

REIVINDICACIONES

1. Un método para construir un perfil de ADN que comprende:
proporcionar una muestra de ácido nucleico,
5 amplificar la muestra de ácido nucleico con una pluralidad de cebadores
que hibridan específicamente con al menos una secuencia diana que
comprende un polimorfismo mononucleotídico (SNP) y al menos una secuencia
diana que comprende una repetición en tándem en una reacción multiplex para
generar productos de amplificación y
10 determinar los genotipos de al menos un SNP y al menos una repetición
en tándem en los productos de amplificación, construyéndose de este modo el
perfil de ADN de la muestra de ácido nucleico.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende generar una biblioteca
15 de ácidos nucleicos a partir de los productos de amplificación.
3. El método de la reivindicación 2, que comprende determinar las
secuencias de la biblioteca de ácidos nucleicos.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la
muestra de ácido nucleico es de un ser humano.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la
muestra de ácido nucleico es de una muestra ambiental, una planta, un animal
25 no humano, una bacteria, una arquea, un hongo o un virus.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que al menos un SNP indica la ascendencia o una característica fenotípica de la fuente de la muestra de ácido nucleico.
- 5 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el perfil de ADN se usa para uno o más diagnósticos o pronósticos de enfermedad, identificación de biomarcadores de cáncer, identificación de anomalías genéticas o análisis de diversidad genética.
- 10 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el perfil de ADN se usa para uno o más bases de datos, medicina forense, investigaciones criminales, identificación de paternidad o identificación de personas.
- 15 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que cada uno de la pluralidad de cebadores tiene una temperatura de fusión baja y/o tiene una longitud de al menos 24 nucleótidos.
10. El método de la reivindicación 9, en el que cada uno de la pluralidad de
20 cebadores tiene una temperatura de fusión que es menor de 60 grados centígrados.
11. El método de la reivindicación 9, en el que cada uno de la pluralidad de
25 cebadores tiene una temperatura de fusión que es de aproximadamente 50 grados centígrados a aproximadamente 60 grados centígrados.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que cada uno de la pluralidad de cebadores tiene una longitud de al menos 24 nucleótidos.

5

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que cada uno de la pluralidad de cebadores tiene una longitud de aproximadamente 24 nucleótidos a aproximadamente 38 nucleótidos.

10 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que cada uno de la pluralidad de cebadores comprende una secuencia de nucleótidos homopolimérica.

15 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que la muestra de ácido nucleico se amplifica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

16. El método de la reivindicación 15, en el que la muestra de ácido nucleico se amplifica en un tampón de amplificación que tiene una concentración de sal que está aumentada en comparación con la concentración de sal de un tampón de amplificación usado junto con cebadores diseñados convencionalmente.

20

17. El método de la reivindicación 16, en el que la sal comprende KCl, LiCl, NaCl o una combinación de las mismas.

25

18. El método de la reivindicación 16, en el que la sal comprende KCl.

19. El método de la reivindicación 18, en el que la concentración de KCl en el tampón de amplificación es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM.

5

20. El método de la reivindicación 18, en el que la concentración de KCl en el tampón de amplificación es menor de aproximadamente 150 mM.

21. El método de la reivindicación 18, en el que la concentración de KCl en el tampón de amplificación es de aproximadamente 145 mM.

10

22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en el que el SNP es un SNP de ascendencia, un SNP fenotípico, un SNP de identidad o una combinación de los mismos.

15

23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en el que la pluralidad de cebadores hibrida específicamente con al menos 30 SNP.

24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en el que la pluralidad de cebadores hibrida específicamente con al menos 50 SNP.

20

25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en el que la repetición en tándem es una repetición en tándem corta (STR), una repetición en tándem intermedia (ITR) o una variante de las mismas.

25

26. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-25, en el que la pluralidad de cebadores hibrida específicamente con al menos 24 secuencias de repetición en tándem.
- 5 27. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-25, en el que la pluralidad de cebadores hibrida específicamente con al menos 60 secuencias de repetición en tándem.
28. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en el que la
10 muestra de ácido nucleico comprende de aproximadamente 100 pg a aproximadamente 100 ng de ADN.
29. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en el que la muestra de ácido nucleico comprende de aproximadamente 10 pg a
15 aproximadamente 100 pg de ADN.
30. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en el que la muestra de ácido nucleico comprende de aproximadamente 5 pg a aproximadamente 10 pg de ADN.
20
31. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-30, en el que la muestra de ácido nucleico comprende ADN genómico.
32. El método de la reivindicación 31, en el que el ADN genómico es de una
25 muestra forense.

33. El método de las reivindicaciones 31 o 32, en el que el ADN genómico comprende ADN degradado.
- 5 34. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-33, en el que se determina al menos el 50 % de los genotipos del al menos un SNP y de la al menos una repetición en tándem.
- 10 35. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-33, en el que se determina al menos el 80 % de los genotipos del al menos un SNP y de la al menos una repetición en tándem.
- 15 36. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-33, en el que se determina al menos el 90 % de los genotipos del al menos un SNP y de la al menos una repetición en tándem.
- 20 37. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-33, en el que se determina al menos el 95 % de los genotipos del al menos un SNP y de la al menos una repetición en tándem.
38. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-37, en el que cada uno de la pluralidad de cebadores comprende una o más secuencias marcadoras.
- 25 39. El método de la reivindicación 38, en el que dichas una o más

secuencias marcadoras comprenden una etiqueta de cebador, una etiqueta de captura, una etiqueta de secuenciación, una etiqueta de identificador de molécula única o una combinación de las mismas.

5 40. El método de la reivindicación 38, en el que la una o más secuencias
marcadoras comprenden una etiqueta de cebador.

41. El método de la reivindicación 38, en el que dichas una o más secuencias marcadoras comprenden una etiqueta de identificador de molécula única.

42. Un método para construir una biblioteca de ácido nucleico, que comprende:

15 proporcionar una muestra de ácido nucleico, y
amplificar la muestra de ácido nucleico con una pluralidad de cebadores
que hibridan específicamente con la al menos una secuencia diana que
comprende un polimorfismo mononucleotídico (SNP) y al menos una secuencia
diana que comprende una secuencia de repetición en tándem en una reacción
multiplex para generar productos de amplificación.

20

43. El método de la reivindicación 42, en el que la muestra de ácido nucleico no está fragmentada antes de la amplificación.

44. El método de las reivindicaciones 42 o 43, en el que las secuencias
25 diana no están enriquecidas antes de la amplificación.

45. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 42-44, en el que el al menos un SNP indica la ascendencia o una característica fenotípica de la fuente de la muestra de ácido nucleico.

5

46. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 42-45, en el que cada uno de la pluralidad de cebadores comprende una o más secuencias marcadoras.

10 47. El método de la reivindicación 46, en el que la una o más secuencias marcadoras comprenden una etiqueta de cebador, una etiqueta de captura, una etiqueta de secuenciación o una etiqueta de identificador molecular único, o una combinación de las mismas.

15 48. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 42-47, que comprende amplificar los productos de amplificación con una segunda pluralidad de cebadores.

20 49. El método de la reivindicación 48, en el que cada uno de la segunda pluralidad de cebadores comprende una parte que corresponde a la etiqueta de cebador de la pluralidad de cebadores y una o más secuencias marcadoras.

25 50. El método de la reivindicación 49, en el que dichas una o más secuencias marcadoras de la segunda pluralidad de cebadores comprende una etiqueta de captura, o una etiqueta de secuenciación o una combinación de las

mismas.

51. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 48-50, que comprende añadir proteína ligante de unión a ADN monocatenario (SSB) a los productos de amplificación.

5

52. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 42-51, en el que la muestra de ácido nucleico y/o los productos de amplificación se amplifican mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

10 53. El método de la reivindicación 52, en el que la muestra de ácido nucleico y/o los productos de amplificación se amplifican en un tampón de amplificación que tiene una concentración de sal que está aumentada en comparación con la concentración de sal de un tampón de amplificación usado junto con cebadores diseñados convencionalmente.

15

54. El método de la reivindicación 53, en el que la sal comprende KCl, LiCl, NaCl, o una combinación de las mismas.

55. El método de la reivindicación 53, en el que la sal comprende KCl.

20

56. El método de la reivindicación 55, en el que la concentración de KCl en el tampón de amplificación es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM.

25 57. El método de la reivindicación 55, en el que la concentración de KCl en

el tampón de amplificación es menor de aproximadamente 150 mM.

58. El método de la reivindicación 55, en el que la concentración de KCl en el tampón de amplificación es de aproximadamente 145 mM.

5 59. Una biblioteca de ácidos nucleicos construida usando el método de una cualquiera de las reivindicaciones 42-58.

60. Una biblioteca de ácidos nucleicos que comprende una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, en la que la pluralidad de moléculas de ácido
10 nucleico comprende al menos una secuencia de repetición en tándem flanqueada por un primer par de secuencias marcadoras y al menos una secuencia de polimorfismo mononucleotídico (SNP) flanqueada por un segundo par de secuencias marcadoras.

15 61. El método de la reivindicación 60, en el que el al menos un SNP indica la ascendencia o una característica fenotípica de la fuente de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico.

62. Una pluralidad de cebadores que hibridan específicamente con al menos
20 una secuencia diana corta y al menos una secuencia diana larga en una muestra de ácido nucleico, donde la amplificación de la muestra de ácido nucleico usando la pluralidad de cebadores en una sola reacción multiplex da como resultado al menos un producto de amplificación corto y al menos un producto de amplificación largo, donde cada uno de la pluralidad de cebadores
25 comprende una o más secuencias marcadoras.

63. La pluralidad de cebadores de la reivindicación 62, donde la secuencia diana corta comprende un polimorfismo mononucleotídico (SNP) y la secuencia diana larga comprende una repetición en tándem.

5

64. La pluralidad de cebadores de las reivindicaciones 62 o 63, donde la una o más secuencias marcadoras comprenden una etiqueta de cebador, una etiqueta de captura, una etiqueta de secuenciación, una etiqueta de identificador molecular único o una combinación de las mismas.

10

65. La pluralidad de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 62-64, donde cada uno de la pluralidad de cebadores tiene una temperatura de fusión baja y/o tiene una longitud de al menos 24 nucleótidos.

15

66. La pluralidad de cebadores de la reivindicación 65, donde cada uno de la pluralidad de cebadores tiene una temperatura de fusión que es menor de 60 grados centígrados.

20

67. La pluralidad de cebadores de la reivindicación 65, donde cada uno de la pluralidad de cebadores tiene una temperatura de fusión que es de aproximadamente 50 grados centígrados a aproximadamente 60 grados centígrados.

25

68. La pluralidad de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 65-67, donde cada uno de la pluralidad de cebadores tiene una longitud de al

menos 24 nucleótidos.

69. La pluralidad de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 65-67, donde cada uno de la pluralidad de cebadores tiene una longitud de
5 aproximadamente 24 nucleótidos a aproximadamente 38 nucleótidos.

70. La pluralidad de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 65-69, donde cada uno de la pluralidad de cebadores comprende una secuencia de nucleótidos homopolimérica.
10

71. La pluralidad de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 62-70, donde la muestra de ácido nucleico está amplificada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

15 72. La pluralidad de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 63-71, donde el SNP es un SNP de ascendencia, un SNP fenotípico, un SNP de identidad o una combinación de los mismos.

73. La pluralidad de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 62-20 72, donde la pluralidad de cebadores hibrida específicamente con al menos 30 SNP.

74. La pluralidad de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 62-25 72, donde la pluralidad de cebadores hibrida específicamente con al menos 50 SNP.

75. La pluralidad de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 63-74, donde la repetición en tándem es una repetición en tándem corta (STR), una repetición en tándem intermedia (ITR) o una variante de las mismas.

5

76. La pluralidad de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 62-75, donde la pluralidad de cebadores hibrida específicamente con al menos 24 secuencias de repetición en tándem.

10 77. La pluralidad de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 62-75, donde la pluralidad de cebadores hibrida específicamente con al menos 60 secuencias de repetición en tándem.

15 78. Un kit que comprende al menos un medio de envase, en el que el al menos un medio de envase comprende una pluralidad de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 62-77.

79. El kit de la reivindicación 78, que adicionalmente comprende un reactivo para la reacción de amplificación.

20

80. El kit de la reivindicación 79, en el que el reactivo es un tampón de amplificación para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

81. El kit de la reivindicación 80, en el que el tampón de amplificación
25 comprende una concentración de sal que está aumentada en comparación con

la concentración de sal de un tampón de amplificación usado junto con cebadores diseñados convencionalmente.

82. El kit de la reivindicación 81, en el que la sal comprende KCl, LiCl, NaCl o una combinación de las mismas.

5

83. El kit de la reivindicación 81, en el que la sal comprende KCl.

84. El kit de la reivindicación 83, en el que la concentración de KCl en el tampón de amplificación es de aproximadamente 100 mM a aproximadamente
10 200 mM.

85. El kit de la reivindicación 83, en el que la concentración de KCl en el tampón de amplificación es menor de aproximadamente 150 mM.

15 86. El kit de la reivindicación 83, en el que la concentración de KCl en el tampón de amplificación es de aproximadamente 145 mM.