



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ N.º de publicación: **ES 2 088 823**

⑫ Número de solicitud: 9401094

⑤① Int. Cl.⁶: C12Q 1/68

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **18.05.94**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.96**

⑫③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.09.96

⑦① Solicitante/s: **Universidad de Alicante**
Carretera de San Vicente del Raspeig, s/n
03690 San Vicente del Raspeig, Alicante, ES

⑦② Inventor/es: **Martínez Murcia, Antonio y**
Rodríguez Valera, Francisco

⑦④ Agente: **Ungria Goiburu, Bernardo**

⑤④ Título: **Método para la obtención de oligonucleótidos y sondas destinados a la determinación e identificación de grupos taxonómicos, productos obtenidos y aplicaciones.**

⑤⑦ Resumen:

Método para la obtención de oligonucleótidos y sondas destinados a la determinación e identificación de grupos taxonómicos, productos obtenidos y aplicaciones.

El método comprende: (a) seleccionar las cepas; (b) extraer el DNA; (c) seleccionar oligonucleótidos capaces de hibridar con una de las hebras del DNA y que posean un extremo 3'-hidróxilo libre, como cebadores; (d) efectuar la reacción en cadena de la polimerasa; (e) analizar los fragmentos de DNA que han sido amplificados; (f) seleccionar las bandas comunes a todos los organismos del taxón, entre los patrones de AP-PCR; (g) secuenciar los extremos de los fragmentos de AP-PCR comunes; (h) diseñar oligonucleótidos específicos complementarios de las secuencias obtenidas; (i) detectar la presencia de fragmentos específicos en el genoma de un individuo.

Los productos obtenidos por este método tienen aplicación para la determinación e identificación de grupos taxonómicos, por ejemplo, bacterias, entre las que destaca la especie *Haloferax mediterranei*.

ES 2 088 823 A1

DESCRIPCION

Método para la obtención de oligonucleótidos y sondas destinados a la determinación e identificación de grupos taxonómicos, productos obtenidos y aplicaciones.

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la detección e identificación de los diferentes grupos taxonómicos por PCR específica aplicando la técnica de la AP-PCR.

10 Más concretamente, la presente invención proporciona un método para la obtención de secuencias nucleótidas específicas utilizables para dicha identificación, a los productos obtenidos y a sus aplicaciones.

Estado de la técnica anterior a la invención

15 La reacción de la polimerasa en cadena [en adelante referida como PCR; (1) Saiki, R.K., D.H. Gel-fand, S. Sotffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B-Mullis y H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491] puede utilizarse para generar patrones de bandas en un gel de agarosa cuando se aplica al DNA total extraído de una bacteria u otro microorganismo o célula. Dichos patrones pueden ser específicos de especie o incluso de cepa y su utilización en identificación bacteriana está ampliamente documentada [(2) Showalter D. B y S. S Sommer. 1988. The generation of radiolabeled DNA and RNA probes with polymerase chain reaction. Anal. biochem. 177: 90-94; y (3) Walker, J. y G. Sougan. 1989. DNA probes: a new role in diagnostic microbiology. J. Appl. Bacteriol. 67: 229-238].

25 Generalmente dichos patrones se obtienen utilizando oligonucleótidos cuya secuencia es homóloga a fragmentos de DNA previamente localizados en la bacteria a identificar. La utilización de oligonucleótidos de secuencia aleatoria, y que por tanto no requieren el conocimiento previo de las secuencias presentes en el DNA de la bacteria, es una técnica denominada cebado al azar de la reacción de la polimerasa en cadena (arbitrarily primed-PCR o AP-PCR) que también se encuentra documentadas en la literatura [(4) Welsh, J., y M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids. Res. 18: 7213-7218; (5) Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, y K. J. Livak, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids. Res. 18: 6531-6536; (6) McClelland, M., y J.T. Welsh. 1991. Arbitrarily primed polymerase chain reaction method for fingerprinting genomes. Patent Cooperation Treaty (PCT). International application number: PCT/US91/07713; (7) McClelland, M., y J.T. Welsh. 1992. Consensus sequence primed polymerase chain reaction method for fingerprinting genomes. Patent Cooperation Treaty (PCT). International application number: PCT/US92/01491].

40 Consiste en la utilización de un número variable de oligonucleótidos de 9 o más bases dispuestas al azar, solos o por grupos. De esta manera se puede generar un patrón de bandas asignable al conjunto y que contiene información sobre el genoma global de la bacteria. La identidad de dos de estos patrones, si el número de oligonucleótidos y sus combinaciones es suficiente puede considerarse como equivalente a identidad de las dos cepas. Se trata por tanto de un sistema de tipificación con innumerables aplicaciones en medicina y epidemiología. Asimismo presenta aplicaciones equivalentes en ecología bacteriana, control de calidad, control de contaminación y en general cualquier técnica en la que la identidad de dos cepas bacterianas puede resultar de importancia.

Sin embargo la AP-PCR o RAPD (random amplified polymorphic DNA) no permite la identificación de microorganismos desconocidos objetivo que sí puede alcanzarse con sondas específicas.

50 Frente a estos inconvenientes, en la presente invención se propone la aplicación de la AP-PCR para buscar sondas específicas que puedan utilizarse en la identificación de los correspondientes microorganismos.

55 Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como indica su enunciado se refiere a un método para la obtención de oligonucleótidos y sondas destinadas a la determinación e identificación de grupos taxonómicos, a los productos obtenidos y a sus aplicaciones.

60 La presente invención consiste en la aplicación de la AP-PCR para buscar sondas específicas. Se trata de utilizar un conjunto suficientemente variado de cepas bacterianas o de otros microorganismos o células como para representar la mayor parte de la diversidad genética presente en el correspondiente grupo

taxonómico (especie, género, familia) y un número amplio de oligonucleótidos cebadores en condiciones en que su grado de especificidad de hibridación sea máxima. En estas condiciones las bandas que aparecen en común a un conjunto de cepas representan secuencias comunes muy conservadas en el taxón. La secuenciación de estos fragmentos de DNA amplificados permite diseñar sondas específicas que pueden usarse en la identificación de los correspondientes microorganismos.

En primer lugar es esencialmente obtener una variedad adecuada de organismo representantes de la diversidad genómica del grupo taxonómico que se quiera identificar. Por ejemplo, si se trata de una especie de bacterias hay que asegurarse de tener un número suficiente de cepas pertenecientes a esta especie. Aunque es difícil generalizar 5 ó 10 cepas podría considerarse un mínimo aceptable. Las cepas deberán elegirse concienzudamente para representar la máxima diversidad posible presente en el taxón. Por ejemplo, si se conocen cepas que son fenotípicamente muy diferentes de la cepa tipo sería muy conveniente incluirlas en el estudio para asegurarse de la universalidad de la secuencia identificada como común. En cualquier caso, parte de este trabajo puede realizarse a posteriori, es decir, una vez identificada la secuencia confirmar su presencia en un número grande de cepas representativas del taxón. Esto se hace casi imprescindible cuando se desarrollan sondas específicas de taxones de orden superior como géneros o familias en los que existen muchas especies. Es mejor trabajar con un número limitado de éstas (5 ó 10 lo más diversas posibles) para desarrollar la sonda específica y luego comprobar su universalidad utilizando todos los representantes accesibles del grupo.

Respecto a los cebadores a utilizar estos deben ser cortos 9 ó 10 bases y utilizar temperaturas de hibridación relativamente elevadas posibles para realizar el AP-PCR en las condiciones más restrictivas posibles, de manera que bandas que aparezcan con iguales pesos moleculares correspondan a secuencias idénticas o muy parecidas en los organismos considerados. El número de cebadores necesario para encontrar una banda específica de grupo es muy variable. El solicitante ha obtenido buenos resultados con número inferiores a 10 cebadores independientes aunque es previsible que estos números varíen dependiendo del grupo de organismo a estudio. Sin embargo, pueden ser los mismos para todos los barrios (screenings), lo que simplifica y abarata notoriamente el trabajo.

Idealmente, la banda específica ha de ser de 500-1500 pares de bases pues son tamaños fácilmente discriminables en geles de agarosa y en los cuales la amplificación por PCR funciona en condiciones excelentes. Una vez identificada la banda común al conjunto de organismos utilizados como referencia se procede a clonarla y secuenciarla por el procedimiento estándar. Finalmente se diseñarán nuevos cebadores más largos y específicos de esta secuencia, de los cuales se ha de determinar experimentalmente la temperatura máxima de hibridación para conseguir un sondeo con PCR de la máxima estringencia posible.

La última etapa de la investigación de una de estas sondas específicas consiste en su aplicación a un conjunto lo más amplio posible de representantes del grupo taxonómico considerado para comprobar la reproducibilidad y fiabilidad de la sonda específica.

A continuación se hace un análisis detallado de cada una de las fases operativas del método general empleado en la presente invención para la obtención de sondas específicas:

Cepas bacterianas y cultivos.

En primer lugar se debe realizar una selección de las cepas de la especie o taxón bacteriano que se desea someter a estudio. Es conveniente elegir un buen número de cepas (junto con la cepa tipo o de referencia obtenida de una colección reconocida) representantes del taxón. Además de bioquímicamente, conviene que hayan sido caracterizadas por algún método genotípico (ej.: hibridación DNA-DNA, secuenciación de rRNA 16S, caracterización de elementos genómicos por campo pulsado, etc.). De forma que no existan dudas sobre su encuadramiento taxonómico. Además se deben incluir cepas de otras especies distintas pero con una relación fenotípica/filogenética tan estrecha como sea posible ya que son los mejores candidatos para dar falsos positivos una vez desarrollado el método específico. Es igualmente deseable incluir en el estudio la comparación con alguna bacteria muy distinta aunque aislada de un nicho similar, ya que podrían aparecer en los mismos medios que la cepa o especie objeto del estudio y por tanto también es muy importante que un método específico pueda discriminarlas. Los microorganismo han de cultivarse en un medio que favorezca su crecimiento y en forma pura. Es muy importante manipular los cultivos con precaución extrema para reducir el riesgo de contaminación al mínimo, ya que una pequeñísima cantidad de DNA (fentomoles o la cantidad equivalente a una sola célula) podría dar lugar a un falso positivo en la PCR. De una placa de cultivo de cada cepa se separa una colonia de células de la cual se extraerá el DNA.

Extracción y purificación de DNA.

Existen muchos métodos para extraer y purificar DNA a partir de material celular y cualquiera de ellos puede ser usado para llevar a cabo los experimentos de PCR. Son perfectamente aplicables los métodos rápidos que permiten extraer DNA suficientemente puro en sólo una o dos etapas tales como el basado en la Matriz de Purificación InstaGene™ comercializado por Biorad.

La concentración de DNA total puede estimarse mediante la ecuación de Lambert midiendo la absorbancia a 260 nm, y el grado de presencia de proteínas mediante la razón $D.O._{260}/D.O._{280}$ (D.O., densidad óptica). Se considera una calidad de muestra aceptable cuando esta razón oscila entre 1.5 y 2.0.

Cebadores o "primers" de secuencia arbitraria.

Como cebadores de la polimerasa de DNA se utilizan oligonucleótidos que hibriden, al menos parcialmente, con una de las hebras del DNA y que posean un extremo 3'-hidroxilo libre. Estos cebadores pueden ser de cualquier longitud pero los que tienen 10 pb resultaron los mejores para este tipo de trabajos. También se ha experimentado con algunos de 7, 8, 9 y 12 pb. (ejemplos en la Tabla 1) pero los resultados no fueron tan satisfactorios. Cuanto más largo es el oligonucleótido menor es la probabilidad de que, por azar, una secuencia suficientemente complementaria se encuentre en el genoma. Por tanto, para que un cebador de 12 pb. ó más genere bandas de RAPD, las condiciones de la PCR han de ser extremadamente relajadas, al menos en los primeros ciclos. Sin embargo, una mayoría de las bandas así obtenidas serán más bien producto de hibridaciones altamente inespecíficas. En condiciones más restrictivas que exigen una mayor complementariedad y cuando los cebadores son de una longitud de 8 pb. (o inferior) la PCR no da lugar a amplificación de fragmentos tal vez por que esas condiciones impiden una hibridación energéticamente estable. Parece ser que aquellos oligonucleótidos de 9 ó 10 pb. cumplen a la vez estos dos requisitos: son lo suficientemente largos para que su hibridación se establezca en condiciones relativamente restrictivas y lo suficientemente cortos para que ésta sea lo más específica posible, es decir, con el mínimo número de desapareamientos. Las secuencias de los cebadores se eligen arbitrariamente procurando que el contenido en bases guanina y citosina sea de un 50% o superior. Los oligonucleótidos pueden sintetizarse en cualquier sintetizador automático siguiendo el método que el fabricante recomienda o adquirirse comercialmente.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cualquier protocolo experimental de PCR puede ser empleado para este tipo de estudios con la única condición de que las condiciones de hibridación permitan la amplificación de fragmentos de DNA con secuencias en sus extremos que sean total o parcialmente complementarias al cebador utilizado. La temperatura de hibridación ("annealing") al menos en los 2 ó 3 primeros ciclos ha de ser la adecuada considerando el punto de fusión de los oligonucleótidos utilizados, normalmente entre 30 y 40°C para oligonucleótidos de 10 bases. Los cebadores pueden usarse de uno en uno o en combinaciones de varios en la misma reacción. La reacción de PCR se realiza de la forma habitual en un termociclador y con un número de ciclos adecuado para obtener una amplificación suficiente, normalmente entre 30 y 40 ciclos es suficiente. Es importante, como en cualquier estudio por PCR, contar con controles negativos adecuados para detectar posibles artefactos.

Análisis de los fragmentos de AP-PCR.

Después de la amplificación se analizan los resultados por cualquier método que permita identificar los fragmentos de DNA que han sido amplificados, normalmente aprovechando sus distintos tamaños. El procedimiento más usual es la utilización de geles de agarosa para electroforesis de DNA por el procedimiento standard. Los resultados obtenidos en estos geles pueden interpretarse directamente o digitalizarlos con una cámara de vídeo y un programa de análisis de imagen en un ordenador personal. Otros métodos alternativos son la electroforesis en geles de poliacrilamida o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Selección de fragmentos para el desarrollo de sondas específicas.

Una vez obtenidos los patrones de AP-PCR se han de examinar con el fin de seleccionar aquel producto del que pudiera interesar obtener su secuencia. El caso más inmediato sería el que presente la aparición de una banda de PCR cuando se añade DNA de un organismo perteneciente al grupo taxonómico escogido, pero que no aparece en PCR con otros DNA. El tamaño de esta banda puede ser cualquiera, pero sería

preferible que oscilara entre 500 y 2000 pb. ya que tal rango de longitud suele ser generado por la PCR en condiciones normales y los fragmentos pueden ser resueltos aceptablemente en geles de agarosa. Si la mezcla de producto de PCR contiene otra banda con fragmentos de distinto peso molecular de aquel que interesa, se debe de proceder a su aislamiento y purificación. Por ello se recomienda escoger aquel
5 producto de PCR que contiene como única banda la elegida para secuenciar.

Uso de fragmentos de AP-PCR como sondas específicas.

El fragmento seleccionado puede ser usado como sonda para la identificación del taxón específico.
10 Este fragmento puede aislarse y purificarse y posteriormente introducir un elemento que permita su detección (por ejemplo un radioisótopo, un fluoróforo o un enzima que catalice una o varias reacciones que den lugar a la visualización directa). El fragmento marcado se somete a hibridación con DNA total del microorganismo a identificar fijado en una membrana en condiciones tales que sólo se permita la hibridación con una secuencia altamente homóloga. Este sondeo también puede realizarse sobre filtros
15 que contengan un lisado celular del cultivo a determinar o sobre placas de agar con una o varias colonias del microorganismo. La membrana, filtro o placa puede exponerse a una placa fotográfica o observarse directamente dependiendo del sistema de marcaje que se emplee.

Secuenciación de fragmentos de AP-PCR.

La obtención de secuencias de nucleótidos de un fragmento de PCR está ampliamente documentada en la literatura [(8) Maniatis, T., E. F. Fritsch y J. Sambrook 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y; (9) Marchuk, D., M. Drumm, A. Saulino y F. S. Collins. 1990. Construction of T-Vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. Nucl. Acids Res. 19: 1154; (10) Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, y K. Struhl. 1992. Short protocols in molecular biology. Harvard Medical School. Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons]. El fragmento específico elegido se puede clonar siguiendo cualquier procedimiento de los ampliamente descritos en la bibliografía. Cuando se consigue insertar el fragmento en un vector, la secuencia de sus extremos puede ser fácilmente
30 determinada utilizando "primers" de secuenciación complementarios a la secuencia del vector utilizado. El método de secuenciación más universalmente usado es el de dideoxi-terminación de cadena o método de Sanger [(11) Sanger, F., S. Nicklen, y A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467], pero actualmente se encuentran cientos de modificaciones del original en la literatura que pueden mejorar la resolución de la técnica. Los productos
35 de secuenciación son normalmente separados en geles de desnaturalizantes de poliacrilamida pero también pueden ser analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Actualmente se dispone de secuenciadores automáticos que facilitan notablemente el procedimiento y que además envían la secuencia obtenida ya leída al ordenador personal. Si se utilizan secuenciadores manuales, la secuencia debe de ser interpretada visualmente y tipografiada a mano.

Diseño de sondas específicas.

Una vez se ha conocido la secuencia de los extremos del fragmento específico de AP-PCR (150 pb. aproximadamente en cada extremo) se procede al diseño de oligonucleótidos específicos complementarios
45 a estas secuencias. En este caso los oligonucleótidos pueden ser todo los largos que se desee ya que interesa que éstos hibriden lo más específicamente posibles con su blanco. Pero tampoco deben ser excesivamente largos ya que si su temperatura de fusión teórica es muy alta se podría dar lugar a hibridaciones parciales (inespecíficas) suficientemente estables, produciendo "artefactos" en el ensayo. Generalmente se considera que cebadores de unos 20 pb. con un contenido en Guanina+Citosina (G+C) entre 50-70%
50 con temperaturas de fusión (T_f) inferiores a la temperatura de polimerización de la Taq polimerasa, son altamente específicos. En este método se recomiendan sondas de 20 pb. con un contenido en G+C de 55-70%. Las sondas pueden sintetizarse en cualquier sintetizador automático u obtenerse comercialmente.

PCR determinativo.

Actualmente se dispone de muchos métodos de biología molecular para detectar la presencia de un fragmento específico en el genoma de un microorganismo toda vez que se conoce, al menos parcialmente, su secuencia de nucleótidos [(8) Maniatis y col., 1982; y (10) Ausubel et al., 1992] anteriormente mencionadas. Aunque todos ellos pueden ser potencialmente válidos, en este apartado se describe éste que
60 utiliza la misma reacción de PCR como proceso de identificación. El ensayo de PCR con los "primers" específicos (sondas) se puede utilizar para la determinación de DNA extraído de cepas pertenecientes a la especie que generó el fragmento de AP-PCR. Esta PCR se prepara siguiendo un protocolo estándar (o

como se ha descrito para la AP-PCR) con la salvedad de que la temperatura de hibridación en cada ciclo termal debe ser más elevada (típicamente entre 60 y 66°C) como corresponde a condiciones restrictivas para cebadores de esta longitud. La presencia del fragmento específico pueden visualizarse de cualquiera de las formas citadas en el análisis de AP-PCR. Comúnmente, por su sencillez, se usan geles de agarosa
 5 teñidos con bromuro de etidio y transiluminados con una lámpara de UV. Para comprobar su especificidad, esta sonda-PCR debe de ensayarse utilizando el mayor número de microorganismos representantes del grupo taxonómico considerado y otros que de cualquier manera estén relacionadas con éste.

En los párrafos siguientes se ponen de manifiesto las *ventajas* de la presente invención con relación al
 10 estado de la técnica actual.

La vía tradicional para desarrollar sondas o cebadores de DNA específicos de taxón para su utilización en diagnóstico de virus, bacterias u otros grupos de microorganismos consiste en identificar secuencias que se correlacionen con un determinado grupo taxonómico en base a un conocimiento profundo de dichos
 15 organismos. Por ejemplo, identificando una toxina producida sólo por un grupo de bacterias patógenas se puede clonar y secuenciar el gen que la codifica y, en base a dicha secuencia, diseñar sondas o cebadores de PCR específicos para estos microorganismos. Naturalmente la fase más difícil en cualquiera de estas investigaciones suele ser precisamente la identificación de éstas secuencias presumiblemente específicas y exclusivas de un cierto grupo taxonómico. Esto es tanto más cierto cuanto menos conocido sea el
 20 microorganismo en cuestión.

Por otra parte, por AP-PCR ó RAPD pueden identificarse cepas una vez conocida su localización taxonómica y cuando exista un importante número de cepas distintas tipadas por este procedimiento. Pero no permite identificar una muestra como perteneciente a una especie ni, por ejemplo, detectar su
 25 presencia en una muestra compleja de DNA como son las muestras clínicas que contienen tejidos humanos. Además, el uso de una sonda específica obtenida de la secuencia del fragmento de RAPD permite confirmar inequívocamente la identidad del propio fragmento, algo que no se consigue con RAPD.

De acuerdo con lo anterior, la ventaja más destacada del método que se describe en esta memoria estriba en que no hace falta poseer ningún conocimiento previo sobre el grupo de microorganismos para
 30 los cuales se quiere desarrollar la sonda. Basta con tener muestras de DNA genómico procedente de un número suficiente de representantes del grupo taxonómico para desarrollar el método de diagnóstico específico. Esto supone un notable ahorro de tiempo y trabajo además de suministrar una vía casi infalible de identificar secuencias útiles para el diagnóstico de grupos de microorganismos independientemente del
 35 nivel de conocimientos que se posea sobre su patogenia, fisiología o biología molecular.

Se pueden desarrollar sondas de DNA para grupos, cuya identificación sea de interés clínico, aplicado a ecológico, y para los que no existen este tipo de sistemas de identificación. También se pueden encontrar sondas adicionales para aquellos para los cuales ya se haya desarrollado alguna previamente. De manera
 40 que, en poco tiempo, se puede ampliar enormemente la gama de sondas de DNA asequibles en el mercado para investigación básica, aplicada o clínica o para identificación rutinaria de bacterias, virus, hongos, levaduras o en general cualquier grupo para el que técnicas de diagnóstico basadas en el DNA pueden ser ventajosas.

45 Breve descripción de las figuras

Figura 1.- Representa un gel de agarosa mostrando los productos de AP-PCR obtenidos con el oligonucleótido A7 SEC ID N° 1. La línea 1 contiene un marcador de peso molecular. A cada reacción de PCR se añadió DNA de: 2. Haloferax mediterranei mutante R4++; 3, Hf.mediterranei mutante R4-;
 50 4,Hf.mediterranei R4, 5, Hf. mediterranei M2a; 6, M2b; 7, M4; 8, M6; 9,M10; 10, Haloferaxsp. M14; 11, Hf. volcanii; 12, Halobacterium salinarium; 13, Haloarcula marismortui; 14 halófilo no identificado cepa 107; 15, cepa 109; 16, control negativo.

Figura 2.- Representa geles de agarosa conteniendo productos de PCR con temperaturas de hibridación de 62°C (A) y de 64°C (B). La línea 1 contiene marcador 1Kb ladder. A cada PCR se añadió: 2, DNA de Hf.mediterranei R4 y sondas X-Y;3, DNA de R4 y sondas X-N; 4,DNA de Hf. mediterranei M4 y sondas X-Y; 5 DNA de M4 y sondas de X-N; 6, DNA de Hf mediterranei M6 y sondas X-Y; 7, DNA de Hf. mediterranei M10 y sondas X-Y; 8, DNA de Hf, volcanii y sondas X-Y.

Figura 3.- Representa geles de agarosa conteniendo productos de PCR con temperaturas de hibridación de 65°C (A) y de 66°C (B). La línea 1 contiene marcador 1Kb ladder. A cada PCR se añadió: 2, DNA de Hf. mediterranei R4 y sondas X-Y; 3, DNA de R4 y sondas X-N; 4, DNA de Hf. mediterranei

M2b y sondas X-N; 5 DNA de *Hf. mediterranei* M6 y sondas X-N; 6, DNA de *Hf. mediterranei* M10 y sondas X-N; 7, DNA de *Haloferax* sp. M14 y sondas X-N; 8, DNA de *Hf. volcanii* y sondas X-N.

Figura 4.- Representa un gel de agarosa conteniendo productos de PCR con temperatura de hibridación de 64°C. La línea 1 contiene marcador 1Kb ladder. A cada PCR se añadió: 2, DNA de *Hf. mediterranei* R4 y sondas X-Y; 3, DNA de R4 y sondas P-N; 4, DNA de R4 y sondas R-N; 5, DNA de *Hf. mediterranei* M6 y sondas P-N; 6, DNA de M6 y sondas R-N; 7, DNA de *Hf. volcanii* y sondas P-N; 8, DNA de *Hf. volcanii* y sondas R-N.

Figura 5.- Representa un gel de agarosa conteniendo productos de PCR y sondas R-N con temperatura de hibridación de 64°C. La línea 1 contiene marcador 1Kb ladder. A cada PCR se añadió: (A) 2, DNA de *Hf. mediterranei* R4; 3, DNA de R4++; 4, DNA de R4-; 5, DNA de *Hf. mediterranei* M4; 6, DNA de *Hf. mediterranei* M10; 7, DNA de *Haloferax* sp. M14; 8 a 15 contienen DNA de aislados identificados fenotípicamente como *Hf. mediterranei*; 16, control negativo. (B) 2, DNA de *Hf. mediterranei* R4; 3, *Hf. volcanii*; 4, *Hf. gibbonsii* LAB1; 5, *Hf. gibbonsii* ATCC 33959; 6 *Hf. denitrificans* ATCC 35960; 7, *Hf. larsenii* ATCC 49116; 8, *Haloarcula hispanica* LAB2; 9, *Ha. hispanica* ATCC 33960; 10, *Ha. californiae* ATCC 33799; 11, *Hc. morrhuae*, ATCC 17082; 12, *Hc. morrhuae* CCM 537; 13, *Hc. saccharolyticus* ATCC 49257; 14, *Natrobacterium gregoryi* ATCC 43098; 15, *Natronococcus occultus* ATCC 43101; 16, control negativo.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo el cual no pretende ser limitativo de su alcance.

Ejemplo:

Búsqueda y preparación de sondas específicas para la identificación de la especie Haloferax mediterranei.

El género *Haloferax* comprende una colección de archaeobacterias pleomórficas que requieren la presencia de Mg²⁺ en una concentración de 0.01-0.04 M pero no necesitan aminoácidos, y que pueden crecer a 38°C en agua de sales al 10%. En este género actualmente existen cuatro especies descritas: *Haloferax denitrificans*, *Hf. gibbonsii*, *Hf. mediterranei* y *Hf. volcanii*. Este estudio se ha encaminado hacia la búsqueda de un fragmento de AP-PCR específico de *Haloferax mediterranei*. Para ello se han utilizado un grupo de cepas archaeobacteriales extremadamente halófilas (cepas M2a, M2b, M4, M6 y M10) aisladas del mismo medio (una salina solar situada en Santa Pola, Alicante) que fueron clasificadas como miembros de la especie *Haloferax mediterranei* en base a caracteres morfológicos y fisiológicos [(12) Torreblanca, M., F. Rodríguez-Valera, G. Juez, A. Ventosa, M. Kamekura y M. Kates. 1986. Classification of nonalkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. Syst. Appl. Microbiol. 8: 89-99]. Recientemente el mismo grupo de aislado ha sido caracterizado mediante PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) revelando que esas cepas son genotípicamente de una misma especie y que existe una cepa adicional (cepa M14) que no pertenece a la especie *Hf. mediterranei* [(13) López-García, P., J.P. Abad, y R. Amils, 1993. Genome analysis of different *Haloferax mediterranei* strains using pulsedfield gel electrophoresis. Syst. Appl. Microbiol. 16: 310-321].

Dichos aislados, junto con la cepa de referencia de *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 (cepa R4) y otras cepas de otras especies de mismo y de distintos géneros fueron cultivadas en placas de agar con agua de sales al 25% complementada con un 5% de extracto de levadura. Las placas se incubaron durante una semana a 37°C. Se preparó DNA total de cada una de las cepas a partir de una colonia. Aquí se describe un método que ha sido elegido por considerarlo rápido, sencillo, económico y que rinde una cantidad y calidad de DNA suficientes para la PCR. Las colonias bacterianas se cosecharon en tubos de plástico de microcentrífuga y se les añadió 200 µl de Matriz de Purificación InstaGene™ (Biorad). Esta mezcla se incubó en un baño de 55°C, 15 min. Los tubos se agitaron en un vortex durante 10 seg. a máxima velocidad, se colocaron en un baño con agua a ebullición por 8 min. y de nuevo se les dió agitación en vortex por 10 seg. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 min., se recogió el sobrenadante y se almacenó a -20°C. La concentración de DNA y contaminación de proteínas fue estimada con el calculador GeneQuant RNA/DNA (Farmacia LKB) usando capilares de cuarzo de 0.5 mm de diámetro y se prepararon diluciones de 20/ µl.

Por otra parte, se diseñaron y sintetizaron una variedad de oligonucleótidos de secuencia arbitraria. Sus características se ilustran en la Tabla 1.

5 TABLA 1.
Secuencias y características de los primeros arbitrarios usados en los RAPD de cepas de Haloferax mediterranei y organismos relacionados.

5	Código	Secuencia (5'-3')	pb.	%GC	Evaluación
	A1	TGCGGCTTAC	10	60	No amplificación o no repetitiva
	A2	TGCGGCTTAG	10	60	Patrones no repetitivos
10	A3	TGCGGCTT	8	62.5	No amplificación
	A4	TGCGGCT	7	71.4	No amplificación
	A5	ATGCTGA	7	43	No amplificación
	A6	AGGGTTCTTG	10	50	Patrón de difícil análisis
	A7	TCACGGTGCA	10	60	Patrones informativos
15	A8	GTCGCCGAC	9	77.7	Patrones informativos
	A9	ACTGCAGGGCCC	12	75	No amplificación
	A10	GTAGACGAGC	10	60	Patrones informativos
	A11	CAAACGGCAC	10	60	No amplificación
20	A12	AAACGTCGGG	10	60	Patrones informativos
	A13	ACTGACTGCG	10	60	Patrones informativos
	A14	ATCGCCTGAT	10	50	No amplificación
	A15	GACTTTCGCA	10	50	Patrones informativos
25	A16	CGCGAAGGAT	10	60	Patrones informativos
	A17	AATTCCCGGG	10	60	No amplificación
	A18	CCGAAAACGC	10	60	Patrones informativos
	A19	CTTGACGCT	10	60	No amplificación o no repetitiva
	A20	TTCGGGCCGT	10	70	No amplificación o no repetitiva
30	A21	CGACCAGAGC	10	70	Patrones informativos
	A22	ATGGACACCA	10	50	Patrones informativos
	A23	CCTGGCGAAA	10	60	No amplificación
	A24	TCGCCGTTTT	10	50	No amplificación
35	A25	ATCTGTTGTC	10	40	No amplificación
	A26	AGCAGCAGCT	10	60	No amplificación
	A27	TAGCCGTAGG	10	60	No amplificación
	A28	CTTTCGTGCT	10	50	No amplificación
	A29	ATCTGGCAGC	10	60	Patrones informativos
40	A30	GCATATCCG	10	50	No amplificación
	A31	GCGGTATAGT	10	50	No amplificación

Los cebadores se sintetizaron según el método de las fosforamiditas en una Applied Biosystems modelo 392 siguiendo las instrucciones del fabricante. El oligonucleótido sintetizado queda diluido en 1 ml de una solución con amoníaco 30%. Estos se desecaron en una centrifuga de vacío durante 2 horas. Posteriormente se añadieron 400 μ l de agua destilada estéril y se calculó la concentración en el GeneQuant. Finalmente se prepararon diluciones de 100 pmol/ μ l aproximadamente y se dispensaron alícuotas de 20 μ l para su uso.

50 Se prepararon reacciones de PCR usando 5 μ l de cada muestra de DNA diluido y cada uno de los "primers" de la Tabla 1. Cualquier protocolo experimental de PCR puede ser un principio empleado para generar fragmentos de DNA al azar. Aquí se describen las características del que habitualmente se utiliza en los laboratorios del solicitante. Se sometieron 100 ng de DNA cromosomal a reacciones de amplificación por PCR con cada uno de los cebadores de secuencia arbitraria. El volumen total de reacción es de 50 μ l y contiene 1 Unidad de DNA Polimerasa Taq I (Promega), KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 9.0), MgCl₂ 1.5 mM, Triton X-100 0.1%, 200 μ M de cada deoxiribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Pharmacia) y 2 μ M de cebador. En cada tubo de reacción se vierte una gota de aceite mineral estéril (Sigma) y los tubos se sometieron a un régimen de 36 ciclos termales en un termociclador OmniGene (Hybaid). Cada ciclo constó de: etapa de desnaturalización 1 min a 94°C, hibridación del primer a 36°C durante 1 min, y 2 min de polimerización a 72°C. En todos los experimentos se incluyeron sistemáticamente reacciones de control negativo en las que no se añadió DNA con el fin de detectar la posible presencia de un DNA contaminante en los reactivos de PCR. Una vez finalizada la reacción, los

productos se analizaron y almacenaron a -20°C.

Los productos fueron analizados en geles de agarosa 1.2% con tampón TBE [(8) Maniatis y col., 1982]. Como marcador de peso molecular se usaron 2 µl de 1Kb DNA Ladder (Gibco BRL). Estos se tiñeron en un baño con bromuro de etidio (0.5 µg/ml y el DNA se visualizó con una lámpara de ultravioleta (lambda=312 nm). Las imágenes se grabaron con un equipo UVP System 500 (Ultra Violet Product) y el tamaño de los fragmentos de AP-PCR se estimó utilizando el programa GelBaseTN para Windows en un ordenador personal IBM.

Los resultados indican que el DNA de cada microorganismo presentan un patrón único de bandas de AP-PCR que puede ser utilizado para una análisis taxonómico/ genotípico. Estos patrones pudieran servir para identificar una cepa, e incluso un clon. Sin embargo cepas reconocidas como miembros de la misma especie pueden llegar a presentar patrones de AP-PCR muy heterogéneos, siendo a ese nivel (el de especie) donde el método de AP-PCR empieza a fallar como instrumento para la identificación de microorganismos desconocidos. El objetivo en esta fase es el de "cazar" una banda de AP-PCR que, usando el mismo cebador, haya sido generada con DNA de cualquiera de las cepas de *Haloflex mediterranei* pero que no esté presente cuando el DNA procede de cualquier otra bacteria.

El oligonucleótido A7 da lugar a una banda de AP-PCR de unos 1700 pb. cuando el DNA molde proviene de una cepa de *Hf.mediterranei* y esto no ocurre con DNA de cualquier otro organismo incluido en el presente estudio (Figura 1). El fragmento de 1700 pb. fue clonado y sus extremos secuenciados siguiendo un método que utiliza un vector con colas T (Marchuck y col., 1990) preparado de la siguiente forma: el plásmido Bluescript (Stratagene) se dirigió con el enzima Eco RV y se incubó durante 2 horas a 70°C (y tampones estándar) en presencia de dTTP 2 mM y de 1 unidad de DNA polimerasa Taq I. Posteriormente el vector se sometió a ligación con el fragmento a insertar durante toda la noche a 16°C. Este producto se utilizó para transformar en *Escherichia coli* XL Blue (Maniatis y Col., 1982). Se aisló una colonia transformada y se incubó en 5 ml de LB con ampicilina a 37°C durante toda la noche. El plásmido con el inserto puede aislarse mediante una MiniPrep (Promega) y los extremos del fragmento de AP-PCR se secuencian por el método de dideoxiterminación de cadena [(11) Sanger y co., 1977] siguiendo el protocolo del Kit Sequenasa Version 2 (USB) y usando los "primers" T3 y T7 de secuenciación de polilinker del vector. Los productos de reacción de la secuenciación se separaron en geles desnaturalizantes (urea 7M) de poliacrilamida al 6% a 55°C en una unidad de secuenciación Macrophor 2010 de Pharmacia LKB operando a 50 W por gel. Las secuencias de dichos extremos (hebras complementarias en dirección 3'-5') se muestran en el siguiente esquema:

EXTREMO I

A7
TCACGGTGCA^{3'}

3'-GGGGGCCCCGACGTCCTTAAGCTAA.AGTGCCACGTCAGACACCGCTGTCAGAGCACCGC

X = TCACGGTGCACTCTGTGGCG^{3'}

P = TCTGTGGCGACAGTCTCGTG^{3'}

CGCCAGCTTGCAAGGTTAGCTTGCCTATCAGTGCAGCTATGAGCCGCCGTT-5'
GCGGTGCAACGTTCCAATCG^{3'} = R

EXTREMO II

A7
TCACGGTGCA^{3'}

3'-GGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTATTTCGAAGCTAA.AGTGCCACGTAGTCTGTGGA

Y = TCACGGTGCAATCAGACACT^{3'}

CATGCAACTGTGAGTGGCACCGCTAGTTTC/ag/aGCCTTAGCTACAATTTGGAGAGACITggCTCA-5'
GTACGTTGACACTCACCGTG^{3'} = N

A partir de estas secuencias se diseñaron y sintetizaron las sondas X, R y P complementarias al

extremo denominado I y las sondas Y y N complementarias al extremo denominado II (Figura 2). Se prepararon reacciones de PCR a una temperatura de hibridación de 62°C con los pares de sondas X-Y y X-N y DNA de diversa procedencia. Todos los experimentos incluyeron un control negativo en el que no se añadió DNA alguno. Cuando se sondeó el DNA de cualquiera de las cepas de *Hf. mediterranei* se observó la presencia de una banda de intensidad muy notable correspondiente al fragmento de aproximadamente 1700 pb. y alguna banda de menor tamaño y muy baja intensidad (figura 3A). Estas bandas menores y débiles se atribuyeron a posibles hibridaciones inespecíficas de alguna de las sondas. Es por tanto recomendable aumentar la temperatura de hibridación de la PCR hasta el límite máximo experimental (aquella temperatura a la cual la sonda deja de hibridar con su blanco específico). Experimentos similares se repitieron con temperaturas de hibridación de 64, 65 y 66°C (Figuras 3B y 4B). La intensidad de las bandas menores y débiles fué disminuyendo conforme se aumentó este parámetro hasta hacerse prácticamente invisible. Sin embargo la banda correspondiente al fragmento de 1700 pb. persistió en estos experimentos excepto en la PCR con una hibridación a 66°C en la que dicha banda no aparecía o era débil (punto de temperatura en el que empieza a vencer la energía de enlace de la hibridación específica). Por tanto se consideró que la sonda-PCR con los oligonucleótidos que aquí se han usado debe de realizarse a una temperatura de hibridación de 64°C ó, a lo sumo, 65°C. Posteriormente se utilizaron los pares de sondas P-N y R-N en PCR con temperatura de hibridación de 64°C. La banda de fragmentos de 1700 pb. fue generada cuando del DNA procedía de *Hf. mediterranei* pero no apareció con DNA de *Hf. volcanii* (Figura 5). A la vista de los resultados se decidió que el ensayo más específico de sonda-PCR para la determinación de *Hf. mediterranei* usará los pares de sondas P-N o R-P a una temperatura de 64°C de hibridación.

La última fase de evaluación de estas sondas consiste en el ensayo de este método específico para *Hf. mediterranei* incluyendo DNA de un número considerable de cepas supuestamente pertenecientes a dicha especie, y muestras conteniendo material cromosómico de otras especies y géneros de bacterias halófilas. El resultado y detalles de esta evaluación se presenta en la Figura 6.

Relación de secuencias originales

Información para la SEC ID N°: 1

(i) Características de la Secuencia:

- (A) Longitud: 10 bases
- (B) Tipo: Oligonucleótido
- (C) Tipo de Hebra: Sencilla
- (D) Topología: Lineal

(ii) Descripción de la secuencia: SEC ID N° 1

TCACGGTGCA

Información para la SEC ID N° : 2

(i) Características de la Secuencia:

- (A) Longitud: 20 bases
- (B) Tipo: Oligonucleótido
- (C) Tipo de Hebra: Sencilla
- (D) Topología: Lineal

(ii) Descripción de la secuencia: SEC ID N° 2

TCACGGTGCAGTCTGTGGCG

ES 2 088 823 A1

Información para la SEC ID N° 3

(i) Características de la Secuencia:

- 5 (A) Longitud: 20 Bases
(B) Tipo: Oligonucleótido
(C) Tipo de Hebra: Sencilla
10 (D) Topología: Lineal

(ii) Descripción de la secuencia: SEC ID N° 3

15 TCTGTGGCGACAGTCTCGTG

Información para la SEC ID N° 4

(i) Características de la Secuencia:

- 20 (A) Longitud: 20 Bases
(B) Tipo: Oligonucleótido
(C) Tipo de Hebra: Sencilla
25 (D) Topología: Lineal

(ii) Descripción de la secuencia: SEC ID N° 4

30 GCGGTCGAACGTTCCAATCG

Información para la SEC ID N° 5

(i) Características de la Secuencia:

- 35 (A) Longitud: 20 Bases
(B) Tipo: Oligonucleótido
(C) Tipo de Hebra: Sencilla
40 (D) Topología: Lineal

(ii) Descripción de la secuencia: SEC ID N° 5

45 TCACGGTGATCAGACACCT

Información para la SEC ID N° 6

(i) Características de la Secuencia:

- 50 (A) Longitud: 20 Bases
(B) Tipo: Oligonucleótido
(C) Tipo de Hebra: Sencilla
55 (D) Topología: Lineal

(ii) Descripción de la secuencia: SEC ID N° 6

60 GTACGTTGACACTCACCGTG

REIVINDICACIONES

1. Método para la obtención de oligonucleótidos y sondas destinadas a la determinación e identificación de grupos taxonómicos, obteniéndose dichas sondas específicas por medio de la técnica de cebado al azar de la reacción de la polimerasa en cadena (AP-PCR) y **caracterizándose** dicho método por las siguientes etapas:

a) selección de las cepas de la especie o taxón bacteriano a estudiar eligiendo un número de cepas suficiente para su perfecto encuadramiento taxonómico, incluyéndose también cepas de otras especies distintas pero con una relación fenotípica/filogenética lo más estrecha posible y cultivas dichas cepas en un medio apropiado en el que puedan crecer de forma pura evitándose cualquier tipo de contaminación;

b) extraer el DNA;

c) seleccionar como cebadores de PCR a realizar con el DNA obtenido oligonucleótidos capaces de hibridar, al menos parcialmente, con una de las hebras del DNA y que posean un extremo 3'-hidroxilo libre, teniendo dichos cebadores una secuencia arbitraria;

d) llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en condiciones tales que al menos en los dos o tres primeros ciclos la temperatura sea relativamente baja; pudiendo utilizarse los cebadores de uno en uno o combinados y efectuándose la reacción en un termociclador;

e) analizar los fragmentos de DNA que ha sido amplificados;

f) seleccionar entre los patrones de AP-PCR las bandas comunes a todos los organismos del taxón buscado que se hayan introducido en el ensayo;

g) secuenciar los extremos de los fragmentos de AP-PCR que aparecen comunes a todos los organismos del taxón que se quiere identificar.

h) una vez conocida la secuencia de los extremos del fragmento específico de AP-PCR de la etapa anterior, proceder al diseño de oligonucleótidos específicos complementarios de estas secuencias, con una longitud suficiente para que hibriden lo más específicamente posible con su blanco (20-30 nucleótidos) con un contenido en guanina+citosina entre 50 y 70% y con temperaturas de fusión inferiores a la temperatura de polimerización de la Taq polimerasa;

i) detectar la presencia de un fragmento específico en el genoma de un individuo, determinando el DNA extraído de cepas pertenecientes a la especie que generó el fragmento de AP-PCR, empleando la PCR como proceso de identificación, empleándose una temperatura de hibridación en cada ciclo termal por encima de los 50°C para asegurar una hibridación específica, la aparición o no de un fragmento amplificado se toma como diagnóstico de la presencia del microorganismo.

2. Oligonucleótidos generados al azar obtenidos por el método de la reivindicación 1, que se **caracterizan** por ser cebadores inespecíficos en reacciones del PCR y por ser capaces de revelar la existencia de secuencias específicas y comunes para todos los miembros de un taxón de microorganismos determinado.

3. Sondas de oligonucleótidos o de DNA obtenido por el método de la reivindicación 1 que se utilizan para detectar la secuencia altamente homóloga presente en todos los individuos de un determinado taxón.

4. Un oligonucleótido, según la reiv. 2, correspondiente a la SEC ID N° 1, capaz de generar un fragmento de AP-PCR de 1.700 pb aproximadamente específico de la especie bacteriana *Haloferax mediterranei*.

5. Un fragmento de 1.700 pb. según reiv. 4, generado en la AP-PCR con el oligonucleótido de la SEC ID N° 1 y DNA de cepas de *Hf. mediterranei*.

6. Sondas, según la reiv. 3, denominadas X SEC ID N° 2, P SEC ID N° 3, y R SEC ID N° 4 de un extremo y las sondas y SEC ID N° 5 y N SEC ID N° 6 del otro extremo del fragmento de 1700 pb. específico de *Hf. mediterranei*.

7. Aplicación de los cebadores completamente homólogos a la secuencia específica del taxón, obtenidos según el método de la reiv. 1, para el diagnóstico e identificación de dicho taxón empleando técnicas de PCR.

8. Aplicación de las sondas obtenidas por el método de la reiv. 1, para el diagnóstico por métodos específicos de dicho taxón.

5 9. Aplicación del oligonucleótido de la reiv. 4, para generar un fragmento del AP-PCR de 1700 pb aproximadamente específico de la especie bacteriana *Haloferox mediterranei*.

10 10. Aplicación del fragmento de la reiv. 5, para su uso directo como sonda de identificación/detección o bien para caracterizar su secuencia y utilizarla en el diseño de sondas específicas para las cepas de *Hf.mediterranei*.

11. Aplicación de los pares de sondas X-Y, X-N, P-Y, P-N, R-Y y R-N de la reiv. 6, en una reacción de PCR para la identificación/detección de cualquier cepa de la especie bacteriana *Hf.mediterranei*.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

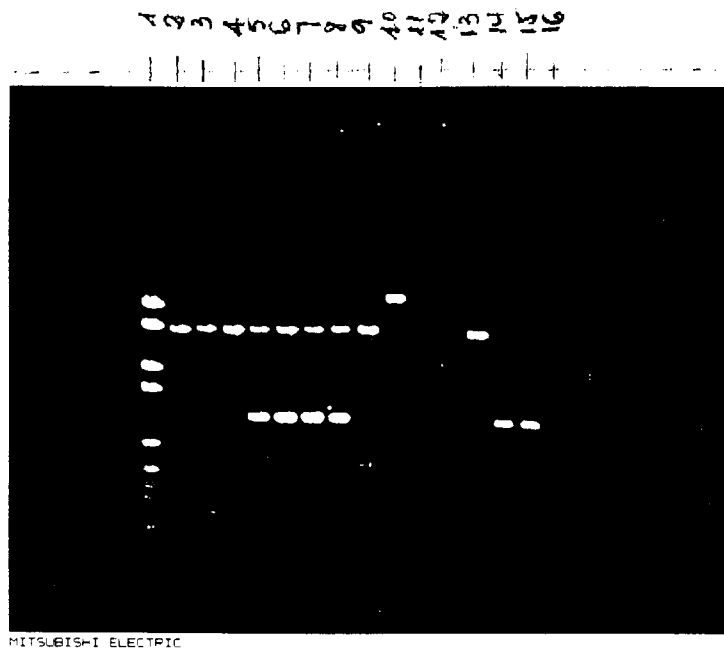


FIGURA 1

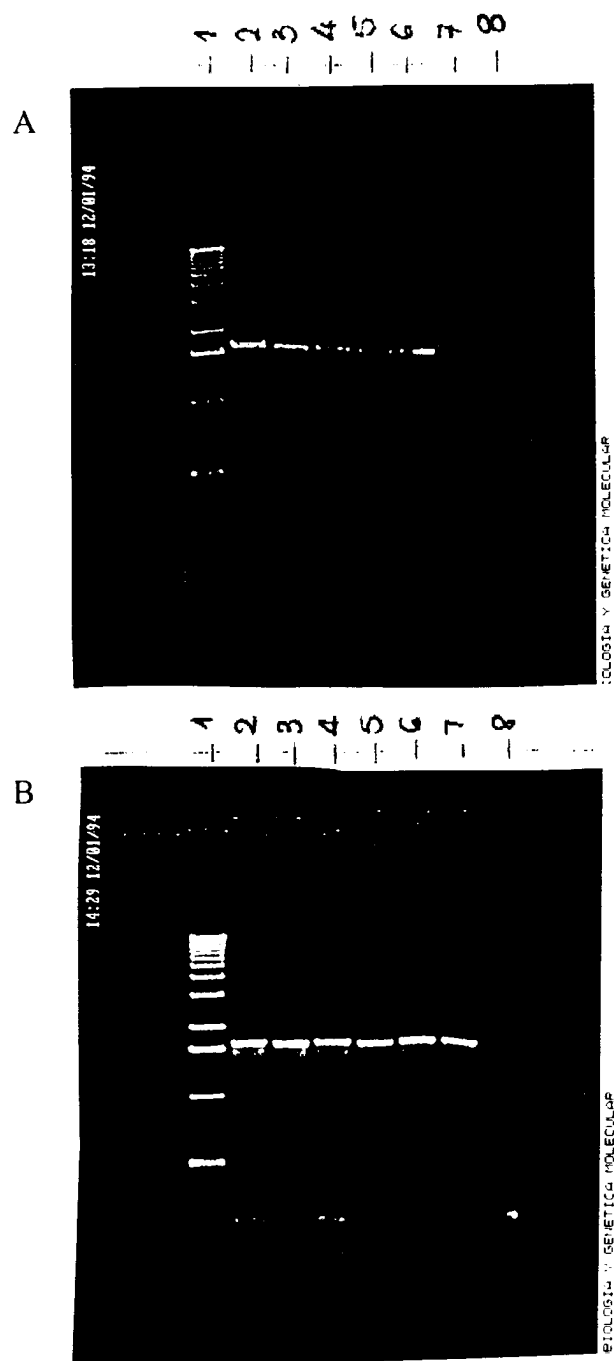


FIGURA 2

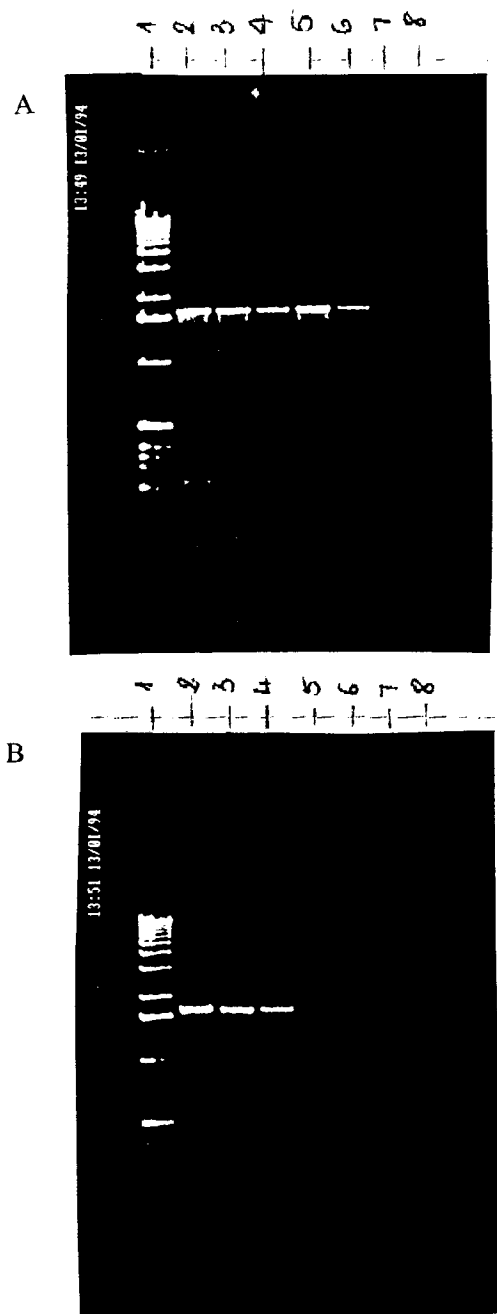


FIGURA 3

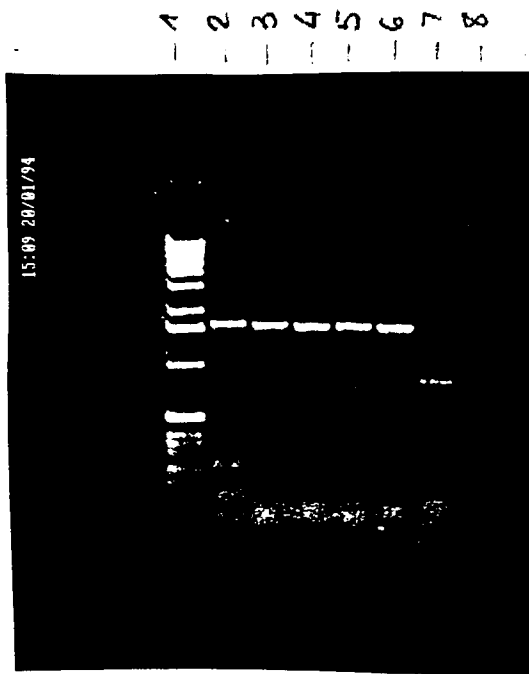


FIGURA 4

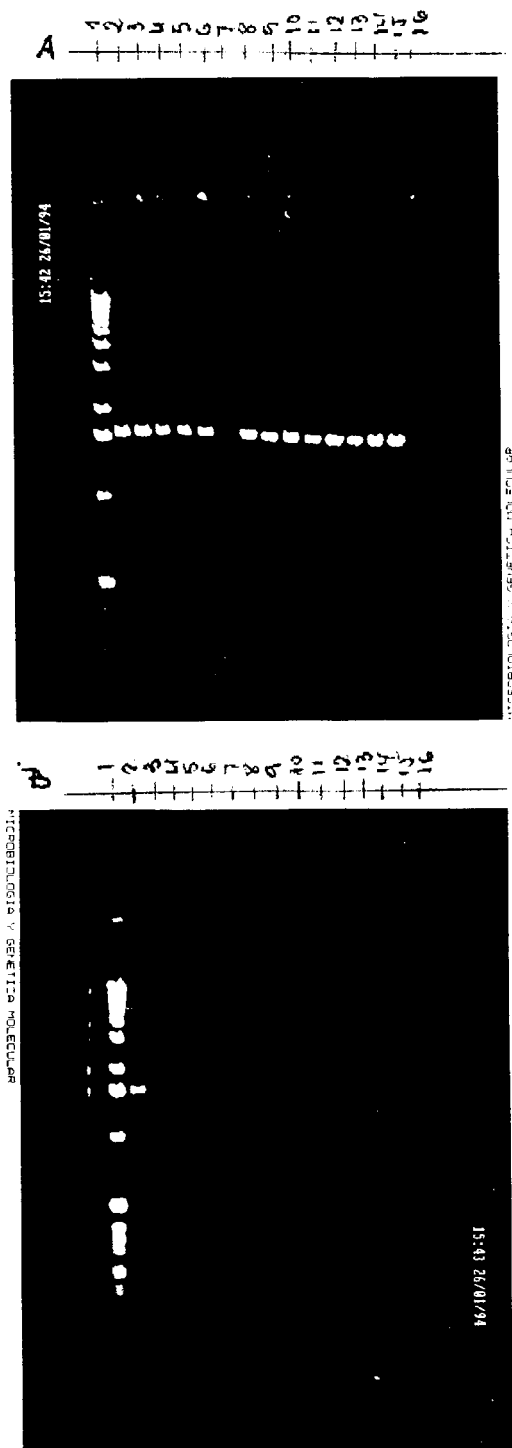


FIGURA 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 088 823
⑫ N.º solicitud: 9401094
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 18.05.94
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12Q1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FANI, R. et al., A general method for generating specific DNA probes by arbitrarily-primed PCR (AP-PCR), ECB6: Proceedings of the 6th European Congress on Biotechnology, part 1, 1993, Amsterdam: Elsevier (Alberghina, L. et al.), 1994, págs. 363-366. * Ver el documento completo *	1-3,7,8
Y	WELSH, J. et al., Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, Nucleic Acids Research, Diciembre 1990, Vol.18, No.24, págs. 7213-7218. * Ver el documento completo *	1-3,7,8
Y	WILLIAMS, J.G., et al., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucleic Acids Research, Noviembre 1990, Vol.18, No.22, págs. 6531-6535. * Ver el documento completo *	1-3,7,8
Y	EP 395292 A (BARRY, T.G. et al.) 31.10.90 * pág. 3; líneas, 4-26; reivindicación 1 *	1-3,7,8
A	HAMELIN, R.C., et al., Identification of Gremmeniella abietina races with random amplified polymorphic DNA markers, Appl. Environ. Microbiol., Junio 1993, Vol.59, No.6, págs. 1752-1755. * Ver el documento completo *	

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 n.º:

Fecha de realización del informe
06.08.96

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
1/2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 088 823
⑫ N.º solicitud: 9401094
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 18.05.94
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12Q1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CANCILLA, M.R., et al., Rapid genomic fingerprinting of Lactococcus lactis strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with p32 and fluorescent labels, Appl. Environ. Microbiol., Mayo 1992, Vol.58, No.5, págs. 1772-1775. * Ver el documento completo *	
A	CROWHURST, R.N., et al., Differentiation of Fusarium solari f. sp. cucurbitae races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA Curr. Genet., 1991, Vol.20, págs. 391-396. * Ver el documento completo *	

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 n.º:

Fecha de realización del informe
06.08.96

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
2/2