

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 318 914**

21 Número de solicitud: 200403106

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

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **14.12.2004**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2009**

Fecha de la concesión: **28.01.2010**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **19.02.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**19.02.2010**

73 Titular/es:  
**Universidade de Santiago de Compostela  
Edificio CACTUS - Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

72 Inventor/es: **Carracedo Álvarez, Ángel;  
Sobрино Rey, Beatriz y  
Brión Martínez, María**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Chip europeo de cromosoma Y ("Y-European Chip") y procedimiento para el genotipado de Y-SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) que determinan los haplogrupos más frecuentes en Europa mediante chips de ADN.**

57 Resumen:

Chip europeo de cromosoma Y ("Y-European Chip") y procedimiento para el genotipado de Y-SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) que determinan los haplogrupos más frecuentes en Europa mediante chips de ADN. El procedimiento se basa en la amplificación de los fragmentos que contienen los SNPs de interés y la determinación de la base implicada en el polimorfismo mediante una reacción de minisequenciación empleando cebadores que en su extremo 5' portan una cola (*tag*), para su posterior detección mediante la hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con un *microarray* constituido por las secuencias complementarias a las colas (*cTag*).

ES 2 318 914 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Chip europeo de cromosoma Y (“Y-European Chip”) y procedimiento para el genotipado de Y-SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) que determinan los haplogrupos más frecuentes en Europa mediante chips de ADN.

## Sector de la técnica

El procedimiento para el genotipado de SNPs de cromosoma Y que determinan los haplogrupos más frecuentes en poblaciones europeas mediante chips de ADN es de aplicación en genética, y en particular, genética forense y genética de poblaciones.

## Estado de la técnica

Los SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) son el tipo de variación genética más frecuente en el genoma humano, e incluyen aquellas posiciones de la cadena del ADN en las cuales dos bases alternativas (alelos) aparecen en alguna población, siendo la frecuencia del alelo menos frecuente igual o mayor al 1%. La mayoría de los SNPs son bialélicos, aunque también existen SNPs con tres y cuatro alelos en un porcentaje mucho menor. Dependiendo de la región en la que se encuentre el SNP, el polimorfismo puede tener distintas consecuencias. Cuando el SNP está situado en la región codificante de un gen, la función o estructura de la proteína codificada puede verse alterada teniendo consecuencias clínicas, bien provocando enfermedades o bien alterando la eficacia de los tratamientos, y por lo tanto la detección de la base polimórfica es importante para el diagnóstico genético y la farmacogenética.

Cuando los SNPs están situados en regiones reguladoras de genes también pueden afectar a la función génica. Sin embargo, la mayoría de los SNPs están situados en regiones no codificantes del genoma y no afectan directamente al fenotipo de un individuo. En este caso son marcadores muy útiles en genética de poblaciones, evolutiva (ZHAO Z., *et. al* Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution. *Gene* 2003, Vol 312, páginas 207-213.), y forense (GILL P. An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms for forensic purposes. *Int J Legal Med* 2001, Vol 114, pág 204-210.). La principal razón del creciente interés en los SNPs es la esperanza de que puedan ser usados como marcadores para identificar genes de predisposición a enfermedades complejas mediante desequilibrio de ligamiento (RISCH N., *et. al* The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996 Vol 273, pág 1516-1517; SCHORK N.J., *et. al*. The future of genetic epidemiology. *Trends Genet*. 1998, Vol 14, N° 7, pág 266-272).

Las características que hacen a este tipo de polimorfismos tan atractivos para aplicaciones tan diversas son su elevada frecuencia en el genoma, estimándose que existe una base polimórfica por cada 500-1000 bases de ADN, aproximadamente (SACHIDANANDAM R., *et. al*. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001, Vol 409, páginas 928-933; VENTER J.C., *et. al*. The sequence of the human genome. *Science* 2001 Vol 291, páginas 1304-51); su baja tasa de mutación, lo que los convierte en marcadores muy estables que no tienden a cambiar de generación en generación; y su simplicidad y en consecuencia la posible automatización de su análisis.

Desde la publicación del borrador del Proyecto Genoma Humano, en febrero del 2001, han sido descritos una gran cantidad de SNPs. En la actualidad existen diversas bases de datos, tanto públicas como privadas, que recogen la información de todos los SNPs descubiertos hasta el momento y que se van actualizando continuamente. Las principales bases de datos son: NCBI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), The SNP Consortium (<http://snp.cshl.org>), Ensembl (<http://www.ensembl.org/Homosapiens/>), HGVBBase (<http://hgvbbase.cgb.ki.se/>) y Celera (<http://www.celeradiscovery.system.com/>).

Todos los marcadores polimórficos situados en el cromosoma Y resultan de gran interés en genética forense, así como en el estudio de las poblaciones humanas, debido a que dicho cromosoma presenta una herencia paterna y a que, en su gran mayoría, es haploide. La falta de recombinación en la mayor parte del cromosoma Y ha hecho que éste se comporte como un fragmento único de ADN portador de un haplotipo (haplogrupo si los marcadores que estamos analizando son SNPs), que se transmite intacto de padres a hijos, a no ser que ocurra algún evento mutacional. De esta manera, cada cromosoma Y contiene una grabación de todos los eventos mutacionales ocurridos a lo largo de su historia y posibilita la reconstrucción de linajes paternos de los cromosomas Y actuales con el fin de encontrar un ancestro común (JOBLING M.A, TYLER-SMITH C. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet*. 1995 Vol, 11, N° 11, páginas 449-456).

La especificidad masculina y la herencia sin recombinación hacen que el cromosoma Y tenga también un alto interés en genética forense. Resulta muy útil en casos de paternidad en los que el presunto padre está ausente y los hijos son varones, teniendo en cuenta que no es posible excluir a ningún otro varón de la línea paterna. En criminalística se aplica fundamentalmente en casos de agresión sexual ya que permite discriminar el ADN masculino en las posibles mezclas hombre-mujer.

Los marcadores genéticos utilizados en genética forense en la actualidad son los STRs (Short Tandem Repeats), aunque en los últimos años el interés por los SNPs ha ido en aumento debido principalmente a su abundancia, su baja tasa de mutación (THOMSON R., *et. al* Recent common ancestry of human Y chromosomes: evidence from DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000, Vol 97, N° 13, páginas 7360-7365) y su simplicidad. Esta última

característica es de gran importancia ya que por un lado nos permite analizar fragmentos de ADN más pequeños que con los STRs, posibilitando el análisis de muestras degradadas, muy frecuentes en los laboratorios de genética forense. Por otro lado, permite la automatización del análisis, lo cual es imprescindible ya que el número de SNPs que es necesario analizar es más elevado que en el caso de los STRs, debido a que son mucho menos polimórficos.

5 A finales de la década de los 90 había descritos unos 40 polimorfismos bialélicos en el cromosoma Y (UNDERHILL P.A., *et al.* Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res.* 1997, Vol 7, N° 10, páginas 996-1005; HURLES M.E., *et al.* European Y-chromosomal lineages in Polynesians: a contrast to the population structure revealed by mtDNA. *Am J Hum Genet.* 1998, Vol 63, N° 6, páginas 1793-1806). En enero de 2004 la base de datos Ensembl ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/)) presentaba 36449 Y-SNPs, aunque la mayoría de ellos pueden ser consecuencia de secuencias parálogas (JOBBLING M.A., TYLER-SMITH C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet.* 2003, Vol 4, N° 8, páginas 598-612; SANCHEZ J.J., *et al.* Duplications of the Y-chromosome specific loci P25 and 92R7 and forensic implications. *Forensic Sci Int.* 2004, Vol 140, N° 2-3, páginas 241-250). En la actualidad hay más de, 240 SNPs de cromosoma Y bien caracterizados. Uno de los principales problemas que había hasta hace muy poco, a la hora de trabajar con los SNPs de cromosoma Y, es que no existía una nomenclatura unificada para los haplogrupos del cromosoma Y. Este problema fue solucionado por el Y Chromosome Consortium (Y Chromosome Consortium. A Nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res.* 2002, Vol 12, páginas 339-348), sentando las bases incluso para la incorporación de nuevos haplogrupos que se puedan ir incorporando a los ya descritos.

20 Los haplogrupos del cromosoma Y no se encuentran distribuidos uniformemente en todas las poblaciones humanas sino que presentan una clara diferenciación geográfica (SEIELSTAD M.T., *et al.* Genetic evidence for a higher female migration rate in humans. *Nature Genet* 1998, Vol 20, páginas 278-280). Como consecuencia, dependiendo de la región del mundo que se esté estudiando, nos encontraremos con unos haplogrupos u otros (ROSSER Z., *et al.* Y chromosomal diversity within Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than language. *Am J Hum Genet* 2000, Vol 67, páginas 1526-1543; KARAFET T.M., *et al.* Ancestral Asian source(s) of New World Y-chromosome founder haplotypes. *Am J Hum Genet* 1999, Vol 64, páginas 817-831). Esta especificidad geográfica de los distintos haplogrupos de cromosoma Y, puede ser una herramienta muy útil en forense a la hora de intentar predecir el origen poblacional de un individuo, aunque teniendo siempre en cuenta que en las poblaciones urbanas hay una gran mezcla de individuos de distintos grupos poblacionales (JOBBLING M.A. Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis. *Forensic Sci Int.* 2001, Vol 118, N° 2-3, páginas 158-62).

35 En función de esta diferenciación geográfica, se seleccionaron los 30 SNPs que se incluyen en el chip propuesto en esta invención, y que determinan los 32 haplogrupos más frecuentes en poblaciones europeas (BRION M., *et al.* Hierarchical analysis of 30 Y-chromosome SNPs in European populations. *Int J Legal Med.* 2004 Apr 17 (Epub ahead of print)) (Figura 1).

40 La selección de los SNPs se realizó estudiando las frecuencias haplotípicas de cada SNP en las poblaciones europeas en los trabajos publicados hasta ese momento. En la tabla 1 se muestran las referencias bibliográficas en las que se describe cada uno de los marcadores seleccionados.

TABLA 1

SNP	Referencia
92R7	HURLES <i>et al.</i> Recent male-mediated gene flow over a linguistic barrier in Iberia, suggested by analysis of a Y-chromosomal DNA polymorphism. <i>Am J Hum Genet.</i> 1999, Vol 65, N° 5, páginas 1437-1448.
M70	UNDERHILL <i>et al.</i> The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. <i>Ann Hum Genet.</i> 2001, Vol 65, N° 1, páginas 43-62.
M22	UNDERHILL <i>et al.</i> Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. <i>Genome Res.</i> 1997, Vol 7, N° 10, páginas 996-1005.
Tat	ZERJAL <i>et al.</i> Genetic relationships of Asians and Northern Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis. <i>Am J Hum Genet.</i> 1997, Vol 60, N° 5, páginas 1174-1183.

5 P25 HAMMER *et al.* Jewish and Middle Eastern non-Jewish populations  
share a common pool of Y-chromosome biallelic haplotypes. Proc Natl  
Acad Sci USA. 2000, Vol 97, N° 12, páginas 6769-6774.

10 SRY<sub>10831</sub> HAMMER *et al.* Out of Africa and back again: nested cladistic analysis  
of human Y chromosome variation. Mol Biol Evol. 1998, Vol 15, N° 4,  
páginas 427-441.

15 M173 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

M213 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

M9 UNDERHILL *et al* (1997). *Op. cited*

20 ROSSER *et al.* Y chromosomal diversity within Europe is clinal and  
12f2 influenced primarily by geography, rather than language. Am J Hum  
Genet 2000, Vol 67, páginas 1526-1543.

25 M201 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

M26 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

30 M170 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

M172 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited.*

M62 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

35 M96 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

M34 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

40 M81 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

M35 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

M123 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

45 M78 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

M65 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

50 M126 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

M73 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

M160 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

55 M37 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

M167 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

M17 UNDERHILL *et al* (1997). *Op. cited*

60 M18 UNDERHILL *et al* (1997). *Op. cited*

M153 UNDERHILL *et al* (2001). *Op. cited*

---

## ES 2 318 914 B1

Para la mayoría de las aplicaciones que hemos comentado, es necesario tipar un alto número de SNPs, siendo imprescindible la utilización de tecnologías que nos permitan analizar muchos SNPs simultáneamente y de la manera más rápida, económica y automatizada posible. En la actualidad, existe un gran número de tecnologías disponibles para el genotipado de SNPs (SYVANEN A.C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. Nat Rev Genet. 2001, Vol 2, N° 12, páginas 930-942).

La elección del método de genotipado adecuado para cada aplicación depende del número de SNPs y muestras que sea necesario analizar, la flexibilidad de la tecnología, el fácil manejo y el coste. Una tecnología prometedora son los *chips* o *microarrays* de ADN (SOUTHERN E.M. DNA chips: analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale. Trends Genet. 1996, Vol 12, N° 3, páginas 110-115; HACIA J.G. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide *microarrays*. Nat Genet. 1999, Vol 21, N° 1, páginas 42-47). Estos consisten en la disposición ordenada de fragmentos de ADN sobre un soporte sólido mediante su inmovilización o síntesis *in situ*, para su posterior hibridación con el ADN marcado fluorescentemente de la muestra que queremos analizar.

En los últimos años se ha producido un avance importante en el desarrollo de esta tecnología. La mayoría de los métodos de genotipado descritos hasta el momento se basan en tres tipos de reacción: la hibridación con sondas alelo-específicas (ASO, Allelic Specific Oligonucleotide) (HACIA J.G. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide *microarrays*. Nat Genet. 1999, Vol 21, N° 1, páginas 42-47), minisequenciación (también llamada Single Base Extensión, SBE) (PASTINEN T., *et al.* Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. Genome Res. 1997, Vol 7, N° 6, páginas 606-614), y ligamiento de oligonucleótidos alelo-específicos (OLA, Oligonucleotide Ligation Assay) (GERRY N.P., *et al.* Universal DNA *microarray* method for multiplex detection of low abundance point mutations. J Mol Biol. 1999, Vol 292, N° 2, páginas 251-262). Todos estos métodos pueden ser utilizados con *microarrays*.

El genotipado simultáneo de múltiples SNPs mediante hibridación con sondas ASO resulta difícil y no siempre fiable (WANG D.G., *et al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. Science. 1998 Vol 280, páginas 1077-1082; CHO R.J., *et al.* Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. Nat Genet. 1999, Vol. 23, N° 2, páginas 203-207). Sin embargo, los métodos basados en reacciones enzimáticas, como son los otros dos mencionados anteriormente, tienen mayor aceptación como alternativas más específicas que la hibridación con sondas ASO (RAITIO M., *et al.* Y-chromosomal SNPs in Finno-Ugric-speaking populations analyzed by minisequencing on *microarrays*. Genome Res. 2001 Vol 11, N° 3, páginas 471-482; PASTINEN T., *et al.* A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on *microarrays*. Genome Res. 2000, Vol 10, páginas 1031-1042; FORTINA P., *et al.* Simple two-color array-based approach for mutation detection. Eur J Hum Genet. 2000, Vol 8, N° 11, páginas 884-894; SOUTHERN E., *et al.* Molecular interactions on *microarrays*. Nat Genet. 1999 Vol 21, N° 1, páginas 5-9).

En las reacciones de minisequenciación una ADN polimerasa es usada para extender el *primer* o cebador, diseñado de tal forma que el extremo 3' es complementario a la base anterior al SNP que queremos analizar. Los cebadores son extendidos con distintos análogos de nucleótidos marcados que son complementarios a los nucleótidos de la base polimórfica. Este método fue descrito en un principio para ser llevado a cabo en placas de microtitulación, donde los productos de PCR eran inmovilizados (SYVANEN A.C., *et al.* A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E. Genomics 1990, Vol 8, N° 4, páginas 684-692; SYVANEN A.C., *et al.* Identification of individuals by analysis of biallelic DNA markers, using PCR and solid-phase minisequencing. Am J Hum Genet. 1993, Vol 52, N° 1, páginas 46-59). Más tarde, la minisequenciación fue adaptada a los *microarrays* uniendo el cebador covalentemente a la superficie del *microarray*. Los dideoxinucleótidos (ddNTPs) usados en la extensión estaban marcados con radioactividad o fluorocromos (PASTINEN T., *et al.* Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. Genome Res. 1997, Vol 7, N° 6, páginas 606-614; PASTINEN T., *et al.* A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on *microarrays*. Genome Res. 2000, Vol 10, páginas 1031-1042; RAITIO M., *et al.* Y-chromosomal SNPs in Finno-Ugric-speaking populations analyzed by minisequencing on *microarrays*. Genome Res. 2001 Vol 11, N° 3, páginas 471-482).

Una alternativa a estas estrategias de minisequenciación es el uso de oligonucleótidos genéricos denominados *cTags* que son inmovilizadas sobre la superficie del *microarray* en lugar de los *primers* o cebadores. En este caso, los cebadores utilizados en la reacción de minisequenciación finalizan en su extremo 3' en la base anterior a la posición polimórfica, y en el extremo 5' tienen una cola o *tag* de unos 25-27 nucleótidos, que son complementarias a las *cTags* que constituyen el *microarray*. Estas colas son secuencias no homólogas con el genoma humano con temperaturas de *melting* similares, lo que facilita la hibridación. La reacción de minisequenciación tiene lugar en un termociclador mediante la incorporación de dideoxinucleótidos marcados con distintos fluorocromos, de forma que podamos detectar que base se ha incorporado. A continuación, el producto de la minisequenciación se hibrida con el *microarray* para genotipar todos los SNPs, identificando la base incorporada en cada una de las posiciones del *microarray*.

El uso de *tag-primers* fue descrito por primera vez para el análisis de la expresión génica en levaduras mediante PCR (SHOEMAKER D.D., *et al.* Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. Nat Genet. 1996, Vol 14, N° 4, páginas 450-456) y ha sido aplicada más tarde para el genotipado de SNPs mediante minisequenciación con micropartículas (CAI H., *et al.* Flow cytometry-based minisequencing: a new platform for high-throughput single-nucleotide polymorphism scoring. Genomics 2000, Vol. 66, N° 2, páginas 135-143), en los chips de alta densidad de Affymetrix (GenFlex™ array) (FAN J.B., *et al.* Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays. Genome Res. 2000, Vol 10, N° 6, páginas

853-860) y en los chips de media densidad (HIRSCHHORN J.N., *et. al.* SBE-TAGS: an array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping. Proc Natl Acad Sci USA. 2000, Vol 97, N° 22, páginas 12164-12169).

5 Esta última estrategia denominada SBE-TAGs (Single Base Extensión con Tags) nos permite tipar al mismo tiempo un gran número de SNPs porque además de ser un método enzimático, y por lo tanto mucho más específico que las sondas ASO, el uso de *Tags* con temperaturas de *melting* similares, facilita en gran medida la hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con el *microarray*. El hecho de que el *microarray* esté constituido por las *cTags*, en lugar de por cebadores específicos de cada locus, nos permite que el mismo *microarray* pueda ser  
10 utilizado para distintos grupos de marcadores, teniendo que cambiar únicamente los cebadores que se utilizan en la reacción de minisequenciación que tiene lugar en el termociclador.

Para la minisequenciación con *microarrays* pueden estar los cuatro ddNTPs marcados con el mismo fluorocromo y usarse en reacciones separadas, o bien cada uno de ellos marcado con un fluorocromo distinto, y llevarse a cabo una única reacción. Por un lado, resulta más ventajoso el uso de cuatro fluorocromos distintos porque únicamente es necesaria una reacción de minisequenciación. Por otro lado, si usamos un solo fluorocromo estamos facilitando la posibilidad de usar esta tecnología en un mayor número de laboratorios, ya que se puede usar un escáner que lea únicamente para dos longitudes de onda, como pueden ser los que se dedican al análisis de expresión génica. Antes de la reacción de minisequenciación ha de llevarse a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (MULLIS K.B.,  
20 FALOONA F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* vía a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987, Vol 155, páginas 335-350) para amplificar los fragmentos de ADN que contienen los SNPs de interés.

En el “Chip europeo de cromosoma Y” se ha aplicado el concepto de “*array de arrays*” (PASTINEN T., *et. al.* A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on *microarrays*. Genome Res. 2000, Vol 10, páginas 1031-1042), que nos permite hibridar simultáneamente varias muestras sobre el mismo soporte al utilizar un molde de silicón que forma pocillos de hibridación independientes.

El objeto de la propuesta de invención consiste en un chip y un procedimiento que nos permita genotipar simultáneamente los SNPs de cromosoma Y que determinan los haplogrupos más frecuentes en poblaciones europeas. La invención se basa en la amplificación de los fragmentos que contienen los SNPs de interés y la determinación de la base implicada en el polimorfismo mediante una reacción de minisequenciación empleando *primers* o cebadores que en su extremo 5' portan una cola (*tag*), para su posterior detección mediante la hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con un *microarray* constituido por las secuencias complementarias a las colas (*cTag*).

35 La novedad de la invención estriba en el hecho de proporcionar al usuario la secuencia de los *primers* o cebadores que permiten identificar el alelo de cada SNP y su posterior detección mediante *microarrays*. El procedimiento utilizado se caracteriza por la facilidad con que son detectados todos los marcadores seleccionados simultáneamente, lo que supone un gran ahorro de tiempo, reactivos y de muestra de partida para realizar el análisis. Este último punto es de gran importancia, tanto en genética forense, donde la muestra de partida suele estar limitada, como en estudios de genética de poblaciones, en los que se trabaja muchas veces con muestras muy valiosas y difíciles de conseguir.  
40

### Modo de realización

La presente invención proporciona un chip y un procedimiento para el genotipado de SNPs de cromosoma Y para determinar los haplogrupos más frecuentes en poblaciones europeas, mediante una reacción de minisequenciación combinada con el uso de *microarrays*. El procedimiento se caracteriza por la amplificación de los fragmentos de ADN que contienen los SNPs de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por la reacción de minisequenciación que permitirá discriminar el alelo de cada polimorfismo y por la detección de los productos de la minisequenciación mediante la hibridación de los mismos con un *microarray* previamente fabricado con las secuencias complementarias a las colas situadas en el extremo 5' de los cebadores de la minisequenciación.  
50

El procedimiento consta de las etapas que se detallan a continuación y que se muestran en la Figura 2.

1. Fabricación de los *microarrays*.
- 55 2. Amplificación de los 30 SNPs mediante PCR multiplex.
3. Comprobación de la amplificación.
- 60 4. Mezcla de los productos de las PCRs multiplex, si han sido varias reacciones las que se han llevado a cabo, y concentración del ADN mediante evaporación.
5. Purificación de los productos de PCR.
- 65 6. Reacción de minisequenciación o *Single Base Extensión* (SBE).
7. Hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con el *microarray*.

## ES 2 318 914 B1

8. Escaneado del *microarray*.
9. Análisis de los resultados mediante un software de análisis de imagen.
- 5 10. Interpretación de los resultados.

A continuación se describe detalladamente cada una de las etapas anteriores:

### 10 1. *Fabricación de los microarrays*

Los *microarrays* son fabricados con un robot o “*arrayer*” que deposita de forma ordenada y precisa sobre un soporte sólido los oligonucleótidos (*cTags*) complementarios a las *tags* que van unidas a los extremos 5’ de los *primers* o cebadores de minisequenciación. Estos oligonucleótidos se unen al soporte sobre el que se fabrican los *microarrays* por el extremo 3’. Para esta unión, dependiendo del tipo de soporte sobre el que se depositen, será necesario que en dicho extremo porten una modificación.

En la Tabla 2 se muestra que *cTag* es usada para detectar cada SNP y su correspondencia con las secuencias recogidas en la Lista de Secuencias.

TABLA 2

SNP	cTag
92R7	SEC. ID. N°: 1
M70	SEC. ID. N°: 2
M22	SEC. ID. N°: 3
Tat	SEC. ID. N°: 4
P25	SEC. ID. N°: 5
SRY <sub>10831</sub>	SEC. ID. N°: 6
M173	SEC. ID. N°: 7
M213	SEC. ID. N°: 8
M9	SEC. ID. N°: 9
M201	SEC. ID. N°: 10
M26	SEC. ID. N°: 11
M170	SEC. ID. N°: 12
M172	SEC. ID. N°: 13
M62	SEC. ID. N°: 14
M96	SEC. ID. N°: 15
M34	SEC. ID. N°: 16
M81	SEC. ID. N°: 17
M35	SEC. ID. N°: 18
M123	SEC. ID. N°: 19

## ES 2 318 914 B1

	M78	SEC. ID. Nº: 20
	M65	SEC. ID. Nº: 21
5	M126	SEC. ID. Nº: 22
	M73	SEC. ID. Nº: 23
10	M160	SEC. ID. Nº: 24
	M37	SEC. ID. Nº: 25
	M167	SEC. ID. Nº: 26
15	M18	SEC. ID. Nº: 27
	M153	SEC. ID. Nº: 28
20	M17	SEC. ID. Nº: 29

---

25 Los *microarrays* son fabricados según el modelo de “*array de arrays*”. Esto consiste en que sobre un mismo portaobjetos se depositan las *cTags* necesarias en distintas posiciones del portaobjetos, de forma que el mismo *array* (que pasaremos a llamarle *subarray*) está repetido varias veces. Usando un molde de silicona y una cámara de hibridación adecuados, que nos permitan aislar cada uno de los *subarrays*, podremos hibridar, simultáneamente sobre el mismo portaobjetos, varias muestras, con el consiguiente ahorro de tiempo y dinero.

30 En la Figura 3 se muestra la disposición de cada *subarray*, así como un ejemplo de una posible distribución de los SNP (aunque sobre el *microarray* está unida la *cTag* correspondiente a cada SNP).

### 2. Amplificación de los 30 SNPs mediante PCR multiplex

35 Los 30 SNPs se someten a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con objeto de obtener la cantidad suficiente de cada fragmento de ADN de manera que sea posible la detección del alelo que presenta cada SNP en cada individuo. La reacción de amplificación y los cebadores utilizados se describen en BRION M., *op. cited*.

### 3. Comprobación de la amplificación

40 La eficacia de la amplificación puede ser comprobada con cualquier técnica apropiadas aunque se recomienda el uso de geles de poliacrilamida porque nos permiten diferenciar cada uno de los fragmentos de los que consta cada multiplex (Figura 4). Para comprobar los tamaños de los fragmentos amplificados se utiliza un marcador de peso molecular.

45 En esta etapa ya se tipa el marcador **12f2**, puesto que el alelo derivado es una inserción de 2 kb. Si el fragmento está presente es que se ha producido dicha inserción, y si no aparece es que no se ha producido.

### 4. Mezcla de los productos de las PCRs multiplex y concentración del ADN mediante evaporación

50 Este paso solamente es necesario si los marcadores son amplificados en varias multiplexes.

55 Como la reacción de minisequenciación de los 29 SNPs se realiza simultáneamente, es necesario mezclar y concentrar los productos de las PCRs para evitar que cada fragmento de ADN amplificado quede muy diluido. Se procede a la concentración de la mezcla de los productos de PCR evaporando la muestra mediante incubación a 37°C hasta obtener un volumen final suficiente para llevar a cabo la reacción de minisequenciación.

### 5. Purificación de los productos de PCR

60 Los productos de PCR deben ser purificados para eliminar los posibles restos de cebadores y dNTPs de la PCR para evitar que interfieran en la reacción de minisequenciación. Esto puede realizarse con cualquier método apropiado para esta aplicación.

### 6. Reacción de minisequenciación o Single Base Extensión (SBE)

65 La minisequenciación se lleva a cabo en una única reacción para los 29 SNPs a partir de los productos de PCR previamente mezclados y concentrados. Los cebadores de esta reacción se han diseñado de manera que el extremo 3' del cebador sea complementario a la base anterior al SNP. De esta manera, en la reacción de minisequenciación, el

## ES 2 318 914 B1

cebador se extenderá con el dideoxinucleotido (ddNTP) complementario a la base polimórfica. Detectando el ddNTP que ha sido añadido podremos determinar el alelo de dicho SNP. Además, el cebador porta en el extremo 5' una cola (*tag*) o secuencia no homologa a secuencias humanas, cuya función es la de permitir la hibridación con el *microarray* (Figura 5). Cada SNP tiene su propia *tag*.

5

El diseño de los cebadores se realizó con el software Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) (ROZEN S., SKALETSKY H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, Humana Press 2000, páginas 365-386.) de forma que la temperatura de *melting* de todos los cebadores fuese similar para facilitar la minisequenciación de todos los marcadores en la misma reacción. La posible formación de estructuras secundarias en los cebadores ha sido comprobada con el software Oligonucleotide Properties Calculator v. 3.02 (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>). También se comprobó si los cebadores diseñados se unían a otros sitios del genoma humano mediante el BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para prevenir posibles reacciones inespecíficas.

15 En la Tabla 3 se muestra la correspondencia entre cada una de las partes de los cebadores de minisequenciación de cada SNP con las secuencias recogidas en la Lista de Secuencias.

TABLA 3

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

SNP	Cebadores de minisequenciación	
	<i>tag</i>	Parte específica
92R7	SEC. ID. N°: 30	SEC. ID. N°: 59
M70	SEC. ID. N°: 31	SEC. ID. N°: 60
M22	SEC. ID. N°: 32	SEC. ID. N°: 61
Tat	SEC. ID. N°: 33	SEC. ID. N°: 62
P25	SEC. ID. N°: 34	SEC. ID. N°: 63
SRY <sub>10831</sub>	SEC. ID. N°: 35	SEC. ID. N°: 64
M173	SEC. ID. N°: 36	SEC. ID. N°: 65
M213	SEC. ID. N°: 37	SEC. ID. N°: 66
M9	SEC. ID. N°: 38	SEC. ID. N°: 67
M201	SEC. ID. N°: 39	SEC. ID. N°: 68
M26	SEC. ID. N°: 40	SEC. ID. N°: 69
M170	SEC. ID. N°: 41	SEC. ID. N°: 70
M172	SEC. ID. N°: 42	SEC. ID. N°: 71
M62	SEC. ID. N°: 43	SEC. ID. N°: 72
M96	SEC. ID. N°: 44	SEC. ID. N°: 73
M34	SEC. ID. N°: 45	SEC. ID. N°: 74
M81	SEC. ID. N°: 46	SEC. ID. N°: 75
M35	SEC. ID. N°: 47	SEC. ID. N°: 76
M123	SEC. ID. N°: 48	SEC. ID. N°: 77
M78	SEC. ID. N°: 49	SEC. ID. N°: 78
M65	SEC. ID. N°: 50	SEC. ID. N°: 79
M126	SEC. ID. N°: 51	SEC. ID. N°: 80

## ES 2 318 914 B1

M73	SEC. ID. N°: 52	SEC. ID. N°: 81
M160	SEC. ID. N°: 53	SEC. ID. N°: 82
M37	SEC. ID. N°: 54	SEC. ID. N°: 83
M167	SEC. ID. N°: 55	SEC. ID. N°: 84
M18	SEC. ID. N°: 56	SEC. ID. N°: 85
M153	SEC. ID. N°: 57	SEC. ID. N°: 86
M17	SEC. ID. N°: 58	SEC. ID. N°: 87

---

15

La minisequenciación se puede llevar a cabo bien utilizando los cuatro ddNTP, marcados cada uno de ellos con un fluorocromo distinto, o bien, utilizando el mismo fluorocromo para los cuatro ddNTPs. En el primer caso se realiza una reacción de minisequenciación por muestra, a la que se añaden los cuatro ddNTPs con marcajes distintos; mientras que en el segundo caso son necesarias cuatro reacciones de minisequenciación por muestra, teniendo cada una de ellas uno de los cuatro ddNTPs marcado y los otros tres sin marcar. Utilizando *microarrays* constituidos por varios *subarrays* (Figura 3), en el caso de reacciones con cuatro fluorocromos distintos podremos analizar un número de muestras cuatro veces superior por *microarray* al que analizaríamos con un único fluorocromo. Por otro lado, la posibilidad de usar un único fluorocromo hace esta técnica más flexible, permitiendo que se pueda realizar en laboratorios que no disponen de escáner que lea a cuatro longitudes de onda distintas.

20

25

### 7. Hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con el *microarray*

Los productos de la reacción de minisequenciación son hibridados con el *microarray*. Las colas (*tag*) situadas en el extremo 5' de los cebadores de minisequenciación hibridarán con las secuencias reversas y complementarias de dichas colas (*cTag*) que constituyen el *microarray* (Figura 5). Para hibridar de forma independiente cada *subarray* se utiliza un molde de silicona que nos permite aislar cada *subarray* de los demás, formando cámaras de hibridación independientes para cada uno de ellos. El producto de cada reacción de minisequenciación es añadido a la cámara de hibridación que le corresponda por su situación sobre el *microarray*. La hibridación tiene lugar a 42°C durante 180 minutos. Transcurrido este tiempo se procede a lavar el *microarray* para retirar los restos de los productos de las reacciones de minisequenciación que no se han unido.

30

35

### 8. Escaneado del *microarray*

El *microarray* se escanea para detectar en que posiciones del *microarray* hay fluorescencia. Esto se realiza siguiendo las instrucciones del escáner usado en cada caso. Cuando la minisequenciación se ha hecho con los cuatro ddNTPs marcados con el mismo fluorocromo, solamente es necesario leer a la longitud de onda de dicho fluorocromo. Sin embargo, si hemos utilizado cuatro marcajes distintos deberemos escanear el *microarray* para cada una de las longitudes de onda de los fluorocromos.

40

45

### 9. Análisis de los resultados mediante un software de análisis de imagen

Las imágenes obtenidas con el escáner deben ser analizadas para cuantificar la fluorescencia en cada uno de los puntos del *microarray*. Esto se puede realizar con cualquier software apropiado para esta aplicación.

50

### 10. Interpretación de los resultados

En la Tabla 4 se muestran los alelos descritos para cada uno de los SNPs, así como el ddNTP incorporado en la reacción de minisequenciación, que no siempre coincide con los alelos descritos, ya que depende de la dirección de diseño del primer.

55

Siguiendo el árbol del *Y-Chromosome Consortium* (Figura 1) se determina a que haplogrupo pertenece la muestra analizada.

60

65

# ES 2 318 914 B1

TABLA 4

SNP	Alelos		ddNTP incorporado	
	ancestral	derivado	ancestral	derivado
5 92R7	G	A	C	T
M70	A	C	A	C
M22	A	G	T	C
10 Tat	T	C	A	G
P25	C	A	C	A
SRY <sub>10831</sub>	A	G	A	G
M173	A	C	A	C
15 M213	T	C	A	G
M9	C	G	C	G
M201	G	T	G	T
M26	G	A	C	T
20 M170	A	C	A	C
M172	T	G	T	G
M62	T	C	A	G
M96	G	C	C	G
25 M34	G	T	C	A
M81	C	T	G	A
M35	G	C	C	G
M123	G	A	C	T
30 M78	C	T	G	A
M65	A	T	A	T
M126		del AATA	A	G
M73		del GT	G	T
35 M160	A	C	A	C
M37	C	T	C	T
M167	C	T	C	T
M17		del G	G	C
40 M18		ins AA	C	A
M153	T	A	T	A
12f2*		ins 2 kb		

\* Determinado por la presencia o ausencia del fragmento amplificado en el gel de poliacrilamida.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

## 50 Ejemplo 1

### *Agresión sexual*

55 El siguiente ejemplo ilustra como usar "Y-European chip" en un laboratorio de genética forense en el caso de una agresión sexual.

Se reciben en el laboratorio un hisopo vaginal procedente de la victima, recogido después de haber sufrido una agresión sexual y una muestra de sangre procedente del sospechoso.

## 60 1. Fabricación del microarray

65 Se prepara una placa de 96 ó 384 pocillos con las *cTags* con las que se va a fabricar el *microarray* (Secuencias ID N° 1-29 de la Lista de secuencias) para que el robot las pueda recoger y depositar sobre el soporte sólido, según se muestra en la Figura 3. Se utilizaron como soporte los "CodeLink Activated Slides" de Amersham Biosciences, y el Arrayer 417 de Affymetrix como robot. Las *cTags* se diluyeron en tampón de impresión (fosfato sódico pH 8.5, 50 mM) hasta una concentración de 20  $\mu$ M. Las *cTags* tienen en el extremo 3' un grupo amino que se va a unir covalentemente a la superficie de los "CodeLink Activated Slides". Una vez que se han depositado las *cTags* sobre los portaobjetos se dejan secar de 4 a 72 horas.

## ES 2 318 914 B1

A continuación es necesario bloquear los grupos amino-reactivos de la superficie del *microarray* a la que no se han unido las *cTags*. Esto se lleva a cabo mediante una serie de pasos que consisten en:

- a) Colocar los *microarrays* en un tubo tipo Falcon de 50 mL y añadir la solución de bloqueo (0.1 M Tris, 50 mM etanolamina, pH 9.0) precalentada a 50°C durante 30 minutos.
- b) Tirar la solución de bloqueo.
- c) Enjuagar los *microarrays* dos veces con agua destilada.
- d) Lavar los *microarrays* con 4x SSC (NaCl 0.6 M, citrato sódico 0.06 M), 0.1% SDS (dodecil sulfato sódico) (precalentado a 50°C) durante 30 minutos con agitación.
- e) Tirar la solución de lavado y enjuagar con agua destilada.
- f) Centrifugar los *microarrays* a 800 r.p.m. durante 3 minutos. Para ello los *microarrays* se colocan en una caja para portaobjetos y esta caja se centrifuga en una centrifuga de placas, o bien, se meten los *microarrays* en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugan en una centrifuga con un rotor para este tipo de tubos.
- g) Se guardan a temperatura ambiente hasta que vayan a ser usados.

En este ejemplo se han utilizado dos *microarrays*, uno por cada muestra. El Arrayer 417 de Affymetrix permite fabricar hasta 42 *microarrays*, que pueden ser guardados hasta su uso (10 meses en el caso de los "CodeLink Activated Slides").

### 2. Extracción del ADN del hisopo vaginal y de la muestra de sangre

La extracción del ADN de ambas muestras se puede realizar por cualquier método de extracción o utilizando cualquier kit de extracción apropiado para este tipo de muestras. En el hisopo vaginal se encontró una mezcla de células femeninas provenientes del epitelio vaginal, y masculinas, provenientes del semen. En el caso de las agresiones sexuales, lo que interesa identificar es el ADN masculino para poder compararlo con el del sospechoso/s. En muchos casos, el número de células femeninas es muy superior al de las masculinas, por lo que si analizamos marcadores autosómicos, el perfil del agresor puede quedar enmascarado por el de la víctima. En estas situaciones es cuando el estudio de los marcadores de cromosoma Y resulta de gran utilidad, siempre y cuando la víctima de la agresión haya sido una mujer, porque de esta manera el perfil de cromosoma Y que podamos obtener pertenecerá únicamente al sospechoso/s.

### 3. Amplificación de los fragmentos

Una vez extraído el ADN del hisopo vaginal y de la sangre del sospechoso, se procede a amplificar los 30 polimorfismos bialélicos seleccionados en ambas muestras. Esto se hace según el protocolo descrito en la referencia BRION M., *op. cited*. En la Tabla 5 se muestran los cebadores de cada marcador, así como su distribución en cuatro reacciones y las concentraciones de cada pareja de cebadores en su multiplex correspondiente.

TABLA 5

SNP	Cebadores		Tamaño (pb)	Conc (µM)	Multiplex 1
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')			
92R7	TGCATGAACACAAA AGACGTA	GCATTGTTAAATAT GACCAGC	55	0.20	
M70	TCATAGCCCCTACTAT ACTTTGGAC	CTGAGGGCTGGACT ATAGGG	81	0.20	
M22	GCTGATAGTCCTGG TTTCCCTA	TGAGCATGCCTACA GCAGAC	106	0.20	
Tat	GACTCTGAGTGTAG ACTTGTGA	GAAGGTGCCGTAA AAGTGTGAA	112	0.20	
P25	GGACCATCACCTGG GTAAAGT	AGTGCTTGTCCAAG GCAGTA	121	0.20	
SRY <sub>10831</sub>	TCCTTAGCAACCAT TAATCTGG	AAATAGCAAAAAC TGACACAAGGC	167	0.20	

ES 2 318 914 B1

5	M173	GCACAGTACTCACT TTAGGTTTGC	GCAGTTTTCCCAGA TCCTGA	172	0.20	
	M213	GGCCATATAAAAAC GCAGCA	TGAATGGCAAATTG ATTCCA	208	0.30	
10	M9	GCAGCATATAAAAAC TTTCAGG	AAAACCTAACTTTG CTCAAGC	340	0.35	
15	12f2	CACTGACTGATCAA AATGCTTACAGAT	GGATCCCTTCCTTA CACCTTATACA	90	0.25	
20	M201	TCAAATTGTGACAC TGCAATAGTT	CATCCAACACTAAG TACCTATTACGAA	144	0.25	
25	M26	AGCAGAAGAGACC AAGACAGC	GACGAAATCTGCAG CAAAAA	147	0.25	Multiplex 2
30	M170	TGCAGCTCTTATTA AGTTATGTTTTCA	CCAATTACTTTCAA CATTTAAGACC	158	0.30	
35	M172	TCCTCATTACCTG CCTCTC	TCCATGTTGGTTTG GAACAG	187	0.25	
40	M62	ACTAAAACACCATT AGAAACAAAGG	CTGAGCAACATAGT GACCCC	309	0.25	
45	M96	GTGATGTGTAACCT GGAAAACAGG	GGACCATATATTTT GCCATAGGTT	88	0.25	
50	M34	CACAGTGTTTTCTC ATGTTAATGC	GGGGACCCCAATA ATCATAA	92	0.25	
55	M81	TTATAGTTTCAATC CCTCAGTAATTTT	TGTTTCTTCTTGTT TGTGTGAGTA	176	0.25	Multiplex 3
60	M35	GCATGGTCCCTTTC TATGGAT	GAGAATGAATAGG CATGGGTTC	198	0.25	
65	M123	CACAGAGCAAGTG ACTCTCAAAG	TCTTCCCTCAACA TAGTTATCTCA	248	0.25	
	M78	CTTCAGGCATTATT TTTTTTGGT	ATAGTGTCCTTCA CCTTTCCTT	301	0.25	
	M65	AAGGCTACCCATTC CCAAAT	AAGTCTGGCATCTG CAAAATC	71	0.15	Multip

## ES 2 318 914 B1

5	M126	GTGCTTGAAACCGA GTTTGT	TCGGGAAACACAAT TAAGCA	83	0.15
10	M73- M160	AAAACAATAGTTCC AAAAACTTCTGA	CCTTTGTGATTCCCT CTGAACG	98	0.5
15	M37	ATGGAGCAAGGAA CACAGAA	AAGAAAGGAGATT GTTTTCAATTTT	124	0.3
20	M167	GAGGCTGGGCCAA GTTAAGG	CTCCTCGGAACCA CTACCA	130	0.15
25	M17-M18	CTGGTCATAACACT GGAAATC	AGCTGACCACAAAC TGATGTAGA	171	0.10
30	M153	TCTGACTTGGAAAG GGGAAA	TTTTCTCCTCATTAT TTGTCTTCA	239	0.5

Las PCR multiplex se llevaron a cabo en 25  $\mu$ L de volumen final. Las condiciones de las PCR para los cuatro multiplexes se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6

Reactivos	[Final]	Programa	
Tampón	1x		
dNTPs	300 $\mu$ M	95°C 10 minutos	
Cl <sub>2</sub> Mg	2 mM	94°C 30 segundos	32 ciclos
Cebadores	ver tabla 5	59°C 30 segundos	
ADN polimerasa <sup>a</sup>	2 U	70°C 30 segundos	
ADN	10 ng	65°C 15 minutos	
H <sub>2</sub> O	Hasta 25 $\mu$ L		

<sup>a</sup> AmpliTaq Gold DNA polimerasa (Applied Biosystems)

#### 4. Comprobación de la amplificación

Se chequeó la amplificación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes. Los geles se prepararon manualmente en el laboratorio utilizando un par de cristales y un film adherente (GelBond PAG film) al que se pega el gel por su cara hidrófila. Los geles utilizados fueron T=9 y C=5, y su composición es:

- 8,8 mL de solución Acrilamida y Piperazina en Tris-C1H 0.375 M (pH 8.8)
- 700  $\mu$ L de glicerol al 87%
- 50  $\mu$ L de persulfato amonio (APS) al 10%
- 20  $\mu$ L de TEMED

## ES 2 318 914 B1

El tampón de electroforesis utilizado ha sido Tris Glicina 0.125 M (pH 8.8) en el que se embeben las tiras de papel “Whatman”, cortadas según el tamaño del gel y situadas a cada uno de los extremos. El voltaje al que se corrieron los geles fue de 150 V y el tiempo de recorrido 90 minutos, aproximadamente.

5

Una vez que ha terminado la electroforesis se realiza una tinción de plata:

- Sumergir el gel en etanol 10% durante al menos 10 minutos. Tirar la solución.
- 10 • Sumergir en ácido nítrico 1% durante 5 minutos.
- Lavar dos veces con agua bidestilada durante varios segundos.
- 15 • Sumergir en  $\text{NO}_3\text{Ag}$  0.2% durante 20 minutos, con agitación suave.
- Lavar dos veces con agua bidestilada durante varios segundos.
- 20 • Sumergir el gel en una solución de  $\text{CO}_3\text{Na}$  0.28 M y Formaldehído al 0.02% hasta que aparezcan las bandas nítidas
- Parar la tinción sumergiendo el gel en ácido acético al 10%.
- Lavar con agua destilada.

25

La determinación del tamaño de los fragmentos obtenidos se hizo comparando con un marcador de peso molecular, el pBR322, digerido con MspI (New England BioLabs).

30 En esta etapa ya se tipa el marcador 12f2, puesto que el alelo derivado es una inserción de 2 kb. Si el fragmento está presente es que se ha producido dicha inserción y si no aparece es que no se ha producido.

### 5. Mezcla de los productos de las 4 PCRs multiplex y concentración del ADN mediante evaporación

35 Los productos de las cuatro reacciones de PCR de cada muestra se mezclan en un único tubo y se dejan evaporando a 37°C hasta llegar a un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ .

### 6. Purificación de los productos de PCR

40 Los productos de PCR deben ser purificados para eliminar los posibles restos de cebadores y dNTPs de la PCR para evitar que interfieran en la reacción de minisequenciación. Para ello, se añaden 4  $\mu\text{L}$  de Exo-SapIT (Amersham Bioscience) a 10  $\mu\text{L}$  de los productos de PCR mezclados y concentrados, y se incuban a 37°C durante 15 minutos, seguido de otros 15 minutos a 85°C.

### 45 7. Reacción de minisequenciación o Single Base Extensión (SBE)

50 En este caso se ha utilizado el mismo fluorocromo para los cuatro ddNTPs y por lo tanto son necesarias cuatro reacciones por muestra. Cada una de las reacciones se llevó a cabo en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ . Las concentraciones de cada uno de los reactivos se muestran en la Tabla 7. Los 29 cebadores utilizados en la minisequenciación se recogen en la Tabla 3.

55

(Tabla pasa a página siguiente)

60

65

# ES 2 318 914 B1

TABLA 7

Reactivos	[Final]	Programa
Tampón	1x	
ddNTPs mix <sup>a,b,c,d</sup>	0.5 µM	95°C 3 minutos
Cebadores (tabla 3)	0.05 µM cada uno	95°C 20 segundos
ADN polimerasa <sup>e</sup>	2 U	55°C 20 segundos
Productos de PCR	2.5 µL	33 ciclos
H <sub>2</sub> O	Hasta 15 µL	

<sup>a</sup> ddATP-Tamra, ddTTP, ddCTP, ddGTP

<sup>b</sup> ddATP, ddTTP-Tamra, ddCTP, ddGTP

<sup>c</sup> ddATP, ddTTP, ddCTP-Tamra, ddGTP

<sup>d</sup> ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP-Tamra

<sup>e</sup> Thermosequenase polimerase (Amersahm Bioscience)

## 8. Hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con el *microarray*

Se coloca el *microarray* en la cámara de hibridación con la silicona formando las cámaras de hibridación independientes. Se preparan las muestras a hibridar mezclando 7 µL de los productos de la reacción de minisequenciación con el tampón de hibridación (4x SSC, 0.1% SDS) en un volumen final de 15 µL. Se introducen los 15 µL de cada muestra en cada una de las cámaras de hibridación formadas por el molde de silicona. La disposición de las muestras sobre el *microarrays* se realiza según la Figura 3, de forma que cada fila representa una muestra y las columnas las reacciones de minisequenciación con uno de los cuatro ddNTP marcados. En este caso, la primera columna son las muestras con ddATP-Tamra, la segunda columna con ddTTP-Tamra, la tercera con ddCTP-Tamra y la cuarta con ddGTP-Tarara. Se deja incubar el *microarray* en un horno de hibridación a 42°C durante 180 minutos, aproximadamente. Pasado este tiempo se retira el *microarray* de la cámara de hibridación y se lava siguiendo los siguientes pasos:

- Colocar el *microarray* en un tubo tipo Falcon de 50 mL y enjuagar brevemente con 4x SSC.
- Pasar el *microarray* a otro tubo de 50 mL y lavar con 2x SSC y 0.1% SDS a 42°C durante 5 minutos.
- Tirar la solución de lavado y repetir el paso b.
- Tirar la solución.
- Lavar con 0.2x SSC a temperatura ambiente durante 1 minuto. Tirar la solución.
- Lavar con 0.1x SSC a temperatura ambiente durante 1 minuto. Tirar la solución.
- Centrifugar los *microarrays* a 1000 r.p.m. durante 5 minutos. Para ello los *microarrays* se colocan en una caja para portaobjetos y esta caja se centrifuga en una centrifuga de placas, o bien, se meten los *microarrays* en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugan en una centrifuga con un rotor para este tipo de tubos.
- Se guardan en la oscuridad hasta ser escaneados.

## 9. Escaneado del *microarray*

Se escanea el *microarray* a la longitud de onda del fluorocromo utilizado en la reacción de minisequenciación. En este caso hemos usado el "Scanner 418 de Affymetrix".

## ES 2 318 914 B1

### 10. Análisis de los resultados mediante un software de análisis de imagen

Se cuantificó la fluorescencia con el Imagen 4.1 (BioDiscovery Inc.).

5

### 11. Interpretación de los resultados

En la Tabla 8 se representan los resultados obtenidos. Dado que los resultados obtenidos a partir de la muestra del sospechoso no coinciden con los del hisopo vaginal, podemos excluir a dicho sospechoso como donante de los restos de semen encontrados en el hisopo vaginal. Los resultados obtenidos en las muestras están representados en negrita.

15

TABLA 8

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

SNP	Sospechoso		Hisopo vaginal	
	Alelos		Alelos	
	ancestral	derivado	ancestral	derivado
92R7	<b>G</b>	A	G	<b>A</b>
M70	<b>A</b>	C	<b>A</b>	C
M22	<b>A</b>	G	<b>A</b>	G
Tat	<b>T</b>	C	<b>T</b>	C
P25	<b>C</b>	A	C	<b>A</b>
SRY <sub>10831</sub>	A	<b>G</b>	A	<b>G</b>
M173	<b>A</b>	C	A	<b>C</b>
M213	T	<b>C</b>	T	<b>C</b>
M9	<b>C</b>	G	C	<b>G</b>
M201	<b>G</b>	T	<b>G</b>	T
M26	G	<b>A</b>	<b>G</b>	A
M170	A	<b>C</b>	<b>A</b>	C
M172	<b>T</b>	G	<b>T</b>	G
M62	<b>T</b>	C	<b>T</b>	C
M96	<b>G</b>	C	<b>G</b>	C
M34	<b>G</b>	T	<b>G</b>	T
M81	<b>C</b>	T	<b>C</b>	T
M35	<b>G</b>	C	<b>G</b>	C
M123	<b>G</b>	A	<b>G</b>	A
M78	<b>C</b>	T	<b>C</b>	T
M65	<b>A</b>	T	<b>A</b>	T
M126		del AATA		del AATA
M73		del GT		del GT
M160	<b>A</b>	C	<b>A</b>	C
M37	<b>C</b>	T	<b>C</b>	T
M167	<b>C</b>	T	<b>C</b>	T
M17		del G		del G
M18		ins AA		ins AA
M153	<b>T</b>	A	<b>T</b>	A
12f2*		ins 2 kb		ins 2 kb
Haplogrupo	I1b2		R1b*	

\* Determinado por la presencia o ausencia del fragmento amplificado en el gel de poliacrilamida.

## ES 2 318 914 B1

### Ejemplo 2

#### *Prueba de paternidad*

5 En un laboratorio en el que se realizan pruebas biológicas de la paternidad se presenta un individuo varón que reclama la paternidad a otro individuo ya fallecido, pero que tiene un hermano vivo. En este caso se toman muestras al solicitante de la prueba (hijo) y al presunto tío paterno.

#### 1. *Fabricación del microarray*

10 Se prepara una placa de 96 ó 384 pocillos con las *cTags* con las que se va a fabricar el *microarray* (Secuencias ID N° 1-29 de la Lista de secuencias) para que el robot las pueda recoger y depositar sobre el soporte sólido, según se muestra en la Figura 3. Se utilizaron como soporte los “CodeLink Activated Slides” de Amersham Biosciences y el Arrayer 417 de Affymetrix como robot. Las *cTags* se diluyeron en tampón de impresión (fosfato sódico pH 8.5, 15 50 mM) hasta una concentración de 20  $\mu$ M. Las *cTags* tienen en el extremo 3' un grupo amino que se va a unir covalentemente a la superficie de los “CodeLink Activated Slides”. Una vez que se han depositado las *cTags* sobre los portaobjetos se dejan secar de 4 a 72 horas.

20 A continuación es necesario bloquear los grupos amino-reactivos de la superficie del *microarray* a la que no se han unido las *cTags*. Esto se lleva a cabo mediante una serie de pasos que consisten en:

a) Colocar los *microarrays* en un tubo tipo Falcon de 50 mL y añadir la solución de bloqueo (0.1 M Tris, 50 mM etanolamina, pH 9.0) precalentada a 50°C durante 30 minutos.

25 b) Tirar la solución de bloqueo.

c) Enjuagar los *microarrays* dos veces con agua destilada.

d) Lavar los *microarrays* con 4x SSC, 0.1% SDS (precalentado a 50°C) durante 30 minutos con agitación.

30 e) Tirar la solución de lavado y enjuagar con agua destilada.

f) Centrifugar los *microarrays* a 800 r.p.m. durante 3 minutos. Para ello los *microarrays* se colocan en una caja para portaobjetos y esta caja se centrifuga en una centrifuga de placas, o bien se meten los *microarrays* en tubos Falcon de 35 50 mL y se centrifugan en una centrifuga con un rotor para este tipo de tubos.

g) Se guardan a temperatura ambiente hasta que vayan a ser usados.

40 En este ejemplo se han utilizado dos *microarrays*, uno por cada muestra. El Arrayer 417 de Affymetrix permite fabricar hasta 42 *microarrays*, que pueden ser guardados hasta su uso (10 meses en el caso de los “CodeLink Activated Slides”).

#### 2. *Extracción del ADN del hijo y del presunto tío*

45 La extracción del ADN de ambas muestras se puede realizar por cualquier método de extracción o utilizando cualquier kit de extracción apropiado para este tipo de muestras, que pueden ser tanto de sangre como saliva.

#### 3. *Amplificación de los fragmentos*

50 Una vez extraído el ADN de ambas muestras, se procede a amplificar los 30 polimorfismos bialélicos seleccionados en ambas muestras. Esto se hace en cuatro PCRs multiplex, recogidas en la Tabla 5, en la que se muestran los cebadores de cada marcador así como las concentraciones de cada pareja de cebadores en su multiplex correspondiente.

55 Las PCR multiplex se llevaron a cabo en 25  $\mu$ L de volumen final. Las condiciones de las PCRs para los cuatro multiplexes se muestran en la Tabla 6.

#### 4. *Comprobación de la amplificación*

60 Se chequeó la amplificación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes. Los geles se prepararon manualmente en el laboratorio utilizando un par de cristales y un film adherente (GelBond PAG film) al que se pega el gel por su cara hidrófila. Los geles utilizados fueron T=9 y C=5, y su composición es:

- 65 • 8,8 mL de solución Acrilamida y Piperazina en Tris-C1H 0.375 M (pH 8.8)
- 700  $\mu$ L de glicerol 87%

## ES 2 318 914 B1

- 50  $\mu\text{L}$  de APS 10%
- 20  $\mu\text{L}$  de TEMED.

5

El tampón de electroforesis utilizado ha sido Tris Glicina 0.125 M (pH 8.8) en el que se embeben las tiras de papel “Whatman”, cortadas según el tamaño del gel y situadas a cada uno de los extremos. El voltaje al que se corrieron los geles fue de 150 V y el tiempo de recorrido 90 minutos aproximadamente.

10

Una vez que ha terminado la electroforesis se realiza una tinción de plata:

15

- Sumergir el gel en etanol 10% durante al menos 10 minutos. Tirar la solución.
- Sumergir en ácido nítrico 1% durante 5 minutos.
- Lavar dos veces con agua bidestilada durante varios segundos.
- Sumergir en  $\text{NO}_3\text{Ag}$  0.2% durante 20 minutos, con agitación suave.
- Lavar dos veces con agua bidestilada durante varios segundos.
- Sumergir el gel en una solución de  $\text{CO}_3\text{Na}$  0.28 M y Formaldehído al 0.02% hasta que aparezcan las bandas nítidas.
- Parar la tinción sumergiendo el gel en ácido acético al 10%.
- Lavar con agua destilada.

20

25

30

La determinación del tamaño de los fragmentos obtenidos se hizo comparando con un marcador de peso molecular, el pBR322 digerido con MspI (New England BioLabs).

35

En este paso ya se tipa el marcador 12f2, puesto que el alelo derivado es una inserción. Si el fragmento está presente es que se ha producido dicha inserción y si no aparece es que no se ha producido.

### 5. Mezcla de los productos de las 4 PCRs multiplex y concentración del ADN mediante evaporación

40

Los productos de las cuatro reacciones de PCR de cada muestra se mezclan en un único tubo y se dejan evaporando a 37°C hasta llegar a un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ .

### 6. Purificación de los productos de PCR

45

Los productos de PCR deben ser purificados para eliminar los posibles restos de cebadores y dNTPs de la PCR para evitar que interfieran en la reacción de minisequenciación. Para ello, se añaden 4  $\mu\text{L}$  de Exo-SapIT (Amersham Bioscience) a 10  $\mu\text{L}$  de los productos de PCR mezclados y concentrados, y se incuban a 37°C durante 15 minutos, seguido de otros 15 minutos a 85°C.

### 7. Reacción de minisequenciación o Single Base Extension (SBE)

50

En este caso se ha utilizado el mismo fluorocromo para los cuatro ddNTPs y por lo tanto son necesarias cuatro reacciones por muestra. Cada una de las reacciones se llevó a cabo en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ . Las concentraciones de cada uno de los reactivos se muestran en la Tabla 7. Los 29 cebadores utilizados en la minisequenciación se recogen en la Tabla 3.

55

### 8. Hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con el microarray

60

Se coloca el *microarray* en la cámara de hibridación con la silicona formando las cámaras de hibridación independientes. Se preparan las muestras a hibridar mezclando 7  $\mu\text{L}$  de los productos de la reacción de minisequenciación con el tampón de hibridación (4x SSC, 0.1% SDS) en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ . Se introducen los 15  $\mu\text{L}$  de cada muestra en cada una de las cámaras de hibridación formadas por el molde de silicona. La disposición de las muestras sobre el *microarrays* se realiza según la Figura 3 de forma que cada fila representa una muestra y las columnas las reacciones de minisequenciación con uno de los cuatro ddNTP marcados. En este caso, la primera columna son las muestras con ddATP-Tamra, las segunda columna con ddTTP-Tamra, la tercera con ddCTP-Tamra y la cuarta con ddGTP-Tamra. Se deja incubar el *microarray* en un horno de hibridación a 42°C durante 180 minutos, aproximadamente. Pasado este tiempo se retira el *microarray* de la cámara de hibridación y se lava siguiendo los siguientes pasos:

65

- a) Colocar el *microarray* en un tubo tipo Falcon de 50 mL y enjuagar brevemente con 4x SSC.

## ES 2 318 914 B1

b) Pasar el *microarray* a otro tubo de 50 mL y lavar con 2x SSC y 0.1% SDS a 42°C durante 5 minutos.

c) Tirar la solución de lavado y repetir el paso b.

5 d) Tirar la solución.

e) Lavar con 0.2x SSC a temperatura ambiente durante 1 minuto. Tirar la solución.

10 f) Lavar con 0.1x SSC a temperatura ambiente durante 1 minuto. Tirar la solución.

g) Centrifugar los *microarrays* a 1000 r.p.m. durante 5 minutos. Para ello los *microarrays* se colocan en una caja para portaobjetos y esta caja se centrifuga en una centrifuga de placas, o bien se meten los *microarrays* en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugan en una centrifuga con un rotor para este tipo de tubos.

15 h) Se guardan en la oscuridad hasta ser escaneados.

### 9. Escaneado del *microarray*

20 Se escanea el *microarray* a la longitud de onda del fluorocromo utilizado en la reacción de minisequenciación. En este caso hemos usado el "Scanner 418 de Affymetrix".

### 10. Análisis de los resultados mediante un software de análisis de imagen

25 Se cuantificó la fluorescencia con el Imogene 4.1 (BioDiscovery Inc.).

### 11. Interpretación de los resultados

30 En la Tabla 9 se representan los resultados obtenidos. Dado que el haplogrupo que presenta el presunto tío no coincide con el del hijo, el resultado de la prueba será una exclusión de la paternidad, siempre y cuando la relación de hermandad entre el presunto padre fallecido y el tío paterno haya sido probada. Los resultados obtenidos en las muestras están representados en negrita.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 318 914 B1

TABLA 9

5	SNP	Presunto tío paterno		Hijo	
		Alelos		Alelos	
		ancestral	derivado	ancestral	derivado
	92R7	G	A	G	A
10	M70	A	C	A	C
	M22	A	G	A	G
	Tat	T	C	T	C
	P25	C	A	C	A
15	SRY <sub>10831</sub>	A	G	A	G
	M173	A	C	A	C
	M213	T	C	T	C
20	M9	C	G	C	G
	M201	G	T	G	T
	M26	G	A	G	A
	M170	A	C	A	C
25	M172	T	G	T	G
	M62	T	C	T	C
	M96	G	C	G	C
	M34	G	T	G	T
30	M81	C	T	C	T
	M35	G	C	G	C
	M123	G	A	G	A
35	M78	C	T	C	T
	M65	A	T	A	T
	M126		del AATA		del AATA
40	M73		del GT		del GT
	M160	A	C	A	C
	M37	C	T	C	T
	M167	C	T	C	T
45	M17		del G		del G
	M18		ins AA		ins AA
	M153	T	A	T	A
50	12f2*		ins 2 kb		ins 2 kb
	Haplogrupo	E3b2		G	

\* Determinado por la presencia o ausencia del fragmento amplificado en el gel de poliacrilamida.

Descripción de las figuras

Figura 1. Árbol filogenético definido por los polimorfismos binarios seleccionados. Los nombres de los marcadores aparecen debajo de las líneas mientras que los de los linajes se sitúan sobre las líneas, aunque la longitud de las ramas no es significativa.

Figura 2. Esquema del protocolo a seguir para el genotipado de SNPs de cromosoma Y mediante el procedimiento descrito.

Figura 3. Diseño del *microarray*. El rectángulo de la izquierda representa el portaobjetos sobre el que se fabrica el *microarray*. En el interior de este rectángulo hay una matriz de círculos. Cada uno de estos círculos representa un *subarray*. Cada *subarray* está formado por las *cTags* correspondientes a cada SNP (cada uno de los puntos del

## ES 2 318 914 B1

subarray). La situación de cada una de las *cTags* en el *subarray* tiene que ser conocida, aunque puede variar de un *microarray* a otro. En esta figura se muestra una de las disposiciones posibles.

5      Figura 4. Esquema de la comprobación de la amplificación de los productos de PCR separados mediante electroforesis, con las condiciones de PCR descritas en BRIÓN M., *op. cited*. En la calle 1 aparece el marcador de peso molecular pBR322 DNA-Msp I Digest, en la 2 el multiplex 1, en la 3 el multiplex 2, en la 4 el multiplex 3, y en la 5 el multiplex 4.

10     Figura 5. Representación de la reacción de minisequenciación y la posterior hibridación de los productos de dicha reacción con el *tag-array*.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el genotipado de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) de cromosoma Y que determinan los haplogrupos más frecuentes en poblaciones europeas mediante chips de ADN, **caracterizado** por la amplificación de los fragmentos que contienen los SNPs de interés, y la determinación de la base implicada en el polimorfismo mediante una reacción de minisequenciación empleando *primers* o cebadores que portan una cola (*tag*), para su posterior detección mediante la hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con un *microarray* constituido por las secuencias complementarias a las colas (*cTag*), procedimiento que consta de las siguientes etapas:

- a) fabricación de los microarrays;
- b) amplificación mediante PCR multiplex de los fragmentos de ADN que incluyen los SNPs seleccionados;
- c) comprobación de la amplificación;
- d) mezcla de los productos de las PCRs multiplex, si han sido varias reacciones las que se han llevado a cabo, y concentración del ADN mediante evaporación;
- e) purificación de los productos de PCR;
- f) reacción de minisequenciación o Single Base Extensión (SBE);
- g) hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con el microarray;
- h) escaneado del microarray a la longitud de onda correspondiente, según los fluorocromos utilizados en la reacción de minisequenciación;
- i) análisis de los resultados mediante un software de análisis de imagen.
- j) interpretación de los resultados.

2. Procedimiento para el genotipado de SNPs, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la fabricación de microarrays constituidos por las *cTags*, Sec ID N° 1-29, que son oligonucleótidos complementarios a las colas que portan los cebadores de minisequenciación en su extremo 5' y que se encuentran unidas al soporte sobre el que se fabrica el *microarray* por el extremo 3'.

3. Procedimiento para el genotipado de SNPs, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la amplificación de los 30 SNPs seleccionados, para determinar los haplogrupos más frecuentes en Europa, y que son los SNPs: 92R7, Tat, P25, SRY<sub>10831</sub>, 12f2, M9, M17, M18, M22, M26, M34, M35, M37, M62, M65, M70, M73, M78, M81, M96, M123, M126, M153, M160, M167, M170, M172, M173, M201, M213.

4. Procedimiento para el genotipado de SNPs, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la reacción de minisequenciación o *single base extension* (SBE) . utilizando los cebadores de minisequenciación que finalizan en su extremo 3' en la base anterior a la posición polimórfica y en el extremo 5' portan una cola o *tag* complementaria a la *cTag* correspondiente y cuyas secuencias se corresponden con los siguientes identificadores: 92R7 (SEC. ID. N°: 30 + SEC. ID. N°: 59), M70 (SEC. ID. N°: 31 + SEC. ID. N°: 60), M22 (SEC. ID. N°: 32 + SEC. ID. N°: 61), Tat (SEC. ID. N°: 33 + SEC. ID. N°: 62), P25 (SEC. ID. N°: 34 + SEC. ID.: N°: 63), SRY<sub>10831</sub> (SEC. ID. N°: 35 + SEC. ID. N°: 64), M173 (SEC. ID. N°: 36 + SEC. ID. N°: 65), M213 (SEC. ID. N°: 37 + SEC. ID. N°: 66), M9 (SEC. ID. N°: 38 + SEC. ID. N°: 67), M201 (SEC. ID. N°: 39 + SEC. ID. N°: 68), M26 (SEC. ID. N°: 40 + SEC. ID. N°: 69), M170 (SEC. ID. N°: 41 + SEC. ID. N°: 70), M172 (SEC. ID. N°: 42 + SEC. ID. N°: 71), M62 (SEC. ID. N°: 43 + SEC. ID. N°: 72), M96 (SEC. ID. N°: 44 + SEC. ID. N°: 73), M34 (SEC. ID. N°: 45 + SEC. ID. N°: 74), M81 (SEC. ID. N°: 46 + SEC. ID. N°: 75), M35 (SEC. ID. N°: 47 + SEC. ID. N°: 76), M123 (SEC. ID. N°: 48 + SEC. ID. N°: 77), M78 (SEC. ID. N°: 49 + SEC. ID. N°: 78), M65 (SEC. ID. N°: 50 + SEC. ID. N°: 79), M126 (SEC. ID. N°: 51 + SEC. ID. N°: 80), M73 (SEC. ID. N°: 52 + SEC. ID. N°: 81), M160 (SEC. ID. N°: 53 + SEC. ID. N°: 82), M37 (SEC. ID. N°: 54 + SEC. ID. N°: 83), M167 (SEC. ID. N°: 55 + SEC. ID. N°: 84), M17 (SEC. ID. N°: 56 + SEC. ID. N°: 85), M18 (SEC. ID. N°: 57 + SEC. ID. N°: 86), M153 (SEC. ID. N°: 58 + SEC. ID. N°: 87).

5. Uso de un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para casos de agresiones sexuales.

Figura 1

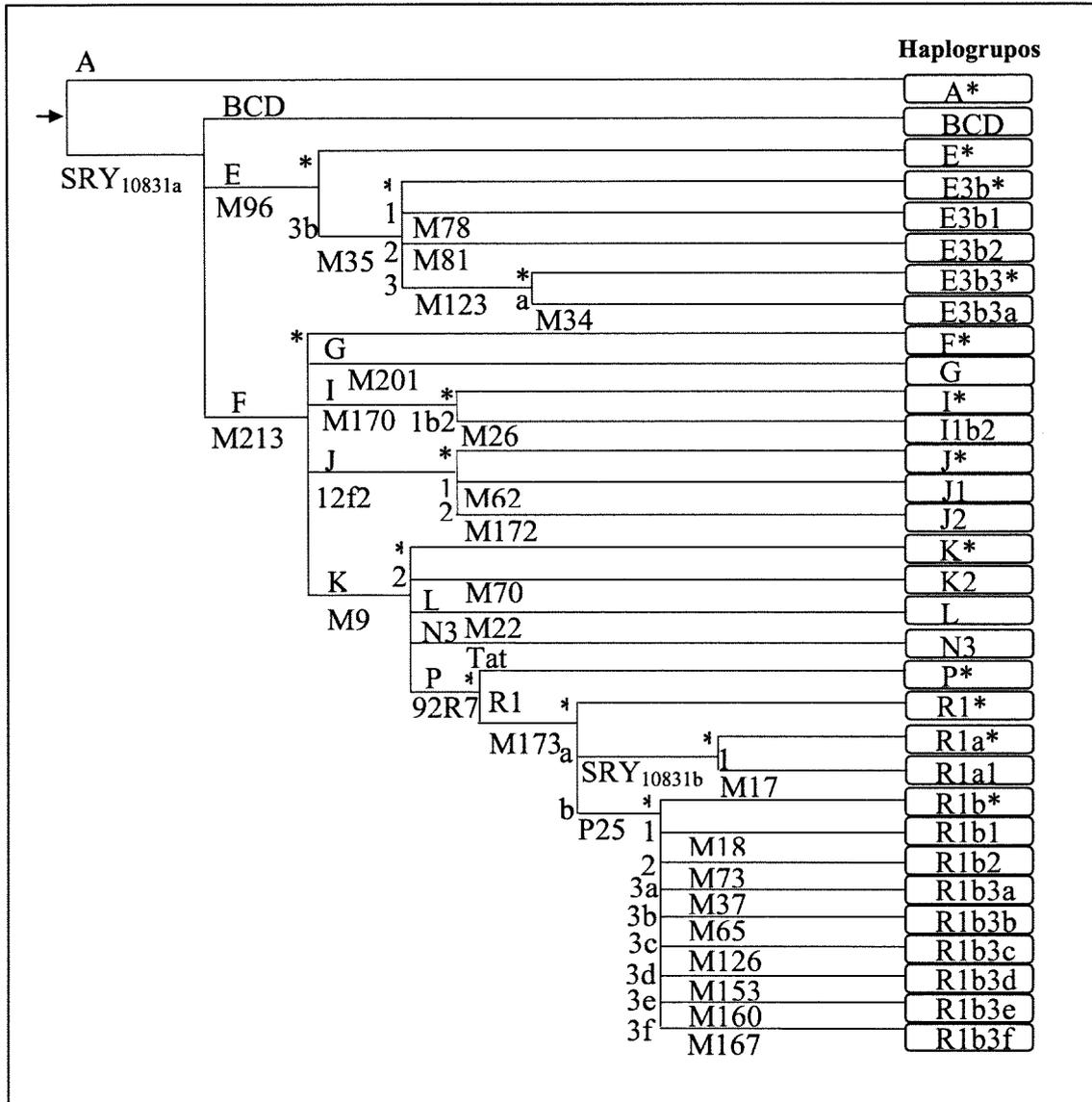
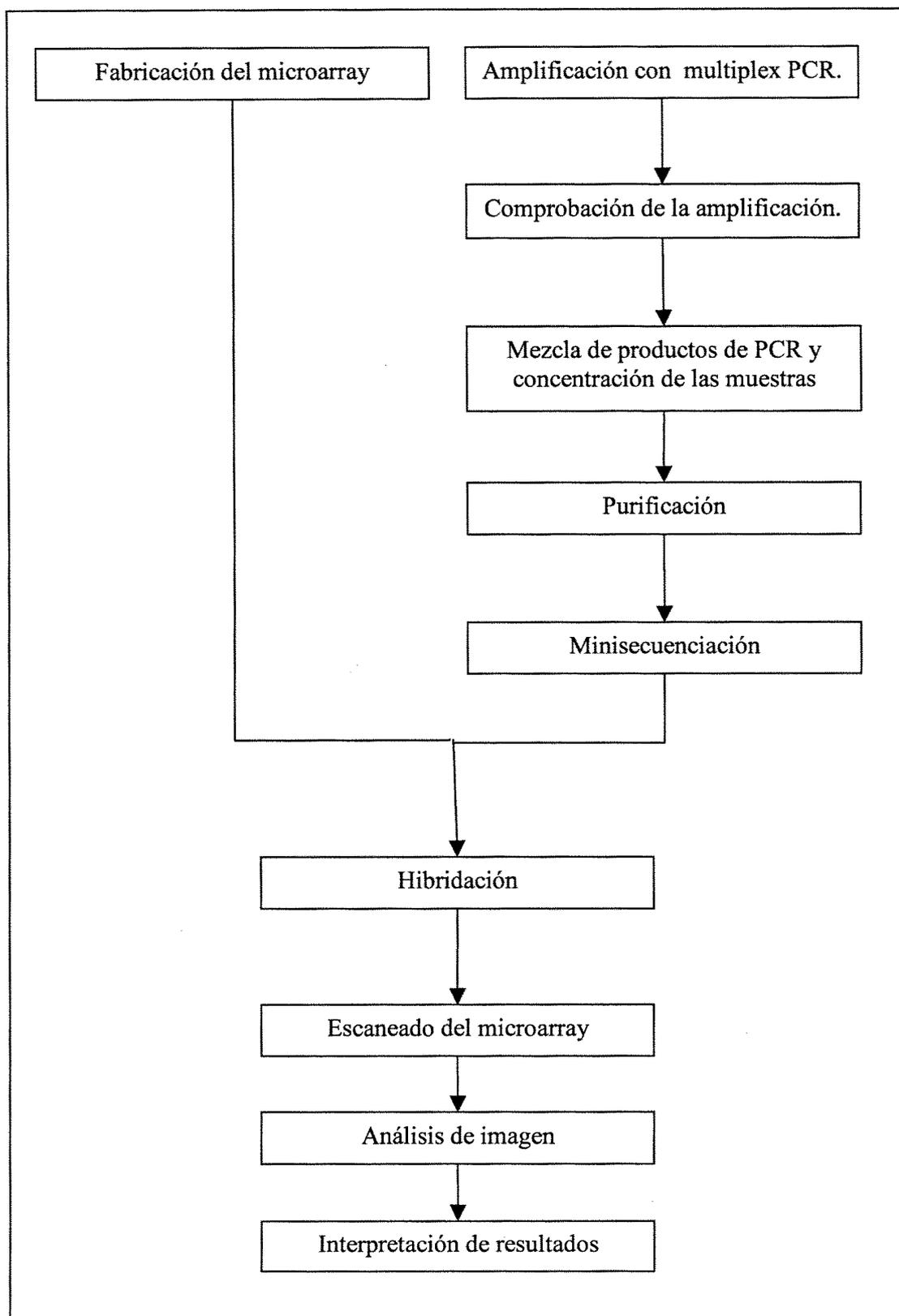


Figura 2



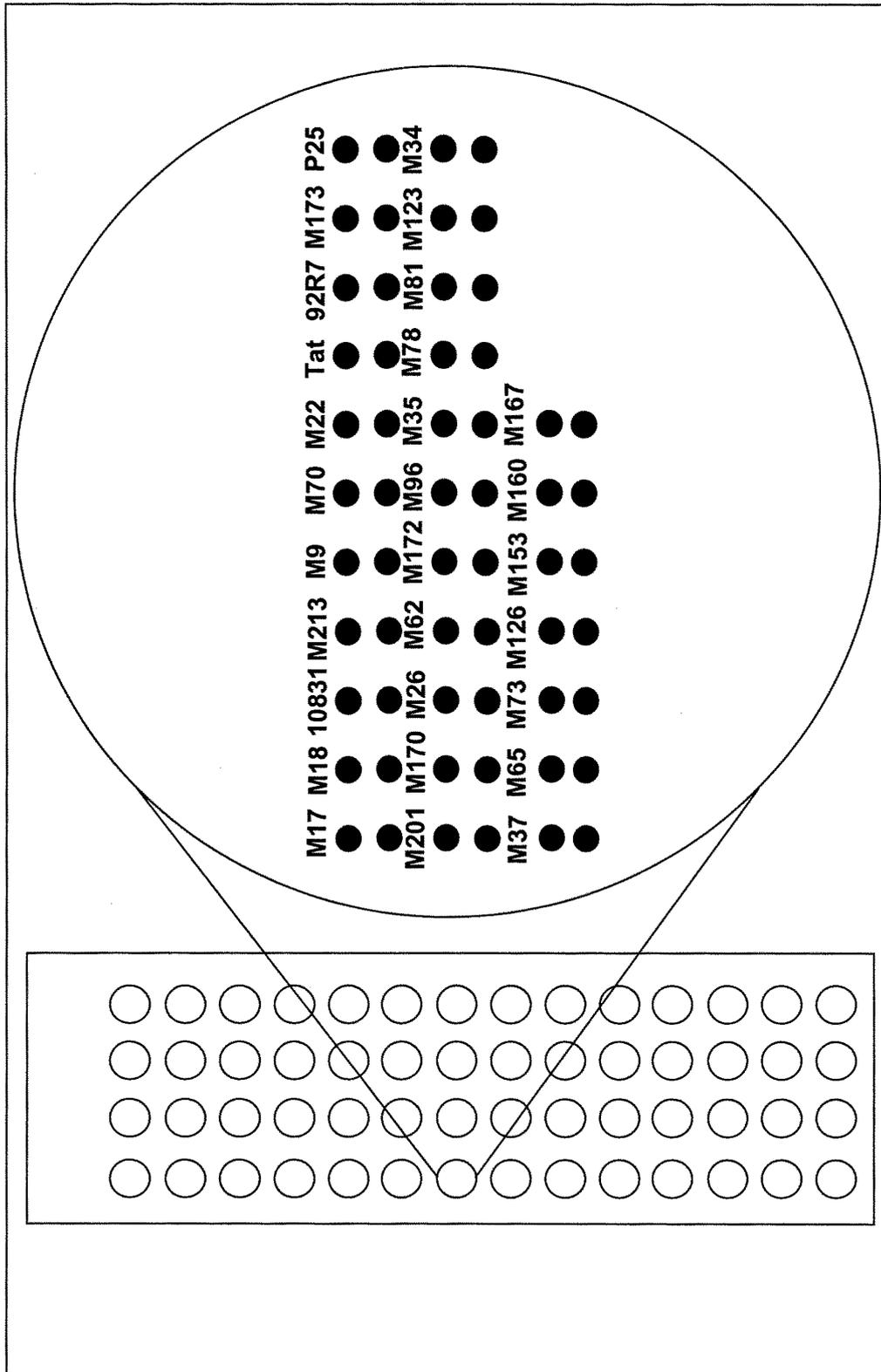


Figura 3

Figura 4

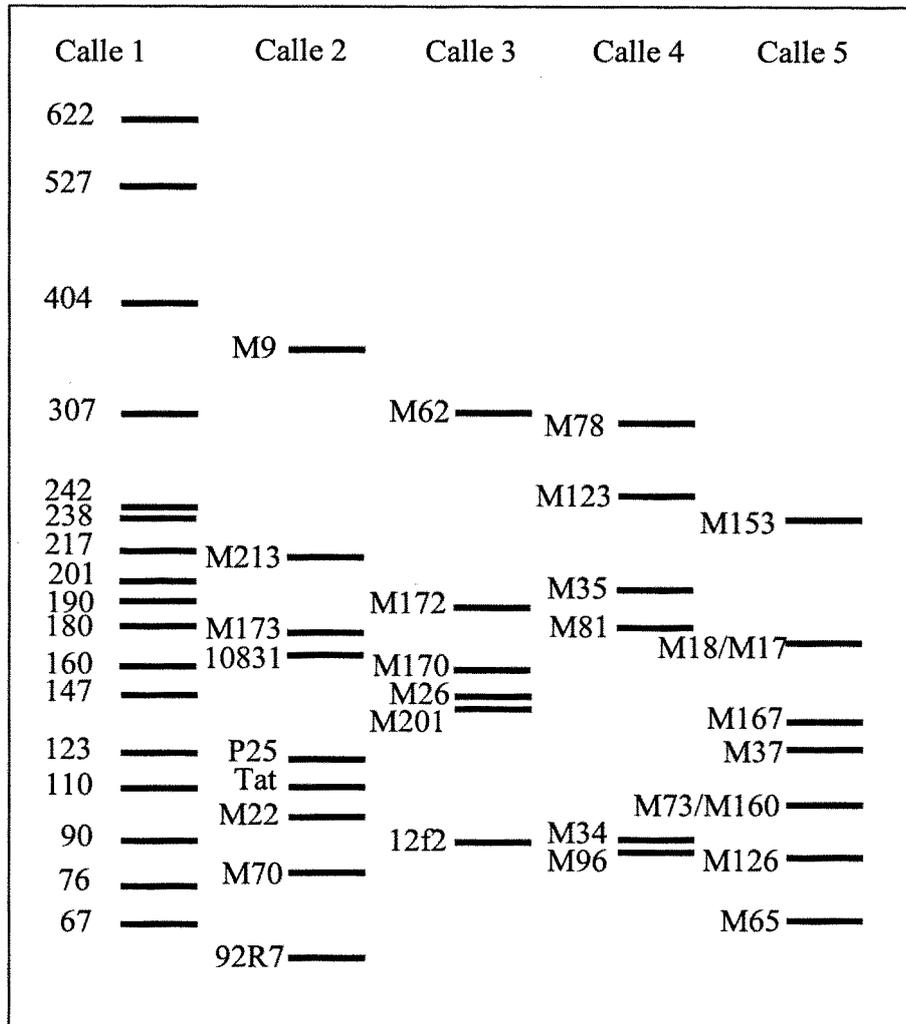
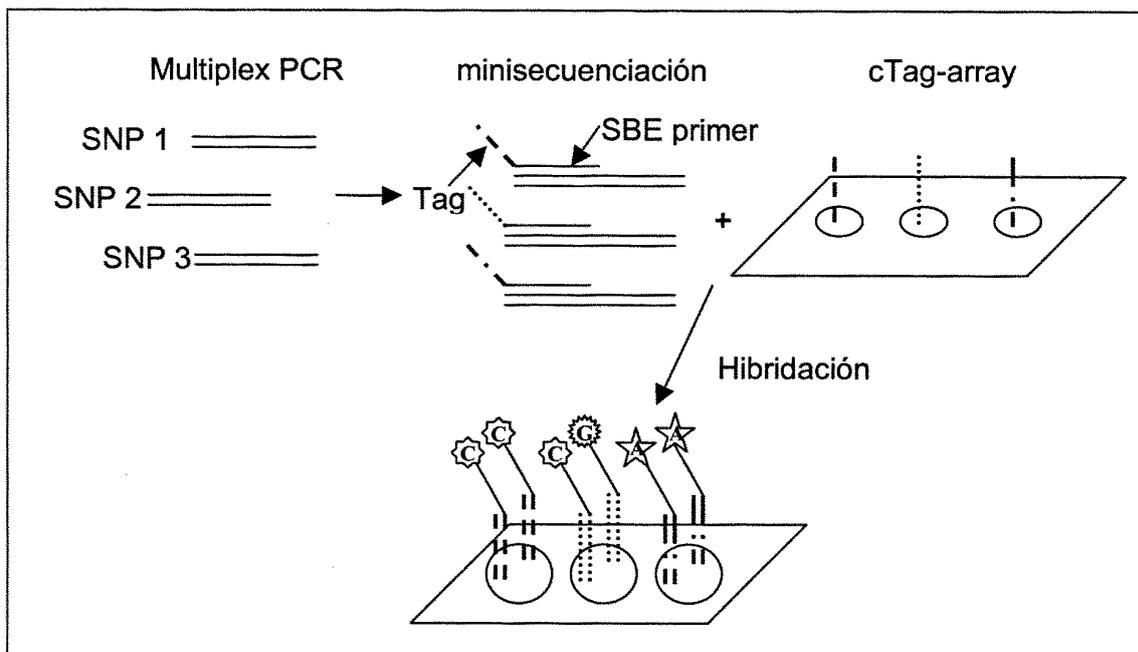


Figura 5





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 318 914

② N° de solicitud: 200403106

③ Fecha de presentación de la solicitud: 14.12.2004

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HIRSCHHORN JOEL N. et al. "SBE-TAGS: An array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping". Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 24.10.2000. Vol. 97, N°. 22, páginas 12164-12169. ISSN 0027-8424.	1-5
X	FAN J. B. et al. "Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays". Genome research. Jun. 2000. Vol. 10, N°.6, páginas 853-860.	1
A	SANCHEZ JUAN J. et al. "Multiplex PCR and minisequencing of SNPs- a model with 35 Y chromosome SNPs". Forensic science international. 14.10.2003. Vol. 137, N°. 1, páginas 74-84. ISSN 0379-0738.	1-5
A	WO 03006677 A2 (ILLUMINA INC.) 23.01.2003	1-5
A	WO 0129260 A2 (AFFYMETRIX INC) 26.04.2001	1-5

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

31.03.2009

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.03.2009

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	2-5	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones		<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	1-5	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HIRSCHHORN JOEL N.et al."SBE-TAGS: An array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping".PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. 24.10.2000. Vol.97, N°. 22, páginas 12164 - 12169. ISSN 0027-8424.	24.10.2000
D02	Fan J. B. et al. "Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays". Genome research. Jun. 2000. Vol.10, N°.6, páginas 853 - 860.	Jun-2000
D03	Sanchez Juan J.et al. "Multiplex PCR and minisequencing of SNPs- a model with 35 Y chromosome SNPs". Forensic science international. 14.10.2003. Vol.137, N°.1, páginas 74 - 84. ISSN 0379-0738.	14.10.2003
D04	WO 03006677 A2	23.01.2003
D05	WO 0129260 A2	26.04.2001

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud divulga un procedimiento de genotipado de SNPs del cromosoma Y para determinar los haplogrupos más frecuentes mediante chips de ADN.

La reivindicación independiente 1 caracteriza el procedimiento por llevarse a cabo en cuatro pasos fundamentalmente (fig.5):

1)amplificación por PCR múltiple de los fragmentos de ADN conteniendo los SNPs. 2)reacción de minisequenciación o SBE haciendo uso de cebadores portando una etiqueta o tag.

3)hibridación molecular en un microarray.

Las reivindicaciones 2-5 caracterizan las secuencias etiqueta (SEQ.ID. N°s 1-29) y los cebadores de minisequenciación (SEQ.ID.N°s 30-59) para llevar a cabo la identificación de los SNPs concretos contenidos en una muestra dada.

D01 describe un método basado en el genotipado de SNPs mediante la técnica SBE (single base extension) haciendo uso de cebadores bifuncionales que portan una secuencia única o tag, junto a una secuencia específica del locus del SNP que se quiere identificar. Adicionalmente está técnica se puede acoplar a una PCR múltiple para la identificación simultanea de múltiples locus.

A la luz del estado de la técnica, la reivindicación 1 parece no ser nueva.

Las reivindicaciones 2-5 carecerían de actividad inventiva puesto que los SNPs identificados en el cromosoma Y ya son conocidos en el estado de la técnica, tal y como se refleja en la propia descripción (tabla 1, páginas 5-6), por lo que la secuencia concreta de los primers bifuncionales diseñados parece entrar dentro del trabajo rutinario de diseño de primers en procedimientos de similares características.