usa como el template ADN y si cientos de sitios de interés relacionados con enfermedad, se amplificaran del template ADN, el ADN amplificado sería una mezcla de pequeños productos de PCR de cada uno de los sitios de interés. Tal preparación podría analizarse más tarde a tiempo de determinar la secuencia de cada sitio de interés o de sólo algunos de sitios de interés. Adicionalmente, la preparación podría guardarse de una manera que conserve el ADN y pueda analizarse en cualquier momento, más tarde. La información contenida en el ADN amplificado puede ser revelada por cualquier método conveniente que incluye pero no se limita a detección fluorescente, secuenciación,

electroforesis en gel, y espectrometría de masa (vea "Detection of Incorporated Nucleotide" más adelante).

PS

Amplificación de Sitios de Interés

[0145] El template ADN puede amplificarse utilizando cualquier método conveniente conocido en la técnica que incluye pero no se limita a PCR (reacción de cadena polimerasa), 3SR (reacción de secuencia auto sostenida), LCR (reacción de cadena ligasa), RACE-PCR (amplificación rápida de terminales de cDNA), PLCR (una combinación de reacción de cadena polimerasa y reacción de cadena ligasa), Q-beta phage amplificación (Shah et al., J. Medical Micro. 33: 1435-41 (1995)), SDA (amplificación de desplazamiento de cadenas), SOE-PCR (extensión de traslape de empalme PCR), y similares. Estos métodos pueden usarse para diseñar las variaciones de la reacción de amplificación cíclica de la plantilla liberable, mediadora, descrita explícitamente en esta aplicación. En la incorporación más preferida, se amplifica la plantilla ADN utilizando PCR (PCR: A Practical Approach, M. J. McPherson, et al, IRL Press (1991); los Protocolos de PCR: Una Guía a Métodos y Aplicaciones, Innis, et al., la Academia Press (1990); y PCR Technology: Principals and Applications of ADN Amplification, H. A. Erlich, Stockton Press (1989)). PCR también se describe en numerosas patentes U.S., incluso Pat. U.S.A. Nos. 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; 4.965.188; 4.889.818; 5.075.216; 5.079.352; 5.104.792; 5.023.171; 5.091.310; y 5.066.584.

[0146] Los componentes de una reacción típica de PCR incluyen pero no se limitan a un template ADN, las plantillas, un búfer de reacción (dependiendo de

la selección de polimerasa), dNTPs (el dATP, dTTP, dGTP, y dCTP) y una polimerasa de ADN.

Las plantillas convenientes de PCR pueden diseñarse y pueden prepararse como se planteó anteriormente (vea el "Diseño del Plantilla" sección anterior). Brevemente, la reacción se calienta a 95°C durante 2 minutos. para separar las cadenas del template ADN, la reacción se refresca a una temperatura apropiada (se determina calculando la temperatura del recocido de las plantillas diseñados) para permitir a las plantillas recocer el template ADN, y se calienta a 72°C durante dos minutos para permitir la extensión.

[0147] En una incorporación preferida, la temperatura del recocido se aumenta en cada uno de los primeros tres ciclos de amplificación, para reducir la amplificación no-específica. También vea Ejemplo 1, más adelante. El TMI del primer ciclo de PCR: está alrededor de la temperatura de fusión de la región 3' de la segunda plantilla que recoce el template ADN. La temperatura de recocido puede elevarse en ciclos 2-10, preferentemente en ciclo 2, a TM2, que está alrededor de la temperatura de fusión de la región 3' que recoce al template ADN de la primera plantilla. Si la temperatura de recocido se aumenta en el ciclo 2, dicha temperatura permanece casi la misma hasta el próximo aumento en la temperatura de recocido. Finalmente, para cualquier ciclo subsiguiente al ciclo en que la temperatura del recocido se aumentó a TM2, preferentemente el ciclo 3, la temperatura del recocido se eleva a TM3 que está alrededor de la temperatura de fusión de la segunda plantilla completa. Después del tercer ciclo, la temperatura de recocido durante los ciclos restantes puede ser alrededor de TM3 o puede aumentarse más allá. En este ejemplo, la temperatura del recocido se aumenta en los ciclos 2 y 3. Sin

embargo, la temperatura del recocido puede aumentarse desde una temperatura de recocido baja en el ciclo 1, hasta una temperatura alta de recocido en el ciclo 2; sin ningún aumento de temperatura o la temperatura de recocido puede cambiar progresivamente desde una temperatura baja de recocido hasta una temperatura alta de recocido, en cualquier cantidad de pasos incrementales. Para el ejemplo, la temperatura de recocido puede cambiarse en ciclos 2, 3, 4, 5, 6, etc.,

[0148] Después de recocer, se aumenta la temperatura por cada ciclo a una temperatura de "extensión", para permitir a las plantillas "extenderse" y entonces a la extensión siguiente se aumenta la temperatura por cada ciclo a la temperatura de desnaturalización. Para los productos PCR menores de 500 pares de base en tamaño, uno puede eliminar el paso de extensión en cada ciclo y simplemente puede tener los pasos de desnaturalización y recocido. Una reacción típica de PCR consiste en 25-45 ciclos de desnaturalización, recocido y extensión, como se describió anteriormente. Sin embargo, como se mencionó previamente, aún un sólo un ciclo de amplificación (una copia) puede ser suficiente para practicar la invención.

[0149] Puede usarse cualquier polimerasa de ADN que catalice la extensión de la plantilla, incluida pero no limitada a polimerasa I de E.coli ADN, fragmento Klenow de polimerasa E. coli ADN I, polimerasa T7 ADN, polimerasa T4 ADN, polimerasa Taq, polimerasa Pfu ADN, polimerasa Vent ADN, bacteriofago 29, y REDTaq™ Genomic polimerasa ADN, o sequenasa. Preferentemente, se usa una polimerasa ADN térmicamente estable. Un "inicio caliente" de PCR, también puede realizarse, en el cual la reacción se calienta a 95°C durante dos minutos antes de la adición de polimerasa, o la polimerasa puede guardarse

inactiva hasta el primer paso de calentamiento en el ciclo 1. El "inicio caliente " de PCR puede usarse para minimizar la amplificación no específica. Cualquier número de ciclos de PCR puede usarse para amplificar el ADN, incluidos pero limitados a 2,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, o 45 ciclos. En una incorporación preferida, el número de ciclos de PCR realizados, es tal que se produce una cantidad equimolar de cada sitio de interés.

Purificación del ADN Amplificado

[0150] La purificación del ADN amplificado no es necesaria para practicar la invención. Sin embargo, en una incorporación, si se prefiere la purificación, el terminal 5' de la plantilla (primera o segunda plantilla) puede modificarse con una marcador que facilita la purificación de los productos de PCR. En una incorporación preferida, la primer plantilla se modifica con una marcador que facilita purificación de los productos de PCR. La modificación es preferentemente la misma para todas las plantillas, aunque pueden usarse modificaciones diferentes si se desea separar los productos PCR en grupos diferentes.

[0151] El marcador puede ser un radioisótopo, molécula reportera fluorescente, molécula reportera químluminiscente, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, hapteno, biotina, derivado de biotina, fotobiotina, iminobiotina, digoxigenina, avidina, enzima, acridinio, azúcar, enzima, apoenzima, oligonucleótido homopolimérico, hormona, mitad ferromagnética, mitad paramagnética, mitad diamagnética, mitad fosforescente, mitad luminiscente, mitad electro-química luminscente, mitad cromática, mitad que tiene una resonancia perceptible de

giro de electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica o conductibilidad eléctrica, o combinaciones de ellos.

[0152] En una incorporación preferida, los terminales 5' de las plantillas pueden ser biotiniladas (Kandpal et al., *Nucleic Acids Res.* 18:1789-1795 (1990); Kaneoka et al., *Biotechniques* 10:30-34 (1991); Green et al., *Nucleic Acids Res.* 18:6163-6164 (1990)). La biotina proporciona un marcador de afinidad que puede usarse para purificar el ADN copiado, del ADN genómico o de cualquier otra molécula de ADN que no sea de interés. Las moléculas Biotiniladas pueden purificarse usando una matriz cubierta de estreptavidina, como se ha mostrado en la FIG. 1F, incluido pero no limitado a Streptawell, transparente, placas High-Bind de Roche Molecular Biochemicals (catálogo número 1 645 692, como aparece listado en Roche Molecular Biochemicals, 2001 Biochemicals Catalog).

[0153] El producto de PCR de cada sitio de interés se coloca en los pozos separados de una placa recubierta de estreptavidina. Alternativamente los productos de los sitios de interés de PCR, pueden agruparse y colocarse dentro de una matriz recubierta de estreptavidina, incluida pero no limitada a Streptawell, transparente, placas High Bind de Roche Molecular Biochemicals (catálogo número 1 645 692, según listado en Roche Molecular Biochemicals, 2001 Biochemicals Catalog).

[0154] El ADN amplificado también puede separarse de el template ADN utilizando los métodos de no-afinidad conocidos en la técnica; por ejemplo, por electroforesis del gel poliacrilamido, utilizando los protocolos normales.

Digestión del ADN Amplificado

[0155] El ADN amplificado puede digerirse con una enzima de restricción que reconoce una secuencia que se había proporcionado en la primera o segunda plantilla, utilizando los protocolos normales conocidos dentro de la técnica (FIGS. 6A-6D). La enzima utilizada depende del sitio de reconocimiento de restricción generado con la primera o segunda plantilla. Vea la sección el "Diseño de la Plantilla", para los detalles sobre sitios de reconocimiento de restricción generados en las plantillas.

[0156] Las enzimas de restricción tipo IIS son sumamente útiles en cuanto que ellas fragmentan aproximadamente 10-20 pares de base fuera del sitio de reconocimiento. Preferentemente, las enzimas de restricción Tipo IIS usadas son aquéllas que generan una proyección 5' y un terminal de receso 3', incluido pero no limitado a BceA I y BsmF I (vea por ejemplo Tabla I). En una incorporación preferencial, la segunda plantilla (o delantero o marcha atrás) que recoce cerca del sitio de interés, contiene una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción para BsmF I o BceA I. La enzima de restricción Tipo IIS BsmF I reconoce la secuencia ácido nucleíca GGGAC, y fragmenta 14 nucleótidos del sitio del reconocimiento sobre la cadena no codificante (antisense) y 10 nucleótidos del sitio de reconocimiento sobre la cadena codificante (sense). La digestión con BsmF I genera una proyección 5' de cuatro (4) bases.

[0157] Por ejemplo, si la segunda plantilla se diseña para que después de la amplificación el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción esté 13 bases del sitio de interés, entonces después de la digestión, el sitio de interés es la primera base en la proyección 5' (leyendo 3' a 5'), y el terminal de receso 3' está una base ascendente del sitio de interés. El Terminal de receso 3'

111
puede rellenarse con un nucleótido que es complementario al sitio de interés. Una base de la proyección puede llenarse usando dideoxinucleótidos. Sin embargo, 1,2,3, o todas las 4 bases de la proyección pueden ser llenadas usando deoxinucleótidos o una mezcla de dideoxinucleótidos y deoxinucleótidos.

[0158] La enzima de restricción BsmF I fragmenta el ADN diez (10) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la cadena codificante (sense) y catorce (14) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la cadena no codificante (antisense). Sin embargo, en una secuencia dependiente del tipo, la enzima de restricción BsmF I también fragmenta once (11) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la cadena codificante y quince (15) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la cadena no codificante. Así, existen dos poblaciones de moléculas de ADN después de la digestión: Las moléculas de ADN fragmentadas a 10/14 y las moléculas de ADN fragmentadas a 11/15. Si el sitio de reconocimiento para BsmF I está 13 bases del sitio de interés en el producto amplificado, entonces las moléculas de ADN fragmentadas a la posición 11/15 generarán una proyección 5' que contiene el sitio de interés en la segunda posición de la proyección (leyendo 3' a 5'). El terminal de receso 3' de las moléculas de ADN puede rellenarse con nucleótidos marcados. Por ejemplo, si se usan los dideoxinucleótidos marcados, el terminal de receso 3' de las moléculas fragmentado a 11/15 se rellenaría con una base la cual corresponde a la base ascendente del sitio de interés y el terminal de receso 3' de corte de moléculas a 10/14 se rellenaría con una base que corresponde al sitio de interés. Las moléculas de ADN que han sido fragmentadas en la posición 10/14 y las moléculas de ADN que han sido fragmentadas en la posición 11/15 pueden ser

separadas por tamaño, y los nucleótidos incorporados detectados. Esto permite la detección de ambos: el nucleótido antes del sitio de interés, la detección del sitio, de interés, y potencialmente los tres pares de bases después del sitio de interés.

[0159] Alternativamente, si la base ascendente del sitio de interés y el sitio de interés son nucleótidos diferentes, entonces el terminal recesado 3' de las moléculas fragmentadas a 11/15 puede rellenarse con deoxinucleótido que es complementario a la base ascendente. El deoxinucleótido restante se lava, y el sitio de interés puede ser llenado con cualquiera: deoxinucleótidos marcados, deoxinucleótidos no marcados, dideoxinucleótidos marcados, o dideoxinucleótidos no marcados. Después de la reacción de llenado, el nucleótido puede ser detectado por cualquier método conveniente. Así, después de la primera reacción del llenado con dNTP, el terminal recesado 3' de las moléculas fragmentadas a 10/14 y 11/15 es ascendente del sitio de interés. El terminal recesado 3' puede llenarse ahora en una base la cual corresponde al sitio de interés, dos bases, tres bases o cuatro bases.

[0160] Alternativamente, si la base ascendente del sitio de interés y la base descendente del sitio de interés se reporta ser lo mismo, el terminal recesado 3' de las moléculas fragmentado a 11/15 puede rellenarse con el deoxnucleótido no marcado, seguido por un relleno con el dideoxinucleótido marcado. Por ejemplo, si el nucleótido ascendente del sitio de interés es una citosina, y una citosina es un nucleótido potencial en el sitio de interés, y una adenosina es el primer nucleótido 3' del sitio de interés, una reacción de llenado puede realizarse con el trifosfato de deoxiguanina no codificante (dGTP), seguido por un llenado con el trifosfato de dideoxitimidina marcado. Si el sitio de interés

contiene una citosina, los ddTTP se incorporarán y se detectarán. Sin embargo, si el sitio de interés no contiene una citosina, los dGTP no se incorporarán, lo cual evita la incorporación del ddTTP.

[0161] La enzima de restricción BceA I reconoce la secuencia ácido nucléica ACGGC y fragmenta 12 (doce) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la cadena codificante (sense) y 14 (catorce) nucleótidos del sitio del reconocimiento en la cadena no codificante (antisense). Si la distancia del sitio del reconocimiento para BceA I en la segunda plantilla se diseñó para estar trece (13) bases del sitio de interés (vea las FIGS. 4A-4D), la digestión con BceA I generará una proyección 5' de dos bases, las que contienen el sitio de interés y un receso 3' que es ascendente del sitio de interés. El sitio de interés es el primer nucleótido en la proyección 5' (leyendo 3' a 5').

[0162] La fragmentación alternativa también se observa con la enzima de restricción BceA I, aunque a una mucho menor frecuencia que la observada con BsmF I. La enzima de restricción BceA I puede fragmentar trece (13) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la cadena codificante y quince (15) nucleótidos del sitio de reconocimiento en la cadena no codificante. Así, existen dos poblaciones de moléculas de ADN: Las moléculas de ADN fragmentadas a 12/14 y las moléculas de ADN fragmentadas a 13/15. Si el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción está 13 bases del sitio de interés en el producto amplificado, las moléculas de ADN fragmentadas en la posición 13/15 producen una proyección de 5' que contiene el sitio de interés en la segunda posición de la proyección (leyendo 3' a 5'). Dideoxinucleótidos marcados pueden usarse para rellenar el receso 3' de las moléculas de ADN. Las moléculas de ADN fragmentadas a 13/15 tendrán la base ascendente del

sitio de interés rellenado, y las moléculas de ADN fragmentadas a 12/14 tendrán el sitio de interés llenado. Las moléculas de ADN fragmentadas a 13/15 y aquellas fragmentadas a 12/14 pueden separarse por el tamaño, y los nucleótidos incorporados detectados. Así, el fragmentado alternativo se usa para obtener información adicional de la secuencia.

[0163] Alternativamente, si las dos bases en la proyección 5' son diferentes, el terminal de receso 3' de las moléculas de ADN que fueron fragmentadas en 13/15 puede rellenarse con el deoxinucleótido complementario a la primera base en la proyección, y el exceso de deoxinucleótido lavado. Después de rellenar, el terminal de receso 3' de las moléculas de ADN que fueron fragmentadas en 12/14 y las moléculas de ADN que fueron fragmentadas en 13/15 son ascendentes del sitio de interés. El receso 3' puede llenarse con cualquiera de los dideoxinucleótidos marcados, dideoxinucleótidos sin marcar, deoxinucleótidos marcados, o deoxinucleótidos sin marcar.

[0164] Si las plantillas proporcionan sitios de restricción diferentes para ciertos sitios de interés que fueron copiados, todas las enzimas de restricción necesarias pueden sumarse para digerir simultáneamente el ADN copiado. Alternativamente, los diferentes digeridos de restricción pueden hacerse en la secuencia, por ejemplo, usando una enzima de restricción a la vez, para que sólo se digiera el producto que es específico para esa enzima de restricción.

Incorporación de Nucleótidos Marcados

[0165] La digestión con la enzima de restricción que reconoce la secuencia en la segunda plantilla genera un receso 3' y una proyección 5' que contienen el sitio de interés (FIG. 1G). Los recesos 3' pueden llenarse usando la proyección

5' como un template en la presencia de nucleótidos marcados o no marcados o una combinación de ambos. Los nucleótidos pueden marcarse con cualquier tipo de grupo químico o mitad que permita detección, que incluye pero no se limita a moléculas radiactivas, moléculas fluorescentes, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, haptenos, hidratos de carbono, biotina, los derivados de biotina, mitades fosforescentes, mitades luminiscentes, mitades electroquímiluminiscentes, mitades cromáticas, y mitades que tienen una resonancia perceptible de giro de electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica o conductibilidad eléctrica. Los nucleótidos pueden marcarse con uno o más de un tipo de grupo químico o mitad. Cada nucleótido puede marcarse con el mismo grupo químico o mitad. Alternativamente, cada nucleótido diferente puede marcarse con un grupo químico diferente o mitad. Los nucleótidos marcados pueden ser dNTPs, el ddNTPs, o una mezcla de ambos dNTPs y ddNTPs. Los nucleótidos no marcados pueden ser dNTPs, ddNTPs o una mezcla de dNTPs y ddNTPs.

[0166] Cualquier combinación de nucleótidos puede usarse para incorporar nucleótidos que incluyen pero no se limitan a deoxinucleótidos no marcados, deoxinucleótidos marcados, dideoxinucleótidos no marcados, dideoxinucleótidos marcados, una mezcla de deoxinucleótidos marcados y no marcados, una mezcla de dideoxinucleótidos marcados y no marcados, una mezcla de deoxinucleótidos marcados y dideoxinucleótidos marcados, una mezcla de deoxinucleótidos marcados y dideoxinucleótidos no marcados, una mezcla de deoxinucleótidos no marcados y dideoxinucleótidos no marcados, una mezcla de deoxinucleótidos no marcados y dideoxinucleótidos marcados, análogos del dideoxinucleótido, análogos del deoxinucleótido, una mezcla de

análogos del dideoxinucleótido y análogos del deoxinucleótido, análogos del nucleósido fosforilado, 2-deoxinucleósido-5' trifosfatos y 2'-deoxinucleósido trifosfatos modificados.

[0167] Por ejemplo, como se exhibe en la FIG. 1H, en la presencia de una polimerasa, los recesos 3' puede llenarse con ddNTP fluorescente utilizando la proyección 5' como un template. Los ddNTP incorporados pueden detectarse usando cualquier método conveniente que incluye pero no se limita a la detección de fluorescencia.

[0168] Todos los cuatro nucleótidos pueden marcarse con grupos fluorescentes diferentes lo que permitirá realizar una reacción en presencia de todos los cuatro nucleótidos marcados. Alternativamente, pueden realizarse cinco reacciones separadas de "llenado" para cada sitio de interés; cada una de las cuatro reacciones contendrá un nucleótido marcado diferente (por ejemplo el ddA TP *, ddTTP *, ddUTP *, ddGTP *, o ddCTP *, dónde * indica un nucleótido marcado). Cada nucleótido puede marcarse con grupos químicos diferentes o con los mismos grupos químicos. Los nucleótidos marcados pueden ser dideoxinucleótidos o deoxinucleótidos.

[0169] En otra incorporación, los nucleótidos pueden marcarse con tintes fluorescentes que incluyen pero no se limitan a fluoresceína, pyrene, 7-methoxycumarina, Cascade Blue.TM., Alexa Flur 350, Alexa Flur 430, Alexa Flur 488, Alexa Flur 532, Alexa Flur 546, Alexa Flur 568, Alexa Flur 594, Alexa Flur 633, Alexa Flur, 647, Alexa Flur 660, Alexa Flur 680, AMCA-X, dialquilaminocumarina, Pacific Blue, Marina Blue, BODIPY 493/503, BODIPY FI-X, DTAF, Oregon Green 500, Dansyl-X, 6-FAM, Oregon Green 488, Oregon Green 514, Rhodamine Green-X, Rhodol Green, Calceína, Eosina, bromuro

ethidium, NBD, TET, 2', 4', 5', 7' tetrabromosulfonefluoresceína, BODIPY-R6G, BODIPY-FI BR2, BODIPY 530/550, HEX, BODIPY 558/568, BODIPY-TMR-X., PyMPO, BODIPY 564/570, TAMRA, BODIPY 576/589, Cy3, Rodamine Rojo-x, BODIPY 581/591, carboxiXrhodamina, Texas Red-X, BODIPY-TR-X., Cy5, SpectrumAqua, SpectrumGreen #1, SpectrumGreen #2, SpectrumOrange, SpectmmRed, o naftofluoresceína.

[0170] En otra incorporación, la reacción de "llenado" puede realizarse con los dNTPs fluorescentemente marcados, en donde el nucleótido se marca con diferentes grupos fluorescentes. Los nucleótidos incorporados pueden detectarse por cualquier método conveniente que incluye pero no se limita al Traslado de Energía Fluorescente de Resonancia (FRET).

[0171] En otra incorporación, una mezcla de ddNTPs marcados y dNTPs no marcados puede usarse para rellenar los receso 3' de la secuencia de ADN que contiene el SNP o sitio de interés. Preferentemente, la proyección 5' consiste de más de una base, incluyendo pero no limitado a 2, 3, 4, 5, 6 o más de 6 bases. Por ejemplo, si la proyección 5' consiste en la secuencia "XGAA", en donde X es el sitio de interés, por ejemplo SNP, entonces rellenando con una mezcla de ddNTPs marcados y dNTPs no marcados, producirán diferentes fragmentos ADN. Si un ddNTP marcado es incorporado en la posición "X", la reacción terminará y una sola base marcada se incorporará. Sin embargo, si un dNTP no marcado es incorporado, la polimerasa continúa incorporando otras bases hasta que un ddNTP marcado sea incorporado. Si los dos primeros nucleótidos incorporados son dNTPs, y el tercero es un ddNTP, los terminales de receso 3' se extenderán por tres bases. Este fragmento de ADN puede separarse de los otros fragmentos de ADN que estaban extendidos

por tamaño de 1, 2, o 4 bases. Una mezcla de ddNTPs marcados y dNTPs no marcados permitirá rellenar todas las bases de la proyección, y proporciona información adicional de la secuencia sobre el sitio de interés, por ejemplo SNP (vea las FIGS. 7E y 9D).

[0172] Después de la incorporación del nucleótido marcado, el ADN amplificado puede digerirse con una enzima de restricción que reconoce la secuencia proporcionada por la primera plantilla. Por ejemplo, en la FIG. 11, el ADN amplificado se digiere con una enzima de restricción que enlaza a la región "a," lo cual libera el fragmento de ADN que contiene el nucleótido incorporado de la matriz estreptavidina.

[0173] Alternativamente, una plantilla de cada par para cada sitio de interés puede adjuntarse a una matriz de apoyo sólida que incluye pero no se limita a un pozo de una placa de microtitulación. Por ejemplo, pueden usarse placas de microtitulación cubiertas de estreptavidina para la reacción de amplificación con una plantilla par, en donde una plantilla es biotinilada. Primero, se ligan las plantillas biotiniladas a las placas de microtitulación cubiertas de estreptavidina. Luego, las placas se usan como el vaso de reacción para la amplificación de PCR de los sitios de interés. Después que la reacción de amplificación está completa, las plantillas de exceso, las sales, y el template ADN pueden quitarse lavando. Los ADN amplificados permanecen adjuntos a la placa de microtitulación. El ADN amplificado puede digerirse con una enzima de restricción que reconoce una secuencia en la segunda plantilla y genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés. Los fragmentos digeridos pueden quitarse lavando. Después de la digestión, el sitio SNP o sitio de interés es expuesto a la proyección 5'. Los recesos 3' se llenan con un

nucleótido marcado, incluido pero no limitado a, ddNTP fluorescente en la presencia de un polimerasa. El ADN marcado puede liberarse dentro del sobrenadante en la placa de microtitulación mediante la digestión con una enzima de restricción que reconoce una secuencia en la región 5' de la primera plantilla.

Análisis del sitio de interés

[0174] Los sitios de interés marcados, pueden ser analizados mediante una variedad de métodos que incluyen pero no pueden limitarse a detección de fluorescencia, gel de secuenciación ADN, electrofóresis capilares en una máquina de secuenciación automatizada de ADN, electrofóresis micro canal, y otros métodos de secuenciación, espectrometría de masa, tiempo de vuelo espectrometría de masa, espectrometría de masa cuadrupole, espectrometría de masa sector magnética, espectrometría de masa sector eléctrico, espectrometría infrarroja, espectrometría ultravioleta, amperometría palentiosstática o por técnicas de hibridación ADN que incluyen Absorción Southern, Slot Absorción, Dot Absorción, y microformaciones de ADN, en donde los fragmentos de ADN serían útiles tanto como "pruebas" y "objetivos", ELISA, fluorimetría, y Traslado de Energía Fluorescencia Resonancia (FRET).

[0175] Los sitios de interés pueden analizarse usando electrofóresis de gel seguido por detección de fluorescencia del nucleótido incorporado. Otro método para analizar o leer los sitios de interés es una placa lectora fluorescente o fluorímetro, directamente sobre las placas de 96 pozos cubiertas de estreptavidina. El placa puede colocarse sobre un placa lectora fluorescente o un escáner como el Pharmacia 9200 Typhoon, para leer cada sitio de interés.

[0176] Alternativamente, los productos de PCR de los sitios de interés, pueden agruparse y después de "rellenado", (FIG. 10) los productos pueden separarse por tamaño, usando cualquier método apropiado para el mismo, y luego analizarlo usando una variedad de técnicas que incluyen pero no se limitan a la detección de fluorescencia, gel secuenciador de ADN, electrofóresis capilar en una máquina de secuenciación automatizada ADN, electrofóresis microscópico, otros métodos de secuenciación, técnicas de hibridación ADN que incluyen los Southern Absorcións, Slot Absorcións, Dot Absorcións, y microformaciones de ADN, espectrometría de masa, tiempo de vuelo espectrometría de masa, espectrometría de masas cuadrupole, espectrometría de masa de sector magnético, espectrometría de masa de sector eléctrico espectrometría infrarroja, espectrometría ultravioleta, amperometría potenciométrica. Por ejemplo, la electrofóresis de gel poliacrílamida puede usarse para separar ADN por tamaño y el gel puede examinarse para determinar el color de fluorescencia en cada banda (usando por ejemplo máquina de secuenciación ABI 377 ADN o un Pharmacia Typhoon 9200).

[0177] En otra incorporación, puede usarse un nucleótido para determinar la secuencia de múltiples alelos de un gen. Un nucleótido que termine la reacción de alargamiento puede usarse para determinar la secuencia de múltiples alelos de un gen. En un alelo, el nucleótido terminador es complementario al sitio de interés en la proyección 5' de dicho alelo. El nucleótido es incorporado y termina la reacción. En un alelo diferente, el nucleótido terminante no es complementario a el sitio de interés, lo que permite incorporar un nucleótido no-terminado, al sitio de interés del alelo diferente. Sin embargo, el nucleótido terminante es complementario a un nucleótido descendente del sitio de interés

en la proyección 5' de dicho alelo diferente. La secuencia de los alelos puede determinarse analizando los modelos de incorporación del nucleótido terminante. Los nucleótidos terminantes pueden ser marcados o no marcados.

[0178] En otra a incorporación, el nucleótido de terminación es un nucleótido que termina o impide la reacción de alargamiento, que incluye pero no se limita a un dideoxinucleótido, un derivado de dideoxinucleótido, un análogo del dideoxinucleótido, un homólogo del dideoxinucleótido, un dideoxinucleótido con un grupo químico de azufre, un deoxinucleótido, un derivado del deoxinucleótido, un homólogo del deoxinucleótido, un análogo del deoxinucleótido, y un deoxynucleótido con un grupo químico de azufre, trifosfato arabinosido, un análogo de trifosfato arabinosido, un homólogo de trifosfato arabinosido, o un derivado del arabinosido.

[0179] En otra incorporación, un nucleótido de terminación marcado con una marcador de una mitad generadora de señal, incluido pero no limitado a un tinte fluorescente, puede usarse para determinar la secuencia de alelos de un sitio de interés. El uso de un solo nucleótido marcado con una mitad generadora de señal elimina cualquier clase de dificultades que pueden surgir al usar diferentes mitades fluorescentes. Además, utilizando un nucleótido marcado con una mitad generadora de señal para determinar la secuencia de los alelos de un sitio de interés, reduce el número de reacciones, y elimina los errores del uso de la pipeta.

[0180] Por ejemplo, si la segunda plantilla contiene el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BsmFI, la digestión generará una proyección 5' de 4 bases. La segunda plantilla puede diseñarse de tal modo que el sitio de interés se localice en la primera posición de la proyección. Una proyección

representativa se describe más adelante, dónde R representa el sitio de interés:

5' CAC				
3' GTG	R	T	G	G
Posición de la proyección	1	2	3	4

[0181] Un nucleótido con una mitad generadora de señal puede usarse para determinar si el sitio variable es homócigo o heterócigo. Por ejemplo, si el sitio variable es la adenina (A) o guanina (G), entonces pueden usarse o la adenina o la guanina para determinar la secuencia de los alelos del sitio de interés, con tal de que haya una adenina o una guanina en la proyección en la posición 2,3, o 4.

[0182] Por ejemplo, si el nucleótido en posición 2 de la proyección es timidina, que es complementaria a la adenina, entonces el ddATP marcado puede usarse; y dCTP, dGTP, y dTTP no marcados pueden usarse para determinar la secuencia de los alelos del sitio de interés. El ddATP puede marcarse con cualquier mitad generadora de señal que incluye pero no puede limitarse a un tinte fluorescente. Si el template ADN es el homócigo para la adenina, entonces el ddA TP * marcado se incorporará a la posición 1 complementaria a la proyección de los alelos, y ninguna incorporación nucleótida se verá en la posición 2, 3 o 4 complementaria a la proyección.

Alelo 1	5' CCC	A *				
	3'GGG	T	T	G	G	
Posición de la Proyección		1	2	3	4	
Alelo 2	5' CCC	A *				

	3'GGG	T	T	G	G
Posición de la proyección	1	2	3	4	

[0183] Se observará una señal que corresponde a la incorporación del ddA TP marcado en la posición 1 complementaria a la proyección, lo cual indica que el individuo es homócigo para adenina en esta posición. Este método de marcar elimina cualquier dificultad que puede surgir de usar tintes distintos que tienen coeficientes cuánticos diferentes.

Homócigo Guanina:

[0184] Si el template ADN es homócigo para la guanina, entonces ningún ddATP se incorporará a la posición 1 complementaria a la proyección, pero ddA TP se incorporará a la primera posición disponible, que en este caso es la posición 2 complementaria a la proyección. Por ejemplo, si la segunda posición en la proyección corresponde a una timidina, entonces:

Alelo 1	5' CCC	G	A *		
	3' GGG	C	T	G	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' CCC	G	A *		
	3' GGG	C	T	G	G
Posición de la proyección		1	2	3	4

[0185] Se observará una señal que corresponde a la incorporación de ddATP en la posición 2 complementaria a la proyección, lo que indica que el individuo

es homólogo para la guanina. Las moléculas que están llenas en la posición 2 complementaria a la proyección, tendrán un peso molecular diferente que las moléculas llenas en la posición 1 complementarias a la proyección.

[0186] Condición de los Heterocigos:

Alelo 1	5' CCC	A *			
	3' GGG	T	T	G	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' CCC	G	A *		
	3' GGG	C	T	G	G
Posición de la proyección		1	2	3	4

[0187] Se verán dos señales; la primera señal corresponde al ddATP lleno en la posición uno complementaria a la proyección y la segunda señal corresponde al ddATP lleno en la posición 2 complementaria a la proyección. Las dos señales pueden separarse con base en el peso molecular; alelo 1 y alelo 2 estarán separados por un solo par de bases, lo que permite la detección fácil y la cuantificación de señales. Las moléculas rellenas en la posición uno pueden ser distinguidas de las moléculas rellenas en la posición dos, utilizando cualquier método que discrimine con base en el peso molecular, que incluye pero no se limita a electrofóresis gel, electrofóresis gel capilar, secuenciación de ADN, y espectrometría de masa. No es necesario que el nucleótido se marque con un medio químico; las moléculas de ADN correspondientes a diferente alelos pueden separarse con base en el peso molecular.

[0188] Si la posición de la proyección 2 no es complementaria con la adenina, es posible que las posiciones 3 o 4 puedan ser complementarias con la misma. Por ejemplo la posición de la proyección 3 puede ser complementaria al nucleótido de adenina, en tal caso que caso el ddATP marcado puede usarse para determinar la secuencia de ambos alelos.

[0189] Homócigo para la adenina:

Alelo 1	5' CCC	A *			
	3' GGG	T	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' CCC	A *			
	3' GGG	T	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4

[0190] Homócigo para la guanina:

Alelo 1	5' CCC	G	C	A *	
	3' GGG	C	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' CCC	G	C	A *	
	3' GGG	C	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4

[0191] Heterócigos:

Alelo 1	5' CCC	A *			
	3'GGG	T	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' CCC	G	C	A*	
	3' GGG	C	G	T	G

Posición de la proyección 1 2 3 4

[0192] Se observarán dos señales; la primera señal corresponde al ddATP rellenado en la posición 1 complementaria a la proyección y la segunda señal corresponde al ddATP que rellenó la posición 3 complementaria a la proyección. Las dos señales pueden separarse con base en el peso molecular, alelo 1 y alelo 2 se separarán por dos bases, que pueden detectarse usando cualquier método que discrimine con base en el peso molecular.

[0193] Alternativamente, si las posiciones 2 y 3 no son complementarias a la adenina (es decir, las posiciones 2 y 3 de la proyección corresponden a guanina, citosina, o adenina) pero la posición 4 es complementaria a la adenina, el ddA TP marcado puede usarse para determinar la secuencia de ambos alelos.

[0194] Homócigo para la adenina:

Alelo 1	5' CCC	A *				
	3' GGG	T	G	G	T	
Posición de la proyección		1	2	3	4	
Alelo 2	5' CCC	A *				
	3' GGG	T	G	G	T	
Posición de la proyección		1	2	3	4	

[0195] Se observará una señal que corresponde al peso molecular de las moléculas rellenadas con ddATP en la posición uno complementaria a la proyección, lo cual indica que el individuo es homócigo para la adenina en el sitio variable.

[0196] Homócigo para la guanina:

Alelo 1	5' CCC	G	C	C	A *
---------	--------	---	---	---	-----

	3'GGG	C	G	G	T	
Posición de la proyección			1	2	3	4
Alelo 2	5' CCC	G	C	C	A *	
	3'GGG	C	G	G	T	
Posición de la proyección		1	2	3	4	

[0197] Se verá una señal que corresponde al peso molecular de moléculas rellenas en la posición 4 complementaria a la proyección, lo que indica que el individuo es homócigo para la guanina.

[0198] Heterócigos:

Alelo 1	5' CCC	A*				
	3' GGG	T	G	G	T	
Posición de la proyección		1	2	3	4	
Alelo 2	5' CCC	G	C	C	A*	
	3' GGG	C	G	G	T	
Posición de la proyección		1	2	3	4	

[0199] Se observarán dos signos; el primer signo corresponde al ddATP relleno en la posición uno complementaria a la proyección y el segundo signo corresponde al ddATP que relleno la posición 4 complementaria a la proyección. Los dos signos pueden separarse con base en el peso molecular; alelo 1 y alelo 2 serán separados por tres bases, lo que permite la detección y cuantificación de los signos. Las moléculas llenadas en la posición 1 y aquellas llenadas en la posición 4, pueden distinguirse con base en el peso molecular.

[0200] Como se discutió anteriormente, si el sitio variable contiene la adenina o la guanina, cualquiera de las dos: la adenina o la guanina marcada, pueden

usarse para determinar la secuencia de ambos alelos. Si las posiciones 2,3, o 4 de la proyección no son complementarias a la adenina, pero una de las posiciones es complementaria a una guanina, entonces pueden usarse los ddGTP marcados para determinar si el template ADN es homócigo o heterócigo para adenina o guanina. Por ejemplo, si la posición 3 en la proyección corresponde entonces a una citosina entonces se esperarán los signos siguientes si el template ADN es homócigo para la guanina, para la adenina; o heterócigo:

[0201] Homócigo para la guanina:

Alelo 1	5' CCC	G *			
	3' GGG	C	T	C	T
Posición de la proyección	1	2	3	4	
Alelo 2	5' CCC	G*			
	3' GGG	C	T	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

[0202] Se verá un signo que corresponde al peso molecular de moléculas rellenas con ddGTP en la posición uno, complementaria a la proyección, lo que indica que el individuo es homócigo para la guanina.

[0203] Homócigo para la adenina:

Alelo 1	5' CCC	A	A	G *	
	3' GGG	T	T	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' CCC	A	A	G *	
	3' GGG	T	T	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

[0204] Se verá un signo que corresponde al peso molecular de las moléculas rellenas en la posición 3 complementaria a la proyección, lo que indica que el individuo es homólogo para la adenina en el sitio variable.

[0205] Heterólogos:

Alelo 1	5' CCC	G *				
	3' GGG	C	T	C	T	
Posición de la proyección		1	2	3	4	
Alelo 2	5' CCC	A	A	G *		
	3' GGG	T	T	C	T	
Posición de la proyección		1	2	3	4	

[0206] Se verán dos signos; el primer signo corresponde al ddGTP relleno en la posición uno complementaria a la proyección y el segundo signo corresponde al ddGTP relleno en la posición 3 complementaria a la proyección. Los dos signos pueden separarse con base en el peso molecular; alelo 1 y alelo 2 serán separados por dos bases, lo que permite la detección fácil y la cuantificación de los signos.

Algunos tipos de enzimas de restricción IIS también despliegan fragmentación alterna, como se discutió anteriormente. Por ejemplo, BsmFI fragmentará a 10/14 y 11/15 del sitio de reconocimiento. Sin embargo, los patrones de fragmentación no son mutuamente exclusivos; si el patrón de fragmentación 11/15 es visto en una secuencia particular, el fragmento 10/14 también se ve. Si la enzima de restricción BsmF I fragmenta a 10/14 del sitio de reconocimiento, la proyección 5' será X₁X₂X₃X₄. Si BsmF I fragmenta 11/15 del sitio de reconocimiento, la proyección 5' será X₀X₁X₂X₃. Si la posición X₀ de la proyección es complementaria al nucleótido marcado, el nucleótido marcado se

incorporará a la posición X_0 y proporcionará un nivel adicional de aseguramiento de la calidad. Esto proporciona información adicional de la secuencia.

[0208] Por ejemplo, si el sitio variable es adenina o guanina, y la posición 3 en la proyección es complementaria a la adenina, el ddATP marcado puede usarse para determinar el genotipo en el sitio variable. Si la posición 0 de la proyección 11/15 contiene el nucleótido complementario a la adenina, el ddATP se rellenará y se observará una señal adicional.

[0209] Heterócigos:

10/14 Alelo 1	5' CCA	A*			
	3'GGT	T	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4

10/14 Alelo 2	5'CCA	G	C	A*	
	3'GGT	C	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4

11/15 Alelo 1	5' CC	A*			
	3' GG	T	T	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3

11/15 Alelo 2	5' CC	A*			
	3' GG	T	C	G	T
Proyección de la posición		0	1	2	3

[0210] Se observan tres signos; uno correspondiente al ddATP incorporado en la posición 0 complementaria a la proyección, otro correspondiente al ddATP incorporado en la posición 1 complementaria a la proyección, y otro correspondiente al ddATP incorporado en la posición 3 complementaria a la proyección. Las moléculas rellenas en las posiciones 0, 1, y 3 complementarias a la proyección difieren en el peso molecular y pueden separarse usando cualquier técnica que discrimine con base en el peso molecular, que incluye pero no se limita a gel electroforesis, y espectrometría de masa.

[0211] Para cuantificar la proporción de un alelo a otro o al determinar la cantidad relativa de una secuencia mutante de ADN en presencia de una secuencia de ADN tipo nativo, debe usarse un método exacto y de detección muy sensible. La fragmentación alternada desplegado por las enzimas de restricción tipo IIS puede aumentar la dificultad para determinar las proporciones de un alelo a otro, porque la enzima de restricción no puede exhibir igualmente el patrón de fragmentación alternado (11/15) en los dos alelos. Por ejemplo, el alelo 1 puede fragmentarse 10/14, el 80% del tiempo, y 11/15, el 20% del tiempo. Sin embargo, debido a que los dos alelos pueden diferir en la secuencia, el alelo 2 puede fragmentarse a 10/14 el 90% del tiempo, y 11/15 el 20% del tiempo.

[0212] Para propósitos de cuantificación, el problema de fragmentación alternada puede eliminarse cuando el nucleótido en posición 0 de la proyección no es complementario al nucleótido marcado. Por ejemplo, si el sitio variable corresponde a adenina o guanina, y la posición 3 de la proyección es complementaria a la adenina (o sea: una timidina se localiza en la posición 3 de

la proyección), pueden usarse los ddATP marcados para determinar el genotipo del sitio variable. Si la posición 0 de la proyección generada por las propiedades fragmentantes 11/15, no es complementaria a la adenina, (es decir: la posición 0 de la proyección corresponde a guanina, citosina, o adenina) ninguna señal adicional será vista de las porciones que fueron fragmentadas 11/15 del sitio de reconocimiento. La posición 0 complementaria a la proyección puede ser llenada con el nucleótido no marcado, eliminando cualquier complejidad vista desde el patrón fragmentante alterno de las enzimas de restricción. Este procedimiento proporciona un método de alta exactitud para cuantificar la proporción de un sitio variable, que incluye pero no se limita a una mutación, o un solo polimorfismo de nucleótido.

[0213] Por ejemplo, si SNP X puede ser adenina o guanina, este método de marcado permite la cuantificación de alelos que corresponden a la adenina y alelos que corresponden a la guanina, sin determinar si el enzima de restricción exhibe alguna diferencia entre alelos con respecto a los patrones de fragmentación alternados.

[0214] Heterócigos:

10/14 Alelo 1	5'CCG	A*			
	3' GGC	T	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4
10/14 Alelo 2	5' CCG	G	C	A*	
	3' GGC	C	G	T	G
Posición de la proyección		1	2	3	4

[0215] La proyección generada por las propiedades de fragmentación alternada de BsmF I se muestra enseguida:

11/15 Alelo 1	5CC				
	3'GG	C	T	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3
11/15 Alelo 2	5' CC				
	3' GG	C	C	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3

[0216] Después de rellenar con el ddATP marcado y dGTP, dCTP, Dttp no marcados, se generarían las siguientes moléculas:

11/15 Alelo 1	5' CC	G	A*		
	3' GG	C	T	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3
11/15 Alelo 2	5' CC	G	G	C	A*
	3'GG	C	C	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3

[0217] Se observan dos signos; uno correspondiente a las moléculas llenas con ddA TP en la posición uno, complementaria a la proyección y otro signo correspondiente a las moléculas llenas con ddATP en la posición 3 complementaria a la proyección. La posición 0 de la proyección 11/15 se llenó con nucleótido no marcado lo que elimina cualquier dificultad en la cuantificación de proporción para el nucleótido en el sitio variable en alelo 1 y el nucleótido en el sitio variable en alelo 2.

[0218] Puede usarse cualquier nucleótido incluso la adenina, derivados de adenina, homólogos de adenina, guanina, derivados de guanina, homólogos de guanina, citosina, derivados de citosina, homólogos de citosina, timidina, derivados de timidina, homólogos de timidina, o cualquier combinación de

adenina, derivados de adenina, homólogos de adenina, guanina, derivados de guanina, homólogos de guanina, citosina, derivados de citosina, homólogos de citosina, timidina, derivados de timidina, u homólogos de timidina.

[0219] Los nucleótidos pueden marcarse con cualquier grupo químico o medio, incluyendo pero no limitando a las moléculas radiactivas, moléculas fluorescentes, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, haptenos, hidratos de carbono, biotina, derivados de biotina, mitades fosforescentes, mitades luminiscentes, mitades electro-químiluminiscentes, mitades cromáticas, y mitades que tienen una resonancia perceptible de giro de electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica o conductibilidad eléctrica. Los nucleótidos pueden marcarse con uno o más de un tipo de grupos o mitades químicas.

[0220] En otra incorporación, pueden usarse los nucleótidos marcados y no marcados.

Cualquier combinación de deoxinucleótidos y dideoxinucleótidos pueden usarse incluyendo pero no limitando a dideoxinucleótidos y deoxinucleótidos marcados; dideoxinucleótidos marcados y deoxinucleótidos no marcados; dideoxinucleótidos no marcados y deoxinucleótidos no marcados; y dideoxinucleótidos no marcados y deoxinucleótidos marcados.

[0221] En otra incorporación, pueden usarse nucleótidos marcados con una mitad química en la reacción de PCR. Nucleótidos no marcados se usan entonces para llenar las proyecciones 5' generadas después de la digestión con la enzima de restricción. Puede usarse un nucleótido de terminación, no marcado, en presencia de nucleótidos no marcados para determinar la secuencia de los alelos de un sitio de interés.

[0222] Por ejemplo, si se utilizó el dTTP marcado en la reacción de PCR, se generaría la siguiente proyección 5' después de la digestión con BsmF I:

10/14 Alelo 1	5' CT*G	A				
	3' GAC	T	G	T	G	
Posición de la proyección		1	2	3	4	
10/14 Alelo 2	5' CT*	G	C	A		
	3' GAC	C	G	T	G	
Posición de la proyección		1	2	3	4	

[0223] El ddATP, el dCTP, el dGTP, y los dTTP no marcados, pueden usarse para llenar la proyección 5'. Se generarán dos signos; un signo corresponde a las moléculas ADN rellenas con ddATP no marcado en la posición 1 complementaria a la proyección y el segunda signo corresponde a moléculas de ADN rellenas con ddATP no marcado en la posición 3 complementaria a la proyección. Las moléculas de ADN pueden separarse con base en el peso molecular y pueden detectarse por la fluorescencia del dTTP que fue incorporado durante la reacción PCR.

[0224] Los sitios ADN marcados de sitios de interés seleccionados pueden ser analizados mediante una variedad de métodos que incluyen pero no pueden limitarse a detección de fluorescencia, gel secuenciación de ADN, electrofóresis capilar en una máquina de secuenciación de ADN automatizada, electrofóresis micro canal microscópico, y otros métodos de secuenciación, espectrometría de masa, espectrometría de masa de tiempo de vuelo, espectrometría de masa quadripolo, espectrometría de masa de sector

magnético, espectrometría infrarroja de masa sector eléctrico, espectrometría ultravioleta, amperometría palentiosstática o por técnicas hibridación ADN que incluyen Absorciones Southern, Absorciones Slot, Absorciones Dot, y microformaciones de ADN, en donde los fragmentos de ADN serían útiles tanto como "pruebas" y "objetivos", ELISA, fluorimetría, y Traslado de Energía Fluorescencia Resonancia(FRET).

[0225] Este método de marcado es sumamente sensible y permite la detección de alelos de un sitio de interés que están en varias proporciones, que incluyen pero no se limitan a 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6-1:10, 1:11-1:20, 1:21-1:30, 1:31-1:40, 1:41-1:50, 1:51-1:60, 1:61-1:70, 1:71-1:80, 1:81-1:90, 1:91-1:100, 1:101-1:200, 1:250, 1:251-1:300, 1:301-1:400, 1:401-1:500, 1:501-1:600, 1:601-1:700, 1:701-1:800, 1:801-1:900, 1:901-1:1000, 1:1001-1:2000, 1:2001-1:3000, 1:3001-1:4000, 1:4001-1:5000, 1:5001-1:6000, 1:6001-1:7000, 1:7001-1:8000, 1:8001-1:9000, 1:9001-1:10.000, 1:10.001-1:20.000, 1:20.001-1:30.000, 1:30.001-1:40.000, 1:40.001-1:50.000, y mayor de 1:50000.

[0226] Por ejemplo, este método de marcado permite a un nucleótido marcado con una mitad generadora de señal, ser usado para determinar la secuencia de alelos en un sitio de SNP, o detecta un alelo mutante entre una población de alelos normales, o detecta un alelo que codifica resistencia antibiótica de una célula bacteriana entre los alelos de bacterias sensibles a antibióticos, o detecta un alelo de un virus resistente a la droga, entre alelos de un virus sensible a la droga, o detecta un alelo de una cepa bacteriana no patógena entre los alelos de una cepa bacteriana patógena.

[0227] Como se mostró anteriormente, un solo nucleótido puede usarse para determinar la secuencia de alelos en un sitio de particular de interés. Este

método es especialmente útil para determinar si un individuo es homócigo o heterócigo para una mutación particular o para determinar la secuencia de alelos en un sitio particular SNP. Este método de rotular elimina cualquier error causado por los coeficientes cuantitativos de los varios tintes. También permite a la reacción proceder en un solo vaso de reacción que incluye pero no se limita un pozo de una placa de microtitulación, o a un solo tubo Eppendorf.

[0228] Este método de rotular es especialmente útil para el detección de signos genéticos múltiples en la misma muestra. Por ejemplo, este método es útil para la detección de ADN fetal en la sangre, suero, o plasma, de una mujer embarazada que contiene ambos: ADN materno y ADN fetal. El ADN materno y fetal pueden estar presentes en la sangre, suero o plasma, en las proporciones 97:3; sin embargo, el método antes descrito puede usarse para detectar el ADN fetal. Este método de rotular puede usarse para detectar dos, tres, o cuatro diferentes signos genéticos en la población de la muestra.

[0229] Este método de rotular es especialmente útil para el detección de un alelo mutante que está entre una población grande de alelos de tipo nativo. Además, este método de rotular permite la detección de una sola célula mutante en una población grande de células de tipo nativo. Por ejemplo, este método de marcado puede usarse para detectar una simple célula cancerosa entre una población grande de células normales. Típicamente, las células cancerosas tienen mutaciones en la secuencia de ADN. La secuencia mutante de ADN puede identificarse aun cuando haya amplios antecedentes de secuencia ADN de tipo nativo. Este método de rotular puede usarse para proteger, detectar, o diagnosticar cualquier tipo de cáncer que incluye pero no

se limita al colon, renal, pecho, seno, hígado, riñón, cerebro, pulmón, próstata, y cánceres de la sangre incluso la leucemia.

[0230] Este método de marcado también puede usarse para detectar los organismos patógenos, incluidos pero no limitados a bacterias, hongos, virus, protozoarios, y micobacteria. También puede usarse para diferenciar entre cepas patógenas de microorganismo y cepas de microorganismos no patógenos, incluidos pero no limitados a bacterias, hongos, virus, protozoarios, y micobacteria.

[0231] Por ejemplo existen varias cepas de *Escherichia coli*, (*E. coli*), y la mayoría no son patógenas. Sin embargo, varias cepas, como la *E. coli* O157 es patógena. Existen diferencias genéticas entre las cepas de *E. coli* patógenas y no patógenas. El método de rotular descrito anteriormente puede usarse para detectar microorganismos patógenos en una población grande de organismos no patógenos, los que a veces son asociados con la flora normal de un individuo.

[0232] En otra incorporación, la secuencia del sitio de interés puede ser determinada detectando la incorporación de un nucleótido que está 3' al sitio de interés, donde dicho nucleótido es un nucleótido diferente de los posibles nucleótidos en el sitio de interés. Esta incorporación es especialmente útil para la secuenciación y detección de SNPs. La eficacia y tasa a la cual las polimerasas de ADN incorporan los nucleótidos, varía para cada nucleótido.

[0233] Según la información del Human Genome Project, 99% de todos los SNPs son binarios. La secuencia del genoma humano puede usarse para determinar el nucleótido que está 3' al SNP de interés. Cuando el nucleótido que está 3' al sitio de SNP difiere del posible nucleótido al sitio de SNP, un

nucleótido que es uno o más que una base 3' al SNP, puede usarse para determinar la identidad del SNP.

[0234] Por ejemplo, suponga que se debe determinar la identidad de SNP X en el cromosoma 13. La secuencia del genoma humano indica que ese SNP X puede ser adenosina o guanina y que un nucleótido 3' al sitio de interés es una timidina. Una plantilla que contiene un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BsmF I la cual está diseñada para estar 13 bases del sitio de interés después de la amplificación, es utilizada para amplificar un fragmento ADN que contiene la SNP X. La digestión con la enzima de restricción BsmF I genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés que o puede ser o adenosina o guanina. Los productos de la digestión pueden dividirse en dos reacciones de "llenado": una contiene el dTTP, y la otra contiene el dCTP. Si el sitio de interés es homócigo para guanina, sólo las moléculas de ADN que fueron mezcladas con el dCTP se rellenarán. Si el sitio de interés es homócigo para la adenosina, sólo las moléculas de ADN que fueron mezcladas con el dTTP se rellenarán. Si el sitio de interés es heterócigo, las moléculas de ADN que fueron mezcladas con el dCTP se rellenarán, así como también las moléculas de ADN que fueron mezcladas con dTTP. Después de lavar para quitar el dNTP excedente, las muestras se llenan con el ddATP marcado que es complementario al nucleótido (timidina) ése es 3' al sitio de interés. Las moléculas de ADN que fueron llenas mediante la reacción anterior, se rellenarán con el ddA marcado TP. Si el individuo es homócigo para la adenosina, las moléculas de ADN que fueron mezcladas con el dTTP, se rellenarán posteriormente con el ddATP marcado. Sin embargo, las moléculas de ADN que fueron mezcladas con dCTP, no habrían incorporado ese

nucleótido, y por consiguiente, no podrían incorporar el ddATP. La detección de ddATP marcado sólo en las moléculas que fueron mezcladas con dTTP indica que la identidad del nucleótido en SNP X en el cromosoma 13, es adenosina.

[0235] En otra incorporación, el tamizado en grande escala puede ser realizado para la presencia o ausencia de mutaciones de nucleótido simple. De uno a decenas a centenares a miles de sitios de interés en un solo cromosoma o en múltiples cromosomas pueden ser amplificados con las plantillas como se describió anteriormente en la sección "Diseño de la Plantilla". Las plantillas pueden diseñarse para que cada uno de los sitios de interés amplificado sea de un tamaño diferente (FIG. 2). Los sitios amplificados de interés que se predican, con base en las secuencias de tipo nativo publicadas, tienen el mismo nucleótido en el sitio de interés, pueden agruparse juntos, pueden ligarse a un apoyo sólido, incluso los pozos de un placa microtitulación cubiertos con estreptavidina, y pueden digerirse con la enzima de restricción que ligará el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla. Después de la digestión, el recesado 3' puede rellenarse con una mezcla de ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP, marcados, dónde cada nucleótido se rotula con un grupo diferente. Después de lavar para quitar el exceso nucleótido, pueden detectarse los espectros de fluorescencia usando una placa lectora o fluorímetro, directamente en las placas recubiertas de estreptavidina. Si todos los 50 sitios de interés contienen el nucleótido del tipo nativo, solamente se observarán los espectros de fluorescencia. Sin embargo, si uno o más de uno de los 50 sitios de interés contienen una mutación, se incorporará un nucleótido diferente y se verá otro patrón(es) de fluorescencia. Los nucleótidos pueden liberarse de la matriz sólida, y analizarse en un gel de secuenciación para

determinar los sitios de interés que contenían las mutaciones. Como cada uno de los 50 sitios de interés es de diferente tamaño, ellos se separarán en un gel de secuenciación.

[0236] Los sitios múltiples de interés pueden ser de una muestra de ADN de un individuo representando múltiples sitios de interés en un solo cromosoma, múltiples cromosomas, múltiples genes, un solo gen, o cualquier combinación de ellos. Los sitios múltiples de interés también pueden representar el mismo sitio de interés pero de múltiples individuos. Por ejemplo, 50 muestras de ADN de 50 individuos diferentes pueden agruparse y pueden analizarse para determinar un nucleótido particular de interés en el gen "X."

[0237] Cuando la data humana está analizándose, la secuencia conocida puede ser una secuencia específica que ha sido determinada de un individuo (incluso por ejemplo el individuo cuyo ADN está analizándose actualmente), o puede ser una secuencia de consenso como aquella publicada como parte del genoma humano.

Kits (Equipos)

[0238] Los métodos de la invención son más convenientemente practicados mediante el suministro de reactivos usados en los métodos en forma de Kits. Un kit contiene uno o preferentemente, más de los componentes siguientes: instrucciones escritas para el uso del kit, búfers apropiados, sales, detergentes de extracción ADN, plantillas, nucleótidos, nucleótidos marcados, materiales de modificación del terminal 5', y si se desea, agua de la pureza apropiada confinada en recipientes o paquetes separados; tales componentes le permiten al usuario del kit extraer la muestra ácido nucléica apropiada, y

analizar la mismo según los métodos de la invención. Los plantillas que se proporcionan con el equipo variarán, dependiendo del propósito del kit y el ADN que se requiere ser probado usando el kit. En las incorporaciones preferidas los kits contienen un plantilla que permite la generación de un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción de tal manera que esa digestión con la enzima procrea en el fragmento de ADN generado durante el método de secuenciación, una proyección 5' que contiene el sitio de interés.

[0239] También puede diseñarse un kit para detectar un polimorfismo sencillo de nucleótido o una variedad, sobre todo aquéllos asociados con una condición no deseada o una enfermedad. Por ejemplo, un equipo puede comprender, entre otros componentes, un juego o juegos de plantillas para amplificar uno o más sitios de interés asociados con el cáncer del pecho. Otro equipo puede comprender, entre otros componentes, un juego o juegos de plantillas para genes asociados con una predisposición para desarrollar el tipo de diabetes I o diabetes II. Aún más, otro equipo puede comprender, entre otros componentes, un juego o juegos de plantillas para genes asociados con una predisposición para desarrollar enfermedades cardíacas. Se proporcionan detalles de utilidades para los tales equipos en la sección de "Utilidades" más adelante.

Utilidades

[0240] Los métodos de la invención pueden usarse siempre que se desee conocer la secuencia de cierto ácido nucleico, sitio de interés o sitios de interés de éste. El método de la invención es especialmente útil cuando se aplica al ADN genómico. Cuando el ADN de un sitio o sitios de interés organismo-específico o de especie-específica se amplifica, el método de la invención

puede usarse en el proceso de genotipo para la identificación de la fuente del ADN, y así confirma o proporciona la identidad del organismo o especie de la cual se deriva la muestra de ADN. El organismo puede ser cualquier ácido nucleico que contenga el organismo, por ejemplo, virus, bacteria, levadura, planta, animal o humano.

[0241] Dentro de cualquier población de organismos, el método de la invención es útil para identificar las diferencias entre la secuencia de la muestra del ácido nucleico y aquella de un ácido nucleico conocido. Por ejemplo, tales diferencias pueden incluir variaciones del alélico, mutaciones, polimorfismos y especialmente polimorfismos de nucleótidos sencillos.

[0242] En una incorporación preferida, el método de la invención proporciona un método para la identificación de polimorfismos de nucleótidos sencillos.

[0243] En una incorporación preferida, el método de la invención proporciona un método para identificación de la presencia de una enfermedad, sobre todo una enfermedad genética que surge como resultado de la presencia de una secuencia genómica, u otra condición biológica que se desea identificar en un individuo para lo cual se desea conocer la condición. Puede usarse la identificación de tal secuencia en el sujeto con base en la presencia de tal secuencia genómica, por ejemplo, para determinar si el sujeto es un portador o para evaluar si el sujeto está predispuesto a desarrollar un cierto rasgo genético, condición o enfermedad. El método de la invención es especialmente útil en la comprobación genética prenatal de padres e hijo. Ejemplos de algunas de las enfermedades que pueden diagnosticarse mediante esta invención, se listan en la Tabla II.

Acondroplasia
Adrenoleucodistrofia, X-enlace
Agamaglobulinemia, X-enlace
Síndrome de Alagille
Alfa-Talasemia X-enlace Síndrome de Retraso Mental
Enfermedad de Alzheimer
Enfermedad de Alzheimer, Temprano-Comienzo Familiar
Esclerosis Amiotrófica Lateral Apreciación global
Síndrome de Insensibilidad Andrógena
Síndrome de Angelman
Apreciación global de la Ataxia, Hereditaria
Ataxia Telangiectasia
Distrofia Muscular Becker (también Las Distrofinopatías)
Síndrome de Beckwith-Wiedemann
Beta-Talasemia
Deficiencia de Biotinidasa
Síndrome Branquiotorenal
Cáncer Seno/Ovario Hereditario BRCA1 y BRCA2
Cáncer Mamario
CADASIL
Enfermedad de Canavan
Cáncer
Charcot-Marie-Tooth Neuropatía Hereditaria
Charcot-Marie-Tooth Neuropatía Tipo 1
Charcot-Marie-Tooth Neuropatía Tipo 2
Charcot-Marie-Tooth Neuropatía Tipo 4

Charcot-Marie-Tooth Neuropatía Tipo X
Síndrome de Cockayne
Cáncer del Colon
Aracnodactilia Contractural, Congénita
Síndromes de Craniosinóstosis (FGFR-relacionado)
Fibrosis Quística
Cistinosis
Sordera y Pérdida Auditiva Hereditaria
DRPLA (Atrofia Dentatorubral-Pallidoluisian)
Síndrome de DiGeorge (también 22q11 Síndrome Deletion)
Cardiomiopatía dilatada, X-enlace
Síndrome de Down (Trisomy 21)
Distrofia Muscular Duchenne (también Las Distrofinopatías)
Distonía, Inicio Temprano Primario (DYT1)
Distrofinopatías
Síndrome Ehlers-Danlos, Forma Cifoscoliótica
Síndrome de Ehlers-Danlos, Tipo Vascular
Epidermolisis Bullosa Simplex
Exostosis, Múltiple Hereditaria
Distrofia Muscular Facioscapulohumeral
Trombofilia Factor V Leiden
Poliposis Adenomatosa familiar (FAP)
Fiebre Mediterránea Familiar
Síndrome frágil X
Ataxia de Friedreich
Demencia Frontotemporal con Parkinsonismo-17
Galactosemia

Enfermedad de Gaucher
Hemocromatosis, Hereditaria,
Hemofilia A
Hemofilia B
Telangiectasia Hemorrágica, Hereditaria
Pérdida Auditiva y Sordera, No sindrómica, DFNA3 (Connexin 26)
Pérdida Auditiva y Sordera, No sindrómica, DFNB 1 (Connexin 26)
Paraplejía Espástica hereditaria
Síndrome de Hermansky-Pudlak
Deficiencia Hexosaminidasa A (también Tay-Sachs)
Enfermedad de Huntington
Hipocondroplasia
Ictiosis, Congénita, Recesiva Autosomal
Incontinencia Pigmenti
Enfermedad de Kennedy (también Atrofia Espinal y Bulbar Muscular)
Enfermedad de Krabbe
Neuropatía Óptica Leber Hereditaria
Síndrome de Lesch-Nyhan
Leucemias
Síndrome de Li-Fraumeni
Distrofia Muscular Limb-Girdle
Deficiencia de Lipoproteína Lipasa, Familiar
Lisencefalia
Síndrome de Marfan
MELAS (Mitocondrial Encefalomiopatía, Acidosis Láctica, y episodios como de ataque)
Monosomias
Neoplasia Endocrina Múltiple Tipo 2

Exostosis Múltiple, Hereditaria
Dystrophia Muscular, Congénita
Distrofia Miotónica
Diabetes Nefrogénica Insipidus
Neurofibromatosis 1
Neurofibromatosis 2
Neuropatía con Propensión a Parálisis de Presión, Hereditaria
Enfermedad de Niemann-Pick Tipo C
Síndrome de Rotura Nijmegen
Enfermedad de Norrie
Albinismo Oculocutáneo Tipo 1
Distrofia Muscular Oculofaríngea
Cáncer ovárico
Síndrome de Pallister-Hall
Enfermedad de Parkinson Juvenil Tipo Parkin
Enfermedad de Pelizaeus- Merzbacher
Síndrome de Pendred
Síndrome de Peutz-Jeghers
Deficiencia Fenilalanina Hidroxilasa
Síndrome de Willi- Prader
PROP 1 Relacionada con la Deficiencia Combinada de la Hormona Pituitaria (CPHD)
Cáncer de la próstata
Retinitis Pigmentosa
Retinoblastoma
Síndrome de Rothmund -Thomson
Síndrome de Smith-Lemli-Opitz

Paraplejía Espástica, Hereditaria
Atrofia Muscular Espinal y Bulbar (también Enfermedad Kennedy)
Atrofia Muscular Espinal
Ataxia de Espinocerebelar Tipo 1
Ataxia Epinocerebelar Tipo 2
Ataxia Epinocerebelar Tipo 3
Ataxia Espinocerebelar Tipo 6
Ataxia Espinocerebelar Tipo 7
Síndrome de Stickler (Artrorofthalmopatía Hereditaria)
Tay-Sachs (también Gangliosidosis GM2)
Trisomias
Complejo de Esclerosis Tuberosa
Síndrome de Usher Tipo I
Síndrome de usher Tipo II
Síndrome Velocardiofacial (también Síndrome de Deletion 22q 11)
Síndrome de Hippel-Lindau
Síndrome de Williams
Enfermedad de Wilson
Adrenoleucodistrofia X-enlace
Agamaglobulinemia X-enlace
Cardiomiopatía Dilatada X-enlace (también las Distrofinopatías)
Síndrome de Retraso Mental Facies Hipotónica X-enlace

[0244] El método de la invención es útil para clasificar a un individuo en múltiples sitios de interés, tanto como los diez, cien, o incluso los miles de sitios de interés asociados con un rasgo genético o enfermedad genética, mediante la secuenciación de los sitios de interés que están asociado con el rasgo o

estado de la enfermedad, sobre todo aquellas más frecuentemente asociadas con tal rasgo o condición. La invención es útil para analizar un conjunto particular de enfermedades que incluyen pero no se limitan a enfermedades del corazón, el cáncer, los desórdenes endocrinos, los desórdenes inmunológicos, los desórdenes neurológicos, los desórdenes músculo-esqueléticos, los desórdenes oftalmológicos, las anomalías genéticas, las trisomías, monosomías, transversiones, translocaciones, desórdenes superficiales, y las enfermedades familiares.

[0245] El método de la invención puede usarse para el proceso de genotipo de los microorganismos, para identificar rápidamente la presencia de un microorganismo específico en una sustancia, por ejemplo, una sustancia alimenticia. A ese respecto, el método de la invención proporciona una manera rápida de analizar alimentos, líquidos o muestras del aire, para la presencia de contaminación biológica indeseable, por ejemplo, microbiológica, desechos de material fungal o animal. La invención es útil para detectar una variedad de organismos, incluyendo pero no limitando a bacterias, virus, hongos, protozoarios, mohos, levaduras, plantas, animales, y archaeobacteria. La invención es útil para detectar organismos coleccionados de una variedad de fuentes que incluyen pero no se limitan al agua, el aire, hoteles, salones de conferencias, piscinas, baños, aviones, naves espaciales, trenes, autobuses, automóviles, oficinas, casas, negocios, iglesias, parques, playas, gimnasios, parques de diversión, teatros, y cualquier otra instalación que sea un sitio público de reunión.

[0246] El método de la invención se puede utilizar para probar la presencia de muchos tipos de bacterias o virus en los cultivos de sangres humana o en muestras de sangre animal.

[0247] El método de la invención también puede usarse para confirmar o identificar la presencia de una cepa deseada o indeseada de levadura, o ciertos rasgos de ella, en la fermentación de productos, por ejemplo vino, cerveza, y otros alcoholes o para identificar la ausencia de ellos.

[0248] El método de la invención también puede usarse para confirmar o para identificar la relación de un ADN de secuencia desconocida con un ADN de origen o secuencia conocida, por ejemplo, para el uso en criminología, en la ciencia forense, en pruebas de paternidad o maternidad, en el análisis arqueológico, y similares.

[0249] El método la invención también puede usarse para determinar los genotipos de plantas, árboles y arbustos, plantas híbridas, árboles y arbustos, incluso plantas, árboles y arbustos que producen frutas y verduras y otras cosechas, incluyendo pero no limitados al trigo, cebada, maíz, tabaco, alfalfa, manzanas, albaricoques, plátanos, naranjas, peras, nectarinas, higos, dátiles, pasas, ciruelas, melocotones, albaricoques, los arándanos, fresas, arándanos agrios, bayas, cerezas, kiwis, limas, limones, melones, piñas, plátanos, guayabas, ciruelas, fruta de pasión, mandarinas, toronjas, uvas, sandías, melones, melones honeydew, granadas, ciruela, nueces, alcachofas, brotes del frijol, remolachas, cardo, chayote, endibia, puerros, quingombó, cebollas verdes, cebollines, chalotes, chirivías, batatas, ñames, espárragos, aguacates, colinabo, rutabaga, berenjena, calabaza, nabos, calabazas, tomates, patatas,

pepinos, zanahorias, berza, apio, brócoli, coliflor, rábanos, pimientas, espinaca, champiñones, calabacín, cebollas, guisantes, frijoles, y otras legumbres.

[0250] Sobre todo, el método de la invención es útil para clasificar una mezcla de muestras de ácido nucleico que contiene muchos sitios diferentes de interés y/o una mezcla de muestras ácido nucleicas de fuentes diferentes que serán analizadas para un sitio de interés. Ejemplos de clasificación en gran escala incluyen la toma de pruebas de ácido nucleico de las manadas de animales de las fincas, o cosechas de plantas de alimento como por ejemplo, maíz o trigo, agrupando los mismos, y luego más tarde analizando las muestras agrupadas para la presencia de un marcador genético no deseado, con muestras individuales que sólo se analizan en una fecha posterior si el muestra agrupada indica la presencia de tal secuencia genética indeseable. Un ejemplo de una secuencia genética indeseable sería el detección de una secuencia del ácido nucleica viral o bacteriana en las muestras ácido nucleicas tomadas de animales de la finca, por ejemplo, micobacteria o pezuña y secuencias de virus de enfermedades orales o patógenos fungales o bacteriales de las plantas.

[0251] Otro ejemplo dónde la agrupación de ácido nucleico puede usarse es para probar la presencia de un patógeno o mutación del gen en las muestras de uno o más tejidos de un sujeto animal o humano, vivo o muerto, sobre todo un sujeto que pueda estar en la necesidad de tratamiento, si el patógeno o la mutación se descubre. Por ejemplo, pueden tomarse numerosas muestras de un sujeto animal o humano para ser tamizadas para identificar la presencia de un patógeno o una mutación genética indeseable, los sitios de interés de cada muestra biológica amplificada individualmente, y luego las muestras del ADN

amplificado combinado para la digestión de restricción, "rellenado", y detección. Esto sería útil como tamizado inicial para el ensayo de la presencia o ausencia de sucesiones ácido nucleicas que serían el diagnóstico de la presencia de un patógeno o mutación. Entonces, si la secuencia ácido nucleica no deseada del patógeno o mutación fue detectada, las muestras individuales podrían analizarse separadamente para determinar la distribución de la secuencia. Tal análisis es económico sobre todo cuando hay grandes cantidades de muestras para ser ensayadas. Las muestras de patógenos incluyen la micobacteria, sobre todo aquellas que causan tuberculosis o paratuberculosis, bacterias, especialmente los patógenos bacterianos usados en la guerra biológica, incluyendo el bacilo antracis, y las bacterias virulentas capaces de causar envenenamiento a los alimentos, virus, sobre todo el virus de la gripa y del SIDA, y mutaciones conocidas por estar asociadas con células malignas. Tal análisis también sería ventajoso para la tamización de bacterias patógenas, en gran escala de productos alimenticios

[0252] Recíprocamente, el método de la invención puede usarse para detectar la presencia y distribución de una secuencia genética deseada en varias localizaciones en una planta, animal o humano, o en una población de sujetos, por ejemplo tamizando una muestra combinada seguido por tamizado de muestras individuales, según se necesite.

[0253] El método de la invención es útil para analizar variaciones genéticas de un individuo que tenga un efecto en el metabolismo de los medicamentos, interacciones de medicamentos, y la sensibilidad a un medicamento o a múltiples medicamentos. El método de la invención es especialmente útil en farmacogenómica.

[0254] Habiendo hasta ahora descrito generalmente la invención, la misma se entenderá mejor por la referencia a ciertos ejemplos específicos los cuales se incluyen en el presente documento con fines de ilustración solamente y no se intenta ser limitantes, a menos que se especifique de otra manera.

EJEMPLOS

[0255] Los ejemplos siguientes sólo son ilustrativos y no se intenta limitar el alcance de la invención según lo definido en la reivindicación.

EJEMPLO 1

[0256] Secuencias de ADN fueron amplificadas por PCR, en donde el paso de recocido en el ciclo 1 se realizó a una temperatura específica, y luego se aumentó en el ciclo 2, y posteriormente se aumentó en el ciclo 3 con el propósito de reducir la amplificación no específica. El TMI del ciclo 1 de PCR fue determinado calculando la temperatura de fusión de la región 3' que recocce a el template ADN de la segunda plantilla. Por ejemplo, en la FIG. 1B el TMI puede estar alrededor de la temperatura de fusión de la región "c." La temperatura de recocido se aumentó en el ciclo 2, a TM2, lo cual estaba cercano a la temperatura de fusión de la región 3' que recocce al template ADN de la primera plantilla. Por ejemplo, en la FIG. 1C, la temperatura de recocido (TM2) corresponde a la temperatura de fusión de la región "b " '. En el ciclo 3, la temperatura de recocido se elevó a TM3 que estaba cercana a la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla.

Por ejemplo en la FIG. 1D, la temperatura de recocido (TM3) corresponde a la temperatura de fusión de la región "e" + la región "d". Los ciclos restantes de amplificación se realizaron a TM3.

Preparación del Template ADN

[0257] El template ADN se preparó a partir de una muestra de sangre obtenida por venipuntura de un voluntario humano, con su consentimiento. Se recolectó sangre de 36 voluntarios. La plantilla de ADN de cada muestra de sangre se aisló usando el Kit de QIAamp ADN Blood Midi proporcionada por QIAGEN (Catálogo número 51183). Después de aislamiento, el template de ADN de cada uno de los 36 voluntarios se agrupó para posterior análisis.

Diseño de las Plantillas

[0258] Los siguientes cuatro polimorfismos de nucleótidos sencillos se analizaron: SNP HC21S00340, número de identificación asignado por la base de datos cSNP Human Chromosome 21, (FIG. 3, línea 1) localizada en el cromosoma 21; SNP TSC 0095512 (FIG. 3, línea 2) localizado en el cromosoma 1, SNP TSC 0214366 (FIG. 3, línea 3) localizado en el cromosoma 1; y SNP TSC 0087315 (FIG. 3, línea 4) localizado en el cromosoma 1. La base de datos Del SNP Consortium Ltd, puede accederse en <http://snp.cshl.org/>, dirección del website válida a partir del 14 de febrero, año 2002.

[0259] SNP HC21S00340 se amplificó utilizando las plantillas siguientes:

Primera plantilla:

5' TAGAATAGCACTGAATTCAGGAATACAATCATTGTCAC 3' (SEQ ID NO:9)

Segunda plantilla:

5' ATCACGATAAACGGCCAAACTCAGGTTA 3' (SEQ ID NO:10)

[0260] SNP TSC0095512 fue amplificado usando las plantillas siguientes:

Primera plantilla:

5' AAGTTTAGATCAGAATTCGTGAAAGCAGAAGTTGTCTG 3' (SEQ ID NO:11)

Segunda plantilla:

5' TCTCCAACTAACGGCTCATCGAGTAAAG 3' (SEQ ID NO:12)

[0261] SNP TSC0214366 se amplificó usando los plantillas siguientes:

Primera plantilla:

5'ATGACT AGCTA TGAATTCGTTCAAGGTAGAAAA TGGAA 3' (SEQ NO: 13)

Segunda plantilla:

5' GAGAATTAGAACGGCCCAAATCCCACTC 3' (SEQ ID NO:14)

[0262] SNP TSC 0087315 se amplificó usando los plantillas siguientes:

Primera plantilla:

5' TTACAATGCATGAATTCATCTTGGTCTCTCAAAGTGC 3' (SEQ ID NO:15)

Segunda plantilla:

5' TGGACCATAAACGGCCAAAACTGTAAG 3' (SEQ ID NO:16)

[0263] Todas las plantillas se diseñaron de tal forma que la región 3' era complementaria a la secuencia ascendente o descendente que flanquea cada sitio de interés y la región 5' contenía un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción. La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el terminal 5' y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI. La segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BceA I.

Reacción de PCR

[0264] Se amplificaron todos los cuatro sitios de interés del template ADN genómico usando PCR (Patente U.S. 4.683.195 y 4.683.202). Los

componentes de la reacción de PCR eran como sigue: 40 ng del template ADN, 5µM primera plantilla, 5µM segunda plantilla, 1X HotStarTaq Master Mix, obtenido de QIAGEN (Catálogo No. 203443). El HotStarTaq Master Mix contenía la polimerasa de ADN, búfer de PCR, 200 µM de cada dNTP, y 1.5 mM MgCl₂.

[0265] La amplificación de cada template ADN que contenía el SNP se realizó usando tres series diferentes de temperaturas de recocido, en el presente denominadas: temperatura de recocido de baja severidad, temperatura de recocido de mediana severidad y temperatura de recocido de alta severidad. Sin tener en cuenta el protocolo de temperatura de recocido, cada reacción de PCR consistió de 40 ciclos de amplificación. Se realizaron las reacciones de PCR usando el kit HotStarTaq Master Mix suministrado por QIAGEN. Según instrucciones del fabricante, las reacciones se incubaron a 95°C durante 15 minutos antes del primer ciclo de PCR. El paso de desnaturalización después de que cada paso de extensión se realizó a 95°C durante 30 segundos. La reacción de recocido se realizó a una temperatura que permitió la extensión eficaz sin ningún aumento de la temperatura.

[0266] La reacción de recocido de baja severidad comprendió tres temperaturas de recocido diferentes en cada uno de los primeros tres ciclos. La temperatura de recocido durante el primer ciclo fue de 37°C durante 30 segundos; la temperatura de recocido durante el segundo ciclo fue de 57°C durante 30 segundos; la temperatura de recocido durante el tercer ciclo fue de 64°C durante 30 segundos. El recocido se realizó a 64°C para los siguientes ciclos hasta la culminación.

[0267] Como se mostró en la fotografía del gel (FIG. 3A), se observaron múltiples bandas después de la amplificación del template ADN que contienen SNP TSC 0087315 (línea 4). Amplificación del template de ADN que contiene SNP HC21S00340 (línea 1), SNP TSC0095512 (línea 2), y SNP TSC0214366 (línea 3) generó una sola banda de alta intensidad y una banda de intensidad débil que era de peso molecular más alto. Cuando fueron usadas las condiciones de temperatura de recocido bajas, el producto del tamaño correcto fue generado y éste fue el producto predominante en cada reacción.

[0268] La reacción de recocido de mediana severidad comprendió tres temperaturas de recocido diferentes en cada uno de los primeros tres ciclos. La temperatura de recocido durante el primer ciclo fue de 40°C durante 30 segundos; la temperatura de recocido durante el segunda ciclo fue de 60°C durante 30 segundos; y la temperatura de recocido durante el tercer ciclo fue de 67°C durante 30 segundos. El recocido se realizó a 67°C durante los ciclos siguientes, hasta la culminación. Similar a lo que se observó durante el recocido de baja severidad, la amplificación del template ADN que contiene SNP TSC0087315 (FIG. 3B, línea 4) generó bandas múltiples bajo las condiciones de mediana severidad. La amplificación de los otros tres fragmentos de ADN conteniendo SNPs (líneas 1-3) produjo una sola banda. Estos resultados demuestran que pueden usarse temperaturas de recocido variables para amplificar nitidamente sitios de interés del ADN genómico con un plantilla que tiene una longitud de recocido de 13 bases.

[0269] La reacción de recocido de alta severidad, comprendió tres temperaturas diferentes de recocido en cada uno de los primeros tres ciclos. La temperatura de recocido del primer ciclo fue 46°C durante 30 segundos; la

temperatura de recocido del segunda ciclo fue de 65°C durante 30 segundos; y la temperatura de recocido para el tercer ciclo fue de 72°C durante 30 segundos. El recocido se realizó a 72°C durante los ciclos subsecuentes hasta culminación. Como se mostró en la fotografía del gel (FIG. 3C), la amplificación del template ADN que contiene SNP TSC0087315 (línea 4) usando las temperaturas de recocido de alta severidad, genera una sola banda de peso molecular correcto. Elevando las temperaturas de recocido para cada uno de los primeros tres ciclos, se eliminó la amplificación no-específica. La amplificación del fragmento de ADN que contiene SNP TSC0095512 (línea 2) generó una sola banda. Los fragmentos ADN conteniendo SNPs HC21S00340 (línea 1), y TSC0214366 (línea 3) fallaron la amplificación a las temperaturas de recocido de alta severidad, sin embargo, a las temperaturas de recocido de mediana severidad, estos fragmentos ADN conteniendo SNPs amplificaron como una banda simple. Estos resultados demuestran que se pueden usar temperaturas de recocido variables, para reducir los productos de PCR no-específicos, como se ha demostrado para el fragmento de ADN que contiene SNP TSC0087315 (FIG. 3, línea 4).

EJEMPLO 2

[0270] Se analizaron SNPs en cromosomas 1 (TSC0095512), 13 (TSC0264580), y 21 (HC21S00027). SNP TSC0095512 se analizó usando dos juegos diferentes de plantillas, y SNP HC21S00027 se analizó usando dos tipos de reacciones para la incorporación de nucleótidos.

Preparación del Template ADN

[0271] El template ADN se preparó de una muestra de 5 ml de sangre obtenida mediante venipuntura de un voluntario humano, con su consentimiento. El template ADN se aisló usando el Kit QIAmp ADN Blood Midi proporcionado por QIAGEN (Catálogo número 51183). El template ADN se aisló según las instrucciones incluidas en el equipo. Después del aislamiento, el template ADN de treinta y seis voluntarios humanos se agruparon juntos y se fragmentaron con la enzima de restricción EcoRI. La digestión de la enzima de restricción se realizó según las instrucciones del fabricante.

Diseño de Plantillas

[0272] SNP HC21 S00027 se amplificó mediante PCR usando el siguiente kit de plantilla:

Primera plantilla:

5' ATAACCGTATGCGAATTCTATAATTTTCCTGATAAAGG 3' (SEQ ID NO: 17)

Segunda plantilla:

5' CTAAATCAGGGGACTAGGTAAACTTCA 3' (SEQ ID NO:18)

[0273] La primera plantilla contenía un marcador de biotina al terminal 5', y la secuencia del nucleótido para la enzima de restricción EcoRI. La segunda plantilla contenía la secuencia del nucleótido para la enzima de restricción BsmF I (FIG. 4A).

[0274] También, se amplificó SNP HC21S00027 mediante PCR usando la misma primera plantilla, pero una segunda plantilla diferente, con la secuencia siguiente:

Segunda plantilla:

5' CTAAATCAGACGGCTAGGTAACTTCA 3' (SEQ ID NO:19)

[0275] Esta segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BceA (FIG. 4B).

Se amplificó SNP TSCOO95512 por PCR usando los siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' AAGTTTAGATCAGAA TTCGTGAAAGCAGAAGTTGTCTG 3' (SEQ ID NO:11)

Segunda plantilla:

5' TCTCCAACTAGGGACTCATCGAGTAAAG 3' (SEQ ID NO:20)

[0276] La primera plantilla tenía un marcador de biotina en el terminal 5' y contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción para BsmF I (FIG. 4C).

[0277] También, se amplificó SNP TSCOO95512 usando la misma primera plantilla y un diferente segunda plantilla con la secuencia siguiente:

Segunda plantilla:

5' TCTCCAACTAACGGCTCATCGAGTAAAG 3' (SEQ ID NO: 12)

[0278] Este segunda plantilla contenía el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BceA I (FIG. 4D).

[0279] Se amplificó SNP TSC0264580 que está localizado en el cromosoma 13 con los plantillas siguientes:

Primera plantilla:

5' AACGCCGGGCGAGAATTCAGTTTTTCAACTTGCAAGG 3' (SEQ ID NO:21)

Segunda plantilla:

5' CTACACATATCTGGGACGTIGGCCATCC 3' (SEQ ID NO:22)

[0280] La primera plantilla contenía un marcador de biotina en el terminal 5' y tenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BsmF I.

Reacción PCR

[0281] Se amplificaron todos los sitios de interés del template de ADN genómico, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, U.S. Patente. 4.683.195 y 4.683.202, incorporado aquí para referencia). En este ejemplo, se amplificaron los sitios de interés en tubos de reacción separados pero ellos también podrían amplificarse juntos en una sola reacción PCR. Para aumentar la especificidad, fue usado un "inicio ardiente" de PCR. Se realizaron las reacciones de PCR usando el Kit HotStarTaq Master Mix Kit suministrado por QIAGEN (catálogo número 203443). La cantidad de template ADN y plantilla para reacción puede perfeccionarse para cada sitio de interés, pero en este ejemplo se usaron 40 ng de template ADN genómico humano y 5 µM de cada plantilla. Se realizaron cuarenta ciclos de PCR. Las siguientes condiciones de PCR fueron usadas:

- (1) 95°C durante 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 37°C durante 30 segundos;
- (3) 95°C durante 30 segundos;
- (4) 57°C durante 30 segundos;
- (5) 95°C durante 30 segundos;
- (6) 64°C durante 30 segundos;
- (7) 95°C durante 30 segundos;

(8) Repite los pasos 6 y 7 treinta nueve (39) veces;

(9) 72°C durante 5 minutos.

162

[0282] En el primer ciclo de PCR, la temperatura de recocido estaba cercana a la temperatura de fusión de la región de recocido 3' de las segundas plantillas; que era de 37°C. La temperatura del recocido en el segunda ciclo de PCR estaba cercano a la temperatura de fusión de la región 3' que recoce al templete ADN de la primera plantilla; que era 57°C. La temperatura de recocido en el tercer ciclo de PCR estaba cerca a la temperatura de fusión de la secuencia completa de la segunda plantilla que era 64°C. La temperatura de recocido durante los ciclos restantes fue de 64°C. Realizando una escalada de la temperatura de recocido desde TM1 a TM2 a TM3 en los primeros tres ciclos de PCR, se mejora grandemente la especificidad. Estas temperaturas de recocido son representativas, y el operario experimentado entenderá que la temperatura de recocido para cada ciclo es dependiente de las plantillas específicas utilizadas.

[0283] Las temperaturas y tiempos para desnaturalización, recocido, y extensión, pueden perfeccionarse probando varias escenas y utilizando los parámetros que rindan los mejores resultados. Se muestran esquemáticos de los productos de PCR para SNP HC21S00027 y SNP TSC095512 en las FIGS. 5A-5D.

Purificación del Fragmento que Contiene el Sitio de Interés

[0284] Los productos de PCR fueron separados del templete de ADN genómico. Cada producto de PCR fue dividido en cuatro pozos de reacción

165

separados de un Streptawell transparente, el placa High Bind Alto-Ligamento de los Roche Diagnostics GmbH (catálogo número 1 645692, como se lista en Roche Molecular Biochemicals, 2001 Biochemicals Catalog). Las primeras plantillas contenían un marcador de biotina 5' de manera que los productos PCR se ligaron a los pozos recubiertos de Estreptavidina, mientras que el template del ADN genómico no lo hizo. La reacción de ligamento de la estreptavidina se realizó utilizando un Thermomixer se (Eppendorf) a 1000 rpm durante 20 minutos, a 37°C. Cada pozo fue bien aspirado para quitar el material de ligamento, y se lavó tres veces con un mezclado suave con IX PBS, (Kandpal et al., Nucl. Acids Res. 18: 1789-1795 (1990); Kaneoka et al., Biotechniques 10:30-34 (1991); Green et al., Nucl. Acids Res. 18:6163-6164 (1990)).

Digestión de la Enzima de Restricción de Fragmentos Aislados que Contienen Sitios de Interés

[0285] Los productos de PCR purificados se digirieron con la enzima de restricción que ligó el sitio de reconocimiento incorporado en los productos de PCR de la segunda plantilla. Los templates de ADN que contienen SNP HC21S00027 (FIG. 6A y 6B) y SNP TSC0095512 (el FIG. 6C y 6D) se amplificaron en reacciones separadas usando dos diferentes segundas plantillas. FIG. 6A (SNP HC21S00027) y FIG. 6C (SNP TSC0095512) indican los productos de PCR después de la digestión con la enzima de restricción BsmF I (New England Biolabs catalog number R0572S). FIG. 6B (SNP HC21S00027) y FIG. 6D (SNP TSC0095512) indican los productos de PCR después de la digestión con la enzima de la restricción BceA I (New England

Biolabs, catálogo número R0623S). Las digestiones se realizaron en el Estreptawells siguiendo las instrucciones proporcionadas con la enzima de restricción. El fragmento ADN conteniendo SNP TSC0264580, se digirió con BsmF I. Después de la digestión con la enzima de restricción apropiada, los pozos se lavaron tres veces con PBS para quitar los fragmentos de la ruptura.

Incorporación del Nucleótido Marcado

[0286] La digestión de la enzima de restricción descrita anteriormente rindió un fragmento de ADN con una proyección 5' que contenía el sitio de SNP o sitio de interés y un terminal de receso 3'. La proyección 5' funcionó como un templete permitiendo la incorporación de un nucleótido o nucleótidos en la presencia de una polimerasa de ADN.

[0287] Para cada SNP se realizaron cuatro reacciones de llenado; cada una de las cuatro reacciones contenía un ddNTP diferente, fluorescentemente marcado (ddA TP, ddTTP, ddGTP, o ddCTP). Los siguientes componentes se agregaron a cada reacción de llenado: 1 µl de un ddNTP fluorescentemente marcado, 0.5 µl de ddNTPs no marcado (40 µM) que contenían todos los nucleótidos excepto el nucleótido que se marcó fluorescentemente, 2µ de 10X búfer sequenasa, 0.25µ Sequenasa, y agua, según la necesidad, para una reacción de 20µl. Todas las reacciones de llenado se realizaron a 40°C durante 10 minutos. El ddNTP No-fluorescentemente marcado se obtuvo de Fermentas Inc. (Hannover, MD). Todos los otros reactivos del marcado se obtuvieron de Amersham (Thermo Sequenase Dye Terminator Tinte Cycle Sequencing Core Kit, USA 79565). En la presencia de ddNTPs fluorescentemente marcados, el receso 3' fue extendido una base, lo que corresponde al SNP o sitio de interés (FIG 7A-7D).

[0288] También se usó una mezcla de ddNTPs marcado y dNTPs no marcado, para la reacción de "llenado" para SNP HC21S00027. Las condiciones de "llenado" fueron como se describió anteriormente, excepto que se usó una mezcla conteniendo 40µM de dNTPs no marcados, 1µl de ddATP fluorescentemente marcado, 1µl de ddTTP fluorescentemente marcado, 1µl de ddCTP fluorescentemente marcado, y 1µl de ddGTP. Los ddNTPs fluorescentes fueron obtenidos de Amersham (Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Core Kit, U.S.A. 79565; Amersham no publicó las concentraciones de los nucleótidos fluorescentes). El fragmento de ADN que contiene SNP HC21S00027 se digirió con la enzima de restricción BsmF I lo que generó una proyección 5' de cuatro bases. Como aparece en la FIG. 7E, si el primer nucleótido incorporado es un ddNTP marcado, el receso 3' se llena mediante una base, permitiendo la detección del SNP o sitio de interés. Sin embargo, si el primer nucleótido incorporado es un dNTP, la polimerasa continúa incorporando nucleótidos hasta que un ddNTP esté lleno. Por ejemplo, los primeros dos nucleótidos pueden rellenarse con dNTPs, y el tercer nucleótido con un ddNTP, permitiendo detección del tercer nucleótido en la proyección. Así, puede determinarse la secuencia entera de la proyección 5', lo cual aumenta la información obtenida de cada SNP o sitio de interés.

[0289] Después de marcar, cada Streptawell se enjuagó con IX PBS (1 00µl) tres veces. Los fragmentos de ADN "lentos" se liberaron entonces de los Streptawells mediante digestión con la enzima de restricción EcoRI, según las instrucciones del fabricante, que se proporcionaron con la enzima (FIGS. 8A-8D). La digestión se realizó durante 1 hora a 37°C, con agitación a 120 rpm.

Detección del Sitio de Interés

[0290] Después de la liberación de la matriz de estreptavidina, 2-3µl de la muestra de 10µl fue cargada en una bandeja de membrana de 48 pozos (The Gel Company, catalog number TAM48-01). La muestra en la bandeja fue absorbida con un Flow Membrana Comb 48 (The Gel Company catalog number AM48), e insertada en un gel 36 centímetros 5% acrilamida (urea) (Bio Whittaker Molecular Applications, Long Ranger Run Gel Packs, catalog number 50691).

[0291] La muestra fue sometida a electrofóresis en el gel, a 3000 voltios, durante 3 minutos. El peine de membrana fue removido, y el gel se trabajó durante 3 horas en una Máquina de Secuenciación Automatizada ABI 377. El nucleótido marcado incorporado se detectó mediante la fluorescencia.

[0292] Como se mostró en la FIG. 9A, de una muestra de treinta seis (36) individuos, se detectaron en SNP HC21S00027, uno de dos nucleótidos: o adenosina o guanina. Estos son los dos nucleótidos que se reportaron existir en SNP HC21S00027 (www.snp.schl.org/snpsearch.shtml). Uno de los dos nucleótidos, o guanina o citosina, se detectó en SNP TSC0095512 (FIG. 9B). Los mismos resultados fueron obtenidos si el sitio de interés se amplificó o con una segunda plantilla que contenía un sitio del reconocimiento para BceA I o la segunda plantilla contenía un sitio del reconocimiento para BsmF I.

[0293] Como se mostró en FIG. 9C, se detectó uno de dos nucleótidos en SNP TSC0264580 que eran: o adenosina o citosina. Éstos son los dos nucleótidos reportados para este sitio SNP (www.snp.schl.org/snpsearch.shtml). Además, fue descubierta una timidita, una base ascendente del sitio de interés. En una secuencia de manera dependiente, BsmF I fragmenta algunas moléculas de ADN en la posición 10/14 y otras moléculas de ADN que tienen la misma

secuencia, en la posición 11/15. Cuando la enzima de restricción BsmF I fragmenta 11 nucleótidos en el filamento codificante y 15 nucleótidos en el filamento no codificante, el extremo de receso 3' está una base ascendente del sitio de SNP. La secuencia de SNP TSC0264580 indicaba que la base inmediatamente precedente del sitio SNP era una timidina. La incorporación de un ddNTP marcado en esta posición generó un fragmento una base más pequeña que el fragmento que fue fragmentado en la posición 10/14. De esta manera, las moléculas de ADN fragmentadas en la posición 11/15 proporcionaron información de la identidad acerca de la base inmediatamente precedente del sitio SNP, y las moléculas de ADN fragmentadas en la posición 10/14 proporcionaron la información de identidad sobre el sitio de SNP.

[0294] Se amplificó SNP HC21S00027 usando una segunda plantilla que contenía el sitio de reconocimiento para BsmF I. Se usó una mezcla de ddNTPs marcado y de dNTPs no marcados, para rellenar la proyección 5' generada por la digestión con BsmF I. Si un dNTP fuera incorporado, la polimerasa continuaría incorporando nucleótidos hasta que un ddNTP fuera incorporado. Se generó una población de fragmentos de ADN, cada uno difiriendo por una base, lo que permitió determinar la secuencia completa de la proyección.

[0295] Como se observó en la FIG. 9D, se detectó una adenosina que era complementaria al nucleótido (una timidina) inmediatamente precedente al SNP o al sitio de interés. Este nucleótido se detectó debido a la propiedad fragmentante 11/15 de BsmF I descrito en detalle anteriormente. En el sitio de SNP se detectaron una guanina y una adenosina, las cuales son los dos nucleótidos reportados para este sitio SNP (FIG. 9A). Los dos nucleótidos se

detectaron en el sitio SNP por la diferencia de los pesos moleculares de los tintes, lo que permitió la separación de los dos nucleótidos. El próximo nucleótido detectado fue una timidina que es complementaria al nucleótido inmediatamente descendente del sitio SNP. El siguiente nucleótido detectado fue una guanina que era complementario al nucleótido dos bases descente del sitio SNP. Finalmente, fue detectada una adenosina que era complementaria al tercer nucleótido descendente del sitio SNP. La información de secuencia no sólo se obtuvo para el sitio de SNP sino también para el nucleótido precedente al sitio SNP y los siguientes tres nucleótidos.

[0296] Ninguno de los sitios de interés contenía mutación alguna. Sin embargo, si uno de los sitios de interés albergó alguna mutación que incluye pero no se limita a un punto de mutación, inserción, eliminación, translocation o cualquier combinación de mutaciones, ello podría identificarse mediante la comparación con el consenso o con la secuencia publicada. La comparación de las secuencias atribuidas a cada uno de los sitios de interés a la secuencia nativa, no relacionada con enfermedad, de un gen en cada sitio de interés, determina la presencia o ausencia de una mutación en esa secuencia. El hallazgo de una mutación en la secuencia se interpreta entonces como la presencia de la enfermedad indicada, o una predisposición para desarrollar la misma, como sea apropiado, en ese individuo. Las cantidades relativas de las secuencias mutadas contra las secuencias no mutadas, pueden evaluarse para determinar si el sujeto tiene uno o dos alelos de la secuencia mutada, y así, si el sujeto es un portador, o si la mutación indicada resulta en un condición dominante o recesiva.

[0297] Cuatro sitios de interés del cromosoma 1 y dos sitios de interés del cromosoma 21 se amplificaron en reacciones separadas PCR, se agruparon juntos, y se analizaron. Las plantillas fueron diseñadas para que cada sitio de interés amplificado fuera de un tamaño diferente que permitiera la detección de los sitios de interés.

Preparación del Template ADN

[0298] El template de ADN se preparó a partir de una muestra de 5ml de sangre obtenida por venipuntura de un voluntario humano, con su consentimiento. El template ADN fue aislado utilizando el QIAmp ADN Blood Midi Kit proporcionado por QIAGEN (Catálogo número 51183). Dicho template ADN se aisló según las instrucciones incluidas en el Kit. El template ADN se aisló de treinta y seis voluntarios humanos, y luego se agrupó en una sola muestra, para el análisis posterior.

Diseño de las Plantillas

[0299] Se amplificó SNP TSC 0087315 usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' TTACAATGCATGAATTCATCTTGGTCTCTCAAAGTGC 3' (SEQ ID NO:15)

Segunda plantilla:

5' TGGACCATAAACGGCCAAAACTGTAAG 3' (SEQ ID NO:16)

[0300] Se amplificó SNP TSC0214366 usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' ATGACTAGCTATGAATTCGTTCAAGGTAGAAAATGGAA 3' (SEQ ID NO:13)

Segunda plantilla:

5' GAGAATTAGAACGGCCCAAATCCCACTC 3' (SEQ ID NO:14)

[0301] Se amplificó SNP TSC 0413944 con las plantillas siguientes:

Primera plantilla:

5' TACCTTTTGATCGAATTCAAGGCCAAAAATATTAAGTT 3' (SEQ ID NO:23)

Segunda plantilla:

5' TCGAACTTTAACGGCCTTAGAGTAGAGA 3' (SEQ ID NO:24)

[0302] Se amplificó SNP TSC0095512 usando las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' AAGTTTAGATCAGAATTCGTGAAAGCAGAAGTTGTCTG 3' (SEQ ID NO:11)

Segunda plantilla:

5' TCTCCAACTAACGGCTCATCGAGTAAAG 3' (SEQ ID NO:12)

[0303] Se amplificó SNP HC21 S00 131 con las plantillas siguientes:

Primera plantilla:

5' CGATTTGATAAGAATTCAAAGCAGTTCTTAGTTCAG 3' (SEQ ID NO:25)

Segunda plantilla:

5' TGCGAATCTTACGGCTGCATCACATTCA 3' (SEQ ID NO:26)

[0304] Se amplificó SNP HC21S00027 con las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' ATAACCGT ATGCGAA TTCT ATAATTTTCCTGA T AAAGG 3' (SEQ ID NO:17)

Segunda plantilla:

5' CTAAATCAGACGGCTAGGTAACTTCA 3' (SEQ ID NO:19)

171

[0305] Para cada SNP, la primera plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI y tenía un marcador de biotina en el terminal 5'. La segunda plantilla utilizada para amplificar cada SNP, contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BceA I.

Reacción de PCR

[0306] Las reacciones de PCR se realizaron como se describió en el Ejemplo 2, sólo que fueron usadas las siguientes temperaturas de recocido: la temperatura de recocido para el primer ciclo PCR fue de 37°C durante 30 segundos, la temperatura de recocido para el segunda ciclo de PCR fue de 57°C durante 30 segundos, y la temperatura de recocido para el tercer ciclo de PCR fue de 64°C durante 30 segundos. Todos los ciclos subsiguientes tenían una temperatura de recocido de 64°C durante 30 segundos. Se efectuaron treinta siete (37) ciclos PCR. Después de PCR, ¼ del volumen fue removido de cada reacción, y combinado en un solo tubo.

Purificación de Fragmentos que Contienen Sitio de Interés

[0307] Los productos de PCR (ahora combinados en una muestra, y denominada "la muestra") fueron separados del template del ADN genómico como se describió en el Ejemplo 2; sólo que la muestra se ligó a un solo pozo de una placa de microtitulación Streptawell.

Digestión de la Enzima de Restricción de Fragmentos Aislados que Contienen Sitios de Interés

[0308] La muestra se digirió con la enzima de restricción BceA I que enlazó el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla. Las digestiones de enzima de restricción se realizaron siguiendo las instrucciones proporcionadas con la enzima. Después de la digestión con la enzima de restricción, los pozos se lavaron tres veces con IX PBS.

Incorporación de Nucleótidos

[0309] La digestión de la enzima de restricción descrita anteriormente, rindió moléculas de ADN con una proyección 5' que contenía el sitio de SNP o sitio de interés y un receso 3'. La proyección 5' funcionó como un template permitiendo la incorporación de un nucleótido en la presencia de un polimerasa de ADN.

[0310] Los siguientes componentes se usaron para la reacción de llenado: 1µl de ddA T-P fluorescentemente marcado; 1µl de ddTTP fluorescentemente marcado; 1µl de ddGTP marcado fluorescentemente; 1µl de ddCTP fluorescentemente marcado; 2µl de 10X búfer sequenasa, 0.25 µl de Sequenasa, y agua, según la necesidad, para una reacción de 20µl. La reacción de llenado se realizó a 40°C durante 10 minutos. Todos los reactivos de marcado se obtuvieron de Amersham (Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequence Core Kit (U.S.A. 79565); la concentración de los ddNTPS proporcionados en el equipo es patentada y no publicada por Amersham). En la presencia de los ddNTPs fluorescentemente marcados, el receso 3' se llenó por una base, la que corresponde al SNP o sitio de interés.

[0311] Después de la incorporación del nucleótido, el Streptawell se enjuagó con IX PBS (100 µl) tres veces. Los fragmentos de ADN "lentos" luego se liberaron del Streptawell mediante la digestión con la enzima de restricción EcoR1 siguiendo las instrucciones del fabricante. La digestión se realizó durante 1 hora a 37°C, con agitación a 120 rpm.

Detección del Sitio de Interés

[0312] Después de la liberación de la matriz de estreptavidina, 2-3µl de la muestra de 10µl fueron cargados en una bandeja de membrana de 48 pozos (The Gel Company, catálogo número, AM48-01). La muestra en la bandeja fue absorbido con un 48 Flow Membrana Comb (The Gel Company, número de catálogo AM48), e insertada en 36 centímetros de gel acrilamida (urea) 5% (Bio Whittaker Molecular Applications, Long Ranger Run Gel Packs, catálogo número 50691).

[0313] La muestra fue sometida a electroforesis en el gel a 3000 voltios durante 3 minutos. El peine de la membrana fue retirado, y el gel se trabajó durante 3 horas en una Máquina de Secuenciación Automatizada ABI 377. El nucleótido incorporado se detectó mediante fluorescencia.

[0314] Las plantillas fueron diseñados para que cada sitio de interés amplificado difiriera en tamaño. Como se muestra en la FIG. 10, cada sitio de interés amplificado difería por aproximadamente 5-10 nucleótidos, lo que permitió separar los sitios de interés entre si, mediante electroforesis del gel. Se detectaron dos nucleótidos para SNP TSC0087315 que eran guanina y citosina. Éstos son los dos nucleótidos reportados de existir en SNP

TSC0087315 (www.snp.schl.org/snpsearch.shtml). La muestra comprendió el template ADN de 36 individuos y debido a que las moléculas de ADN que incorporaron una guanina, difirieron en el peso molecular de aquéllas que incorporaron una citosina; se observaron bandas distintas para cada nucleótido.

[0315] Se detectaron dos nucleótidos en SNP HC2IS00027 que eran guanina y adenosina (FIG. 10). Los dos nucleótidos reportados para este sitio SNP son guanina y adenosina (www.snp.schl.org/snpsearch.shtml). Como se discutió anteriormente, la muestra contenía templates ADN de treinta y seis individuos, y uno esperaba ambos nucleótidos estar representados en la muestra. El peso molecular de los fragmentos ADN que incorporaron un guanina, era distinto de los fragmentos de ADN que incorporaron una adenosina, lo que permitió detectar ambos nucleótidos.

[0316] El nucleótido de citosina se detectó en SNP TSC02I4366 (FIG. 10). Los dos nucleótidos reportados de existir en esta posición SNP son: timidina y citosina.

[0317] El nucleótido de guanina se detectó en SNP TSC0413944 (FIG. 10). Los dos nucleótidos reportados para este SNP son: guanina y citosina (<http://snp.csW.org/snpsearch.shtml>).

[0318] El nucleótido de citosina se detectó en SNP TSC0095512 (FIG. 10). Los dos nucleótidos reportados para este sitio de SNP son: guanina y citosina (www.snp.schl.org/snpsearch.shtml).

[0319] El nucleótido detectado en SNP HC21S0013I fue la guanina. Los dos nucleótidos reportados para este sitio de SNP son: guanina y adenosina (www.snp.scW.org/snpsearch.shtml).

[0320] Como se expuso anteriormente, la muestra comprendió templates de ADN de treinta y seis individuos y uno esperaba ambos nucleótidos en los sitios de SNP ser representados. Para SNP TSC0413944, TSC00955 12, TSC0214366 y HC2IS00131, se detectó uno de los dos nucleótidos. Es probable que ambos nucleótidos reportados para estos sitios de SNP estén presentes en la muestra, pero ese tinte fluorescente se impone al otro. El peso molecular de las moléculas de ADN que incorporaron un nucleótido no permitió la separación eficaz de las moléculas de ADN que incorporaron el otro nucleótido. Sin embargo, los SNPs fueron prontamente separados entre si, y para cada SNP, un nucleótido apropiado fue incorporado. Fueron determinadas las secuencias de sitios de interés de múltiples cromosomas, las cuales se trataron como una sola muestra después de PCR.

[0321] Fue realizada una sola reacción conteniendo ddNTPs fluorescentemente marcados, con la muestra que contenía sitios múltiples de interés. Alternativamente, cuatro reacciones separadas de llenado pueden realizarse, donde cada reacción contiene un nucleótido fluorescentemente marcado (ddATP, ddTTP, ddGTP, o ddCTP) y ddNTPs no marcados (vea Ejemplo 2, FIGS. 7 A-7D y Figs. 9A-C). Cuatro reacciones separadas de "llenado" permitirán la detección de cualquier nucleótido que esté presente en los sitios de interés. Por ejemplo, si analizando una muestra de un solo individuo que contenga sitios múltiples de interés, y dicho individuo es heterócigo en uno o más sitios de interés, cuatro reacciones separadas de "llenado" pueden usarse para determinar los nucleótidos en los sitios heterócigos de interés.

[0322] También, al analizar una muestra que contenga tómbles de múltiples individuos, cuatro reacciones separadas de "llenado" permitirán la detección de nucleótidos presentes en la muestra, independiente de con que frecuencia el nucleótido se encuentra en el sitio de interés. Por ejemplo, si una muestra contiene los tómbles de ADN de 50 individuos, y 49 de los individuos tienen una timidina en el sitio de interés, y un individuo tiene un guanina, la actuación de las cuatro reacciones separadas de "llenado" en las que cada reacción de llenado se trabaja en una línea separada de un gel, como en las FIGS. 9A-9C, permitirá la detección de la guanina. Al analizar una muestra que consta de múltiples tómbles de ADN, múltiples reacciones de "llenado" aliviarán la necesidad de distinguir múltiples nucleótidos en un solo sitio de interés, por las diferencias en la masa.

[0323] En este ejemplo, fueron analizados múltiples polimorfismos de nucleótidos sencillos. También es posible determinar la presencia o ausencia de mutaciones, incluso el punto de mutaciones, transiciones, transversions, translocaciones, inserciones, y eliminaciones, de los sitios múltiples de interés. Los sitios múltiples de interés pueden ser de un solo cromosoma o de múltiples cromosomas. Los sitios múltiples de interés pueden ser de un solo gen o de múltiples genes.

[0324] Puede determinarse la secuencia de sitios múltiples de interés que causan o predisponen a un fenotipo de enfermedad. Por ejemplo, uno podría amplificar, uno, una decena, centenares, miles de genes, implicados en el cáncer o cualquier otra enfermedad. Las plantillas pueden diseñarse para que cada uno de los sitios de interés amplificado, difiera en tamaño. Después de PCR, pueden combinarse los sitios de interés amplificados y pueden tratarse

como una sola muestra. Alternativamente, los sitios múltiples de interés pueden ser amplificados en una reacción de PCR o el número total de sitios de interés, por ejemplo 100, puede ser dividido en muestras, por ejemplo 10 sitios de interés para la reacción de PCR, y luego pueden agruparse. Como se demostró en el presente, puede determinarse la secuencia de sitios múltiples de interés. Por lo tanto, en una reacción puede determinarse, la secuencia de uno, a diez, a los centenares, a los miles, de genes que predisponen o causan un fenotipo de enfermedad.

EJEMPLO 4

[0325] El ADN genómico se obtuvo de cuatro individuos, después de haber obtenido su consentimiento. Seis SNPs en el cromosoma 13 (TSC0837969, TSC0034767, TSC1130902, TSC0597888, TSC0195492, TSC0607185) se analizaron usando el template de ADN. La información referente a estos SNPs puede encontrarse en el siguiente website (www.snp.schl.org/snpsearch.shtml), dirección válida a partir del 11 de febrero, 2003).

[0326] Se usó un solo nucleótido marcado con un tinte fluorescente para el proceso de genotipo, para los individuos en los seis sitios SNP seleccionados. Las plantillas fueron diseñadas para permitirles a los seis SNPs ser analizados en una sola reacción.

Preparación del Template de ADN

[0327] El template de ADN se preparó a partir de una muestra de 9 ml de sangre obtenida mediante venipuntura, de un voluntario humano, con su

consentimiento. La plantilla ADN fue aislada usando el QIAmp ADN Blood Midi Kit proporcionado por QIAGEN (Catálogo número 51183). El template de ADN se aisló según las instrucciones incluidas en el equipo.

178

Diseño de las Plantillas

[0328] Se amplificó SNP TSC0837969 usando el siguiente plantilla:

Primera plantilla:

5'GGGCTAGTCTCCGAATTCCACCTATCCTACCAAATGTC3'

Segunda plantilla:

5' TAGCTGTAGTTAGGGACTGTTCTGAGCAC 3'

[0329] La primera plantilla tenía un marcador de biotina al terminal 5' y contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI. La primera plantilla fue diseñada para reconocer 44 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción para BsmF I.

[0330] Se amplificó SNP TSC0034767 usando la plantilla siguiente:

Primera plantilla:

5'CGAATGCAAGGCGAATTCGTTAGTAATAACACAGTGCA3'

Segunda plantilla:

5' AAGACTGGATCCGGGACCATGTAGAATAC 3'

[0331] La primera plantilla tenía un marcador de biotina en el terminal 5' y contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción para EcoRI. La primera plantilla fue diseñada para reconocer 50 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción para BsmF I.

181

[0332] Se amplificó SNP TSC1130902 usando el plantilla siguiente:

Primera plantilla:

5' TCTAACCATTGCGAATTCAGGGCAAGGGGGGTGAGATC 3'

Segunda plantilla:

5' TGACTTGGATCCGGGACAACGACTCATCC 3'

[0333] La primer plantilla tenía una marcador de biotina en el terminal 5' y contenía un un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción para EcoRI. La primera plantilla fue diseñadapara recocer 60 bases del sitio de interés. El segunda plantilla contenía un un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción para BsmF I.

[0334] Se amplificó SNP TSC0597888 usando la plantilla siguiente:

Primera plantilla:

5' ACCCAGGCGCCAGAATTCTTTAGATAAAGCTGAAGGGA3

Segunda plantilla: 5'GTTACGGGATCCGGGACTCCATATTGATC3'

[0335] La primera plantilla tenía una marcador de biotina en el terminal 5' y contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción para EcoRI. La primera plantilla fue diseñada para recocer 70 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción para BsmF I.

[0336] Se amplificó SNP TSC0195492 usando la plantilla siguiente:

Primera plantilla:

5 'CGTTGGCTTGAGGAA TTCGACCAAAGAGCCAAGAGAA

Segunda plantilla:

5' AAAAAGGGATCCGGGACCTTGACTAGGAC 3'

[0337] La primera plantilla tenía un marcador de biotina en el terminal 5' y contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción para EcoRI. La primera plantilla fue diseñada para reconocer 80 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción para BsmF I.

[0338] Se amplificó SNP TSC0607185 usando la plantilla siguiente:

Primera plantilla:

5' ACTTGATTCCGTGAATTCGTTATCAATAAATCTTACAT3

Segunda plantilla:

5' CAAGTTGGATCCGGGACCCAGGGCTAACC 3'

[0339] La primera plantilla tenía un marcador de biotina a los 5' y contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción para EcoRI. la primera plantilla fue diseñada para reconocer 90 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción para BsmF I.

[0340] Se amplificaron todos los sitios de interés del template de ADN genómico que usa la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, U.S. Patente. 4.683.195 y 4.683.202, incorporada en el presente como referencia). En este ejemplo, se amplificaron los sitios de interés en los tubos de reacción separados, pero ellos también podrían amplificarse juntos en una sola reacción PCR. Para especificidad incrementada, fue usado un "inicio caliente" de PCR. Las reacciones de PCR se realizaron usando el HotStarTaq Master Mix Kit, proporcionado por QIAGEN (catálogo número 203443). La cantidad de template ADN y plantilla para reacción, pueden ser optimizados para cada sitio

de interés, pero en este ejemplo, se usaron 40 ng de template ADN genómico humano y 5µM de cada plantilla. Fueron ejecutados cuarenta ciclos de PCR.

181

Fueron usadas las siguientes condiciones PCR:

- (1) 95°C durante 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 37°C durante 30 segundos;
- (3) 95°C durante 30 segundos;
- (4) 57°C durante 30 segundos;
- (5) 95°C durante 30 segundos;
- (6) 64°C durante 30 segundos;
- (7) 95°C durante 30 segundos;
- (8) repite los pasos 6 y 7 treinta nueve (39) veces;
- (9) 72°C durante 5 minutos.

[0341] En el primer ciclo de PCR, la temperatura de recocido estaba cercana a la temperatura de fusión de la región de recocido de los 3' de las segundas plantillas, que era de 37°C. La temperatura de recocido en el segunda ciclo de PCR estaba alrededor de la temperatura de fusión de la región 3' lo cual recocce a el template de ADN de la primera plantilla que era de 57°C. La temperatura de recocido en el tercer ciclo de PCR estaba cercana a la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla que era de 64°C. La temperatura del recocido durante los ciclos restantes fue de 64°C. Escalando la temperatura de recocido de TM1 a TM2 a TM3, en los primeros tres ciclos de PCR, se incrementa grandemente la especificidad. Estas temperaturas de recocido son representativas, y el técnico experimentado entenderá que las temperaturas de recocido durante cada ciclo son dependientes de las plantillas específicas usadas.

[0342] Las temperaturas y tiempos para desnaturalización, recocido, y extensión, pueden perfeccionarse probando varias escenas y usando los parámetros que rindan los mejores resultados. En este ejemplo, la primer plantilla se diseñó para recocer a varias distancias del sitio de interés. El técnico experimentado entiende que la localización de recocido de la primera plantilla puede ser 5-10, 11-15, 16-20, 21-25, 26-30, 31-35, 36-40, 41-45, 46-50, 51-55, 56-60, 61-65, 66-70, 71-75, 76-80, 81-85, 86-90, 91-95, 96-100, 101-105, 106-110, 111-115, 116-120, 121-125, 126-130, 131-140, 141-160, 161-180, 181-200, 201-220, 221-240, 241-260, 261-280, 281-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500, o superior a 500 bases del sitio de interés.

Purificación de Fragmentos que Contienen Sitios de Interés

[0343] Los productos de PCR fueron separados del templete de ADN genómico. Después de la reacción de PCR, 1/4 del volumen de cada reacción de PCR, de un individuo, fue mezclado junto en un pozo de un Streptawell, transparente, placa High-Bind de Roche Diagnostics GmbH (catálogo número 1 645 692, según lista en Roche Molecular Biochemicals, 2001 Biochemicals Catalog). Las primeras plantillas contenían un marcador biotina 5' para los productos PCR ligados a los pozos recubiertos de Estreptavidina, mientras que los templates del ADN genómico no lo tenían. La reacción ligante de estreptavidina se efectuó usando un Thermomixer (Eppendorf) a 1000 rpm durante 20 minutos, a 37°C. Cada pozo fue bien aspirado, para quitar el material no ligado, y se lavó tres veces con IX PBS, con mezclado suave (Kandpal et al., Nucl. Acids Res. 18:1789-1795 (1990); Kaneoka et al.,

Digestión de la Enzima de Restricción de Fragmentos Aislados que Contienen Sitios de Interés

[0344] Los productos de PCR purificados se digirieron con la enzima de restricción BsmF I, la cual enlaza al sitio del reconocimiento incorporado en los productos de PCR de la segunda plantilla. Las digestiones se realizaron en Streptawells, siguiendo las instrucciones proporcionadas con la enzima de restricción. Después de la digestión, los pozos se lavaron tres veces con PBS para quitar los fragmentos de las rupturas.

Incorporación de Nucleótido Marcado

[0345] La digestión de la enzima de restricción con BsmF I produjo un fragmento de ADN con una proyección 5' que contenía el sitio de SNP o sitio de interés y un receso 3'. La proyección 5' funcionó como un template, permitiendo la incorporación de un nucleótido o nucleótidos en la presencia de una polimerasa de ADN.

[0346] Más adelante se muestra un esquema de la proyección 5' para SNP TSC0837969. No se reproduce la secuencia ADN completa, sólo la porción para demostrar la proyección (donde R indica el sitio variable).

5' TT AA				
3' AATT	R	A	C	A
Posición de la proyección	1	2	3	4

[0347] El nucleótido observado para TSC0837969 en la cadena codificante 5' (aquí exhibido como el filamento superior) es adenina y guanina. La tercera posición en la proyección en la cadena no codificante corresponde a citosina, que es complementaria a la guanina. Por cuanto este sitio variable puede ser adenina o guanina, el ddGTP fluorescentemente marcado en la presencia de dCTP, dTTP, y dATP, no marcados fueron usados para determinar la secuencia de ambos alelos. Las reacciones de llenado para un individuo homócigo para la guanina, homócigo para la adenina o heterócigo, están exhibidas más adelante.

[0348] Homócigo para la guanina en TSC 0837969:

Alelo 1	5' TTAA	G *			
	3' AATT	C	A	C	A
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' TT AA	G *			
	3' AATT		C	A	C A
Posición de la proyección		1	2	3	4

[00100] ddGTP marcado es incorporado en la primera posición de la proyección. Sólo se observa un signo que corresponde a las moléculas rellenas con el ddGTP marcado en la primera posición de la proyección.

[0349] Homócigo para la adenina en TSC 0837969:

Alelo 1	5' TTAA	A	T	G*	
	3' AATT	T	A	C	A
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' TTAA	A	T	G*	
	3' AATT	T	A	C	A

Posición de la proyección 1 2 3 4

[0350] El dATP no marcado es incorporado en la posición uno de la proyección, y el dTTP no marcado es incorporado en la posición dos de la proyección. El ddGTP marcado es incorporado en la posición tres de la proyección. Sólo un signo se observará; las moléculas llenas con el ddGTP en la posición 3 tendrán un peso molecular diferente de las moléculas llenas en la posición uno, lo que permite la identificación fácil de individuos homócigos para adenina o guanina.

[0351] Heterócigos en TSC0837969:

Alelo 1	5' TTAA	G *				
	3' AATT	C	A	C	A	
Posición de la proyección	1	2	3	4		
Alelo 2	5' TTAA		A	T	G *	
	3' AATT		T	A	C	A
Posición de la proyección		1	2	3	4	

[0352] Se verán dos signos; un signo corresponde las moléculas ADN rellenas con ddGTP en la posición 1, y un segundo signo correspondiente a las moléculas rellenas en la posición 3 de la proyección. Los dos signos se pueden separar utilizando cualquier técnica de separación con base en el peso molecular, que incluye pero no se limita a electrofóresis en gel.

[0353] Más adelante se muestra un esquemático de la proyección 5' para SNP TSC0034767. La secuencia completa de ADN no se reproduce, sólo la porción para demostrar la proyección (donde R indica el sitio variable).

A C A R GTGT 3'

CACA 5'

Posición de la proyección 4 3 2 1

[0354] Los nucleótidos observados para TSCOO34767 en la cadena codificante (sense) 5' (aquí exhibido como la cadena superior) son citosina y guanina. La segunda posición en la proyección corresponde la adenina que es complementaria a la timidina. La tercera posición en la proyección corresponde a la citosina que es complementaria a la guanina. El ddGTP fluorescentemente marcado en la presencia de dCTP, dTTP, y dA TP, no marcados, se usa para determinar la secuencia de ambos alelos.

[0355] En este caso, la segunda plantilla reconoce ascendentemente el sitio de interés, y por lo tanto la reacción de llenado ocurre en la cadena no codificante (anti-sense) (aquí mostrado como la cadena inferior). Cualquiera, o el filamento codificante o el filamento no codificante pueden ser llenados dependiendo si el segunda plantilla que contiene el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción tipo IIS, reconoce via ascendente o descendente del sitio de interés.

Más adelante se muestra un esquemático de la proyección 5' para SNP TSCI130902 .

No se reproduce la secuencia de ADN completa, sólo una porción para demostrar la proyección (donde R indica el sitio variable).

5' TTCAT

3' AAGTA R T C C

Posición de la proyección 1 2 3 4

[00101] Los nucleótidos observados para TSCI130902 en la cadena codificante 5' son adenina y guanina. La segunda posición en la proyección corresponde a una timidina, y la tercera posición en la proyección corresponde a citosina que es complementaria a la guanina.

[0356] El ddGTP fluorescentemente marcado en la presencia del dCTP, el dTTP, y el dATP no marcados, se usan para determinar la secuencia de ambos alelos.

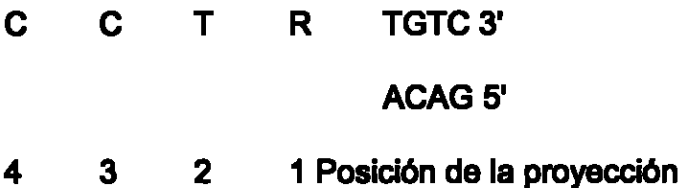
[00102] Más adelante se muestra, un esquemático de la proyección 5' para SNP TSC0597888. No se reproduce la secuencia entera de ADN, sólo la porción para demostrar la proyección (donde R indica el sitio variable).



[0357] Los nucleótidos observados para TSC0597888 en la cadena codificante 5' (aquí dibujado como la cadena superior) son citosina y guanina. La tercera posición en la proyección corresponde a la citosina que es complementaria a la guanina.

El ddGTP fluorescentemente marcado en la presencia de dCTP, dTTP, y el dATP, no marcados, se utiliza para determinar la secuencia de ambos alelos.

[0358] Más adelante se muestra un esquemático de la proyección 5' para SNP TSC0607185. No se reproduce la secuencia de ADN entera, sólo la porción para demostrar la proyección (donde R indica el sitio variable).



[0359] Los nucleótidos observados para TSC0607185 en la cadena codificante 5' (aquí presentado como la cadena superior) son citosina y timidina. En este caso, la segunda plantilla recoge ascendentemente el sitio de interés, lo que

permite rellenar la cadena no codificante. La cadena no codificante (aquí presentada como la cadena inferior) se rellenará con guanina o adenina.

[0360] La segunda posición en la proyección 5' es timidita, que es complementaria a la adenina; y la tercera posición en la proyección corresponde a citosina, la cual es complementaria a la guanina. El ddGTP fluorescentemente marcado en la presencia de dCTP, dTTP, y dA TP, no marcados, se usa para determinar la secuencia de ambos alelos.

[0361] Más adelante se muestra un esquemático de la proyección 5' para SNP TSC0195492. No se reproduce la secuencia de ADN entera, sólo la porción para demostrar la proyección.

5' A TCT				
3' TAGA	R	A	C	A
Posición de la proyección	1	2	3	4

[0362] Los nucleótidos observados en este sitio son citosina y guanina, en la cadena codificante (aquí mostrada como la cadena superior). La segunda posición en la proyección 5' es adenina, que es complementaria a la timidina y la tercer posición en la proyección corresponde a la citosina, que es complementario a la guanina.

El ddGTP fluorescentemente marcado en la presencia el dCTP, dTTP, y dATP, no marcados, fue usado para determinar la secuencia de ambos alelos.

[0363] Como se demostró anteriormente, la secuencia de ambos alelos de los seis SNPs puede determinarse marcando con el ddGTP en la presencia de dATP, dTTP, y dCTP, no marcados. Los siguientes componentes se agregaron a cada reacción de llenado: 1µl de ddGTP flourescentemente marcado, 0.5µl de ddNTPs no marcados (40µM), el cual contenía todos los

nucleótidos, excepto la guanina, 2µl de búfer secuenasa 10X, 0.25µl de Secuenasa, y agua según la necesidad para una reacción de 20µl. La reacción de llenado fue realizada a 40°C durante 10 minutos. El ddNTP no-fluorescentemente marcado fue adquirido de Fermentas Inc. (Hannover, MD). Todos los otros reactivos del marcado se obtuvieron de Amersham (el Thermo Sequenase Dye Terminador Cycle Sequencing Core Kit EE.UU. 79565).

[0364] Después de marcar, cada Streptawell se enjuagó con IX PBS (100µl) tres veces. Los fragmentos de ADN rellenos fueron luego liberados del Streptawells mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI, según las instrucciones del fabricante, que se proporcionaron con la enzima. La digestión fue realizada durante 1 hora a 37°C, con agitación a 120 rpm.

Detección del Sitio de Interés

[0365] Después de la liberación de la matriz de estreptavidina, la muestra fue cargada en una línea de gel de 36 centímetros 5% acrilamida (urea) (Bio Whittaker Molecular Applications, Lone Ranger Run Gel Packs, catálogo número 50691). La muestra fue sometida a electroforesis en gel a 3000 voltios, durante 3 minutos. El gel se trabajó durante 3 horas en un aparato de secuenciación (Hoefer SQ3 Sequencer). El gel fue retirado del aparato y examinado en el Typhoon 9400 Variable Mode Imager. El nucleótido marcado incorporado se detectó por fluorescencia.

[0366] Como se muestra en la FIG. 11, la plantilla ADN en las sendas 1 y 2 para SNP TSC0837969, es homócigo para la adenina. La siguiente reacción de

llenado se esperaba que ocurriera, si el individuo fuera homócigo para la adenina:

[0367] Homócigo para la adenina en TSC 0837969:

5' TTAA	A	T	G *	
3' AATT	T	A	C	A
Posición de la proyección	1	2	3	4

[0368] El dATP no marcado fue incorporado en la primera posición complementaria a la proyección. El dTTP no marcado fue incorporado en la segunda posición complementaria a la proyección. El ddGTP marcado fue incorporado en la tercera posición complementaria a la proyección. Sólo una banda fue observada, que emigró cerca a la posición 46 del gel de acrilamida. Esto indicó que esa adenina era el nucleótido relleno en la posición uno. Si el nucleótido guanina hubiera sido llenado, una banda hubiera sido esperada en la posición 44.

[0369] Sin embargo, el template ADN en las sendas 3 y 4 para SNP TSC0837969 era heterócigo. Las siguientes reacciones de llenado fueron esperadas si el individuo fuera heterócigo:

[0370] Heterócigos en TSC0837969:

Alelo 1	5' TTAA	G *			
	3' AATT	C	A	C	A
Posición de la proyección		1	2	3	4
Alelo 2	5' TT AA	A	T	G *	
	3' AATT	T	A	C	A
Posición de la proyección		1	2	3	4

[0371] Se observaron dos bandas distintas; una banda corresponde a las moléculas rellenas con ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección (el alelo G), y la segunda banda corresponde a moléculas rellenas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección (alelo A). Las dos bandas fueron separadas con base en las diferencias de peso molecular, usando electrofóresis en gel. Un nucleótido ddGTP fluorescentemente marcado fue usado para determinar que un individuo era heterócigo en un sitio SNP. Este es el primer uso de un solo nucleótido para detectar eficazmente la presencia de dos alelos diferentes.

[0372] Para SNP TSC0034767, el template ADN en las sendas 1 y 3 es heterócigo para citosina y guanina, como se evidencia por las dos bandas distintas. La banda inferior corresponde a ddGTP relleno en la posición 1 complementaria a la proyección. La segunda banda de peso molecular ligeramente más alto corresponde a ddGTP relleno en la posición 3, indicando que la primera posición en la proyección estaba llena con dCTP no marcado, lo que permitió a la polimerasa continuar incorporando nucleótidos hasta que incorporara el ddGTP en la posición 3, complementaria a la proyección. El template ADN en las sendas 2 y 4 era el homócigo para la guanina, como lo evidenciado por una sola banda de peso molecular más alto, que si los ddGTP hubieran sido llenos en la primera posición complementaria a la proyección.

[0373] Para SNP TSC1130902, la plantilla ADN en las sendas 1,2, y 4 es homócigo para la adenina en el sitio variable, como lo evidenciado por una sola banda de peso molecular más alta emigrando cerca de una posición 62 en el gel. El template ADN en la senda 3 es heterócigo en el sitio variable, como lo

indica la presencia dos bandas distintas. La banda inferior correspondía a moléculas rellenas con ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección (el alelo guanina). La banda de peso molecular más alta correspondió a moléculas rellenas con el ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección (el alelo de adenina).

[0374] Para SNP TSC0597888, el template ADN en las sendas 1 y 4 era homócigo para la citosina en el sitio variable; la plantilla ADN en la senda 2 era heterócigo en el sitio variable, y el template ADN en la senda 3 era homócigo para la guanina. Las esperadas reacciones de llenado están diagramadas enseguida:

[0375] Homócigo para la citosina:

Alelo 1	T	C	T	G	ATTC 3'
		G*	A	C	TAAG 5'
	4	3	2	1	Posición de la proyección

Alelo 2	T	C	T	G	ATTC 3'
		G*	A	C	TAAG 5'
	4	3	2	1	Posición de la proyección

[0376] Homócigo para la guanina:

Alelo 1	T	C	T	C	ATTC 3'
				G*	TAAG 5'
4		3	2	1	Posición de la proyección

Alelo 2	T	C	T	C	ATTC 3'
				G*	TAAG 5'

4		3	2	1	Posición de la proyección
[0377] Heterócigos para guanina/citosina:					
Alelo 1	T	C	T	G	ATTC 3'
		G *	A	C	TAAG 5'
4		3	2	1	Posición de la proyección
Alelo 2	T	C	T	C	ATTC 3'
				G*	TAAG 5'
4		3	2	1	Posición de la proyección

[0378] El template homócigo de ADN para la guanina en el sitio variable desplegó una sola banda que correspondió a las moléculas ADN llenadas con el ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección. Estas moléculas ADN eran de peso molecular más bajo, comparado con las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 3 de la proyección (vea senda 3 para SNP TSC0597888). Las moléculas ADN diferían en peso molecular por dos bases.

[0379] La plantilla homócigo de ADN para la citosina en el sitio variable desplegó una sola banda que corresponde a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección. Estas moléculas de ADN emigraron a un peso molecular más alto que las moléculas de ADN rellenas con ddGTP en la posición 1 (vea las sendas 1 y 4 para SNP TSC0597888).

[0380] La plantilla heterócigo de ADN en el sitio variable desplegó dos bandas; una banda correspondió a las moléculas de ADN rellenas con el ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección y era de bajo peso molecular, y la

segunda banda correspondió a moléculas de ADN rellenas con ddGTP en la posición 3 complementaria a la proyección, y era de peso molecular más alto (vea senda 3 para SNP TSC0597888).

[0381] Para SNP TSC0195492, el template ADN en las sendas 1 y 3 era heterócigo en el sitio variable, lo que se demostró por la presencia de dos bandas distintas. El template ADN en la senda 2 era el homócigo para la guanina en el sitio variable. El template ADN en la senda 4 era homócigo para la citosina. Sólo una banda fue observada en la senda 4 para este SNP, y tenía un peso molecular más alto que las moléculas de ADN rellenas con ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección (compare sendas 2, 3 y 4).

[0382] Los alelos observados para SNP TSC0607185 fueron reportados como citosina o timidina. Por consistencia, el consorcio SNP denota los alelos observados como ellos aparecen en la cadena codificante (www.snp.schl.org/snpsearch.shtml); website activo a partir del 11 de febrero, año 2003). Para este SNP, la segunda plantilla recoció ascendentemente el sitio de interés, lo que permitió que la reacción de llenado ocurriera en la cadena no codificante después de la digestión con BsmF I.

[0383] El template ADN en las sendas 1 y 3 era heterócigo; el template ADN en la senda 2 era homócigo para la timidina, y el template ADN en la senda 4 era homócigo para la citosina. La cadena no codificante fue llenada con ddGTP, de manera que el nucleótido en la cadena codificante correspondía a citosina.

[0384] Pueden usarse marcadores de peso molecular para identificar las posiciones de las bandas esperadas. Alternativamente, para cada SNP analizado, puede usarse una muestra conocida de heterócigo, que identificará precisamente la posición de las dos bandas esperadas.

[0385] Como está demostrado en la FIG. 11, un nucleótido marcado con un tinte fluorescente puede usarse para determinar la identidad de un sitio variable que incluye pero no puede limitarse a SNPs y mutaciones nucleótidas sencillas. Típicamente, para determinar si un individuo es homócigo o heterócigo a un sitio SNP, son ejecutadas múltiples reacciones usando un nucleótido marcado con un tinte y un segunda nucleótido marcado con un segundo tinte. Sin embargo, esto introduce problemas comparando los resultados porque los dos tintes tienen los coeficientes cuánticos diferentes. Aun cuando nucleótidos diferentes se marcaran con el mismo tinte, los coeficientes cuánticos son diferentes. El uso de un solo nucleótido marcado con un tinte elimina cualquier error de los coeficientes cuánticos de tintes diferentes.

[0386] En este ejemplo se usó ddGTP fluorescentemente marcado. Sin embargo, el método es aplicable para un nucleótido marcado con cualquier mitad generadora de señal, incluido pero no limitado a molécula radiactiva, molécula fluorescente, anticuerpo, fragmento del anticuerpo, hapteno, hidrato de carbono, biotina, derivado de biotina, mitad fosforescente, mitad luminiscente, mitad electro-químico- luminiscente, mitad cromática, y mitad que tienen una resonancia perceptible de giro de electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica o conductibilidad eléctrica. Además, pueden usarse ddATP, ddTTP, o ddCTP, marcados.

[0387] El ejemplo anterior usó la tercera posición complementaria a la proyección como un indicador del segunda alelo. Sin embargo también puede usarse, la segunda o cuarta posición de la proyección (vea la Sección sobre Incorporación de Nucleótidos). Además, la proyección se generó con la enzima BsmF I tipo IIS; sin embargo puede usarse cualquier enzima que fragmente

ADN a una distancia de su sitio de enlazamiento, incluyendo pero sin limitarse a las enzimas listadas en la Tabla I.

[0388] También, en el ejemplo anterior, el nucleótido inmediatamente precedente del sitio SNP era un guanina en la cadena que estaba llena. Esto eliminó ser removido cualquier efecto de las propiedades fragmentantes alternativas de la enzima de restricción tipo IIS. Por ejemplo, en SNP TSC0837969, el nucleótido ascendente del sitio SNP en la cadena codificante era una adenina. IfBsmF I desplegó las propiedades fragmentantes alternas, las siguientes proyecciones se generarían para el alelo de adenina y el alelo de la guanina:

Alelo G - 11/15 fragmento		5' TTA			
		3' AAT	T	C	A C
Posición de la proyección			0	1	2 3
Alelo G después de llenado		5' TTA	A	G*	
		3' AAT	T	C	A C
Posición de la proyección			0	1	2 3
Alelo A fragmento 11/15		5' TTA			
		3' AAT	T	T	A C
Posición de la proyección			0	1	2 3
Alelo A después de llenado		5' TTA	A	A	T G*
		3' AAT	T	T	A C
Posición de la proyección			0	1	2 3

[0389] Para el alelo de guanina, la primera posición en la proyección se rellenaría con el dATP lo que permitiría la polimerasa incorporar el ddGTP en la

posición 2 complementario a la proyección. No habría ninguna diferencia perceptible entre las moléculas fragmentadas en la posición 10/14 o las moléculas fragmentadas en la posición 11/15.

[0390] Para el alelo de adenina, la primera posición complementaria a la proyección se rellenaría con el dATP, la segunda posición se rellenaría con el dATP, la tercera posición se rellenaría con el dTTP, y la cuarta posición se rellenaría con el ddGTP. No habría ninguna diferencia en los pesos moleculares entre las moléculas fragmentadas a 10/14 o las moléculas fragmentadas a 11/15. Las únicas referencias corresponderían a si las moléculas de ADN contuvieran una adenina en el sitio variable o una guanina en el sitio variable.

[0391] Como se vió en la FIG. 11, colocando la región del recocido de la primera plantilla permite a múltiple SNPs ser analizados en una sola senda de un gel. También, al usar el mismo nucleótido con el mismo tinte, puede realizarse una reacción sencilla de llenado. En este ejemplo, se analizaron 6 SNPs en una senda. Sin embargo, cualquier número de SNPs pueden analizarse en una sola reacción, que incluye pero se limita a 1,2,3,4,5,6, 7,8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30, 30-40, 41-50,51-60,61-70, 71-80,81-100, 101-120,121-140,141-160, 161-180, 181-200, y superiores a 200.

[0392] Además, se puede mezclar un nucleótido marcado, utilizado para detectar ambos alelos, con un segundo nucleótido marcado usado para detectar un diferente juego de SNPs con tal de que ninguno de los nucleótidos que están marcados ocurra inmediatamente antes del sitio variable (complementario al nucleótido en la posición 0 del fragmento 11/15). Por

ejemplo, suponga que SNP X puede ser guanina o timidina en el sitio variable y. tiene la siguiente proyección 5' generada después de la digestión con BsmF l:

198

SNP X 10/14	5' TTGAC				
Alelo G	3'AACTG	C	A	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

SNP X 11/15	5' TTGA				
Alelo G	3'AACT	G	C	A	C
Posición de la proyección		0	1	2	3

SNP X 10/14	5' TTGAC				
Alelo T	3' AACTG	A	A	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

SNP X 11/15	5' TTGA				
Alelo T	3'AACT	G	A	A	C
Posición de la proyección		0	1	2	3

[0393] Después de la reacción de llenado con ddGTP marcado, dATP, dCTP y dTTP, no marcados, se generarían las siguientes moléculas:

SNP X 10/14	5' TTGAC	G *			
Alelo G	3' AACTG	C	A	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

SNP X 11/15	5' TTGA	C	G*		
Alelo G	3' AACT	G	C	A	C
Posición de la proyección		0	1	2	3

SNP X 10/14	5' TTGAC	T	T	G*	
Alelo T	3'AACTG	A	A	C	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

SNP X 11/15	5' TTGA	C	T	T	G*
Alelo T	3' AACT	G	A	A	C
Posición de la proyección		0	1	2	3

[0394] Ahora suponga que SNP Y puede ser adenina o timidina y puede tener las proyecciones siguientes 5' generadas después de la digestión con BsmF I.

SNP Y 10/14	5' GTTT				
Alelo A	3' CAAA	T	G	T	A
Posición de la proyección		1	2	3	4

SNP Y 11/15	5' GTT				
Alelo A	3' CAA	A	T	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3

SNP Y 10/14	5' GTTT				
Alelo T	3' CAAA	A	G	T	A
Posición de la proyección		1	2	3	4

SNP Y 11/15	5' GTT				
Alelo T	3' CAA	A	A	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3

[0395] Después deL llenado con ddATP marcado y dCTP, dGTP, y dTTP, no marcados se generarían las siguientes moléculas:

SNP Y 10/14	5' GTTT	A *			
Alelo A	3' CAAA	T	G	T	A
Posición de la proyección		1	2	3	4

SNP Y 11/15	5' GTT '	T	A *		
Alelo A	3'CAA	A	T	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3

SNP Y 10/14	5'GTTT	T	C	A*	
Alelo T	3'CAAA	A	G	T	A
Posición de la proyección		1	2	3	4

SNP Y 11/15	5' GT T	T	T	C	A *
Alelo T	3' CAA	A	A	G	T
Posición de la proyección		0	1	2	3

[0396] En este ejemplo, el ddGTP marcado y el ddATP marcado, se usan para determinar la identidad de ambos alelos de SNP X y SNP Y respectivamente. El nucleótido inmediatamente precedente (el nucleótido complementario a la

posición 0 de la proyección del corte 11/15 SNP X no es guanina ni adenina en la cadena que está llena. Igualmente, el nucleótido inmediatamente precedente SNPY no es guanina ni adenina en la cadena que está llena. Esto permite la reacción de llenado para ambos SNPs ocurrir en una sola reacción con el ddGTP marcado, ddATP marcado, dCTP, dTTP, no marcados. Esto reduce el número de reacciones que necesitan ser realizadas y aumenta el número de SNPs que pueden analizarse en una reacción.

[0397] Pueden diseñarse las primeras plantillas para cada SNP para recocer a diferentes distancias del sitio de interés, lo cual le permite al SNPs emigrar a diferentes posiciones en el gel. Por ejemplo, la primera plantilla usada para amplificar SNP X puede recocer a 30 bases del sitio de interés, y la primera plantilla usada para amplificar SNP Y puede recocer a 35 bases del sitio de interés. También, los nucleótidos pueden ser marcados con tintes fluorescentes que emiten espectros que no se traslapan. Después de trabajar el gel, éste puede ser examinado a una longitud de onda específica para un tinte. Sólo aquellas moléculas rotuladas con ese tinte emitirán una señal. El gel puede luego ser examinado a la longitud de onda para el segundo tinte. Sólo aquellas moléculas marcadas con ese tinte emitirán una señal. Este método permite la máxima compresión para el número de SNPs que pueden analizarse en una sola reacción.

[0398] En este ejemplo, el nucleótido que precede el sitio variable en la cadena que fue llenada, no es adenina ni guanina. Este método puede trabajar con cualquier combinación nucleótidos marcados, y el técnico experimentado entendería cuales reacciones de rotulación pueden mezclarse y cuales no. Por ejemplo, si un SNP se marca con la timidina y un segundo SNP se marca con

la citosina, los SNPs pueden ser marcados en una sola reacción, si el nucleótido inmediatamente precedente a cada sitio variable no es timidina o citosina en la cadena codificante y el nucleótido inmediatamente después del sitio variable no es timidina ni citosina en la cadena codificante.

[0399] Este método permite que las señales de un alelo sean comparadas con las señales de un segundo alelo, sin la complejidad adicional de determinar el grado de fragmentación alternante, o teniendo que corregir los coeficientes cuánticos de los tintes. Este método es especialmente útil al intentar cuantificar la proporción de un alelo con respecto a otro. Por ejemplo, este método es útil para detectar anomalías cromosómicas. La proporción de alelos en un sitio heterocigoto, se espera que sea sobre 1: 1 (un alelo A y un alelo G). Sin embargo, si un cromosoma extra está presente se espera que la proporción sea aproximadamente 1:2 (un alelo A y 2 alelos G o 2 alelos A y 1 alelo G). Este método es especialmente útil al intentar detectar ADN fetal en la presencia de ADN materno.

[0400] Además, este método es útil para detectar dos signos genéticos en una muestra. Por ejemplo, este método puede detectar las células mutantes en la presencia de células de tipo nativo (vea Ejemplo 5). Si una célula mutante contiene una mutación en la secuencia de ADN de un gen particular, este método puede usarse para detectar ambos: el signo mutante y el signo del tipo nativo. Este método puede usarse para detectar la secuencia de ADN mutante en presencia de la secuencia de ADN del tipo nativo. La proporción de ADN mutante al tipo ADN nativo puede ser cuantificada porque se usa un solo nucleótido marcado con una mitad generadora de señal.

EJEMPLO 5

[0401] Los métodos no invasivos para el detección de varios tipos de cáncer tienen el potencial para reducir morbilidad y mortalidad de la enfermedad. Se han desarrollado varias técnicas para el detección temprana de tumores del colorectal incluso colonoscopia, enemas de bario, y sigmoidoscopia, pero están limitadas en el uso porque las técnicas son invasivas lo cual origina una proporción baja de conformidad del paciente. Las pruebas genéticas no invasivas pueden ser útiles identificando la fase temprana de los tumores colorectales.

[0402] En 1991, investigadores identificaron el gen Coli Poliposis Adenomatosa (Adenomatous Polyposis Coli) (APC) que desempeña un papel crítico en la formación de tumores colorectales (Kinzler *et al.*, Science 253:661.:665, 1991). El gen de APC reside en el cromosoma 5q21-22 y un total de 15 exones codifican para una molécula de ARN de 8529 nucleótidos, lo cual produce un 300 Kd de proteína APC. La proteína se expresa en numerosos tipos celulares y es esencial para la adherencia celular.

[0403] Las mutaciones en el gen APC generalmente inician neoplasia colorectal (Tsao, J. *et al.*, Am, J. Pathol. 145:531-534, 1994). Aproximadamente el 95% de las mutaciones en el gen APC resultan en mutaciones sin sentido/de desfase. Las mutaciones más comunes ocurren en los codones 1061 y 1309; las mutaciones de estos codones corresponden a 1/3 de todas las mutaciones de la línea germinal. Con respecto a las mutaciones somáticas, el 60% ocurren dentro de los codones 1286-1513, lo cual es aproximadamente 10% de la secuencia codificadora. Esta región es denominada la Región de Acumulación de Mutación (MCR). Numerosos tipos de mutaciones han sido identificados en el gen APC, incluso sustituciones del nucleótido (vea la Tabla III), errores de

empalme (vea la Tabla IV), eliminaciones pequeñas (vea la Tabla V), inserciones pequeñas (vea la Tabla VI), inserciones/eliminaciones pequeñas (vea la Tabla VII), eliminaciones mayores (vea la Tabla VIII), inserciones mayores (vea la Tabla IX), y reestructuraciones complejas (vea la Tabla X).

[0404] Investigadores han intentado identificar las células que albergan mutaciones en el gen de APC en muestras coprológicas (Traverso, G. *et al.*, New England Journal of Medicine, Vol. 346:311-320, 2002). Mientras las mutaciones de APC se encuentran en casi todos los tumores, aproximadamente 1 en 250 células en la muestra coprológica tiene una mutación en el gen APC; la mayoría de las células son células normales que se han vertido en los excrementos. Además, el ADN humano representa alrededor de una-billonésima del ADN total encontrado en las muestras coprológicas; la mayoría de ADN es bacteriana. La técnica empleada por Traverso *et al.*, sólo detecta las mutaciones que resultan en una proteína truncada.

[0405] Como se discutió anteriormente, numerosas mutaciones en el gen APC, han sido implicadas en el formación de tumores colorectales. Por lo tanto, allí todavía existe la necesidad de una técnica no invasiva, altamente sensible, para la detección de tumores colorectales.

Más adelante se describen los métodos para la detección de dos mutaciones en el gen APC. Sin embargo, puede analizarse cualquier número de mutaciones usando los métodos descritos aquí. Preparación del Template ADN

[0406] El template ADN se purifica de una muestra que contiene células del colon, que incluyen pero no se limitan a una muestra de heces. El template ADN se purifica usando los procedimientos descritos por Ahlquist *et al.* (Gastroenterology, 119:1219-1227, 2000). Si las muestras fecales están

congeladas, dichas muestras se descongelan a la temperatura ambiental, y se homogeneizan con un Exactor stool shaker (Exact Laboratories, Maynard, Mass.) después de la homogeneización, un equivalente a 4 gramos de materia fecal de cada muestra se centrifuga a 2536 x g durante 5 minutos. Las muestras se centrifugan una segunda vez a 16.500 x g durante 10 minutos. Se incuban los sobrenadantes con 20 µl de RNase (0.5 mg por mililitro) durante 1 hora a 37°C. El ADN se precipita con 1/10 volumen de 3 moles de acetato de sodio por litro y un volumen igual de isopropanol. El ADN se disuelve en 5 ml de TRIS-EDTA (0.01 mol de Tris por litro (pH 7.4) y 0.001 mol de EDTA por litro.

Diseño de Plantillas

[0407] Para determinar si una mutación reside en el codón 1370, se usan las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5'GTGCAAAGGCCTGAATTCCCAGGCACAAAGCTGTTGAA3'

Segunda plantilla:

5' TGAAGCGAACTAGGGACTCAGGTGGACTT

[0408] La primera plantilla contiene un marcador de biotina en el terminal 5', y la secuencia nucleótida para la enzima de restricción EcoRI. La segunda plantilla contiene la secuencia del nucleótido para la enzima de restricción BsmF I.

[0409] Para determinar si existe una pequeña eliminación en el codón 1302, se usan las siguientes plantillas:

Primera plantilla:

5' GATTCCGTAAACGAATTCAGTICATTATCATCTTTGTC 3'

5' CCA TTGTTAAGCGGGACTTCTGCT UN TTTG 3'

[0410] La primera plantilla tiene un marcador de biotina en el terminal 5' y contiene un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para EcoRI. La segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción para BsmF I.

Reacción de PCR

[0411] Se amplifican los sitios de interés del template de ADN genómico usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, U.S. Patente. 4.683.195 y 4.683.202, aquí incorporado para referencia). Se amplifican los sitios de interés en tubos de reacción separados; también se pueden amplificar juntos en una sola reacción de PCR. Para incrementar la especificidad, se usa una reacción PCR "inicio caliente", por ejemplo usando el HotStarTaq Master Mix Kit proporcionado por QIAGEN (catálogo número 203443). La cantidad de template ADN y plantilla por reacción son optimizados para cada sitio de interés, pero en este ejemplo son utilizados 40 ng de template ADN genómico humano y 5µM de cada plantilla. Se efectúan cuarenta ciclos de PCR. Se usan las siguientes condiciones de PCR:

- (1) 95°C durante 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 37°C durante 30 segundos;
- (3) 95°C durante 30 segundos;
- (4) 57°C durante 30 segundos;
- (5) 95°C durante 30 segundos;
- (6) 64°C durante 30 segundos;

(7) 95°C durante 30 segundos;

(8) repite los pasos 6 y 7 treinta nueve (39) veces;

(9) 72°C durante 5 minutos.

[0412] En el primer ciclo de PCR, la temperatura del recocido está alrededor de la temperatura de fusión de la región de recocido 3' de las segundas plantillas, que es 37°C. La temperatura de recocido en el segunda ciclo de PCR está alrededor de la temperatura de fusión de la región 3' que recocce el template ADN de la primera plantilla, que es 57°C. La temperatura de recocido en el tercer ciclo de PCR está cerca a la temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla que es 64°C. La temperatura del recocido durante los ciclos restantes es 64°C. Se mejora grandemente la especificidad realizando una escalada de la temperatura de recocido de TM1 a TM2 a TM3 en los primeros tres ciclos de PCR. Estas temperaturas de recocido son representativas, y el técnico experimentado entiende que las temperaturas del recocido durante cada ciclo son dependientes de las plantillas específicas utilizadas.

[0413] Las temperaturas y los tiempos para desnaturalización, templando, y extensión, se perfeccionan probando varias escenas y usando los parámetros que rindan los mejores resultados.

Purificación del Fragmento que Contiene el Sitio de Interés

[0414] Los productos de PCR son separados del template de ADN genómico. Cada producto PCR es dividido en cuatro pozos de reacción separados de un placa transparente, Streptawell, High Bind plate from Roche Diagnostics GmbH (catálogo número 1 645 692, como aparece listado en Roche Molecular

Biochemicals, 2001 Biochemicals Catalog). Las primeras plantillas contienen una marcador 5' biotina de modo que los productos de PCR se ligan a los pozos recubiertos de Estreptavidina mientras el template del ADN genómico no lo hace. La reacción de ligado de estreptavidina se ha realizado usando un Thermomixer (Eppendorf) a 1000 rpm durante 20 minutos a 37°C. Cada pozo se aspira bien para remover el material no ligado, y se lava tres veces con IX PBS, con mezclado suave (Kandpal et al., Nucl. Acids Res. 18:1789-1795 (1990); Kaneoka et al., Biotechniques 10:30-34 (1991); Green et al., Nucl. Acids Res. 18:6163-6164 (1990)).

[0415] Alternativamente, los productos de PCR se colocan en un solo pozo de una placa de estreptavidina para efectuar la reacción de incorporación del nucleótido en un solo pozo.

Digestión de la Enzima de Restricción de Fragmentos Aislados que Contienen Sitios de Interés

[0416] Los productos purificados de PCR se digieren con la enzima de restricción BsmF I (New England Bio1abs catálogo número R0572S) que enlaza al sitio de reconocimiento incorporado en los productos PCR de la segunda plantilla. Las digestiones se realizan en Streptawells siguiendo las instrucciones proporcionadas con la enzima de la restricción. Después de la digestión con la enzima de restricción apropiada, los pozos se lavan tres veces con PBS para remover los fragmentos de la ruptura.

Incorporación del Nucleótido Marcado

[0417] La digestión de la enzima de restricción descrito antes, rinde un fragmento ADN' con una proyección 5' que contiene el sitio de interés y un terminal de receso 3'.

La proyección 5' funciona como un template que permite la incorporación de un nucleótido o nucleótidos en la presencia de un polimerasa de ADN.

[0418] Para cada sitio de interés, son realizadas cuatro reacciones separadas de llenado; cada una de las cuatro reacciones contiene un ddNTP fluorescentemente diferente marcado (ddATP, ddTTP, ddGTP, o ddCTP). Los siguientes componentes se agregan a cada reacción de llenado: 1µl de un ddNTP fluorescentemente marcado, 0.5µl de ddNTPs no marcados (40µM), que contiene todos los nucleótidos excepto el nucleótido que es fluorescentemente marcado, 2µl de búfer secuenasa 10X, 0.25µl de secuenasa, y agua, según la necesidad para una reacción 20µl. El llenado se efectúa en reacciones a 40°C durante 10 minutos. El ddNTP no fluorescentemente marcado se obtiene de Fermentas Inc. (Hannover, MD). Todos los otros reactivos de marcado se obtienen de Amersham (Thermo Sequenase Dye Terminador Cycle Core Kit, EE.UU. 79565). En la presencia de ddNTPs fluorescentemente marcados, el receso 3' se extiende una base, lo que corresponde al sitio de interés.

[0419] También puede usarse una mezcla de ddNTPs marcados y dNTPs no marcados para la reacción de llenado. Las condiciones de "llenado" son como se describió anteriormente, excepto que se usa una mezcla que contiene 40µM dNTPs no marcados, 1µl ddATP fluorescentemente marcado, 1µl ddTTP fluorescentemente marcado, 1µl ddCTP fluorescentemente marcado, y 1µl ddGTP. Los ddNTPs fluorescentes se obtienen de Amersham (Thermo

Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Core Kit, EE.UU. 79585; Amersham no publica las concentraciones de los nucleótidos fluorescentes). El sitio de interés se digiere con la enzima de restricción BsmF I, lo que genera la proyección 5' de cuatro bases. Si el primer nucleótido incorporado es un ddNTP marcado, el terminal de receso 3' es llenado por una base, permitiendo la detección del sitio de interés. Sin embargo, si el primer nucleótido incorporado es un dNTP, la polimerasa continúa incorporando nucleótidos hasta que un ddNTP esté lleno. Por ejemplo, los primeros dos nucleótidos pueden rellenarse con dNTPs, y el tercer nucleótido con un ddNTP, permitiendo la detección del tercer nucleótido en la proyección. Así, la secuencia de la proyección entera 5' es determinada, lo que aumenta la información obtenida de cada SNP o sitio de interés. Este tipo de reacción de llenado es especialmente útil para detectar la presencia de inserciones, eliminaciones, inserciones, eliminaciones, reestructuraciones, y translocaciones.

[0420] Alternativamente, un nucleótido marcado con un solo tinte se usa para determinar la secuencia del sitio de interés. Vea el Ejemplo 4. Este método elimina cualquier error potencial al usar tintes diferentes que tienen diferentes coeficientes cuánticos.

[0421] Después de marcar, cada Streptawell se enjuaga con IX PBS (100µl) tres veces. Los fragmentos de ADN "Llenados" son liberados del Streptawells mediante la digestión con la enzima de restricción EcoRI, según las instrucciones del fabricante que se proporcionan con la enzima. La digestión es realizada durante 1 hora a 37°C con agitación a 120 rpm.

[0422] Después de la liberación de la matriz de estreptavidina, la muestra es cargada en una senda de unos 36 centímetros 5% gel acrilamida (urea) (Bio Whittaker Molecular Applications, Lone Ranger Run Gel Packs, catálogo número 50691). La muestra es sometida a electrofóresis en el gel a 3000 voltios, durante 3 minutos. El gel se trabaja durante 3 horas usando un aparato de secuenciación (Hoefer SQ3 Sequencer). El nucleótido marcado incorporado se detecta mediante la fluorescencia.

[0423] Para determinar si alguna célula contiene mutaciones en el codón 1370 del gen de APC cuando se efectúan reacciones separadas de llenado, se analizan las sendas del gel a que corresponde la reacción de llenado para el ddATP y ddTTP. Si sólo están presentes células normales, la senda que corresponde a la reacción de llenado con el ddATP es una señal brillante. Ninguna señal se detecta para la reacción de "llenado" con ddTTP. Sin embargo, si la muestra del paciente contiene células con mutaciones en el codón 1370 del gen de APC, la senda que corresponde a la reacción de llenado con el ddATP es una señal brillante, y una señal es detectada de la senda correspondiente a la la reacción de llenado con ddTTP. La intensidad de la señal de la senda que corresponde a la reacción de llenado con el ddTIP es indicativa del número de células mutantes en la muestra.

[0424] Alternativamente, un nucleótido marcado es usado para determinar la secuencia de alelos en el codón 1370 del gen de APC. En el codón 1370, la secuencia normal es AAA que codifica para lisina aminoácida. Sin embargo, una substitución del nucleótido se ha identificado en el codón 1370 que está asociado con tumores colorectales.

Específicamente, un cambio de A a T (AAA - TAA) típicamente se encuentra en el codón 1370, lo que resulta en un codon de detención. Una sola reacción de llenado es realizada usando ddATP marcado, y dTTP, dCTP, dGTP no marcados. Se usa un solo nucleótido marcado con un tinte fluorescente para determinar la presencia de ambos: la secuencia normal y mutante de ADN que codifica para codón 1370. La secuencia relevante de ADN se transcribe más adelante, con la secuencia que corresponde al codón 1370 en letras resaltadas:

5' CCCAAAAGTCCACCTGA
3' GGGTTTTTCAGGTGGACT

[0425] Después de la digestión con BsmF I, se produce la siguiente proyección:

5' CCC				
3' GGG	T	T	T	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

[0426] Si la muestra del paciente no tiene ninguna célula que alberga una mutación en el codon 1370, se observa una señal correspondiente a la incorporación del ddATP marcado.

5' C C C	A *			
3' GGG	T	T	T	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

[0427] Sin embargo, si la muestra del paciente tiene células con mutaciones en el codón 1370 del gen APC, se observa una señal que corresponde a la secuencia normal en el codón 1370 y se observa una segunda señal que

corresponde a la secuencia mutante en el codón 1370. Las señales se identifican claramente por cuanto ellas difieren en el peso molecular.

Proyección de la secuencia normal de ADN: C C C

	GGG	T	T	T	T
Posición de la proyección	1	2	3	4	
Secuencia de ADN normal después del llenado:	CCC	A *			
		GGG	T	T	
T	T				

Posición de la proyección	1	2	3	4
---------------------------	---	---	---	---

Proyección de la secuencia mutante de ADN: C C C

	GGG	A	T	T	
Posición de la proyección	1	2	3	4	
Secuencia mutante de ADN después del llenado:	CCC	T	A *		
	GGG	A	T	T	T
Posición de la proyección	1	2	3	4	

[0428] Se observan dos señales cuando el alelo mutante está presente. Las moléculas de ADN mutante están llenas en una base después del tipo nativo de moléculas ADN. Las dos señales son separadas usando cualquier método que discrimine con base en el peso molecular.

Se usa un nucleótido marcado (ddATP) para detectar la presencia de ambos: la secuencia de ADN tipo nativo y la secuencia de ADN mutante. Este método de marcado reduce el número de reacciones que necesitan ser realizadas y permite la cuantificación exacta para el número de células mutantes, en la muestra del paciente. El número de células mutantes en la muestra se usa para determinar la prognosis del paciente, el grado y la severidad de la enfermedad.

Este método de marcar elimina las complicaciones asociadas con usar diferentes tintes que tienen los coeficientes cuantitativos distintos. Este método de marcar también elimina errores asociados con las reacciones del proceso de pipetas.

[0429] Para determinar si alguna célula contiene mutaciones en el codón 1302 del gen de APC, cuando se realizan reacciones separadas de llenado, se analizan las sendas del gel que corresponden a la reacción de llenado para ddTTP y ddCTP. La secuencia de ADN normal se describe más adelante, en letra más oscura, con secuencia que codifica para codón 1302.

Secuencia Normal: 5' ACCCTGCAAATAGCAGAA

3' TGGGACGTT TATCGTCT T

[0430] Después de digestión, se produce la siguiente proyección 5':

5' ACCC				
3' TGGG	A	C	G	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

[0431] Después de la reacción, el ddTTP marcado es incorporado.

5' ACCC	T *			
3' TGGG	A	C	G	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

[0432] Una eliminación de una sola base de la secuencia APC, la cual típicamente codifica para codón 1302, ha sido asociada con los tumores colorectales. La secuencia de ADN mutante se muestra enseguida con la secuencia pertinente en **negrita**:

Secuencia Mutante:5' ACCCGCAAATAGCAGAA

3' TGGGCGTITATCGTCTT

Después de Digerir:

213

	5' ACC			
	3'TGG	G	C	G T
Posición de la proyección		1	2	3 4

Después de llenado:

	5'ACC	C *			
	3' TGG	G	C	G	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

[0433] Si no hay ninguna mutación en el gen de APC, no se detecta ninguna señal para la reacción de llenado con el ddCTP*, pero para la reacción de llenado con el ddTTP *. si se detecta una señal brillante. Sin embargo, si hay células en la muestra del paciente que tengan mutaciones en el gen de APC, se observan señales para las reacciones de llenado con el ddCTP * y ddTTP *.

[0434] Alternativamente, una sola reacción de llenado es realizada usando una mezcla que contiene dNTPs no marcados, ddATP fluorescentemente marcado, ddTTP fluorescentemente marcado, ddCTP fluorescentemente marcado, y ddGTP fluorescentemente marcado. Si ni existe ninguna eliminación, el ddTTP marcado es incorporado.

	5' ACCC	T *			
	3' TGGG	A	C	G	T
Posición de la proyección		1	2	3	4

[0435] Sin embargo, si el T ha sido anulado, el ddCTP marcado * es incorporado.

	5' A C C	C *			
	3' TGG	G	C	G	T

218

[0436] Los dos signos están separados por el peso molecular debido a la eliminación del nucleótido de la timidina. Si las células mutantes están presentes, dos señales son generadas en la misma sonda, pero están separadas por un solo par de bases (este principio se demuestra en FIG. 9D. La eliminación causa un cambio en el peso molecular de los fragmentos ADN, lo que permite utilizar una sola reacción de llenado para detectar la presencia de células normales y mutantes.

[0437] En el ejemplo anterior se describen los métodos para la detección de una sustitución de nucleótido y una eliminación pequeña. Sin embargo, los métodos usados para la detección de cualquier tipo de mutación que incluye pero no se limita a sustituciones del nucleótido (vea la Tabla III), traslazo de errores (vea la Tabla IV), eliminaciones pequeñas (vea la Tabla V), inserciones pequeñas (vea la Tabla VI), inserciones/eliminaciones pequeñas (vea la Tabla VII), eliminaciones mayores (vea la Tabla VIII), inserciones mayores (vea la Tabla IX), y reestructuraciones complejas (vea la Tabla X).

[0438] Los métodos antes descritos se usan para la detección de cualquier tipo de enfermedad, que incluye pero no se limita a aquéllas listadas en la Tabla II. Además, cualquier tipo de gen mutante se detecta usando las invenciones descritas aquí, incluyendo pero sin limitar a los genes asociados con las enfermedades listadas en la Tabla II, BRCA1, BRCA2, MSH6, MSH2, MLH1, RET, PTEN, ATM, H-RAS, p53, ELAC2, CDHI, APC, AR, PMS2, MLH3, CYP1A1, GSTP1, GSTM1, AXIN2, CYP19, MET, NAT1, CDKN2A, NQO1, trc8, RAD51, PMS1, TGFB2, VHL, MC4R, POMC, NROB2, UCP2, PCSK1,

PPARG, ADRB2, UCP3, glur1, cart, SORBS1, LEP, LEPR, SIM1, TNF, IL-6, IL-1, IL-2, IL-3, IL1A, TAP2, THPO, THRB, NBS1, RBM15, LIF, MPL, RUNXI, Her-2, receptor glucocorticoide, receptor estrógeno, receptor tiroideo, el p21, p27, K-RAS, N-RAS, proteína retinoblastoma, gen Wiskott-Aldrich (WAS), Factor V Leiden, Factor II (protrombina), metileno tetrahidrofolato reductasa, fibrosis quística, receptor LDL, receptor HDL, gen de la superóxido dismutasa, gen SHOX, genes involucrados en la regulación óxido nítrico, genes involucrados en la regulación del ciclo celular, genes supresores de tumores, oncogenes, genes asociados con la neurodegeneración, genes asociados con la obesidad. Las abreviaciones corresponden a las proteínas como aparecen listadas en la Base de datos de Human Gene Mutation, el cual se incorpora al presente para referencia (www.archive.uwcm.ac.uk/uwcm) dirección del website activa a partir del 12 de febrero, año 2003).

[0439] El ejemplo anterior demuestra la detección de células y alelos mutantes de una muestra fecal. Sin embargo, los métodos descritos aquí se usan para el detección de células mutantes de cualquier muestra biológica que incluye pero no se limita a muestras de sangre, muestras de suero, muestras de plasma, muestra de orina, fluido espinal, fluido linfático, semen, secreción vaginal, fluido ascítico, saliva, secreción de la mucosa, fluido peritoneal, muestra fecal, exudados corporales, fluido del seno, aspirados pulmonares, células, tejidos, células individuales o extractos de tales fuentes que contienen el ácido nucleico del mismo, y estructuras subcellulares como mitocondria o cloroplasto. Adicionalmente, se usan los métodos descritos aquí para la detección de células mutantes y ADN mutado de cualquier número de ácido nucleico que

contiene fuentes que incluyen pero se no limitan a muestras forenses, comida, muestras arqueológicas, agrícolas o inorgánicas.

[0440] Los ejemplos anteriores son dirigidos a la detección de mutaciones en el gen de APC. Sin embargo, las invenciones descritas aquí dentro se usan para la detección de mutaciones en cualquier gen que esté asociado con o que predisponga a enfermedad (vea la Tabla XI).

[0441] Por ejemplo, la hipermetilación del glutatión S-transferasa P1 (GSTP1) es el promotor más común de la alteración de ADN en el cáncer de próstata. El estado de metilación del promotor se determina usando bisulfito de sodio y los métodos descritos aquí.

[0442] El tratamiento con el bisulfito de sodio convierte los residuos de la citosina no metilada en uracilo, dejando las citosinas metiladas sin ninguna alteración. Usando los métodos descritos aquí, se diseñan una primera y segunda plantillas para amplificar las regiones del GSTP1 promotor, que son a menudo metiladas. Enseguida se muestra una región del GSTP1 promotor antes del tratamiento del bisulfito de sodio:

[0443] Antes del tratamiento de Bisulfito de Sodio:

5' ACCGCTACA
3' TGGCGATCA

[0444] Enseguida se muestra una región del GSTP1 promotor después del tratamiento del bisulfito de sodio, amplificación de PCR, y digestión con la enzima de restricción BsmF I, tipo IIS:

No Metilada

5' ACC
3' TGG U G A T

Posición de la proyección	1	2	3	4
Metilada				
5' ACC				
3' TGG	C	G	A	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

[0445] Se usan ddATP marcados, dCTP, dGTP, y dTTP no marcados, para llenado de las proyecciones 5'. Se generan las moléculas siguientes:

No Metiladas

5' ACC	A*			
3' TGG	U	G	A	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

Metilada

5' ACC	G	C	T	A*
3' TGG	C	G	A	T
Posición de la proyección	1	2	3	4

[0446] Se observan dos señales; una corresponde a moléculas ADN llenadas con ddATP en la posición uno, complementaria a la proyección (no metilado), y el otro corresponde a las moléculas de ADN rellenas con ddATP en la posición 4 complementaria a la proyección (metilado). Las dos señales son separadas con base en el peso molecular. Alternativamente, las reacciones de llenado son realizadas en reacciones separadas usando el ddGTP marcado en una reacción y el ddATP marcado en otra reacción.

[0447] Los métodos descritos aquí se usan para detección del cáncer de la próstata y también para supervisar la progresión y severidad de la enfermedad.

El uso de un solo nucleótido para detectar las secuencias metiladas y no metiladas permite la cuantificación exacta y mantiene un alto nivel de sensibilidad para las secuencias metiladas, lo cual es útil para la detección más temprana de la enfermedad.

[0448] La información contenida en las Tablas III-X se obtuvo de la Base de datos Human Gene Mutation. Con la información proporcionada aquí, el técnico experimentado entenderá como aplicar estos métodos para determinar la secuencia de alelos para cualquier gen. Un número grande de genes y sus mutaciones asociadas pueden encontrarse en el siguiente website: \ [www.archive.uwcm.ac.uk / uwcm](http://www.archive.uwcm.ac.uk/uwcm).

TABLA III:
SUBSTITUCIONES DE NUCLEOTIDO

Codon	Nucleótido	Aminoacido	Fenotipo
99	CGG-TGG	Arg-Trp	Coli poliposis adenomatoso
121	AGA-TGA	Arg-Term	Coli poliposis adenomatoso
157	TGG-TAG	Trp-Term	Coli poliposis adenomatoso
159	TAC-TAG	Tyr-Term	Coli poliposis adenomatoso
163	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
168	AGA-TGA	Arg-Term	Coli poliposis adenomatoso
171	AGT-ATT	Ser-Ile	Coli poliposis adenomatoso
181	CAA-TAA	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
190	GAA-TAA	Glu-Term	Coli poliposis adenomatoso
202	GAA-TAA	Glu- Term	Coli poliposis adenomatoso
208	CAG-CGG	Gln-Arg	Coli poliposis adenomatos
208	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
213	CGA-TGA	Arg-Term	Coli poliposis adenomatoso
215	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
216	CGA-TGA	Arg- Term	Coli poliposis adenomatoso
232	CGA-TGA	Arg-Term	Coli poliposis adenomatoso

233	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
247	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
267	GGA-TGA	Gly- Term	Coli poliposis adenomatoso
278	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
280	TCA-TGA	Ser-Term	Coli poliposis adenomatoso
280	TCA-TAA	Ser- Term	Coli poliposis adenomatoso
283	CGA-TGA	Arg- Term	Coli poliposis adenomatoso
302	CGA-TGA	Arg-Term	Coli poliposis adenomatoso
332	CGA-TGA	Arg-Term	Coli poliposis adenomatoso
358	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
405	CGA-TGA	Arg-Term	Coli poliposis adenomatoso
414	CGC- TGC	Arg-Cys	Coli poliposis adenomatoso
422	GAG-TAG	Glu- Term	Coli poliposis adenomatoso
423	TGG-TAG	Trp- Term	Coli poliposis adenomatoso
424	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
433	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
443	GAA-TAA	Glu-Term	Coli poliposis adenomatoso
457	TCA-TAA	Ser-Term	Coli poliposis adenomatoso
473	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
488	TAC-TAG	Tyr-Term	Coli poliposis adenomatoso
499	CGA-TGA	Arg-Term	Coli poliposis adenomatoso
500	TAT-TAG	Tyr- Term	Coli poliposis adenomatoso
541	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
553	TGG-TAG	Trp-Term	Coli poliposis adenomatoso
554	CGA- TGA	Arg-Term	Coli poliposis adenomatoso
564	CGA-TGA	Arg- Term	Coli poliposis adenomatoso
577	TTA-TAA	Leu- Term	Coli poliposis adenomatoso

586	AAA-TAA	Lys-Term	Coli poliposis adenomatoso
592	TTA-TGA	Leu-Term	Coli poliposis adenomatoso
593	TGG-TAG	Trp-Term	Coli poliposis adenomatoso
593	TGG-TGA	Trp-Term	Coli poliposis adenomatoso
622	TAC-TAA	Tyr-Term	Coli poliposis adenomatoso
625	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
629	TTA-TAA	Leu-Term	Coli poliposis adenomatoso
650	GAG-TAG	Glu-Term	Coli poliposis adenomatoso
684	TTG-TAG	Leu-Term	Coli poliposis adenomatoso
685	TGG-TGA	Trp-Term	Coli poliposis adenomatoso
695	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
699	TGG-TGA	Trp-Term	Coli poliposis adenomatoso
699	TGG-TAG	Trp-Term	Coli poliposis adenomatoso
713	TCA-TGA	Ser-Term	Coli poliposis adenomatoso
722	AGT-GGT	Ser-Gly	Coli poliposis adenomatoso
747	TCA-TGA	Ser-Term	Coli poliposis adenomatoso
764	TTA-TAA	Leu-Term	Coli poliposis adenomatoso
784	TCT-ACT	Ser-Thr	Coli poliposis adenomatoso
805	CGA-TGA	Arg-Term	Coli poliposis adenomatoso
811	TCA-TGA	Ser-Term	Coli poliposis adenomatoso
848	AAA-TAA	Lys-Term	Coli poliposis adenomatoso
876	CGA-TGA	Arg-Term	Coli poliposis adenomatoso
879	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
893	GAA-TAA	Glu-Term	Coli poliposis adenomatoso
932	TCA-TAA	Ser-Term	Coli poliposis adenomatoso
932	TCA-TGA	Ser-Term	Coli poliposis adenomatoso
935	TAC-TAG	Tyr-Term	Coli poliposis adenomatoso
935	TAC-TAA	Tyr-Term	Coli poliposis adenomatoso
995	TGC-TGA	Cys-Term	Coli poliposis adenomatoso
997	TAT-TAG	Tyr-Term	Coli poliposis adenomatoso
999	CAA-TAA	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1000	TAC-TAA	Tyr-Term	Coli poliposis adenomatoso
1020	GAA-TAA	Glu-Term	Coli poliposis adenomatoso
1032	TCA-TAA	Ser-Term	Coli poliposis adenomatoso
1041	CAA-TAA	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1044	TCA-TAA	Ser-Term	Coli poliposis adenomatoso
1045	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1049	TGG-TGA	Trp-Term	Coli poliposis adenomatoso
1067	CAA-TAA	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1071	CAA-TAA	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1075	TAT-TAA	Tyr-Term	Coli poliposis adenomatoso
1075	TAT-TAG	Tyr-Term	Coli poliposis adenomatoso
1102	TAC-TAG	Tyr-Term	Coli poliposis adenomatoso

1110	TCA-TGA	Ser- Term	Coli poliposis adenomatoso
1114	CGA- TGA	Arg-Term	Coli poliposis adenomatoso
1123	CAA-TAA	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1135	TAT-TAG	Tyr- Term	Coli poliposis adenomatoso
1152	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1155	GAA-TAA	Glu-Term	Coli poliposis adenomatoso
1168	GAA-TAA	Glu-Term	Coli poliposis adenomatoso
1175	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1176	CCT-CTT	Pro-Leu	Coli poliposis adenomatoso
1184	GCC-CCC	Ala-Pro	Coli poliposis adenomatoso
1193	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1194	TCA- TGA	Ser- Term	Coli poliposis adenomatoso
1198	TCA-TGA	Ser-Term	Coli poliposis adenomatoso
1201	TCA-TGA	Ser-Term	Adenomatous polyposi coli
1228	CAG-TAG	Gln-Term	Adenomatouspolyposis coli
1230	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1244	CAA-TAA	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1249	TGC- TGA	Cys- Term	Coli poliposis adenomatoso
1256	CAA-TAA	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1262	TAT-TAA	Tyr-Term	Coli poliposis adenomatoso
1270	TGT- TGA	Cys- Term	Adnomatous polyposis coli
1276	TCA- TGA	Ser- Term	Coli poliposis adenomatoso
1278	TCA-TAA	Ser- Term	Coli poliposis adenomatoso
1286	GAA-TAA	Glu-Term	Coli poliposis adenomatoso
1289	TGT- TGA	Cys- Term	Coli poliposis adenomatoso
1294	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1307	ATA-AAA	Ile-Lys	Cáncer colorectal, predisposición asociación
1309	GAA-TAA	Glu-Term	Coli poliposis adenomatoso
1317	GAA-CAA	Glu-Gln	Cáncer Colorectal, predisposición
1328	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1338	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1342	TTA-TAA	Leu- Term	Coli poliposis adenomatoso

1342	TTA-TGA	Leu- Term	Coli poliposis adenomatoso
1348	AGG-TGG	Arg- Trp	Coli poliposis adenomatoso
1357	GGA-TGA	Gly-Term	Coli poliposis adenomatoso
1367	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1370	AAA-TAA	Lys-Term	Coli poliposis adenomatoso
1392	TCA-TAA	Ser- Term	Coli poliposis adenomatoso
1392	TCA- TGA,	Ser-Term	Coli poliposis adenomatoso
1397	GAG-TAG	Glu-Term	Coli poliposis adenomatoso
1449	AAG-TAG	Lys- Term	Coli poliposis adenomatoso
1450	CGA-TGA	Arg-Term	Coli poliposis adenomatoso
1451	GAA-TAA	Glu-Term	Coli poliposis adenomatoso
1503	TCA-TAA	Ser-Term	Coli poliposis adenomatoso
1517	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1529	CAG- TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1539	TCA-TAA	Ser- Term	Coli poliposis adenomatoso
1541	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
1564	TTA-TAA	Leu- Term	Coli poliposis adenomatoso
1567	TCA-TGA	Ser-Term	Coli poliposis adenomatoso
1640	CGG- TGG	Arg- Trp	Coli poliposis adenomatoso
1693	GAA-TAA	Glu-Term	Coli poliposis adenomatoso
1822	GAC-GTC	Asp- Val	Coli poliposis adenomatoso, asociación con
2038	CTG-GTG	Leu-Val	Coli poliposis adenomatoso
2040	CAG-TAG	Gln-Term	Coli poliposis adenomatoso
2566	AGA-AAA	Arg-Lys	Coli poliposis adenomatoso
2621	TCT-TGT	Ser-Cys	Coli poliposis adenomatoso
2839	CTT-TTT	Leu-Phe	Coli poliposis adenomatoso

TABLA IV:
SUBSTITUCIONES DE NUCLEÓTIDO

Donante Aceptante	Localización Relativa	Substitución	Fenotipo
ds	-1	G-C	Coli poliposis adenomatoso
as	-1	G-A	Coli poliposis adenomatoso
as	-1	G-C	Coli poliposis adenomatoso
ds	+2	T-A	Coli poliposis adenomatoso
as	-1	G-C	Coli poliposis adenomatoso
as	-1	G-T	Coli poliposis adenomatoso
as	-1	G-A	Coli poliposis adenomatoso
as	-2	A-C	Coli poliposis adenomatoso
as	-5	A-G	Coli poliposis adenomatoso
ds	+3	A-C	Coli poliposis adenomatoso
as	-1	G-A	Coli poliposis adenomatoso
ds	+1	G-A	Coli poliposis adenomatoso
as	-1	G-T	Coli poliposis adenomatoso
ds	+1	G-A	Coli poliposis adenomatoso
as	-1	G-A	Coli poliposis adenomatoso
ds	+1	G-A	Coli poliposis adenomatoso
ds	+3	A-G	Coli poliposis adenomatoso
ds	+5	G-T	Coli poliposis adenomatoso
as	-1	G-A	Coli poliposis adenomatoso
as	-6	A-G	Coli poliposis adenomatoso
as	-5	A-G	Coli poliposis adenomatoso

as	-2	A-G	Coli poliposis adenomatoso
ds	+2	T-C	Coli poliposis adenomatoso
as	-2	A-G	Coli poliposis adenomatoso
ds	+1	G-A	Coli poliposis adenomatoso
ds	+1	G-T	Coli poliposis adenomatoso
ds	+2	T-G	Coli poliposis adenomatoso

TABLAV:

PEQUEÑAS ELIMINACIONES APC

[1449] Las letras reñidas indican el codón. Las letras en minúsculas representan eliminación. Donde las eliminaciones se extienden más allá de la región codificadora, otra información posicional es suministrada. Por ejemplo, la abreviación 5' UTR representa 5' región sin traducción; y la abreviación E6I6 denota exon 6/intron I línea divisoria 6.

Localización Codón	Eliminación	Fenotipo
77	TTAgataGCAGTAATTT	Coli poliposis adenomatoso
97	GGAAGccggaagGATCTGTATC	Coli poliposis adenomatoso
138	GAGAAAGAGAG_E3I3_GTAA	Coli poliposis adenomatoso
139	AAAGAgag_E3I3_Gtaactttct	Cáncer tiroide
139	AAAGagag_E3I3_GTAACTTTTC	Coli poliposis adenomatoso
142	TTTTAAAAAaAAAAATAG_I3E4GTCA	Coli poliposis adenomatoso
144	AAAATAG_I3E4_GTCatTGCTTCTTGC	Coli poliposis adenomatoso
149	GACAaaGAAGAAAAGG	Coli poliposis adenomatoso
149	GACAAagaaGAAAAGGAAA	Coli poliposis adenomatoso
155	AGGAA^AAAGActggtATTACGCTCA	Coli poliposis adenomatoso
169	AAAAGA^ATAGatagTCTTCCTTTA	Coli poliposis

		adenomatoso
172	AGATAGT^CTTcCTTTAACTGA	Coli poliposis adenomatoso
179	TCCTTacaaACAGATATGA	Coli poliposis adenomatoso
185	ACCaGAAGGCAATT	Coli poliposis adenomatoso
198	ATCAGagTTGCGATGGA	Coli poliposis adenomatoso
213	CGAGCaCAG_E515_GTAAGTT	Coli poliposis adenomatoso
298	CACtcTGCACCTCGA	Coli poliposis adenomatoso
329	GATaTGTCGCGAAC	Coli poliposis adenomatoso
365	AAAGActCTGTATTGTT	Coli poliposis adenomatoso
397	GACaaGAGAGGCAGG	Coli poliposis adenomatoso
427	CATGAacCAGGCATGGA	Adenomatous polyposis coli
428	GAACCaGGCATGGACC	Coli poliposis adenomatoso
438	AATCCaa_E9I9_gTATGTTCTCT	Coli poliposis adenomatoso
440	GCTCCiGTTGAACATC	Coli poliposis adenomatoso
455	AAACTtTCATTTGATG	Coli poliposis adenomatoso
455	AAACttcaTTTGATGAAG	Coli poliposis adenomatoso
472	CTAcAGGCCATTGC	Coli poliposis adenomatoso
472	TAAATTAG_I10E11_GGgGACTACAGGC	Coli poliposis adenomatoso
478	TTATiGCAAGTGGAC	Coli poliposis adenomatoso
488	TACGgGCTTACTAAT	Coli poliposis adenomatoso
494	AGTATiACACTAAGAC	Coli poliposis adenomatoso
495	ATTACacTAAGACGATA	Coli poliposis adenomatoso
497	CTAaGACGATATGC	Coli poliposis adenomatoso
520	TGCTCtaTGAAAGGCTG	Coli poliposis adenomatoso
528	ATGAGagcactgtgGCCCAACTAA	Coli poliposis adenomatoso
539	GACTTaCAGCAG_E12I12_GTAC	Coli poliposis adenomatoso
560	AAAAAgaCGTTGCGAGA	Coli poliposis adenomatoso
566	GTTGgaagtGTGAAAGCAT	Coli poliposis

		adenomatoso
570	AAAGCaTTGATGGAAT	Coli poliposis adenomatoso
577	TTAGaagtTAAAAAG_E13I13_GTA	Coli poliposis adenomatoso
584	ACCCTcAAAAGCGTAT	Coli poliposis adenomatoso
591	GCCTtATGGAATTTG	Coli poliposis adenomatoso
608	GCTgTAGATGGTGC	Adenomatous polyposis coli
428	GAACCaGGCATGGACC	Coli poliposis adenomatoso
436	AATCCaa_E9I9gTATGTTCTCT	Coli poliposis adenomatoso
440	GCTCCtGTTGAACATC	Coli poliposis adenomatoso
455	AAACTtTCATTTGATG	Coli poliposis adenomatoso
455	AAACtttcaTTTGATGAAG	Coli poliposis adenomatoso
472	CTAcAGGCCATTGC	Coli poliposis adenomatoso
472	TAAATTAG_I10E11_GGgGACTACAGGC	Coli poliposis adenomatoso
478	TTATtGCAAGTGGAC	Coli poliposis adenomatoso
486	TACGgGCTTACTAAT	Coli poliposis adenomatoso
494	AGTATtACACTAAGAC	Coli poliposis adenomatoso
495	ATTACacTAAGACGATA	Coli poliposis adenomatoso
497	CTAaGACGATATGC	Coli poliposis adenomatoso
520	TGCTCtaTGAAAGGCTG	Coli poliposis adenomatoso
526	ATGAGagcacttgGCCCCAACTAA	Coli poliposis adenomatoso
539	GACTTaCAGCAG_E12I12_GTAC	Coli poliposis adenomatoso
560	AAAAAgaCGTTGCGAGA	Coli poliposis adenomatoso
566	GTTGgaagtGTGAAAGCAT	Coli poliposis adenomatoso
570	AAAGCaTTGATGGAAT	Coli poliposis adenomatoso
577	TTAGaagtTAAAAAG_E13I13_GTA	Coli poliposis adenomatoso
584	ACCCTcAAAAGCGTAT	Coli poliposis adenomatoso
591	GCCTtATGGAATTTG	Coli poliposis adenomatoso
608	GCTgTAGATGGTGC	Coli poliposis

		adenomatoso
617	GTTggcactcttactaccGGAGCCAGAC	Coli poliposis adenomatoso
620	CTTACTtacCGGAGCCAGA	Coli poliposis adenomatoso
621	ACTTaCCGGAGCCAG	Coli poliposis adenomatoso
624	AGCCaGACAAACACT	Coli poliposis adenomatoso
624	AGCCagacAAACACTTTA	Coli poliposis adenomatoso
626	ACAaacaCTTTAGCCAT	Coli poliposis adenomatoso
629	TTAGCcATTATTGAAA	Coli poliposis adenomatoso
635	GGAGgTGGGATATTA	Coli poliposis adenomatoso
638	ATATiACGGAATGTG	Coli poliposis adenomatoso
639	TTACGgAATGTGTCCA	Coli poliposis adenomatoso
657	AGAgAACAACACTGT	Coli poliposis adenomatoso
659	TATTTcAG_I14E15_GCaaatcctaagagagAA CAACTGTC	Coli poliposis adenomatoso
660	AACTgtCTACAAACTT	Coli poliposis adenomatoso
665	TTAttACAACACTTA	Coli poliposis adenomatoso
668	CACttAAAATCTCAT	Coli poliposis adenomatoso
673	AGTttgacaatagtCAGTAATGCA	Coli poliposis adenomatoso
768	CACTTaTCAGAAACTT	Coli poliposis adenomatoso
769	TTATcAGAAACTTTT	Coli poliposis adenomatoso
770	TCAGAAACTTTTGACA	Coli poliposis adenomatoso
780	AGTCcCAAGGCATCT	Coli poliposis adenomatoso
792	AAGCaAAGTCTCTAT	Coli poliposis adenomatoso
792	AAGCAaaGTCTCTATGG	Coli poliposis adenomatoso
793	CAAAGTCTCTATGGT	Coli poliposis adenomatoso
798	GATTatGTTTTTGACA	Coli poliposis adenomatoso
802	GACACcaatcgacatGATGATAATA	Coli poliposis adenomatoso
805	CGACatGATGATAATA	Coli poliposis adenomatoso
811	TCAGacaaTTTTAATACT	Coli poliposis

		adenomatoso
825	TATtTGAATACTAC	Coli poliposis adenomatoso
827	AATAcTACAGTGTTA	Coli poliposis adenomatoso
830	GTGTTaccagctcccttTCATCAAGAG	Coli poliposis adenomatoso
833	AGCTCcTCTTCATCAA	Coli poliposis adenomatoso
836	TCATcAAGAGGAAGC	Coli poliposis adenomatoso
848	AAAGAtaGAAGTTTGGA	Coli poliposis adenomatoso
848	AAAGatagaagTTTGGAGAGA	Coli poliposis adenomatoso
855	GAACgCGGAATTGGT	Coli poliposis adenomatoso
856	CGCGgaattGGTCTAGGCA	Coli poliposis adenomatoso
856	CGCGgAATTGGTCTA	Coli poliposis adenomatoso
879	CAGaTCTCCACCAC	Coli poliposis adenomatoso
902	GAAGAcagaAGTTCTGGGT	Coli poliposis adenomatoso
907	GGGTcTACCACTGAA	Coli poliposis adenomatoso
915	GTGACaGATGAGAGAA	Coli poliposis adenomatoso
929	CATACacatTCAAACACTT	Coli poliposis adenomatoso
930	ACACAItcaAACACTTACA	Coli poliposis adenomatoso
931	CATtCAAACACTTA	Coli poliposis adenomatoso
931	CATTcAAACACTTAC	Coli poliposis adenomatoso
933	AACacttACAATTTAC	Coli poliposis adenomatoso
935	TACAatttcaactAAGTCGGA	Coli poliposis adenomatoso
937	TTCActaaGTCGGA	Coli poliposis adenomatoso
939	AAGtcggAAAATTCAA	Coli poliposis adenomatoso
946	ACATgTTCTATGCCT	Coli poliposis adenomatoso
954	TTAGaaTACAAGAGAT	Coli poliposis adenomatoso
961	AATgATAGTTTAA	Coli poliposis adenomatoso
963	AGTTTaAATAGTGTC	Coli poliposis adenomatoso
964	TTAaataGTGTCAGTAG	Coli poliposis

		adenomatoso
973	TATGgTAAAAGAGGT	Coli poliposis adenomatoso
974	GGTAAaAGAGGTCAAA	Coli poliposis adenomatoso
975	AAAgaGGTCAAATGA	Cáncer Tiroide
982	AGTAAgTTTTGCAGTT	Cáncer Tiroide
993	AAGtttgcagttaTGGTCAATAC	Coli poliposis adenomatoso
999	CAAtaccagCCGACCTAGC	Coli poliposis adenomatoso
1023	ACACcAATAAATTAT	Coli poliposis adenomatoso
1030	AAAiATTCAGATGA	Coli poliposis adenomatoso
1032	TCAGatgagCAGTTGAACT	Coli poliposis adenomatoso
1033	GATGaGCAGTTGAAC	Coli poliposis adenomatoso
1049	TGGGcAAGACCCAAA	Coli poliposis adenomatoso
1054	CACAtaataGAAGATGAAA	Coli poliposis adenomatoso
1055	ATAAtagaaGATGAAATAA	Coli poliposis adenomatoso
1056	ATAGaAaGATGAAATAA	Coli poliposis adenomatoso
1060	ATAAAacaaaGTGAGCAAAG	Adenoroatous polyposis coli
1061	AAAcaaaGTGAGCAAAG	Coli poliposis adenomatoso
1061	AAACaaAGTGAGCAAA	Coli poliposis adenomatoso
1062	CAAAgtgaGCAAAGACAA	Coli poliposis adenomatoso
1065	CAAAGacAATCAAGGAA	Coli poliposis adenomatoso
1067	CAAtcaaGGAATCAAAG	Coli poliposis adenomatoso
1071	CAAAgTACAACCTTATC	Coli poliposis adenomatoso
1079	ACTGagAGCACTGATG	Coli poliposis adenomatoso
1082	ACTGAtgATAAACACCT	Adeuomatous polyposis coli
1084	GATaaacACCTCAAGTT	Coli poliposis adenomatoso
1086	CACCTcAAGTTCCAAC	Coli poliposis adenomatoso
1093	TTTGgACAGCAGGAA	Coli poliposis adenomatoso
1098	TGTgtTTCTCCATAC	Coli poliposis adenomatoso
1105	CGGgGAGCCAATGG	Cáncer Tiroide

1110	TCAGAAACAAATCGAG	Coli poliposis adenomatoso
1121	ATTAAIcaaAATGTAAGCC	Coli poliposis adenomatoso
1131	CAAgAAGATGACTA	Coli poliposis adenomatoso
1134	GACTAI GAAGATGATA	Coli poliposis adenomatoso
1137	GATgataaGCCTACCAAT	Coli poliposis adenomatoso
1146	CGTTAcTCTGAAGAAG	Coli poliposis adenomatoso
1154	GAAGaagaaGAGAGACCAA	Coli poliposis adenomatoso
1155	GAAGaagaGAGACCAACA	Coli poliposis adenomatoso
1156	GAAgagaGACCAACAAA	Coli poliposis adenomatoso
1168	GAAgagaaACGTCATGTG	Coli poliposis adenomatoso
1178	GATTAtagtttaAAATATGCCA	Coli poliposis adenomatoso
1181	TTAAaATATGCCACA	Coli poliposis adenomatoso
1184	GCCacagaTATTCCTTCA	Coli poliposis adenomatoso
1185	ACAgATATTCCTTCA	Coli poliposis adenomatoso
1190	TCACAgAAACAGTCAT	Coli poliposis adenomatoso
1192	AAAcGTCATTTTCA	Coli poliposis adenomatoso
1198	TCAaaGAGTTCATCT	Coli poliposis adenomatoso
1207	AAAAcCGAACATATG	Coli poliposis adenomatoso
1208	ACCgaacATATGTCTTC	Coli poliposis adenomatoso
1210	CATatGTCTTCAAGC	Coli poliposis adenomatoso
1233	CCAAGtCTGCACAGA	Coli poliposis adenomatoso
1249	TGCAaaGTTTCTTCTA	Coli poliposis adenomatoso
1259	ATAcaGACTTATTGT	Coli poliposis adenomatoso
1260	CAGACTtATTGTGTAGA	Coli poliposis adenomatoso
1268	CCAaTATGTTTTTC	Coli poliposis adenomatoso
1275	AGTtCATTATCATC	Coli poliposis adenomatoso
1294	CAGGAaGCAGATTCTG	Coli poliposis adenomatoso

1301	ACCCtGCAAATAGCA	Coli poliposis adenomatoso
1306	GAAAtaaaAGAAAAGATT	Coli poliposis adenomatoso
1307	ATAaAAGAAAAGAT	Coli poliposis adenomatoso
1308	AAAgaaaAGATTGGAAC	Coli poliposis adenomatoso
1308	AAAGAaaagaTTGGAAGTAG	Coli poliposis adenomatoso
1318	GATCcTGTGAGCGAA	Coli poliposis adenomatoso
1320	GTGAGcGAAGTTCCAG	Coli poliposis adenomatoso
1323	GTTCcAGCAGTGTCA	Coli poliposis adenomatoso
1329	CACCctagaaccAAATCCAGCA	Coli poliposis adenomatoso
1336	AGACtgCAGGGTTCTA	Coli poliposis adenomatoso
1338	CAGgGTTCTAGTTT	Coli poliposis adenomatoso
1340	TCTAgTTTATCTTCA	Coli poliposis adenomatoso
1342	TTATcTTCAGAATCA	Coli poliposis adenomatoso
1352	GTTgAATTTTCTTC	Coli poliposis adenomatoso
1361	CCCTcCAAAAGTGGT	Coli poliposis adenomatoso
1364	AGTggtgCTCAGACACC	Coli poliposis adenomatoso,
1371	AGTCCacCTGAACACTA	Coli poliposis adenomatoso
1372	CCACCtGAACACTATG	Coli poliposis adenomatoso
1376	TATGttCAGGAGACCC	Coli poliposis adenomatoso
1384	GATAgTTTTGAGAGTC	Coli poliposis adenomatoso
1401	ATTGCcAGCTCCGTTC	Coli poliposis adenomatoso
1415	AGTGGcATTATAAGCC	Coli poliposis adenomatoso
1426	AGCCcTGGACAAACC	Coli poliposis adenomatoso
1427	CCTGGaCAAACCATGC	Coli poliposis adenomatoso
1431	ATGCcACCAAGCAGA	Coli poliposis adenomatoso
1454	AAAAAtAAAGCACCTA	Coli poliposis adenomatoso
1461	GAAaAGAGAGAGAG	Coli poliposis adenomatoso

1463.	AGAgagaGTGGACCTAA	Coli poliposis adenomatoso
1464	GAGAgTGGACCTAAG	Coli poliposis adenomatoso
1464	GAGAgTGGACCTAAGC	Coli poliposis adenomatoso
1464	GAGagTGGACCTAAG	Coli poliposis adenomatoso
1492	GCCaCGGAAAGTAC	Coli poliposis adenomatoso
1493	ACGGAaAGTACTCCAG	Coli poliposis adenomatoso
1497	CCAgATGGATTTTC	Coli poliposis adenomatoso
1503	TCAAtccaGCCTGAGTGC	Coli poliposis adenomatoso
1522	TTAagaataaTGCTCCAGT	Coli poliposis adenomatoso
1536	GAAACagAATCAGAGCA	Coli poliposis adenomatoso
1545	TCAAAtgaaaACCAAGAGAA	Coli poliposis adenomatoso
1547	GAAaACCAAGAGAA	Coli poliposis adenomatoso
1550	GAGAAagaGGCAGAAAAA	Coli poliposis adenomatoso
1577	GAATgtATTATTTCTG	Coli poliposis adenomatoso
1594	CCAGCcCAGACTGCTT	Coli poliposis adenomatoso
1596	CAGACtGCTTCAAAT	Coli poliposis adenomatoso
1823	TTCAaTGATAAGCTC	Coli poliposis adenomatoso
1859	AATGAtctTTGAGTTCTC	Coli poliposis adenomatoso
1941	CCAGAcagaGGGGCAGCAA	Coli poliposis adenomatoso
1957	GAAaATACTCCAGT	Coli poliposis adenomatoso
1980	AACaATAAAGAAAA	Coli poliposis adenomatoso
1985	GAACCIATCAAAGAGA	Coli poliposis adenomatoso
1986	CCTaTCAAAGAGAC	Coli poliposis adenomatoso
1998	GAACcAAGTAAACCT	Coli poliposis adenomatoso
2044	AGCTCcGCAATGCCAA	Coli poliposis adenomatoso
2556	TCATCcccttctcGAGTAAGCAC	Coli poliposis adenomatoso
2643	CTAATttatCAAATGGCAC	Coli poliposis adenomatoso

TABLA VI:
PEQUEÑAS INSERCIONES

Codón	Inserción	Fenotipo
157	T	Coli poliposis adenomatoso
170	AGAT	Coli poliposis adenomatoso
172	T	Coli poliposis adenomatoso
199	G	Coli poliposis adenomatoso
243	AG	Coli poliposis adenomatoso
266	T	Coli poliposis adenomatoso
357	A	Coli poliposis adenomatoso
405	C	Coli poliposis adenomatoso
413	T	Coli poliposis adenomatoso
416	A	Coli poliposis adenomatoso
457	G	Coli poliposis adenomatoso
473	A	Coli poliposis adenomatoso
503	ATTC	Coli poliposis adenomatoso
519	C	Coli poliposis adenomatoso
528	A	Coli poliposis adenomatoso
561	A	Coli poliposis adenomatoso
608	A	Coli poliposis adenomatoso
620	CT	Coli poliposis adenomatoso
621	A	Coli poliposis adenomatoso
623.	TTAC	Coli poliposis adenomatoso
627	A	Coli poliposis adenomatoso
629	A	Coli poliposis adenomatoso
636	GT	Coli poliposis adenomatoso
639	A	Coli poliposis adenomatoso
704	T	Coli poliposis adenomatoso
740	ATGC	Coli poliposis adenomatoso
764	T	Coli poliposis adenomatoso
779	TT	Coli poliposis adenomatoso
807	AT	Coli poliposis adenomatoso
827	AT	Coli poliposis adenomatoso
831	A	Coli poliposis adenomatoso
841	CTTA	Coli poliposis adenomatoso
865	CT	Coli poliposis adenomatoso
865	AT	Coli poliposis adenomatoso
900	TG	Coli poliposis adenomatoso
921	G	Coli poliposis adenomatoso
927	A	Coli poliposis adenomatoso
935	A	Coli poliposis adenomatoso
936	C	Coli poliposis adenomatoso
975	A	Coli poliposis adenomatoso
985	T	Coli poliposis adenomatoso
997	A	Coli poliposis adenomatoso
1010	TA	Coli poliposis adenomatoso
1085	C	Coli poliposis adenomatoso
1085	AT	Coli poliposis adenomatoso
1095	A	Coli poliposis adenomatoso

1100	GTTT	Coli poliposis adenomatoso
1107	GGAG	Coli poliposis adenomatoso
1120	G	Coli poliposis adenomatoso
1166	A	Coli poliposis adenomatoso
1179	T	Coli poliposis adenomatoso
1187	A	Coli poliposis adenomatoso
1211	T	Coli poliposis adenomatoso
1256	A	Coli poliposis adenomatoso
1265	T	Coli poliposis adenomatoso
1267	GATA	Coli poliposis adenomatoso
1268	T	Coli poliposis adenomatoso
1301	A	Coli poliposis adenomatoso
1301	C	Coli poliposis adenomatoso
1323	A	Coli poliposis adenomatoso
1342	T	Coli poliposis adenomatoso
1382	T	Coli poliposis adenomatoso
1458	GTAG	Coli poliposis adenomatoso
1463	AG	Coli poliposis adenomatoso
1488	T	Coli poliposis adenomatoso
1531	A	Coli poliposis adenomatoso
1533	T	Adeuomatous polyposis coli
1554	A	Coli poliposis adenomatoso
1555	A	Coli poliposis adenomatoso
1556	T	Coli poliposis adenomatoso
1563	GACCT	Coli poliposis adenomatoso
1924	AA	Tumores de Desmoid

TABLA VII: PEQUEÑAS INSERCIONES/SUPRESIONES

Localización/ Codón	Supresión	Inserción	Fenotipo
538	GAAGAcTTACAGCAGG	gaa	Coli poliposis adenomatoso
620	CTTACttaCCGGAGCCAG	ct	Coli poliposis adenomatoso
728	AATctcatGGCAAATAGG	Ttgcagcttta a	Coli poliposis adenomatoso
971	GATGgtTATGGTAAAA	taa	Coli poliposis adenomatoso

TABLA VIII:
ELIMINACIONES MAYORES

2 kb incluyendo ex. 11	Coli poliposis adenomatoso
3 kb I10E11-1.5 kb to I12E13-170 bp	Coli poliposis adenomatoso
335bpnt. 1409-1743 ex. 11-13	Coli poliposis adenomatoso
6kbincl. ex. 14	Coli poliposis adenomatoso
817 bp I13E14-679 to I13E14+138	Coli poliposis adenomatoso
ex.II-15M	Coli poliposis adenomatoso

ex. 11-3'UTR	Coli poliposis adenomatoso
ex. 15A-ex. 15F	Coli poliposis adenomatoso
ex.4	Coli poliposis adenomatoso
ex. 7, 8 and 9	Coli poliposis adenomatoso
ex. 8 to beyond ex. 15F	Coli poliposis adenomatoso
ex. 8 - ex. 15F	Coli poliposis adenomatoso
ex.9	Coli poliposis adenomatoso
> 10mb (del 5q22)	Coli poliposis adenomatoso

TABLA IX:
INSERCIONES Y DUPLICACIONES MAYORES

Descripción	Fenotipo
Insertión de 14 bp nt. 3816	Coli poliposis adenomatoso
Insertion of 22 bp nt. 4022	Coli poliposis adenomatoso
Duplication of 43 bp cd. 1295	Coli poliposis adenomatoso
Insertion of 337 bp ofAlu I sequence cd. 1526	Tumores Desmold

TABLA X:
REESTRUCTURACIONES COMPLEJAS
(INCLUYENDO INVERSIONES)

A-Tnt. 4893 Q1625H, Del C nt. 4897 cd.	1627	Coli poliposis adenomatoso
Del 1099 bpl13E14-728 toE14I14-H56,	Ins 126 bp	Coli poliposis adenomatoso
Del 1601 bpE14I14+27toE14I14+1627,	Ins180bp	Coli poliposis adenomatoso
Del 310 bp, ins. 15 bp nt. 4394, cd 1464		Coli poliposis adenomatoso
Del A and Ted. 1395		Coli poliposis adenomatoso
Del TC nt 4145, Del TGTnt. 4548		Coli poliposis adenomatoso
Del. T, nt. 983, Del. 70 bp, nt 985		Coli poliposis adenomatoso
Del. nt. 3892-3903, ins ATTT		Coli poliposis adenomatoso

TABLA XI:
APLICACIONES DE DIAGNOSTICO

Tipo de Cancer	Marcador	Aplicación	Referencia
Seno	Her2/Neu polimorfismo en codón 655 (GTC/valina a ATC/isoleucina[Val(655)Ile])	Usando los métodos aquí descritos, diseñe una segunda plantilla tal que después de PCR y digestión con la enzima de restricción, una proyección 5' sea	D.Xiec J. Natl. Cancer Institute 92., 412 (2000) K.S. Wilson et al., Am J, Pathol.,} 161,1 171 (2002)

		generada, conteniendo la secuencia ADN para codón 655 de Her2/Neu. Her2/Neu puede detectarse y cuantificarse como posible marcador para el cáncer del seno. Los métodos aquí descritos pueden detectar ambos alelos: mutantes y normales, aún cuando el alelo mutante es solo una pequeña fracción del ADN total. Terapia de Herceptin para el cáncer del seno se basa en la revisión para Her2. Entre más pronto se detecte el alelo mutante, más rápida puede ser la terapia proporcionada	L. Newman <i>Cancer Control</i> ,9, 473 (2002)
Seno Ovario	Hipermetilación de BRCA1	Los métodos descritos aquí pueden usarse para diferenciar entre tumores resultantes de mutaciones BRCA1 heredadas y aquellas de mutilación anormal del gen, no heredadas	M-Esteller et al., <i>New England Jnl Med.</i> ,344, 539 (2001)
Vejiga	Análisis microsatélite de ADN libre de tumor en la orina, suero y plasma	Los métodos aquí descritos se pueden aplicar a análisis microsatélite y mutación FGFR3 para detección de cáncer en la vejiga. Los métodos aquí descritos proporcionan un método no invasivo para detección de cáncer de la vejiga.	W.G. Bas et al. <i>Clinical Cancer Res.</i> , 9,257 (2003) M. Utting et al., <i>Clinical Cancer Res.</i> , 8,35 (2002) L. Mao D. Sidransky et al., <i>Science</i> , 271, 669 (1996)
Pulmón	Análisi microsatélite de ADN	Los métodos aquí	T. Liloglou et al.,

	de esputo	descritos se pueden usar para detectar mutaciones en muestras de esputo, y pueden decisivamente mejorar la exactitud de evaluación pre clínica de cáncer del pulmón.	Cancer Research, 61, 1624, (2001)M. Tockman et al., Cancer Control, 7, 19 (2000) Field et al., Cancer Research, 59, 2690 (1999)
Cervical	Análisis de genotipo HPV	Los métodos aquí descritos pueden usarse para detectar HPV genotipo de un frotis cervical	N. Munoz et al., New England Jnl Med., 348, 518 (2003)
Cabeza y Cuello	Alteraciones tumorales específicas en células exfoliadas de mucosa oral (marcadores microsatélite)	Los métodos aquí descritos pueden usarse para detectar cualquiera de 23 marcadores microsatélite, los cuales están asociados con carcinoma de células escamosas de Cabeza y Cuello (HNSCC)	M. Spafford et al., Clinical Cancer Research, 17, 607 (2001) A. El Naggar et al., J. Mol. Diag., 3, 164 (2001)
Colorectal	Evaluación para mutación en Genes Kras2 y APC	Los métodos aquí descritos pueden usarse para detectar mutaciones K-ras2, lo cual puede usarse como prognosis indicador para cáncer colorectal APC (vea el Ejemplo 5)	B. Ryan et al., Gut, 52, 101 (2003)
Próstata	GSTP1 Hipermetilación	Los métodos aquí descritos pueden usarse para detectar GSTP1 hipermetilación en orina, de pacientes con cáncer de próstata; este puede ser mejor indicador que PSA.	P. Cairns et al., Clin. Can. Res., 7, 2727 (2001)

VIH

Resistencia antiretroviral	Evaluación de Individuos para mutaciones en el virus VIH. Ej.,	Los métodos aquí descritos pueden usarse para la detección de	J. Durant et al., The Lancet, 353, 2195 (1999)
----------------------------	--	---	--

	mutación 154V o alelo CCR5 32	mutaciones en el virus VIH. Los resultados de tratamientos son mejores en individuos que reciben terapia antiretroviral con base en los análisis de resistencia	
--	-------------------------------	---	--

CARDIOLOGIA			
Falla cardiaca congestiva	Polimorfismos sinérgicos de beta 1 y alfa 2c Receptores adrenérgicos	Los métodos aquí descritos pueden usarse par el proceso de genotipo de estos sitios y puede ayudar a identificar individuos que están en muy alto riesgo de falla cardiaca	K. Small et al., New England Jnl. Med., 347,1135 (2002)

[0450] Ahora habiendo descrito totalmente la invención, lo entenderán aquellos calificados en la técnica, que la invención puede realizarse en un amplio y equivalente rango de condiciones, parámetros, y similares, sin afectar el espíritu o alcance de la invención o cualquier incorporación de ella.

[0451] Todos los documentos, por ejemplo publicaciones científicas, patentes y publicaciones de patentes citadas aquí, están por la presente incorporadas en su integridad para referencia; con el mismo alcance como si cada documento individual fuera específica e individualmente indicado a ser incorporado por referencia en su totalidad.

Donde los documentos citados sólo proporcionaron la primera página del documento, se piensa en el documento completo, incluso las páginas restantes del documento.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la determinación de una secuencia de un sitio de interés, dicho método comprende:

- (a) replicar una región de ADN que comprende un sitio de interés de un template ADN usando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene una secuencia que genera un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, de forma que esa digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés;
- (b) digerir el ADN con la enzima de restricción que distingue el sitio de reconocimiento generado por la segunda plantilla para crear un fragmento de ADN;
- (c) incorporar un nucleótido en el ADN digerido de (b) usando la proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template; y
- (d) determinar la secuencia del sitio de interés determinando la secuencia de ADN de (c).

2. Un método para la determinación de una secuencia de un sitio de interés, dicho método comprende:

- (a) amplificar un sitio de interés en un template ADN que usa una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, de forma que esa digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés;
- (b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que distingue el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla;
- (c) incorporar un nucleótido en el ADN digerido de (b) usando la proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template; y
- (d) determinar la secuencia del sitio de interés determinando la secuencia de ADN de (c).

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el template de ADN se obtiene de una muestra seleccionada del grupo consistente de una bacteria, hongo, virus, protozoario, planta, animal y humano.
4. El método de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el template de ADN se obtiene de una muestra seleccionada del grupo consistente de una célula, tejido, sangre, suero, plasma, orina, fluido espinal, fluido linfático, semen, secreción vaginal, fluido ascítico, saliva, secreción mucosa, fluido peritoneal, material fecal o exudación corporal.
5. El método de la reivindicación 2 a 3, en donde la amplificación en (a) comprende la reacción en cadena de polimerasa (PCR).
6. El método de la reivindicación 2 o 3, en donde la enzima de restricción fragmenta ADN en el sitio de reconocimiento.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la región 5' de la primera y/o segunda plantilla no se recoce al template de ADN.
8. El método de la reivindicación 6 o 7, en donde la enzima de restricción es seleccionada del grupo consistente en BsaJ I, Bssk I, Dde I, EcoN I, Fnu4H I y Hinf I.
9. El método de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la enzima de restricción fragmenta ADN a una distancia del sitio de reconocimiento.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la región 5' de la primera y/o segunda plantilla no recoce al template de ADN.
11. El método de la reivindicación 9 o 10, en donde una longitud de recocido de la región 3' de la segunda plantilla se selecciona entre un grupo consistente de 25-20, 20-15, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, y menos de 4 bases.

12. El método de las reivindicaciones 2 a 11, en donde una temperatura de recocido para el ciclo 1 de PCR está cerca de la temperatura de fusión de la porción de la región 3' de la segunda plantilla que recoce al template ADN.
13. El método de la reivindicación 12, en donde una temperatura de recocido para el ciclo 2 de PCR está cerca de la temperatura de fusión de la porción de la región 3' de la primera plantilla que recoce al template ADN.
14. El método de la reivindicación 13, en donde una temperatura de recocido para los ciclos restantes de PCR está cerca de la temperatura de fusión de la segunda plantilla completa.
15. El método de las reivindicaciones 2 a 14, en donde el terminal 3' de la segunda plantilla es adyacente al sitio de interés.
16. El método de la reivindicación 9, en donde el sitio de reconocimiento es para una enzima de restricción Tipo IIS.
17. El método de la reivindicación 16, en donde la enzima de restricción Tipo IIS es seleccionada del grupo consistente en Alw I, Alw26 I, Bbs I, Bbv I, BcaA I, Bmr I, Bsa I, Bst71 I, BsmA I, BsmB I, BsmF I, BspM I, Ear I, Fau I, Fok I, Hga I, Ple I, Sap I, SSfaN I y SthI32 I.
18. El método de las reivindicaciones 2 a 17, en donde la primera plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que es diferente del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción en la segunda plantilla.
19. El método de la reivindicación 22, además comprende la digestión del ADN de (c) con una enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento de la primera plantilla.
20. El método de las reivindicaciones 2 a 19, en donde la primera y/o segunda plantilla contiene un marcador en el terminal 5'.

21. El método de las reivindicaciones 2 a 19, en donde la primera plantilla contiene un marcador en el terminal 5'.
22. El método de las reivindicaciones 20 o 21, en donde el marcador se usa para separar el ADN amplificado del template ADN.
23. El método de la reivindicación 22, en donde el marcador se usa para separar el ADN amplificado que contiene el nucleótido incorporado, del ADN ampliado que no contiene el nucleótido incorporado.
24. El método de las reivindicaciones 20, 21, 22 o 23, en donde el marcador es seleccionado del grupo consistente de: radioisótopo, molécula reportera fluorescente, molécula reportera químiluminescente, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, hapteno, biotina, derivado de biotina, fotobiotina, iminobiotina, digoxigenina, avidina, enzima, acridinio, azúcar, enzima, apoenzima, oligonucleótido homopolimérico, hormona, mitad ferromagnética, mitad paramagnética, mitad diamagnética, mitad fosforescente, mitad luminescente, mitad electroquímiluminescente, mitad cromática, mitad que tiene una resonancia detectable del giro del electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica o conductividad eléctrica, y combinaciones de estos.
25. El método de la reivindicación 24, en donde se usa un marcador de biotina para separar el ADN amplificado del template de ADN usando una matriz de estreptavidina, y en donde, opcionalmente, la matriz de estreptavidina está recubierta en los agujeros de una placa microtituladora.
26. El método de las reivindicaciones 2 a 25, en donde la incorporación de un nucleótido en (c) es mediante una polimerasa de ADN seleccionada del grupo consistente de E. coli polimerasa de ADN, fragmento Klenow de E. coli polimerasa I de ADN, polimerasa T7 de ADN, polimerasa T4 de ADN, polimerasa Taq, ADN polimerasa Pfu de ADN, polimerasa Vent de ADN y secuenasa.

27. El método de las reivindicaciones 2 a 26, en donde la incorporación de un nucleótido en (c) comprende la incorporación de un nucleótido marcado.

28. El método de las reivindicaciones 2 a 27, en donde la incorporación de un nucleótido en (c) además comprende la incorporación de un nucleótido no marcado.

29. El método de la reivindicación 27, en donde el nucleótido marcado es seleccionado del grupo consistente de un dideoxynucleótido y un deoxynucleótido.

30. El método de las reivindicaciones 28 o 29, en donde el nucleótido marcado es marcado con una molécula seleccionada del grupo consistente de: molécula radiactiva, molécula fluorescente anticuerpo, fragmento de anticuerpo, hapteno, carbohidrato, biotina, derivado de biotina, mitad fosforescente, mitad luminescente, mitad electroquímico luminescente, mitad cromática, y mitad que tiene una resonancia detectable del giro del electrón, capacitancia eléctrica, constante dieléctrica, conductividad eléctrica, y combinaciones de estos.

31. El método de las reivindicaciones 2 a 30, en donde la determinación de la secuencia del sitio de interés en (d) comprende la detección del nucleótido.

32. El método de las reivindicaciones 27 a 31, en donde la determinación de la secuencia del sitio de interés en (d) comprende la detección del nucleótido marcado.

33. El método de las reivindicaciones 31 o 32, en donde la detección es mediante un método seleccionado del grupo consistente de electroforesis en gel, electroforesis en gel poliacrilamida, detección de fluorescencia, secuenciación, ELISA, espectrometría de masas, fluorometría, hibridación, microformación y manchas al Sur.

34. El método de las reivindicaciones 2 a 33, en donde se sospecha que el sitio de interés contiene un polimorfismo de nucleótido sencillo o mutación.

35. El método de las reivindicaciones 2 a 34, en donde el método se usa para determinar concurrentemente la secuencia de múltiples sitios de interés.

36. El método de la reivindicación 35, en donde el template de ADN comprende múltiples sitios de un cromosoma sencillo o de múltiples cromosomas.

37. El método de las reivindicaciones 35 o 36, en donde los sitios de interés en el template de ADN son amplificados en una reacción.

38. El método de las reivindicaciones 35 o 36, en donde cada uno de los sitios de interés en el template de ADN son amplificados en una reacción separada.

39. El método de la reivindicación 38, en donde el ADN amplificado es agrupado antes de la digestión del ADN amplificado.

40. El método de las reivindicaciones 27 a 39, en donde cada ADN marcado en (c) conteniendo un sitio de interés, es separado antes de (d).

41. El método de las reivindicaciones 35 a 40, en donde al menos uno de los sitios de interés es sospechoso de contener un polimorfismo de nucleótido sencillo o una mutación.

42. Un método para determinar la secuencia de un sitio de interés, dicho método comprende:

(a) amplificar un sitio de interés en un template de ADN usando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene una porción de un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, en donde el sitio de reconocimiento completo para la enzima de restricción se genera a la

amplificación del template de ADN, de forma que esa digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés;

(b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento completo generado por la segunda plantilla y el template de ADN;

(c) incorporar un nucleótido en el ADN digerido de (b) mediante el uso de la proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template; y

(d) determinar la secuencia del sitio de interés mediante la determinación de la secuencia del ADN de (c).

43. El método de la reivindicación 42, en donde la región 3' de la segunda plantilla contiene una desigualdad con el template de ADN.

44. El método de la reivindicación 42, en donde la desigualdad ocurre en las últimas 1, 2 o 3 bases de la región 3'.

45. Un método para determinar una secuencia de un sitio de interés, dicho método comprende:

(a) amplificar un sitio de interés en un template de ADN usando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que fragmenta ADN a una distancia del sitio de reconocimiento, y la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés, y en donde la primera plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que es diferente del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción en la segunda plantilla, y contiene un marcador en el terminal 5';

(b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla;

(c) incorporar un nucleótido marcado en el ADN digerido de (b) mediante el uso de una proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template;

(d) digerir el ADN de (c) con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la primera plantilla; y

(e) determinar la secuencia del sitio de interés mediante la determinación de la secuencia del ADN digerido de (d) que contiene el nucleótido marcado.

46. Un método para determinar una secuencia de un sitio de interés, dicho método comprende:

(a) amplificar un sitio de interés en un template de ADN usando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que fragmenta ADN a una distancia del sitio de reconocimiento, y la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés, y en donde la primera plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que es diferente del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción en la segunda plantilla, y contiene un marcador en el terminal 5', y en donde la temperatura de recocido para el ciclo 1 de PCR es cercana a la temperatura de fusión de la región 3' de la segunda plantilla que recoce al template de ADN, la temperatura de recocido para el ciclo 2 de PCR es cercana a la temperatura de fusión de las porciones de la región 3' de la primera plantilla que recoce al template de ADN, y la temperatura de recocido para los ciclos restantes es cercana a la temperatura de fusión de la segunda plantilla completa;

(b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla;

(c) incorporar un nucleótido marcado en el ADN digerido de (b) mediante el uso de una proyección 5' que contiene el sitio de interés como un template;

(d) digerir el ADN de (c) con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la primera plantilla; y

(e) determinar la secuencia del sitio de interés mediante la determinación de la secuencia del ADN digerido de (d) que contiene el nucleótido marcado.

47. El método de la reivindicación 46, en donde el marcador se usa para separar el ADN amplificado del template de ADN.

48. Un kit para uso en cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 1 a 47, que comprende un conjunto de plantillas usadas en el método, en donde la

segunda plantilla contiene una secuencia que genera un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, de forma que esa digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés, y un conjunto de instrucciones.

49. Un fragmento de ADN que contiene un sitio de interés a ser secuenciado y un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, en donde la digestión con la enzima de restricción crea una proyección 5' en el fragmento de ADN, y en donde el sitio de interés y el sitio de reconocimientos de la enzima de restricción están relacionados entre sí, de forma que esa digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés.

50. Un método para determinar una secuencia de alelos de un sitio de interés, dicho método comprende:

- (a) amplificar los alelos de un sitio de interés en un template de ADN usando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción tal que la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés;
- (b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla;
- (c) incorporar nucleótidos en el ADN digerido de (b), en donde
 - (i) un nucleótido que termina el alargamiento, y es complementario al sitio de interés de un alelo, es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo, y
 - (ii) un nucleótido complementario al sitio de interés del otro alelo es incorporado en la proyección 5' de dicho otro alelo, y dicho nucleótido terminador, que es complementario a un nucleótido posterior en la proyección 5' de dicho otro alelo, es incorporado en la proyección 5' de dicho otro alelo;
- (d) determinar la secuencia de los alelos de un sitio de interés mediante la determinación de la secuencia del ADN de (c).

51. Un método para determinar una secuencia de alelos de un sitio de interés, dicho método comprende:

- (a) amplificar un sitio de interés en un template de ADN usando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene una porción de un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción, en donde el sitio de reconocimiento completo se genera a la amplificación del template de ADN, tal que la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés;
- (b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento completo generado por la segunda plantilla y el template de ADN;
- (c) incorporar nucleótidos en el ADN digerido de (b), en donde
 - (i) un nucleótido que termina el alargamiento, y es complementario al sitio de interés de un alelo, es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo, y
 - (ii) un nucleótido complementario al sitio de interés del otro alelo es incorporado en la proyección 5' de dicho otro alelo, y dicho nucleótido terminador, que es complementario a un nucleótido posterior en la proyección 5' de dicho otro alelo, es incorporado en la proyección 5' de dicho otro alelo;
- (d) determinar la secuencia del sitio de interés mediante la determinación de la secuencia del ADN de (c).

52. Un método para determinar una secuencia de alelos de un sitio de interés, dicho método comprende:

- (a) amplificar un sitio de interés en un template de ADN usando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que fragmenta ADN a una distancia del sitio de reconocimiento, y la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés, y en donde la primera plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que es diferente del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción en la segunda plantilla, y contiene un marcador en el terminal 5';

- (b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla;
- (c) incorporar nucleótidos en el ADN digerido de (b), en donde
 - (i) un nucleótido marcado que termina el alargamiento, y es complementario al sitio de interés de un alelo, es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo, y
 - (ii) un nucleótido complementario al sitio de interés del otro alelo es incorporado en la proyección 5' de dicho otro alelo, y dicho nucleótido terminador, que es complementario a un nucleótido posterior en la proyección 5' de dicho otro alelo, es incorporado en la proyección 5' de dicho otro alelo;
- (d) digerir el ADN de (c) con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la primera plantilla; y
- (e) determinar la secuencia de alelos de un sitio de interés mediante la determinación de la secuencia del ADN digerido de (d) que contiene el nucleótido marcado.

53. Un método para determinar una secuencia de alelos de un sitio de interés, dicho método comprende:

- (a) amplificar un sitio de interés en un template de ADN usando una primera y segunda plantillas, en donde la segunda plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que fragmenta ADN a una distancia del sitio de reconocimiento, y la digestión con la enzima de restricción genera una proyección 5' que contiene el sitio de interés, en donde la primera plantilla contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción que es diferente del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción en la segunda plantilla, y contiene un marcador en el terminal 5', y en donde la temperatura de recocido para el ciclo 1 de PCR es cercana a la temperatura de fusión de la región 3' de la segunda plantilla que recoce al template de ADN, la temperatura de recocido para el ciclo 2 de PCR es cercana a la temperatura de fusión de la porción de la región 3' de la primera plantilla que recoce al template de ADN, y la temperatura de recocido para los ciclos restantes es cercana a la temperatura de fusión de la segunda plantilla completa;

- (b) digerir el ADN amplificado con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la segunda plantilla;
- (c) incorporar nucleótidos en el ADN digerido de (b), en donde
 - (i) un nucleótido marcado que termina el alargamiento, y es complementario al sitio de interés de un alelo, es incorporado en la proyección 5' de dicho alelo, y
 - (ii) un nucleótido complementario al sitio de interés del otro alelo es incorporado en la proyección 5' de dicho otro alelo, y dicho nucleótido terminador, que es complementario a un nucleótido posterior en la proyección 5' de dicho otro alelo, es incorporado en la proyección 5' de dicho otro alelo;
- (d) digerir el ADN de (c) con la enzima de restricción que reconoce el sitio de reconocimiento en la primera plantilla; y
- (e) determinar la secuencia de alelos de un sitio de interés mediante la determinación de la secuencia del ADN digerido de (d) que contiene el nucleótido marcado.

54. El método de las reivindicaciones 50 a 53, en donde dicho método se usa para determinar la secuencia de un alelo mutante en la presencia de un alelo normal.

55. El método de la reivindicación 54, en donde el alelo mutante y el alelo normal están presentes en una relación seleccionada del grupo consistente de: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6-1:10, 1:11-1:20, 1:21-1:30, 1:31-1:40, 1:41-1:50, 1:51-1:60, 1:61-1:70, 1:71-1:80, 1:81-1:90, 1:91-1:100, 1:101-1:200, 1:250, 1:251-1:300, 1:301-1:400, 1:401-1:500, 1:501-1:600, 1:601-1:700, 1:701-1:800, 1:801-1:900, 1:901-1:1000, 1:1001-1:2000, 1:2001-1:3000, 1:3001-1:4000, 1:4001-1:5000, 1:5001-1:6000, 1:6001-1:7000, 1:7001-1:8000, 1:8001-1:9000, 1:9001-1:10,000; 1:10,001-1:20,000, 1:20,001-1:30,000, 1:30,001-1:40,000, 1:40,001-1:50,000 y más de 1:50,000.

56. El método de las reivindicaciones 54 o 55, en donde dicho alelo mutante es de un gen seleccionado del grupo consistente de BRCA1, BRCA2, MSH6, MSH2, MLH1, RET, PTEN, ATM, H-RAS, p53, ELAC2, CDH1, APC, AR, PMS2, MLH3, CYP1A1, GSTP1, GSTM1, AXIN2, CYP19, MET, NAT1,

CDKN2A, NQ01, trc8, RAD51, PMS1, TGFBR2, VHL, MC4R, POMC, NROB2, UCP2, PCSK1, PPARG, ADRB2, UCP3, glur1, cart, SORBS1, LEP, LEPR, SIM1, TNF, IL-6, IL-1, IL-2, IL-3, IL1A, TAP2, THPO, THRB, NBS1, RBM15, LIF, MPL, RUNX1, Her-2, receptor glucocorticoide, receptor estrógeno, receptor tiroide, p21, p27, K-RAS, N-RAS, proteína retinoblastoma, gen Wiskott-Aldrich (WAS), Factor V Leiden, Factor II (protrombina), metileno tetrahidrofolato reductasa, fibrosis quística, receptor LDL, receptor HDL, gen de la superóxido dismutasa, y gen SHOX,

FIG. 1A

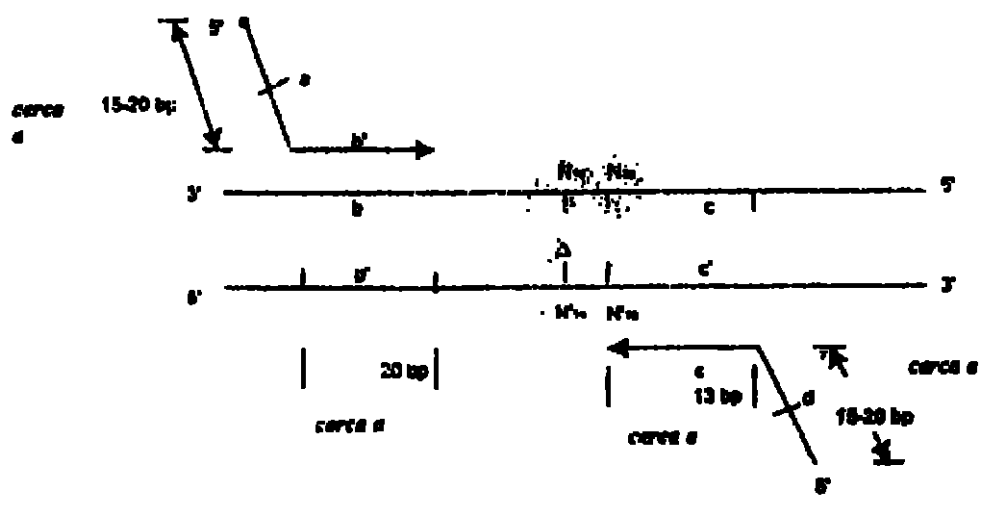


FIG. 1B

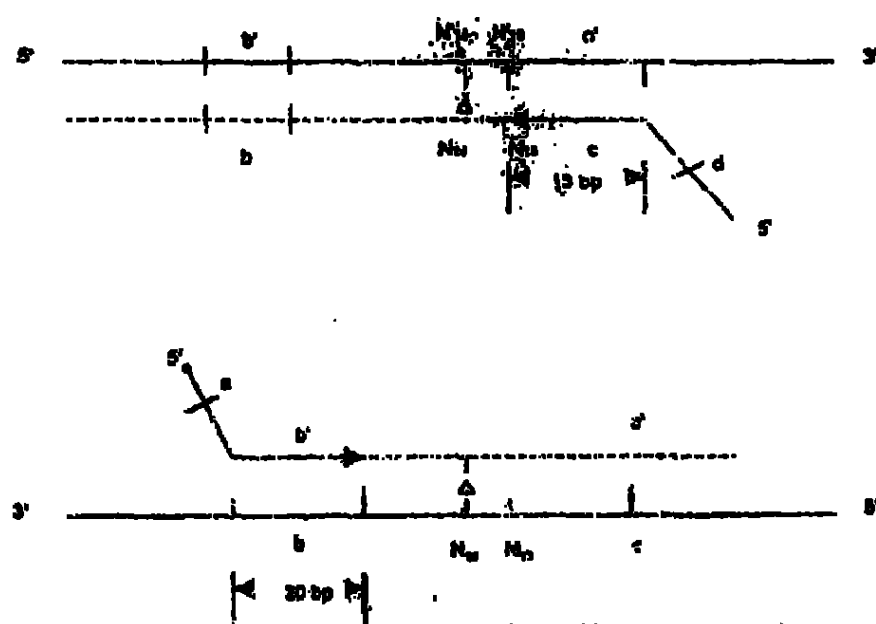


FIG. 1C

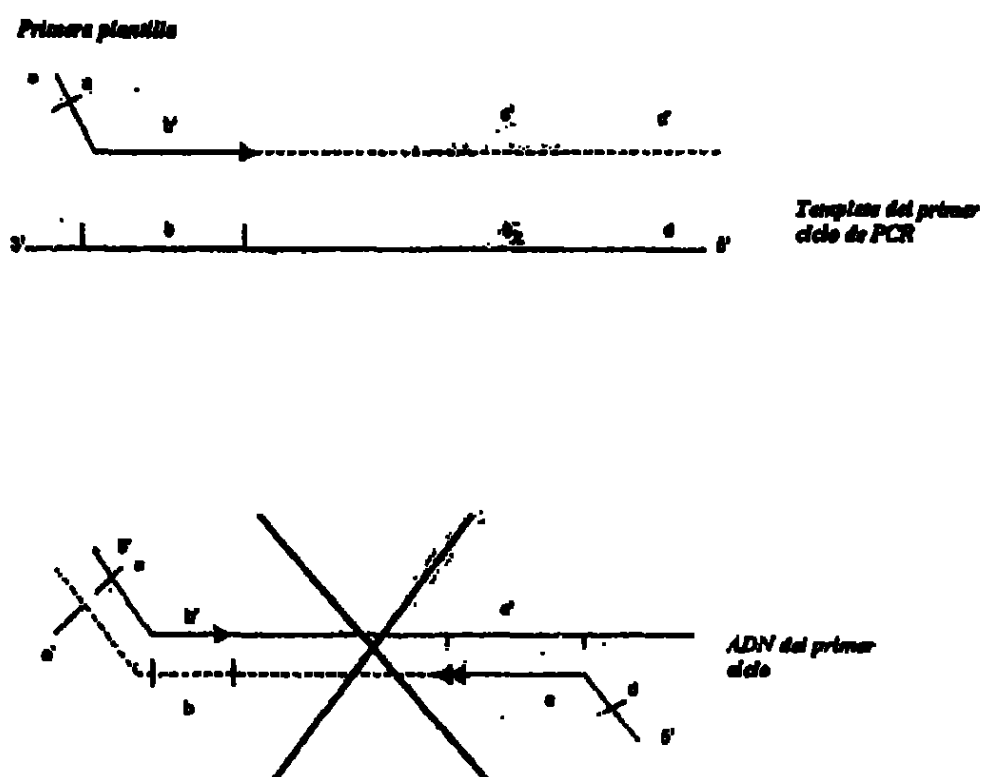


FIG. 1D

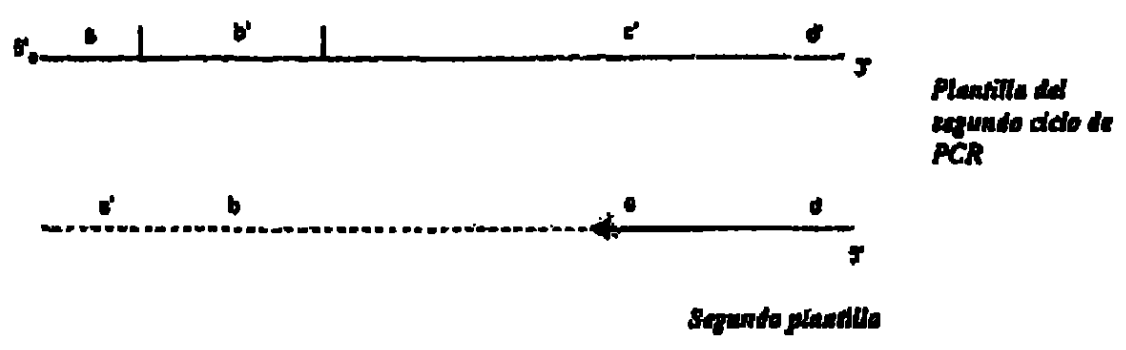


FIG. 1E

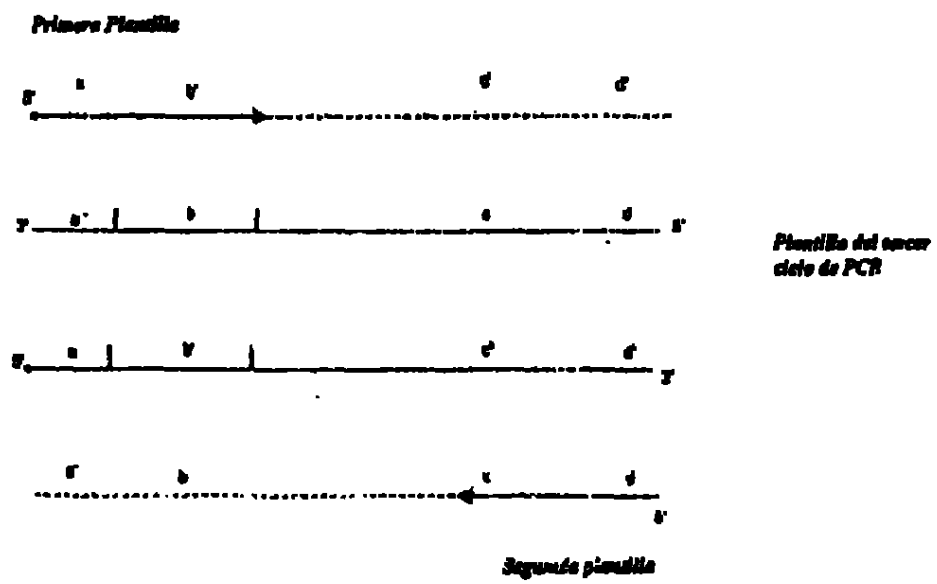


FIG. 1F

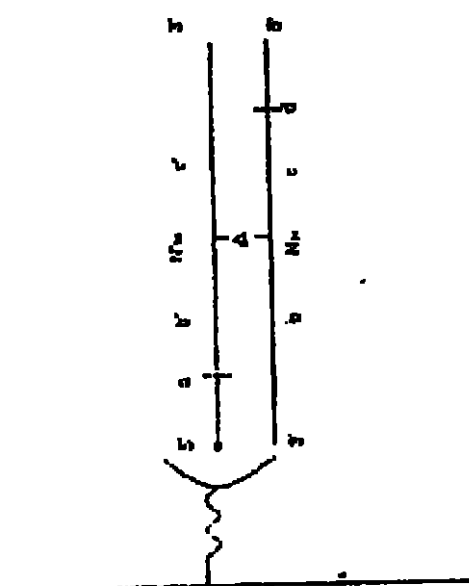


FIG. 1G

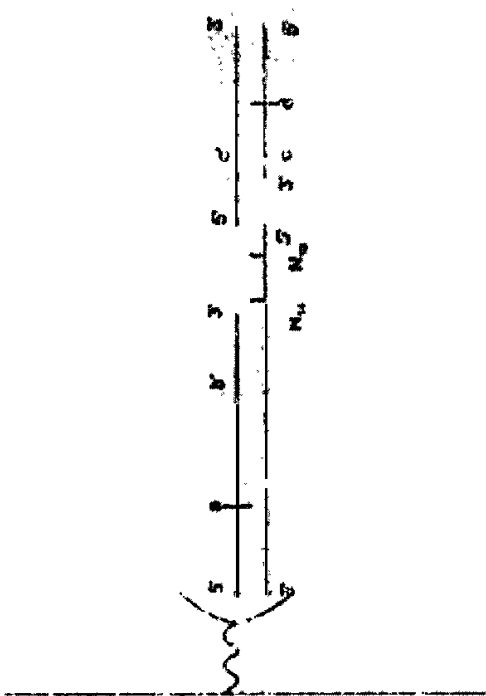


FIG. 1H

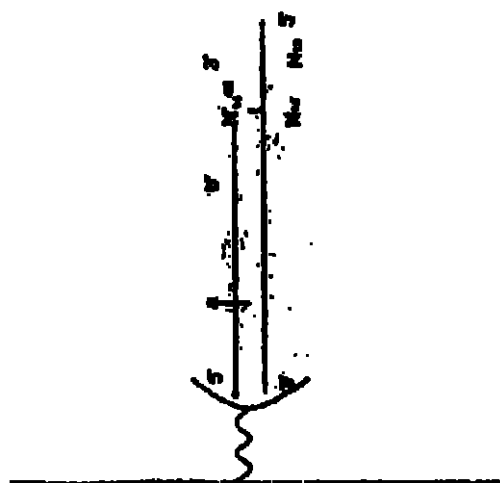


FIG. 11

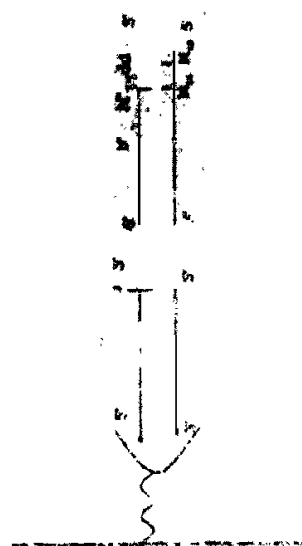
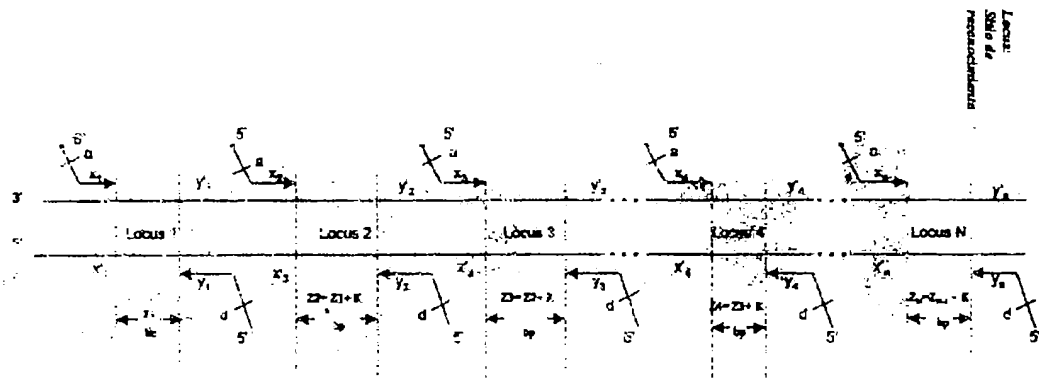
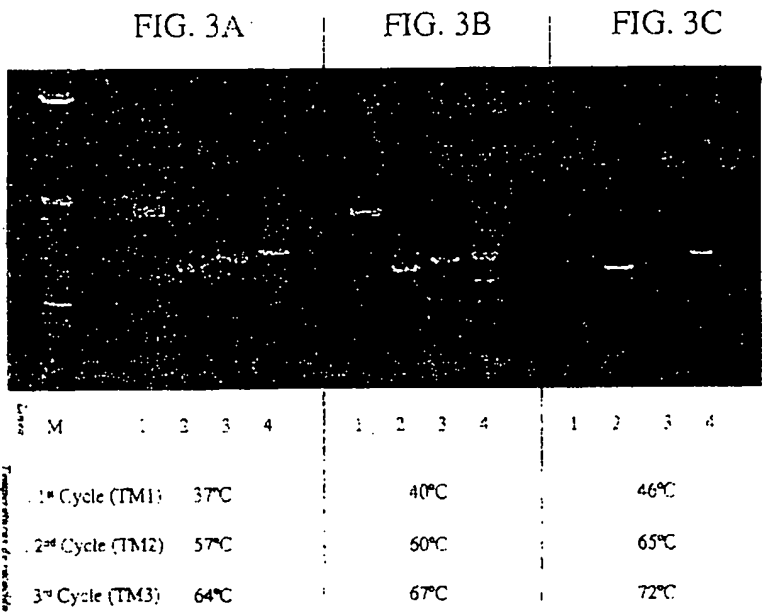


FIG. 2





Temperature of annealing

FIG. 4A

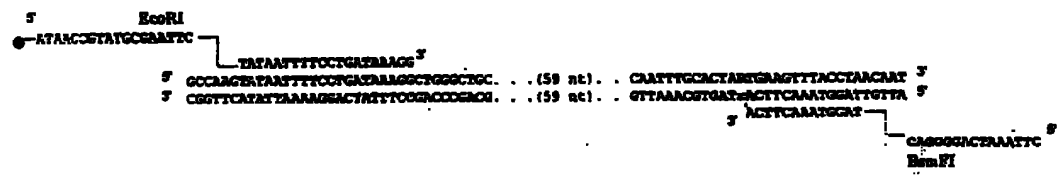
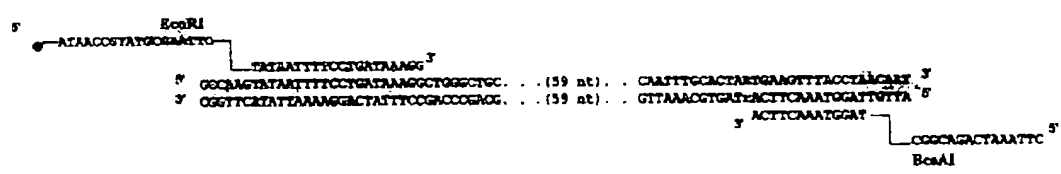


FIG. 4B



b52

FIG. 4C

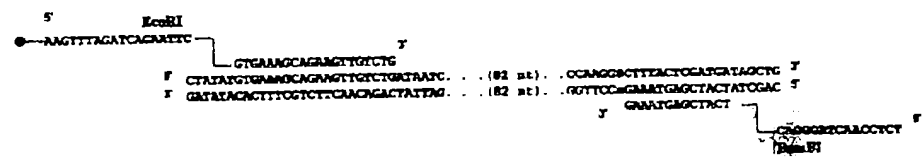


FIG. 5A

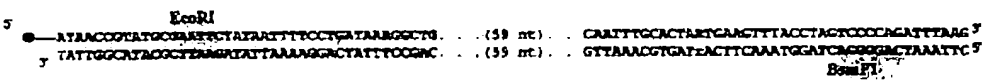


FIG. 5B

5' EcoRI 3'
—ATACCGTATGCGAAATCTATATTTTCCTGATAAAGCTG . . . (59 nt) . . . CAATTGCACTATGGAAGTTTACCTAGCGGCTCAGATTTAG
3' TATTGGCATAGCGTSMAGATATTAAGGACTATTTCCGAC . . . (59 nt) . . . GTTAAAGCTGATCACTTCAAAATGGATCGGCGAGCTAAATTC
BclAI

FIG. 5C

5' **EcoRI**
●—AAGTTTAGATCAGAAATTCGTGAAAGCAGAACTGTGTGATAATC... (82 nt) ...CCAAGGCTTTACTGATGAGTCCCTTATGTTGNT 5'
TTCAAATCTAGTCCCAAGCACTTTCGTCTCAGCAGACTATTAG... (82 nt) ...GGTTCGGAATGAGCTACTCAGGGATAGCACTA 5'
BsmFI

FIG. 5D

5' EcoRI 3'
●—AAGTTTAGATCGGAAATTCGTGAAGCAGAAATTGCTGTGATC . . . (82 nt) . . . CCAGGSCCTTACTOGATGACCGTTATCTGTAT 3'
y TTCAATCTAGTCTGAGCACTTTCTCTTCAACAGACTATTG . . . (82 nt) . . . GTTTCGGAATGAGCTACTGCGAATAGCACTA 5'
BclAI

285

FIG. 6B

5

EcoRI

●—ATTAACGGTTCGGAATTCGCGAATTTCCGATTAAGGCTG . . . (55 nt) . . . GAATTCGACATA

3

5

RTGAAGTTTACCTTACCGCGCAGATTATG

3

3

TACTGGCATACGCTGACGCTTAAAGGCTATTTCCGAC . . . (55 nt) . . . GTTAAAGGTGATTA

5

3

CTTCAATGGATGCGCGACTTAAATTC

5

BclAI

FIG. 6C

EcoRI

●—AGTTTACATCAGAAATCTCTGAAACAGAGATTTGCTGATAATC. . . (82 nt) . . . CCAAGG 3'

3' TTTAAATCTAGCTTAAACACCTTGTCTCTACAGAGACTATTAG. . . (82 nt) . . . GTTCCAGAA 5'

BsmPI

5' . . . SCTTTACTCGATGAGTCCCTTATGCTGCT 3'

3' ATGAGCTACTCAGGGAAATAGCACTA 5'

BsmPI

275

FIG. 7A



FIG. 7C

5' EcoRI ↑ 3'
●—AAGTTTAGATCGAATTCGTGAAGCAGAGTTGCTGATAATC. . . (82 nt) . . . CCAAGGS
3' TTCAATCTAGTCTTAAACACTTTGGTCTTCACAGACTATTAG. . . (82 nt) . . . GGTTCGGA 5'

82

FIG. 7D

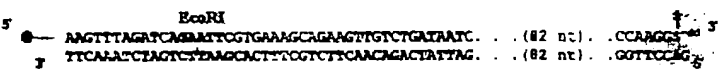


FIG. 7E

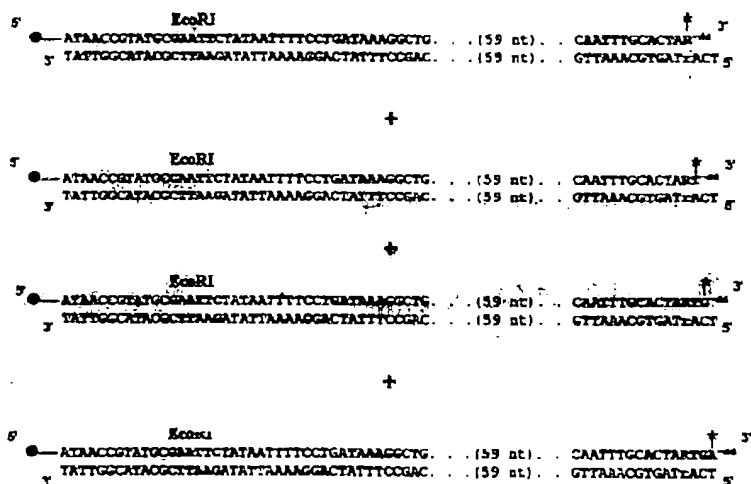


FIG. 8A

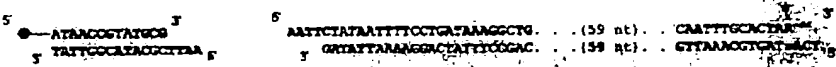
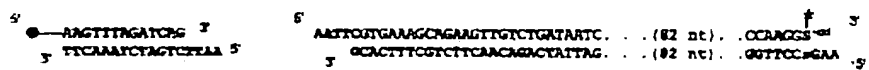


FIG. 8B



28

FIG. 8C



28

25

FIG. 8D

5' ~~9~~ AAGTTTAGATCAG 3' 5' AATTCCTGGAAGCAGAGAGTCTCTCTAATC. . . (B2 nt) . . . CCAAGG⁴⁴ 3'
3' TTCAATCTAGTCTAA 5' 3' GCACCTTCCTCTTCAACGACTATTAG. . . (B2 nt) . . . GCTTC=6 5'

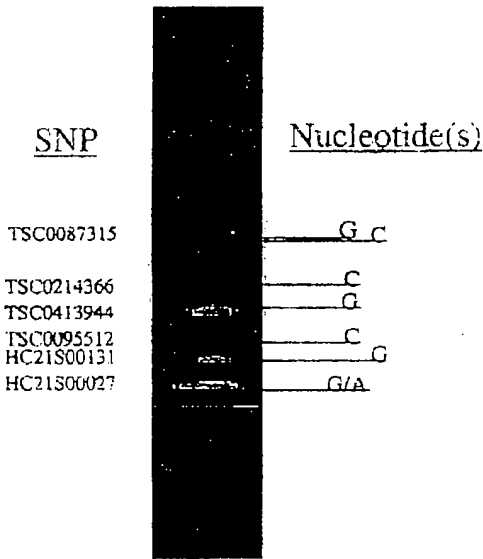
25

FIG. 9A | FIG. 9B | FIG. 9C | FIG. 9D



5' Overhang Site de la séquence de ramification 5' primaires	Nucleotides	G A T C	G A T C	G A T C	G A T C	
	SNP	HC21S00027	TSC0025512	TSC0098512	TSC0264580	HC21S00027
	Restriction enzyme site on second primer	BceA I	BceA I	BsmF I	BsmF I	BsmF I
	5' Overhang	3'A T r A 5'	3'G C s G 5'	3'G C s G A A 5'	3' T 10/14 cut A r C C C 5' 3'A 11/16 cut T A r C C 5'	3'A 12/14 cut T r A C T 5' 3'T 11/15 cut A T r A C 5'
	F	G/A			A/C	G/A
	S		G/C	G/C		

FIG. 10



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD [1]

- | | |
|---|---------|
| ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente | [X] 1 |
| ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [X] 1 |
| ◆ Descripción de la invención. | [X] 51. |
| ◆ Dibujos de ser estos pertinentes | [X] 257 |
| ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas | [X] 12 |

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL [1]

- | | | |
|---|---|-----|
| ◆ | Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial | [] |
| ◆ | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [] |
| ◆ | Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño | [] |
| ◆ | Comprobante de pago de las tasas establecidas | [] |

COMPLETA [] .

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO [1]

- | | | |
|---|---|-----|
| ◆ | Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado | [] |
| ◆ | Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [] |
| ◆ | Representación gráfica del esquema trazado | [] |
| ◆ | Comprobante de pago de las tasas establecidas | [] |

COMPLETA 11

INCOMPLETA [1

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@slc.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

2020

Bogotá D C

Doctor(a)
ALICIA LLOREDA RICAURTE
Apoderado
ravgen

Oficio N°

10047

ASUNTO:

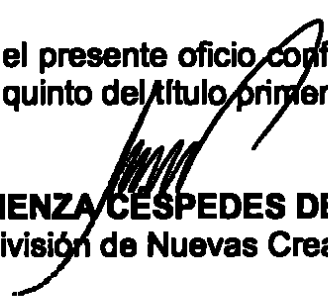
Radicación N°	04-97182
Solicitud internacional	PCT/US03/06376
Fecha inicio fase nacional	2004-10-01
Trámite	011
Evento	379
Actuación	430
Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k) Decisión 486).
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando éste fuere una persona jurídica.
- En caso que se presenten anexos al examen preliminar, estos deben ser anexados junto con su respectiva traducción.. (Art. 36.2.b) del tratado PCT).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,

29 OCT. 2004
202063

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
E-mail: info slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia