



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 216 682**

② Número de solicitud: 200201300

⑤ Int. Cl.7: **C12Q 1/68**

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **06.06.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2004**

Fecha de la concesión: **13.06.2005**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.07.2005**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.07.2005

⑰ Titular/es: **Universidad de Salamanca
Patio de Escuelas, 1
37008 Salamanca, ES**

⑱ Inventor/es: **Rivas González, Raúl;
Velázquez Pérez, María Encarnación;
Mateos González, Pedro Francisco y
Martínez Molina, Eustaquio**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Procedimiento para la identificación de organismos basado en una región universalmente amplifiable de ADN ribosómico.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para la identificación de organismos basado en una región universalmente amplifiable de ADN ribosómico.

El procedimiento para identificar organismos, tanto procariontas como eucariotas, basado en la amplificación y secuenciación de ADN ribosómico (ADNr), comprende: a) poner en contacto ADN de dicho organismo con una mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN, comprendiendo dicha mezcla un par de iniciadores que permiten amplificar una región del ADNr que contiene 495 pb en procariontas y 508 pb en eucariotas y que ha sido denominada UARR, bajo condiciones en las que un fragmento de ADN amplifiable presente en el ADN de dicho organismo es amplificado para formar un producto de amplificación; b) secuenciar el producto de amplificación obtenido; y c) comparar la secuencia obtenida con secuencias de nucleótidos identificativas de organismos. De aplicación en la identificación rápida, precisa y fiable, de organismos procariontas y eucariotas.

ES 2 216 682 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la identificación de organismos basado en una región universalmente amplificable de ADN ribosómico.

Campo de la invención

La invención se relaciona con la identificación de organismos, tanto procariotas como eucariotas, basada en la amplificación y secuenciación de ADN ribosómico.

Antecedentes de la invención

Todos los organismos conocidos están incluidos en tres dominios: eucariotas, arqueas y bacterias. La clasificación dentro de cada dominio se basa en diferentes criterios fenotípicos o moleculares. Los avances en técnicas moleculares, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación del ADN han proporcionado la clasificación filogenética de organismos y, en el caso de los microorganismos, han permitido una identificación más rápida y fiable.

Desde los trabajos de Woese [Woese, C.R. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* 51, 221-271 (1987)] relativos a la evolución, los ARN ribosómicos (ARNr) son las moléculas más ampliamente utilizadas en los estudios filogenéticos, aunque el ARNr 16S (en procariotas) y el ARNr 18S (en eucariotas) se utilizan separadamente en los estudios taxonómicos de estos organismos. La importancia del ARNr 16S ha ido aumentando desde su empleo en las clasificaciones filogenéticas actuales, registradas en 1 a segunda edición de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (<http://server.mph.msu.edu/bergeys/>), razón por la que dicha molécula ha sido, y está siendo secuenciada, en los procariotas conocidos. La molécula de ARNr 18S también ha sido secuenciada en numerosos eucariotas, aunque no ha sido utilizada en la misma medida que la molécula de ADNr 16S en los procariotas. No obstante, numerosas secuencias de ADNr 18S de especies eucarióticas, especialmente de microorganismos, están actualmente disponibles en las bases de datos de secuencias de nucleótidos.

Se han descrito métodos para identificar, por separado, organismos procariotas y eucariotas mediante amplificación y secuenciación de regiones de ADN ribosómico (ADNr). Estos métodos comprenden el empleo de iniciadores diferentes para la molécula del ARNr 16S y la del 18S, tanto para amplificar como para secuenciar la región de ADNr en cuestión. Adicionalmente, las regiones que se amplifican son, en general, muy grandes lo que dificulta la posibilidad de aplicar tales métodos de un modo rápido (y por tanto rutinario) a la identificación de organismos en aquellos campos en los que éste es más necesario, por ejemplo, en clínica, fitopatología, microbiología de alimentos, etc.

Sigue existiendo, por tanto, la necesidad de disponer de métodos basados en la amplificación y secuenciación del ADN ribosómico que permitan la identificación precisa de cualquier organismo. Ventajosamente, dichos métodos deberán ser rápidos, rutinarios y universales, es decir, que utilizando los mismos iniciadores se puedan amplificar y secuenciar regiones identificadoras de cada organismo.

Compendio de la invención

La invención se enfrenta, en general, con el problema de proporcionar un procedimiento para la identificación rápida de organismos, tanto procariotas como eucariotas, basado en la amplificación y secuenciación de ADN ribosómico.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han descubierto la existencia de dos secuencias ribosómicas altamente conservadas en todos los organismos, tanto procariotas como eucariotas, que permiten la amplificación de una región del ADN ribosómico que contiene 495 pb en procariotas y 508 pb en eucariotas y que ha sido denominada UARR, del inglés "Universal Amplified Ribosomal Region" (Región Ribosómica Universal Amplificable) en esta descripción. La secuencia interna de dicha UARR en procariotas y eucariotas es variable y permite la identificación de organismos por comparación de dicha secuencia con secuencias de nucleótidos conocidas de distintos organismos. Dicha UARR puede ser amplificada mediante el empleo de unos iniciadores diseñados en base a las secuencias que flanquean la UARR, los cuales pueden ser utilizados, además, para secuenciar la UARR de cualquier organismo. La comparación de las secuencias de dichas UARR obtenidas utilizando dichos iniciadores con las secuencias de nucleótidos conocidas de los organismos permite la identificación de especies individuales y la generación de árboles filogenéticos universales.

Un procedimiento como el proporcionado por esta invención presenta la ventaja de que permite la identificación rápida, precisa y fiable, de organismos procariotas y eucariotas, de forma sencilla.

Un objeto de esta invención lo constituye un método para la identificación de organismos que comprende la amplificación de una región de ADN ribosómico amplificable en procariotas y eucariotas (UARR), la secuenciación de los productos amplificados y la comparación de dichas secuencias con las de otras secuencias de nucleótidos conocidas y representativas de organismos.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye un método para la amplificación enzimática de dicha región de ADN ribosómico amplificable en procariotas y eucariotas (UARR).

ES 2 216 682 B1

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un método para la identificación de un organismo procariota o de un organismo eucariota que comprende la amplificación de una región de ADN ribosómico universalmente amplificable en procariotas y eucariotas (UARR) y el análisis de los productos amplificados.

- 5 Los iniciadores utilizados en la realización de dichos método, así como los kits que los contienen constituyen objetos adicionales de esta invención.

Breve descripción de las figuras

- 10 La Figura 1 muestra las posiciones en *Escherichia coli* y en *Saccharomyces cerevisiae* de secuencias ampliamente conservadas que permiten la amplificación de UARR. Regiones ribosómicas universales amplificadas (UARR) en diferentes especies de microorganismos: carril 1: *Escherichia coli* ATCC11775^T, carril 2: *Lactobacillus casei* ATCC393^T, carril 3: *Brevundimonas diminuta* ATCC11568^T, carril 4: *Clavibacter michiganensis* DSM46364^T, carril 5: *Streptomyces griseus* ATCC23345^T, carril 6: *Haloarcula hispanica* ATCC33960^T, carril 7: *Halobacterium salinarium* ATCC33171^T, carril 8: *Saccharomyces cerevisiae* CBS1171^T y carril 9: *Trichoderma* sp. IFO9061. MW: bandas correspondientes al marcador de tamaño VI (Roche). [ATCC: American Type Culture Collection; DSM: German Collection of Microorganisms; CBS: Centraal Bureau voor Schimmelcultures; IFO: Institute for Fermentation of Osaka].

- 20 La Figura 2 es un árbol de parsimonia que muestra las relaciones filogenéticas entre especies representativas de distintas *phyla* procarióticas y eucarióticas.

- 25 La Figura 3 es un árbol de parsimonia que muestra las relaciones filogenéticas entre especies microbianas representativas de distintos órdenes de arqueas, bacterias y eucariotas. Los nombres de las distintas especies han sido intercambiados por los números indicados en la Tabla 1.

Descripción detallada de la invención

- 30 La invención proporciona, en general, un procedimiento para identificar y clasificar cualquier organismo, procariota o eucariota, por secuenciación de una región ribosómica flanqueada por dos regiones ampliamente conservadas en procariotas y eucariotas. Para la identificación de dicha región, los inventores compararon las secuencias de ADNr 16S de varias especies procarióticas con las secuencias de ADNr 18S de varias especies eucarióticas (véase el Ejemplo 1) con el fin de obtener las regiones conservadas en ambos organismos. La comparación entre las secuencias completas reveló que las secuencias de ADNr 16S y ADNr 18S poseen dos regiones comunes localizadas entre las posiciones 909 y 1.404 en *E. coli* y entre las posiciones 1.134 y 1.642 en *S. cerevisiae* (véase la Figura 1). Estas dos regiones permitieron el diseño de dos iniciadores universales, identificados como U1F (SEQ. ID. NO: 1) y U1R (SEQ. ID. No: 2), que permiten amplificar una banda de 495 pares de bases (pb) en procariotas y de 508 pb en eucariotas que podían ser secuenciadas utilizando los mismos iniciadores. La región amplificada de esa manera ha sido denominada "Región Ribosómica Universal Amplificada" (UARR) en esta descripción.

- 40 Dicha UARR es una región hipervariable que varía ampliamente entre los distintos *phylum*, tanto en eucariotas como en procariotas. El análisis de parsimonia de secuencias de diversas especies procarióticas y eucarióticas procedentes de varios *phyla* permite la generación de árboles filogenéticos que son consistentes con los obtenidos utilizando las secuencias de ARNr 16S y ARNr 18S por separado (véase el Ejemplo 2). Aunque la secuencia interna de dicha UARR varía ampliamente entre individuos de diferentes dominios, los estudios realizados por los inventores han puesto que manifiesto que, sorprendentemente, dicha UARR permite distinguir entre diferentes especies pertenecientes a diferentes *phyla* de microorganismos. De hecho, los resultados obtenidos muestran que todas las especies de los diferentes órdenes de microorganismos procariotas y eucariotas pueden ser diferenciadas en base a las secuencias de las UARR. Estos resultados ponen de manifiesto la utilidad de las secuencias de dichas UARR en la identificación de organismos ya que la unidad taxonómica básica es la especie y dicha UARR es diferente entre especies incluso del mismo género.

Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para la identificación de un organismo, procariota o eucariota, que comprende:

- 55 a) poner en contacto ADN de dicho organismo con una mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN, comprendiendo dicha mezcla de reacción un par de iniciadores constituido por los iniciadores U1F (SEQ. ID. NO: 1) y U1R (SEQ. ID. NO: 2) bajo condiciones en las que un fragmento de ADN amplificable presente en el ADN de dicho organismo es amplificado para formar un producto de amplificación;
- 60 b) secuenciar el producto de amplificación obtenido en la etapa a); y
- c) comparar la secuencia obtenida en la etapa b) con secuencias de nucleótidos identificativas de organismos.

- 65 Antes de poner en contacto ADN del organismo a ensayar con la mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN, se procede a extraer la totalidad o parte del ADN de dicho organismo. La extracción de ADN del organismo en cuestión se puede realizar mediante métodos convencionales, incluyendo aquellos que no precisan una purificación del ADN extraído. El organismo a ensayar puede proceder de cualquier fuente, por ejemplo de un cultivo puro, de una fuente clínica, de una fuente medioambiental (agua, alimentos, plantas, animales, etc.).

ES 2 216 682 B1

La mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN contiene los reactivos necesarios para la realización de dicha amplificación. En una realización particular, la amplificación enzimática de un fragmento de ADN se realiza mediante una reacción PCR, en cuyo caso, la mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN comprende agua ultrapura, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), un tampón adecuado para la reacción de amplificación enzimática, una ADN polimerasa termoestable, una sal magnésica, etc., junto con un par de iniciadores constituido por los iniciadores U1F (SEQ. D. NO: 1) y U1R (SEQ. ID. NO: 2) que amplifican una región de ADN amplificable presente en procariotas y eucariotas (UARR).

La amplificación enzimática de los fragmentos de ADN se puede realizar mediante el empleo de técnicas convencionales, por ejemplo, PCR, bajo condiciones en las que fragmentos de ADN amplificables presentes en el ADN del organismo a ensayar son amplificados.

Los productos de la amplificación enzimática se pueden separar y analizar por cualquier método convencional. En una realización particular, los productos de la amplificación enzimática se separan y secuencian utilizando técnicas convencionales, por ejemplo, en un secuenciador automático utilizando iniciadores o sondas de oligonucleótidos. En una realización particular, dichos productos de amplificación se secuencian utilizando los iniciadores U1F (SEQ. ID. NO: 1) y U1R (SEQ. ID. NO: 2). El empleo de los mismos iniciadores tanto para la amplificación de ADN como para la secuenciación del fragmento de ADN amplificado simplifica el procedimiento de identificación de organismos.

A continuación, las secuencias obtenidas se comparan con secuencias de nucleótidos identificativas de distintos organismos, por ejemplo, con secuencias de organismos depositadas en bases de datos de nucleótidos y se identifica el organismo ensayado. En caso de que el organismo a identificar tuviera la secuencia amplificada contenida en dicha base de datos de nucleótidos, la identificación del organismo en cuestión sería inmediata. La comparación de las secuencias puede realizarse por cualquier método o soporte lógico convencional. En una realización particular, las secuencias obtenidas se pueden comparar con secuencias contenidas en la base de datos GenBank y/o EMBL utilizando el programa FASTA (véase el apartado relativo a los Materiales y Métodos) y/o BLAST. Si se desea, dichas secuencias pueden ser alineadas utilizando cualquier soporte lógico convencional, por ejemplo, el programa ClustalW.

Los productos de amplificación obtenidos mediante el procedimiento previamente descrito son específicos de cada organismo, por lo que resultan útiles para la identificación de los mismos. Por tanto, dichos productos de amplificación constituyen una herramienta que ofrece un gran potencial en estudios taxonómicos con un gran número de aislados, así como en la identificación rápida de organismos, tanto procariotas como eucariotas.

El procedimiento de la invención permite identificar aislados individuales a partir de fuentes clínicas y medioambientales (agua, alimentos, plantas, etc.) mediante la amplificación y secuenciación de la UARR. Esto es de considerable importancia en el campo de la diagnosis porque todos los microorganismos (eucarióticos y procarióticos) que son infecciosos para humanos, animales y plantas pueden ser identificados utilizando el mismo par de iniciadores y las mismas condiciones de PCR y secuenciación.

La identificación de organismos es preciso llevarla a cabo en numerosos sectores técnicos, por ejemplo, en Microbiología Clínica (humana y veterinaria), Microbiología de Alimentos y Agua, Fitopatología, Ecología Microbiana, Taxonomía Microbiana, Microbiología Industrial, Microbiología Ambiental y, en general, en todas aquellas disciplinas que incluyan seguimiento y control de microorganismos, por lo que el procedimiento proporcionado por esta invención tiene aplicación, entre otros, en los sectores previamente mencionados.

Adicionalmente, un importante empleo potencial de la UARR podría ser la identificación y clasificación de fósiles microbianos. Debido a que las secuencias ribosómicas flanqueadas por secuencias altamente conservadas (UARR) se encuentran en todos los organismos estudiados (incluyendo arqueas, bacterias, algas, hongos, plantas, animales e incluso, seres humanos) es probable que dichas regiones también puedan ser amplificadas en organismos fósiles, permitiendo su clasificación en una primera etapa. Dicha UARR podría ser, consecuentemente, el punto de partida para obtener la secuencia completa del ADN ribosómico de dichos organismos.

También esta región puede ser utilizada en técnicas como el TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) puesto que las diferencias en el contenido en G+C de la UARR de cada organismo es diferente. Esta técnica se basa en la identificación de los diferentes organismos de una población mediante la diferente movilidad de bandas del ADN ribosómico 16S en geles de poliacrilamida sometidos a un gradiente de temperatura siendo el principal condicionante de esta separación el diferente contenido en G+C de la región sometida a la técnica. La UARR tiene la ventaja de que al poder ser amplificada tanto en eucariotas como en procariotas, se pueden analizar poblaciones mezcladas de estos dos tipos de organismos que se hallan habitualmente juntos en los diferentes ecosistemas, mientras que la TGGE convencional sólo puede ser aplicada a los procariotas de una población, perdiéndose la información relativa a los eucariotas de la misma.

Asimismo, esta región permite la aplicación de la técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de un modo seguro y más fiable. Actualmente esta técnica se utiliza en la molécula entera del ADNr 16S y del ADNr 18S por separado y debido a que estos dos genes no están completamente secuenciados en todas las especies (faltan el extremo inicial, el final o los dos en muchas especies) es difícil establecer a qué nivel taxonómico establecen las diferencias. Como la UARR es una zona completamente secuenciada por encontrarse en el interior de los genes (tanto del 16S como del 18S) y bien definida se puede establecer claramente si un perfil es típico de una especie, de un

ES 2 216 682 B1

género o incluso de una familia. Además se pueden comparar juntos procariotas y eucariotas, cosa que hasta ahora es imposible.

Por último, una de las aplicaciones más importantes es la detección de procariotas dentro de tejidos eucariotas debido a que en ambos se amplifica la UARR, pero en eucariotas esta región tiene unos 15 nucleótidos más que en eucariotas y se pueden separar perfectamente en geles de agarosa incluso al 1%, concentración que se utiliza para purificar las bandas de ADN desde geles antes de la secuenciación. Esta técnica tiene especial importancia en el diagnóstico de bacterias patógenas de vegetales y animales amplificando el ADN directamente a partir de las muestras de tejidos infectados.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la detección y/o clasificación de un organismo procariota o eucariota, que comprende poner en contacto ADN de dicho organismo con una mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN, comprendiendo dicha mezcla de reacción un par de iniciadores constituido por los iniciadores U1F (SEQ. ID. NO: 1) y U1R (SEQ. ID. NO: 2) bajo condiciones en las que un fragmento de ADN amplificable presente en el ADN de dicho organismo es amplificado para formar un producto de amplificación y analizar el producto de amplificación en donde la presencia de una banda de 495 pb es indicativa de la presencia de un organismo procariota y la presencia de una banda de 508 pb es indicativa de la presencia de un organismo eucariota.

Antes de poner en contacto ADN del organismo a ensayar con la mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN, se procede a extraer la totalidad o parte del ADN de dicho organismo. La extracción de ADN del organismo en cuestión se puede realizar mediante métodos convencionales, incluyendo aquéllos que no precisan una purificación del ADN extraído. El organismo a ensayar puede proceder de cualquier fuente, por ejemplo de un cultivo puro, de una fuente clínica, de una fuente medioambiental (agua, alimentos, plantas, animales, etc.). La mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN contiene los reactivos necesarios para la realización de dicha amplificación. En una realización particular, la amplificación enzimática de un fragmento de ADN se realiza mediante una reacción PCR, en cuyo caso, la mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN comprende agua ultrapura, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), un tampón adecuado para la reacción de amplificación enzimática, una ADN polimerasa termoestable, una sal magnésica, etc., junto con un par de iniciadores constituido por los iniciadores U1F (SEQ. ID. NO: 1) y U1R (SEQ. ID. NO: 2) que amplifican una región de ADN amplificable presente en procariotas y eucariotas (UARR). La amplificación enzimática de los fragmentos de ADN se puede realizar mediante el empleo de técnicas convencionales, por ejemplo, PCR, bajo condiciones en las que fragmentos de ADN amplificables presentes en el ADN del organismo a ensayar son amplificados.

Los productos de la amplificación enzimática se pueden separar y analizar por cualquier método convencional. En una realización particular, los productos de la amplificación enzimática se separan mediante electroforesis en agarosa, acrilamida o, en general, en cualquier matriz a la que pueda aplicarse una corriente eléctrica que permita la separación de moléculas, y se visualizan por métodos convencionales, por ejemplo, mediante luz ultravioleta (UV) tras tinción con bromuro de etidio.

Consecuentemente, la invención ofrece la posibilidad de detectar y clasificar organismos, eucariotas y procariotas, en un solo paso, utilizando una electroforesis directa de los productos de amplificación del ADN extraído por cualquier método. Por tanto, la invención proporciona un procedimiento preciso, seguro y fiable de detección y clasificación de organismos basado en la amplificación de una región de ADN ribosómico amplificable en procariotas y eucariotas (UARR) y en la electroforesis directa de los productos de dicha amplificación utilizando un par de iniciadores basados en secuencias de ADN ribosómico que amplifican dicha UARR.

La invención también proporciona un kit para la identificación de organismos, o para la detección y clasificación de organismos, mediante amplificación enzimática de ADN, que comprende un oligonucleótido iniciador seleccionado del grupo formado por los iniciadores U1F (SEC. ID. NO: 1), U1R (SEC. ID. NO: 2), y sus mezclas.

Los kits proporcionados por esta invención pueden presentarse en forma de estuche conteniendo, además de unos recipientes con uno o más de los iniciadores mencionados, unos recipientes con la totalidad o parte del resto de reactivos necesarios para la realización de la amplificación enzimática, por ejemplo, agua ultrapura, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), un tampón adecuado para la reacción de amplificación enzimática, una ADN polimerasa termoestable (por ejemplo, ADN polimerasa Taq), una sal magnésica (por ejemplo, cloruro magnésico), etc. Adicional y opcionalmente, los kits proporcionados por esta invención pueden incluir unos recipientes con ADN de distintas especies conocidas y bien caracterizadas para su empleo como controles positivos.

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

Ejemplos

Materiales y métodos

5 Los Materiales y Métodos utilizados en los Ejemplos que se describen a continuación fueron los siguientes.

Cepas y números de acceso

10 Las cepas utilizadas en este estudio para su análisis filogenético se relacionan en la Tabla 1. En dicha Tabla, se han ordenado las especies de acuerdo con la clasificación actual de organismos y, además, se indica el número de acceso de cada cepa.

15 Las cepas utilizadas para la amplificación y secuenciación se indican en la leyenda de la Figura 1 [*Escherichia coli* ATCC11775^T; *Lactobacillus casei* ATCC393^T; *Brevundimonas diminuta* ATCC11568^T; *Clavibacter michiganensis* DSM46364^T; *Streptomyces griseus* ATCC23345^T; *Haloarcula hispanica* ATCC33960^T; *Halobacterium salinarium* ATCC33171^T; *Saccharomyces cerevisiae* CBS1171^T; y *Trichoderma* sp. IFO9061].

Extracción, amplificación, secuenciación y análisis de ADN

20 Las cepas fueron crecidas en medio YED (0,5% de extracto de levadura y 0,7% de glucosa) durante 24 horas a 28°C y 1.800 rpm. Las células se recogieron por centrifugación a temperatura ambiente en una centrifuga microspin a 5.000xg y se lavaron con 200 µl de una solución de 0,1% de sarcosilo en agua [Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. A two primers RAPD procedure (TP-RAPD) to obtain PCR fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* 22, 1086-1089. (2001)]. El ADN fue extraído en 100 µl de NaOH 0,05 M (libre de ADN) calentándolo durante 4 minutos a 100°C. A continuación, las muestras se pusieron en un baño de hielo, se añadieron 900 µl de agua a cada microtubo y se mezclaron perfectamente. Después de una nueva centrifugación a 4.000xg durante 3 minutos, se recogieron 700 µl de los sobrenadantes y se congelaron a -20°C.

30 El ADN bruto fue utilizado como molde para la amplificación mediante PCR de ADN_r 16S. La PCR fue realizada utilizando un kit del reactivo AmpliTaq (Perkin-Elmer Biosystem, California, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante (MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada dNTP y 2 Unidades de polimerasa Taq para un volumen final de 25 µl). Los iniciadores utilizados para la amplificación fueron el iniciador directo U1F (SEQ. ID. NO: 1) [*Escherichia coli*, posiciones 909-932] y el inverso U1R (SEQ. ID. NO: 2) [*Escherichia coli*, posiciones 1.383-1.404] y se añadieron hasta una concentración final de 0,2 µM.

35 Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: precalentamiento a 95°C durante 9 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto; anillamiento a 55°C durante 2 minutos; y elongación a 72°C durante 1 minutos; y una elongación final a 72°C durante 7 minutos. Los productos de la PCR se guardaron a 4°C.

40 Finalizada la PCR, el producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1,5%, en tampón TBE (100 mM Tris, ácido bórico 83 mM, EDTA 1 mM, pH 8,5), a 6 V/cm y se tiñó con una solución que contenía 0,5 µl/ml de bromuro de etidio. Como marcador de tamaño se utilizó el patrón VI (Boehringer-Roche, EEUU). A cada muestra se le añadió una alícuota de 3 µl de solución de carga 6x (30% de glicerol, 0,25% de xileno cianol y 0,25% de azul de bromofenol).

45 La banda se purificó a partir del gel por centrifugación en tubos Eppendorf (Millipore Co., Illinois, EEUU) durante 10 minutos a 5.000xg a temperatura ambiente.

50 La secuenciación se realizó en un secuenciador ABI377 (Applied Biosystems Inc.) utilizando un kit de secuenciación de ciclo BigDye terminator v3.0 siguiendo las instrucciones del fabricante. Los iniciadores utilizados fueron los mismos que los utilizados en la reacción de amplificación por PCR. Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias contenidas en la base de datos GenBank utilizando el programa FASTA [Pearson, W.R. & Lipman, D.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 2444-2448. (1988)]. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa ClustalW [Thompson et al., citado *supra*]. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando análisis de parsimonia. El análisis por cuenta propia se basó en 1.000 muestras. El programa PHYLIP [Felsenstein, J. PHYLIP (Phylogenetic inference package) version 3.5c. Seattle: University of Washington. (1985)] fue utilizado para todos los análisis.

Ejemplo 1

60 *Identificación de la región ribosómica universal amplificada (UARR)*

Se realizó este estudio con el fin de intentar localizar la posible existencia de una secuencia de nucleótidos presente en ácidos nucleicos de organismos procariotas y eucariotas. Esta secuencia podría ser utilizada para identificar y clasificar cualquier organismo, tanto procariota como eucariota, por secuenciación de dicha región.

65 Para ello, se compararon las secuencias de ADN_r 16S de varias especies procarióticas con las secuencias de ADN_r 18S de varias especies eucarióticas utilizando el programa ClustalW [Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment

ES 2 216 682 B1

aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.* 24, 4876-4882. (1997)] con el fin de obtener las zonas conservadas en ambos organismos. La comparación entre las secuencias completas reveló que las secuencias de ADN_r 16S y ADN_r 18S poseían dos regiones comunes localizadas entre las posiciones 909 y 1.404 en *E. coli* y entre las posiciones 1.134 y 1.642 en *S. cerevisiae* (véase la Figura 1). Estas dos regiones permitieron el diseño de 2 iniciadores universales, identificados como U1F (SEQ. ID. NO: 1) y U1R (SEQ. ID. No: 2) que permiten amplificar por PCR una banda de 495 pares de bases (pb) en procariotas y una banda de 508 pb en eucariotas que podían ser secuenciadas utilizando los mismos iniciadores. La región amplificada de esa manera ha sido denominada “Región Ribosómica Universal Amplificada” (UARR) en esta descripción.

10 Ejemplo 2

Generación de árboles filogenéticos basados en la UARR

15 Se realizó este estudio para evaluar la posibilidad de construir árboles filogenéticos utilizando la información contenida en dicha UARR. Las cepas utilizadas en este estudio para su análisis filogenético se relacionan en la Tabla 1, en donde se han ordenado las especies de acuerdo con la clasificación actual de organismos, indicándose, además, el número de acceso de cada cepa.

20 Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la UARR es una región hipervariable que varía ampliamente entre los distintos *phylum*, tanto en eucariotas como en procariotas (véase la Figura 2).

25 El análisis de parsimonia de secuencias de distintas especies procarióticas y eucarióticas procedentes de varios *phyla* permite la generación de árboles filogenéticos que son consistentes con los obtenidos utilizando las secuencias de ARNr 16S y ARNr 18S por separado [Prescott, R., Harley, J.P., Klein, D.A. in *Microbiology* (eds Prescott, R., Harley, J.P. & Klein, D.A.) 522- 564 (WCB MacGraw-Hill, Boston, 1999)].

30 En el árbol filogenético mostrado en la Figura 2, las especies procedentes de distintos *phyla* de los dominios eucariota, arquea y bacteria están claramente separadas. Dentro de las ramas eucarióticas, las especies representativas de los *phyla* de plantas, hongos, animales y cromistas están localizadas en diferentes ramas. Los dos *phyla* de arqueas (crenarchaeota y euryarchaeota) están en dos ramas diferentes localizadas entre las ramas eucariótica y procariótica. Todos los *phyla* bacterianos también están localizados en diferentes ramas y su distribución está de acuerdo con la clasificación actual de este grupo de microorganismos. Por tanto, el análisis de la secuencia de la UARR reproduce el mismo tipo de árboles que cuando se utilizan separadamente las secuencias completas de los ARNr 16S y ARNr 18S.

35 No obstante, habitualmente, las especies de diferentes *phyla* presentan grandes diferencias, las cuales, en el caso de organismos pluricelulares, son evidentes incluso a nivel morfológico. Por ejemplo, las plantas son claramente divergentes de los animales y, por tanto, se pueden encontrar marcadas diferencias en sus secuencias de ARNr 18S, incluso, razonablemente, más diferencias que las esperadas entre los ARNr 16S de procariotas y los ARNr 18S de eucariotas. Por tanto, también puede esperarse que la UARR varíe entre individuos de diferentes dominios o *phyla*. Sin embargo, sorprendentemente, la UARR permite distinguir entre diferentes especies pertenecientes a diferentes *phyla*. Para comprobar ésto, se analizaron especies representativas de diferentes órdenes microbianos pertenecientes a *phyla* de diferentes dominios.

45 La Figura 2 muestra un árbol de parsimonia que contiene especies representativas de diferentes órdenes de microorganismos pertenecientes a *phyla* de archaea, bacteria y eukarya. Debido a que este árbol es bastante complejo, se muestra un esquema con números en la Figura 3 que incluye todas las especies utilizadas en el estudio realizado y en donde se han marcado las zonas correspondientes a los órdenes eukarya, archaea y bacteria. Los números correspondientes a cada especie han sido incluidos en la Tabla 1. Como puede apreciarse, el análisis de la UARR permite una clara separación de estos tres grupos de organismos. Las especies representativas de los diferentes órdenes están situadas en ramas diferentes del árbol, lo que indica que las especies que pertenecen a diferentes órdenes tienen grandes diferencias en sus secuencias de UARR.

55

60

65

Tabla 1. Organismos usados en este estudio

Organismo	Número en Fig.3	Familia	Orden	Phylum	Dominio	Número de acceso
<i>Thermoproteus tenax</i>	34	Thermoproteaceae	Thermoproteales	Crenarchaeota	Archaea	M35966
<i>Desulfurococcus mobilis</i>	35	Desulfurococcaceae	Desulfurococcales	Crenarchaeota	Archaea	M36474
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	36	Desulfurococcaceae	Desulfurococcales	Crenarchaeota	Archaea	D14053
<i>Methanobacterium formicium</i>	41	Methanobacteriaceae	Methanobacteriales	Euryarchaeota	Archaea	AF169245
<i>Methanobact palustre</i>		Methanobacteriaceae	Methanobacteriales	Euryarchaeota	Archaea	AF093061
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>		Methanothermaceae	Methanobacteriales	Euryarchaeota	Archaea	AB065294
<i>Methanothermus fervidus</i>	40	Methanococcaceae	Methanococcales	Euryarchaeota	Archaea	M59145
<i>Methanococcus vannielii</i>	44	Methanomicrobiaceae	Methanomicrobiales	Euryarchaeota	Archaea	M36507
<i>Methanomicrobium mobile</i>	45	Methanosarcinaceae	Methanosarcinales	Euryarchaeota	Archaea	M59142
<i>Methanosarcina barkeri</i>	43	Halobacteriaceae	Halobacteriales	Euryarchaeota	Archaea	M59144
<i>Halobacterium salinarum</i>	39	Thermoplasmataceae	Thermoplasmatales	Euryarchaeota	Archaea	U68538
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	38	Thermococcaceae	Thermococcales	Euryarchaeota	Archaea	M38637
<i>Thermococcus celer</i>	42	Archaeoglobaceae	Archaeoglobales	Euryarchaeota	Archaea	M21529
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	37	Methanopyraceae	Methanopyrales	Euryarchaeota	Archaea	X05567
<i>Methanopyrus kandleri</i>	128	Aquificaceae	Aquificales	Euryarchaeota	Archaea	M59932
<i>Aquifex pyrofilus</i>	129	Thermotogaceae	Thermotogales	Aquificae	Bacteria	M83548
<i>Thermotoga maritima</i>	121	Thermodesulfobacteriaceae	Thermodesulfobacteriales	Thermotogae	Bacteria	AJ401017
<i>Thermodesulfobacterium hveragerdicum</i>	80	Deinococcaceae	Deinococcales	Thermodesulfobacteria	Bacteria	X96725
<i>Deinococcus radiodurans</i>	125	Thermaceae	Thermales	Deinococcus-Thermus	Bacteria	Y11332
<i>Thermus aquaticus</i>	74	Chrysiogenaceae	Chrysiogenaceae	Deinococcus-Thermus	Bacteria	L09663
<i>Chrysiogenes arseniatis</i>	127	Chloroflexaceae	Chloroflexales	Chrysiogenetes	Bacteria	X81319
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	126	Thermomicrobiaceae	Thermomicrobiales	Chloroflexi	Bacteria	AJ308501
<i>Thermomicrobium roseum</i>	120	Nitrospiraceae	Nitrospirales	Thermomicrobia	Bacteria	M34115
<i>Nitrospira marina</i>	122	Deferribacteraceae	Deferribacteriales	Nitrospira	Bacteria	X82559
<i>Deferribacter thermophilus</i>	85		Chroococcales	Deferribacteres	Bacteria	U75602
<i>Gloeocapsa</i> sp.	87		Pleurocapsales	Cyanobacteria	Bacteria	AB039000
<i>Stania</i> sp.	86		Pleurocapsales	Cyanobacteria	Bacteria	AB039009
<i>Pleurocapsa</i> sp.	81		Oscillatoriales	Cyanobacteria	Bacteria	X78681
<i>Aritrospira</i> sp.	84		Nostocales	Cyanobacteria	Bacteria	X70769
<i>Anabaena variabilis</i>	83		Nostocales	Cyanobacteria	Bacteria	AB016520
<i>Calothrix</i> sp.	82		Stigonematales	Cyanobacteria	Bacteria	AJ133164
<i>Chlorogloeopsis</i> sp.				Cyanobacteria	Bacteria	X68780

Tabla 1. Organismos usados en este estudio

48	<i>Chlorobium limicola</i>	Chlorobiaceae	Chlorobi	<i>Bacteria</i>	AB054671
92	<i>Rhodospirillum rubra</i>	Rhodospirillaceae	Proteobacteria	<i>Bacteria</i>	D30778
94	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Rickettsiaceae	Proteobacteria	<i>Bacteria</i>	M21789
95	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Rhodobacteraceae	Rhodobacterales	<i>Bacteria</i>	D16427
97	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Sphingomonadaceae	Sphingomonadales	<i>Bacteria</i>	U37337
96	<i>Caulobacter vibriodes</i>	Caulobacteraceae	Caulobacterales	<i>Bacteria</i>	AJ227754
93	<i>Rhizobium etli</i>	Rhizobiaceae	Rhizobiales	<i>Bacteria</i>	U28916
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Rhizobiaceae	Rhizobiales	<i>Bacteria</i>	U29386
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Rhizobiaceae	Rhizobiales	<i>Bacteria</i>	D01256
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Bradyrhizobiaceae	Rhizobiales	<i>Bacteria</i>	U69638
103	<i>Burkholderia cepacia</i>	Burkholderiaceae	Burkholderiales	<i>Bacteria</i>	AF097530
101	<i>Methylophilus methylotropus</i>	Methylobacteriaceae	Methylobacteriales	<i>Bacteria</i>	L15475
104	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Neisseriaceae	Neisseriales	<i>Bacteria</i>	M34130
100	<i>Nitrosomonas europaea</i>	Nitrosomonadaceae	Nitrosomonadales	<i>Bacteria</i>	AF353160
102	<i>Rhodocyclus purpureus</i>	Rhodocyclaceae	Rhodocyclales	<i>Bacteria</i>	M34132
98	<i>Chromatium okenii</i>	Chromatiaceae	Chromatiales	<i>Bacteria</i>	AJ223234
109	<i>Xanthomonas campestris</i>	Xanthomonadaceae	Xanthomonadales	<i>Bacteria</i>	X99298
106	<i>Cardiobacterium hominis</i>	Cardiobacteriaceae	Cardiobacteriales	<i>Bacteria</i>	M35014
108	<i>Thiothrix nivea</i>	Thiothrichaceae	Thiothrichaceae	<i>Bacteria</i>	L40993
107	<i>Legionella pneumophila</i>	Legionellaceae	Legionellales	<i>Bacteria</i>	X73402
99	<i>Methylococcus capsulatus</i>	Methylococcaceae	Methylococcales	<i>Bacteria</i>	X72770
115	<i>Oceanospirillum linum</i>	Oceanospirillaceae	Oceanospirillales	<i>Bacteria</i>	M22365
105	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	Pseudomonadales	<i>Bacteria</i>	AF094713
113	<i>Alteromonas macleodii</i>	Alteromonadaceae	Alteromonadales	<i>Bacteria</i>	Y18228
110	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Aeromonadales	<i>Bacteria</i>	X74677
114	<i>Vibrio cholerae</i>	Vibriaceae	Vibrionaceae	<i>Bacteria</i>	X74695
111	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	Enterobacteriales	<i>Bacteria</i>	Z83205
112	<i>Pasteurella multocida</i>	Pasteurellaceae	Pasteurellales	<i>Bacteria</i>	AF294410
47	<i>Desulfurella acetivorans</i>	Desulfurellaceae	Desulfurellales	<i>Bacteria</i>	X72768
53	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrionales	<i>Bacteria</i>	AF354664
90	<i>Desulfobacter curvatus</i>	Desulfobacteraceae	Desulfobacteriales	<i>Bacteria</i>	M34413
89	<i>Desulfuromonas chloroethenica</i>	Desulfuromonadaceae	Desulfuromonadales	<i>Bacteria</i>	U49748
88	<i>Syntrophobacter wolnini</i>	Syntrophobacteraceae	Syntrophobacteriales	<i>Bacteria</i>	X70905
91	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	Bdellovibrionaceae	Bdellovibrionales	<i>Bacteria</i>	AJ292759
46	<i>Campylobacter fetus</i>	Campylobacteraceae	Campylobacteriales	<i>Bacteria</i>	M65012

Tabla 1. Organismos usados en este estudio

65	<i>Clostridium tetani</i>	Clostridiaceae	Clostridiales	Firmicutes	Bacteria	X74770
66	<i>Thermoanaerobacterium</i> <i>thermosulfurigenes</i>	Thermoanaerobacteriaceae	Thermoanaerobacteriales	Firmicutes	Bacteria	L09171
67	<i>Halanaerobium praevalens</i>	Halanaerobiaceae	Halanaerobiales	Firmicutes	Bacteria	AB022034
68	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Mycoplasmataceae	Mycoplasmatales	Mollicutes	Bacteria	AF132740
69	<i>Entomoplasma freundtii</i>	Entomoplasmataceae	Entomoplasmatales	Mollicutes	Bacteria	AF036954
70	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Acholeplasmataceae	Acholeplasmatales	Mollicutes	Bacteria	M23932
71	<i>Anaeroplasma abactoclasticum</i>	Anaeroplasmataceae	Anaeroplasmatales	Mollicutes	Bacteria	M25050
72	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Erysipelotrichaceae	Erysipelotrichales	Mollicutes	Bacteria	AB034200
73	<i>Bacillus subtilis</i>	Bacillaceae	Bacillales	Bacilli	Bacteria	AB055007
74	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	Paenibacillaceae	Bacillales	Bacilli	Bacteria	X94194
75	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Lactobacillaceae	Lactobacillales	Bacilli	Bacteria	AY050172
76	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Acidimicrobiaceae	Acidimicrobiales	Actinobacteria	Bacteria	U75647
77	<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	Rubrobacteriaceae	Rubrobacteriales	Actinobacteria	Bacteria	X98372
78	<i>Cortobacterium glomerans</i>	Cortobacteriaceae	Cortobacteriales	Actinobacteria	Bacteria	X79048
79	<i>Actinomyces bovis</i>	Actinomycetaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	Bacteria	X81061
80	<i>Micrococcus luteus</i>	Micrococcaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	Bacteria	AB023371
81	<i>Corynebacterium diptheriae</i>	Corynebacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	Bacteria	X84248
82	<i>Micromonospora chalcone</i>	Micromonosporaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	Bacteria	X92594
83	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Propionibacteriaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	Bacteria	X53217
84	<i>Pseudonocardia thermophila</i>	Pseudonocardiaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	Bacteria	AJ252830
85	<i>Streptomyces albus</i>	Streptomycetaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	Bacteria	AB045884
86	<i>Streptosporangium roseum</i>	Streptosporangiaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	Bacteria	U48996
87	<i>Frankia alni</i>	Frankiaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	Bacteria	M88466
88	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Bifidobacteriaceae	Bifidobacteriales	Actinobacteria	Bacteria	S83624
89	<i>Planctomyces brasiliensis</i>	Planctomycetaceae	Planctomycetales	Planctomycetes	Bacteria	AJ231190
90	<i>Glycomyces harbinensis</i>	Glycomycetaceae	Actinomycetales	Actinobacteria	Bacteria	AJ293747
91	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Chlamydiaceae	Chlamydiales	Chlamydiae	Bacteria	E17344
92	<i>Spirochaeta stenostrepta</i>	Spirochaetaceae	Spirochaetales	Spirochaetes	Bacteria	M88724
93	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Fibrobacteraceae	Fibrobacteriales	Fibrobacteres	Bacteria	M62696
94	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	Acidobacteriaceae	Acidobacteriales	Acidobacteria	Bacteria	D26171
95	<i>Bacteroides fragilis</i>	Bacteroidaceae	Bacteroidales	Bacteroidetes	Bacteria	AB050106
96	<i>Flavobacterium xanthum</i>	Flavobacteriaceae	Flavobacteriales	Flavobacteria	Bacteria	AF030380
97	<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	Sphingobacteriaceae	Sphingobacteriales	Sphingobacteria	Bacteria	M58778
98	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fusobacteriaceae	Fusobacteriales	Fusobacteria	Bacteria	AJ133496

Tabla 1. Organismos usados en este estudio

54	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobia	X90515
130	<i>Dictyoglossus thermophilus</i>	Dictyoglomales	Dictyoglossi	X69194
29	<i>Agaricostilbum hyphaenes</i>	Agaricostilbales	Basidiomycota	U40809
25	<i>Cryptococcus gastricus</i>	Filobasidiales	Basidiomycota	AB032632
19	<i>Endomyces scopularum</i>	Saccharomycetales	Ascomycota	AF267229
21	<i>Exobasidium vaccinii</i>	Exobasidiales	Basidiomycota	AJ271382
24	<i>Filobasidium uniguttulatum</i>	Filobasidiales	Basidiomycota	AB032664
20	<i>Graphiola cylindrica</i>	Exobasidiales	Basidiomycota	D63929
	<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>	Saccharomycetales	Eukarya	X83826
28	<i>Mycogloea macrospora</i>		Eukarya	U41848
16	<i>Pneumocystis carinii</i>	Pneumocystidales	Eukarya	S83267
27	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Heterogastriales	Ascomycota	AB021668
18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetales	Ascomycota	Z75578
	<i>Saccharomyces transvaalensis</i>	Saccharomycetales	Ascomycota	X99522
15	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Schizosaccharomycetales	Ascomycota	X58056
26	<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	Heterogastriales	Basidiomycota	L22261
22	<i>Taphrina maculans</i>	Taphrinales	Ascomycota	AB000953
23	<i>Tremella foliacea</i>	Tremellales	Basidiomycota	L22262
14	<i>Ustilago hordei</i>	Ustilaginales	Basidiomycota	U00973
6	<i>Amoebidium parasiticum</i>		Eukarya	Y19155
	<i>Boletus satanas</i>	Boletales	Basidiomycota	M94337
	<i>Lycoperdon</i> sp.	Lycoperdales	Basidiomycota	AF026619
10	<i>Hyphochytrium catenoides</i>		Eukarya	X80344
12	<i>Chytridium confervae</i>	Chytridiales	Chytridiomycota	M59758
17	<i>Fusarium oxysporum</i>	Hypocreales	Ascomycota	E17083
13	<i>Penicillium namyslowskii</i>	Eurotiales	Eukarya	AB028190
11	<i>Phytophthora undulata</i>	Pythiales	Eukarya	AJ238654
2	<i>Polyomyxa graminis</i>		Eukarya	AF310898
7	<i>Chara globularis</i>		Eukarya	Y16465
4	<i>Chlamydomonas mexicana</i>	Volvocales	Eukarya	AF395434
33	<i>Corallina elongata</i>	Corallinales	Eukarya	U60946
32	<i>Euglena viridis</i>	Euglenales	Eukarya	AF090868
5	<i>Gymnodinium fuscum</i>	Gymnodiniales	Eukarya	AF022194
8	<i>Sargassum macrocarpum</i>	Fucales	Eukarya	AB011432
9	<i>Tessellaria volvocina</i>	Synurales	Eukarya	U73219

Tabla 1. Organismos usados en este estudio

<i>Labyrinthula sp.</i>	3	<i>Labyrinthulidae</i>	<i>Labyrinthulida</i>	<i>Eukarya</i>	AB022105
<i>Naegleria fowleri</i>	30	<i>Schizopyrenida</i>	<i>Vahlkampfiidae</i>	<i>Eukarya</i>	U80059
<i>Paramoecium caudatum</i>	1		<i>Peniculida</i>	<i>Eukarya</i>	AF217655
<i>Trypanosoma brucei</i>	31	<i>Trypanosomatidae</i>	<i>Kinetoplastida</i>	<i>Eukarya</i>	AJ009142
<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Brassicaceae</i>	<i>Brassicales</i>	<i>Eukarya</i>	X16077
<i>Gerbera jamesonii</i>		<i>Asteraceae</i>	<i>Asterales</i>	<i>Eukarya</i>	AF107576
<i>Glycine max</i>		<i>Fabaceae</i>	<i>Fabales</i>	<i>Eukarya</i>	X02623
<i>Pinus wallichiana</i>		<i>Pinaceae</i>	<i>Coniferales</i>	<i>Eukarya</i>	X75080
<i>Pteridium aquilinum</i>		<i>Demstaedtiaceae</i>	<i>Filicales</i>	<i>Eukarya</i>	U18628
<i>Ranunculus taiwanensis</i>		<i>Ranunculaceae</i>	<i>Ranunculales</i>	<i>Eukarya</i>	D29780
<i>Zea mays</i>		<i>Poaceae</i>	<i>Poales</i>	<i>Eukarya</i>	AF168884
<i>Eubothrium crassum</i>		<i>Triaenophoridae</i>	<i>Pseudophyllidea</i>	<i>Eukarya</i>	AJ287509
<i>Alligator mississippiensis</i>		<i>Crocodylidae</i>		<i>Eukarya</i>	AF173605
<i>Gallus gallus</i>		<i>Phasianidae</i>	<i>Galliformes</i>	<i>Eukarya</i>	AF173612
<i>Homo sapiens</i>		<i>Hominidae</i>	<i>Primates</i>	<i>Eukarya</i>	X03205
<i>Salmo trutta</i>		<i>Salmonidae</i>	<i>Salmoniformes</i>	<i>Eukarya</i>	X98839
<i>Thermobia domestica</i>		<i>Lepismatidae</i>	<i>Arthropoda</i>	<i>Eukarya</i>	AF370790
<i>Xenopus laevis</i>		<i>Pipidae</i>	<i>Anura</i>	<i>Eukarya</i>	X04025

ES 2 216 682 B1

Dentro de las arqueas, los géneros representativos de los órdenes incluidos en el *phylum* crenarchaeota están claramente separados de aquéllos incluidos en el *phylum* euryarchaeota.

5 Dentro de las bacterias, géneros representativos de los principales grupos (proteobacteria, cyanobacteria, actinobacteria, mycoplasma, etc.) están localizados en diferentes ramas y la disposición de los órdenes dentro del *phylum* bacteria es básicamente la misma que la indicada en Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

10 Dentro de los organismos eucarióticos, los grupos obtenidos utilizando la UARR están sustancialmente de acuerdo con los mencionados en la literatura [Prescot et al., citado *supra*]. Por ejemplo, *Naegleria*, *Trypanosoma* y *Euglena* tienen un origen monofilético. Dentro de los hongos, los basidiomicetos están en ramas distintas a las de los ascomicetos. *Phytophthora*, que pertenece a hongos acuáticos forma un grupo con las algas (incluyendo las algas pluricelulares tales como *Sargassum* o *Corallina*), formando el grupo de Stramenopiles [Prescot et al., citado *supra*].

15 Todos los resultados obtenidos en procariotas y eucariotas son consistentes con los obtenidos utilizando las secuencias completas de las moléculas de ARNr 16S [Woese, C.R., citado *supra*] y ARNr 18S [James, S.A., Cai, J., Roberts, I.N., Collins, M.D. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 453-460. (1997)] y con los perfiles de ARN de bajo peso molecular (ARN LMW) [Velázquez, E., Cruz-Sánchez, J.M., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. Analysis of stable low molecular weight RNA profiles of members of the family Rhizobiaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1555-1559. (1998); Velázquez, E., Calvo, O., Cervantes, E., Mateos, P.F., Tamame, M., And Martínez-Molina, E. Staircase electrophoresis profiles of stable Low Molecular Weight RNA as yeast fingerprinting. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 917-923. (2000); Velázquez, E., Trujillo, M.E., Peix, A., Palomo, J.L., García-Benavides, P., Mateos, P.F., Ventosa, A., Martínez-Molina, E. Stable low molecular weight RNA analyzed by staircase electrophoresis, a molecular signature for both prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 486-499. (2001)].

30 Los resultados obtenidos muestran que todas las especies de todos los diferentes órdenes de organismos, tanto procarióticos como eucarióticos, pueden ser diferenciadas en base a sus secuencias de UARR. Por tanto, estos resultados indican que las secuencias de las distintas UARR pueden ser muy útiles en identificación microbiana. Sin embargo, ya que la especie es la unidad taxonómica básica, una UARR sólo será útil en la identificación microbiana cuando dicha UARR sea diferente entre especies del mismo género.

35 Debido a la práctica imposibilidad de analizar todas las especies microbianas, se han elegido unos grupos bien estudiados cuyas secuencias ribosómicas ya han sido obtenidas. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2, en donde se han incluido varios ejemplos de porcentajes de similitud entre organismos de diferentes grupos filogenéticos (dominios, *phyla*, órdenes, familias, géneros y especies).

TABLA 2

Porcentajes de similitud entre especies pertenecientes a diferentes categorías filogenéticas

Organismos	Similitud
<i>Homo sapiens</i> / <i>Salmo trutta</i>	95,5%
<i>Homo sapiens</i> / <i>Arabidopsis thaliana</i>	81,0%
<i>Homo sapiens</i> / <i>Halobacterium salinarum</i>	59,9%
<i>Homo sapiens</i> / <i>Escherichia coli</i>	58,4%
<i>Halobacterium salinarum</i> / <i>Escherichia coli</i>	64,4%
<i>Halobacterium salinarum</i> / <i>Thermoproteus tenax</i>	78,7%
<i>Escherichia coli</i> / <i>Bacillus subtilis</i>	83,0%
<i>Escherichia coli</i> / <i>Rhizobium leguminosarum</i>	84,4%
<i>Methanobacterium formicium</i> / <i>Methanothermus fervidus</i>	91,5%
<i>Methanobacterium formicium</i> / <i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	96,2%
<i>Methanobacterium formicium</i> / <i>Methanobacterium palustre</i>	99,0%

ES 2 216 682 B1

TABLA 2 (continuación)

Organismos	Similaridad
<i>Rhizobium leguminosarum/Bradyrhizobium japonicum</i>	89,8%
<i>Rhizobium leguminosarum/Agrobacterium tumefaciens</i>	91,3%
<i>Rhizobium leguminosarum/Rhizobium etli</i>	99,0%
<i>Saccharomyces cerevisiae/Endomyces scoullarum</i>	95,5%
<i>Saccharomyces cerevisiae/Kluyveromyces wickerhami</i>	97,9%
<i>Saccharomyces cerevisiae/Saccharomyces transvaalensis</i>	99,4%

Como puede apreciarse en dicha Tabla 2, el porcentaje de similaridad es más bajo en especies que pertenecen al mismo género que en especies que pertenecen a diferentes géneros, familias, órdenes, phyla y dominios. No obstante, las secuencias UARR permiten la diferenciación incluso entre especies del mismo género. A partir de dichos resultados, puede concluirse que la UARR es muy útil en identificación microbiana a nivel de especie.

Ejemplo 3

Identificación de organismos a nivel de especie utilizando UARR

Se realizó este ejemplo con el fin de comprobar si la UARR puede ser útil en la identificación microbiana a nivel de especie. Para ello, se utilizaron los iniciadores U1F (SEQ. ID. NO: 1) y U1R (SEQ. ID. NO: 2) para amplificar ADNr 16S (procariotas) y ADNr 18S (eucariotas) y secuenciar dichas moléculas en varias especies bacterianas representativas de Proteobacteria: *Escherichia coli* y *Brevundimonas diminuta*; Firmicutes: *Lactobacillus casei* y Actinobacteria: *Clavibacter michiganensis* y *Streptomyces griseus*. También se incluyeron dos especies de arqueas: *Haloarcula hispanica* y *Halobacterium salinarium*, y dos especies fúngicas: *Saccharomyces cerevisiae* y *Trichoderma* sp.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1. Las bandas de UARR se visualizaron a un nivel superior que las de los procariotas. Por tanto, se puede conocer si un individuo es procariota o eucariota observando simplemente el tamaño de la UARR obtenida tras la amplificación enzimática (PCR). Las secuencias de cada banda se compararon con otras secuencias incluidas en bases de datos públicas, permitiendo una correcta identificación de todas las cepas ensayadas. Por tanto, es posible identificar aislados individuales a partir de fuentes clínicas y medioambientales mediante la amplificación y secuenciación de la UARR.

ES 2 216 682 B1

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la identificación de un organismo, procariota o eucariota, que comprende:

- a) poner en contacto ADN de dicho organismo con una mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN, comprendiendo dicha mezcla de reacción un par de iniciadores constituido por los iniciadores U1F (SEQ. ID. NO: 1) y U1R (SEQ. ID. NO: 2) bajo condiciones en las que un fragmento de ADN amplificable presente en el ADN de dicho organismo es amplificado para formar un producto de amplificación;
- b) secuenciar el producto de amplificación obtenido en la etapa a); y
- c) comparar la secuencia obtenida en la etapa b) con secuencias de nucleótidos identificativas de organismos.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la amplificación enzimática de los fragmentos de ADN se realiza mediante PCR.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que los productos de amplificación se secuencian utilizando los iniciadores U1F (SEQ. D. NO: 1) y U1R (SEQ. ID. NO: 2).

4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las secuencias obtenidas en la etapa b) se comparan con secuencias de nucleótidos identificativas de distintos organismos mediante el empleo de un soporte lógico.

5. Un procedimiento para la detección de un organismo procariota o eucariota, que comprende poner en contacto ADN de dicho organismo con una mezcla de reacción para la amplificación enzimática de ADN, comprendiendo dicha mezcla de reacción un par de iniciadores constituido por los iniciadores U1F (SEQ. ID. NO: 1) y U1R (SEQ. ID. NO: 2) bajo condiciones en las que un fragmento de ADN amplificable presente en el ADN de dicho organismo es amplificado para formar un producto de amplificación y analizar el producto de amplificación en donde la presencia de una banda de 495 pb es indicativa de la presencia de un organismo procariota y la presencia de una banda de 508 pb es indicativa de la presencia de un organismo eucariota.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la amplificación enzimática de los fragmentos de ADN se realiza mediante PCR.

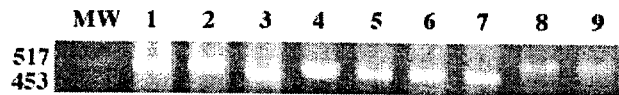
7. Procedimiento según la reivindicación 5, que comprende separar los productos de la amplificación enzimática mediante electroforesis en una matriz a la que pueda aplicarse una corriente eléctrica que permita la separación de moléculas, y visualizar los productos amplificados separados mediante luz ultravioleta tras tinción con bromuro de etidio.

8. Un oligonucleótido iniciador que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo formado por las secuencias identificadas como SEQ. ID. NO: 1 y SEQ. ID. NO: 2.

9. Un kit para la identificación de un organismo o para la detección o clasificación de organismos, mediante amplificación enzimática de un fragmento de ADN, que comprende, al menos, un oligonucleótido iniciador según la reivindicación 8.

ES 2 216 682 B1

<i>Arabidopsis thaliana</i>	AACTTAAAGGAATTGACGGAA-GGGCA	CCACCAGGAGTGGAGCC-TGCCG
<i>Homo sapiens</i>	AACTTAAAGGAATTGACGGAA-GGGCA	CCACCAGGAGTGGAGCC-TGCCG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AACTTAAAGGAATTGACGGAA-GGGCA	CCACCAGGAGTGGAGCC-TGCCG
<i>Escherichia coli</i>	AACTCAAATGAATTGACGGGG--GCCG	GCACAAGCGGTGGAGCA-TGTGG
<i>Archaeoglobus profundus</i>	AACTTAAAGGAATTGGCGGGG-GAGCA	CTACAACGGGTGGAGCC-TGCCG
	* * * * *	* * * * *



<i>Arabidopsis thaliana</i>	CGTTG-ACTACGTCCC	TGCCCTTTGTACACACCGCCCGT	CGCTCCTACCG
<i>Homo sapiens</i>	CGTTG-ATAAGTCCC	TGCCCTTTGTACACACCGCCCGT	CGCTACTACCG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CGTTG-ATTACGTCCC	TGCCCTTTGTACACACCGCCCGT	CGCTAGTACCG
<i>Escherichia coli</i>	CGGTG-AATACGTCCC	TGGCCTTTGTACACACCGCCCGT	CAC-ACCATGG
<i>Archaeoglobus profundus</i>	CGGTG-AATACGTCCC	TGCTCCTTGCACACACCGCCCGT	CAAGCCACCCG
	* * * * *	* * * * *	* * * * *

Figura 1

Figura 2

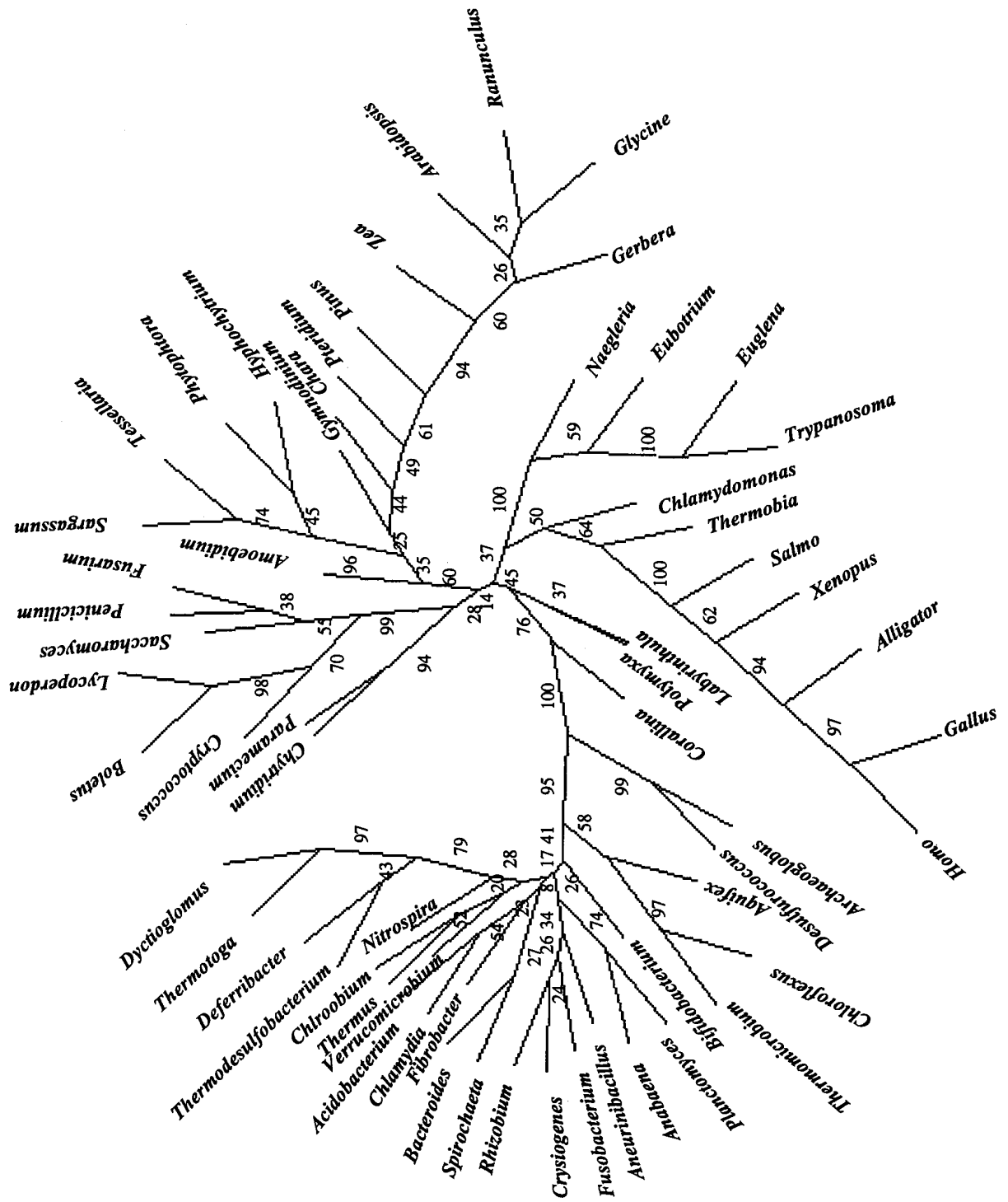
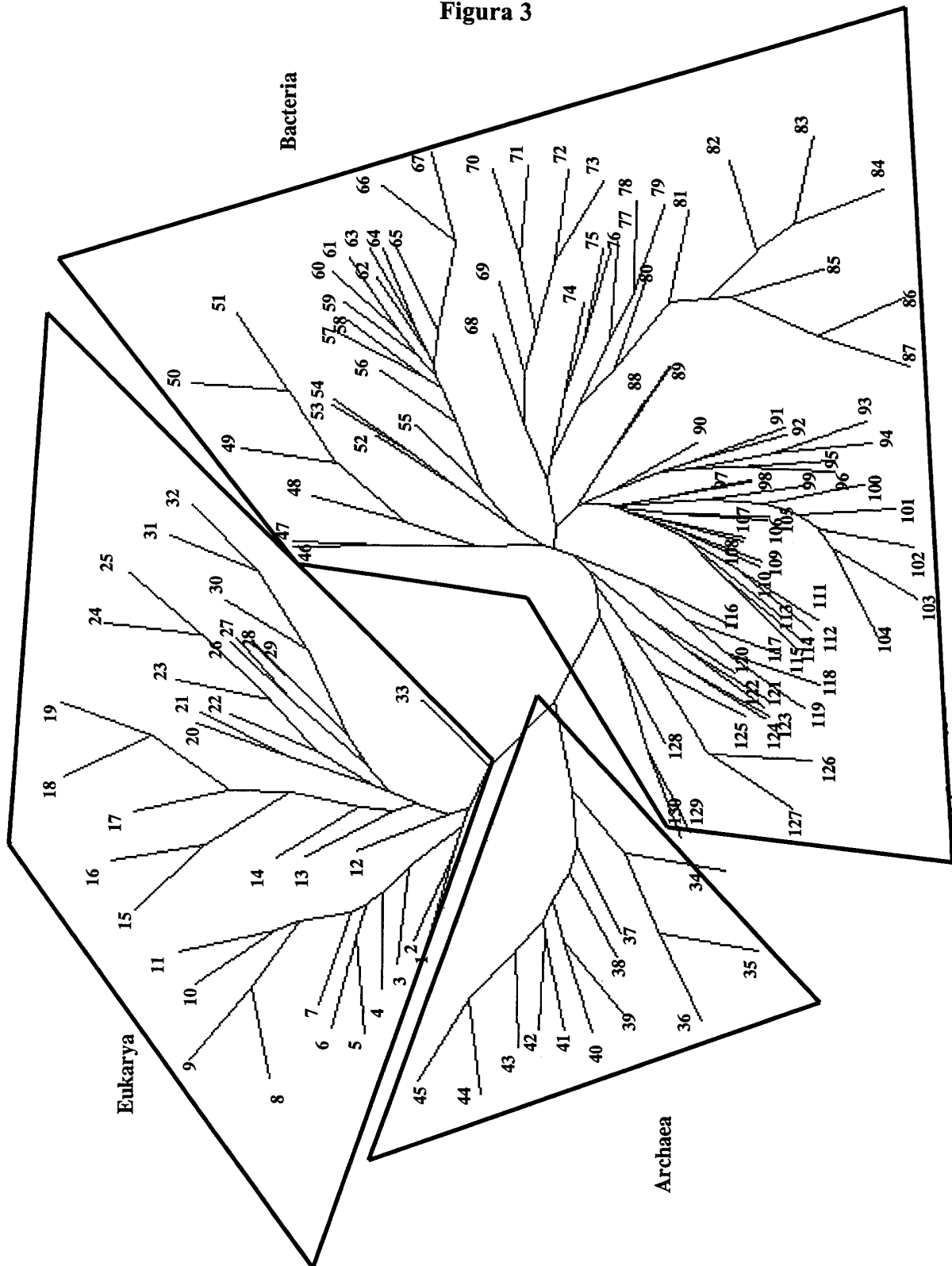


Figura 3



ES 2 216 682 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110>	Universidad de Salamanca	
5	<120> Procedimiento para la identificación de organismos basado en una región universalmente amplificable de ADN ribosómico	
	<160> 2	
10	<210> 1	
	<211> 23	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótido iniciador U1F	
	<400> 1	
20	CTYAAAKRAA TTGRCGRRR SSC	23
	<210> 2	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótido iniciador U1R	
30	<400> 2	
	CGGGCGGTGT GTRCAARRSS C	21
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 216 682

② Nº de solicitud: 200201300

③ Fecha de presentación de la solicitud: 06.06.2002

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12Q 1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RIVAS, R. et al. "A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species". ELECTROPHORESIS, 2001, Vol. 22, Nº 6, páginas 1086-1089. Ver todo el documento.	1-9
A	WILSON, K.H. et al. "Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction". J. CLIN. MICROBIOL., 1990, Vol. 28, Nº 9, páginas 1942-1946. Ver todo el documento.	1-9
A	MOREIRA, D. et al. "The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world". TRENDS MICROBIOL., 2002, Vol. 10, Nº 1, páginas 31-38. Ver todo el documento.	1-9
A	JENSEN, M.A. et al. "Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms". APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 1993, Vol. 59, Nº 4, páginas 945-952. Ver todo el documento.	1-9

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

21.09.2004

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1