



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 228 217**

② Número de solicitud: 200201570

⑤ Int. Cl.7: **C12Q 1/68**

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **04.07.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2005**

Fecha de la concesión: **16.09.2005**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.10.2005**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.10.2005

⑰ Titular/es:
**Universidade de Santiago de Compostela
Edificio Cactus-CITT-Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑱ Inventor/es: **Carmiña Darriba, Manuel Félix;
Mayan Santos, María Dolores y
Rodríguez-Segade Villamarín, Santiago**

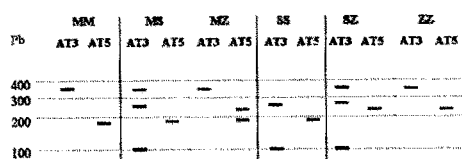
⑳ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Método para identificación de los alelos M, S y Z de α -1-antitripsina con enzimas de restricción.**

⑤⑦ Resumen:

Método para identificación de los alelos M, S y Z de α -1-antitripsina con enzimas de restricción.

El procedimiento es capaz de detectar los alelos normal M y deficientes S y Z del inhibidor de proteasas α -1-antitripsina. Se realizan amplificaciones *in vitro* de los exones III y V del gen de la antiproteasa para generar dos productos que, al incubarse con las enzimas Sex AI y Ava I, permiten realizar la asignación genotípica del paciente, en base a los tamaños de los fragmentos de la digestión enzimática. Es de utilidad en los laboratorios clínicos por su practicabilidad y menor coste con respecto a otros procedimientos establecidos. Es realizable tanto por procedimientos manuales, como adaptable a sistemas automáticos con registros en tiempo real.



ES 2 228 217 B2

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

DESCRIPCIÓN

Método para identificación de los alelos M, S y Z de α -1-antitripsina con enzimas de restricción.

5 Método para identificación de los alelos M, S y Z de alfa-1-antitripsina con enzimas de restricción. El método sirve para la identificación de genotipos de alfa-1-antitripsina y aporta como novedad la utilización de enzimas de restricción.

10 La alfa-1-antitripsina (A1 AT) es el inhibidor de las serin proteasas que se encuentra en mayor concentración en el plasma. Es una glucoproteína de 52 kDa con 394 residuos aminoácidos, sintetizada en el hígado y considerada como una proteína protectora (Long GL, Chandra T, Woo SL, Davie EW, Kurachi K. (1984). "Complete sequence of the cDNA for human α 1-antitrypsin and the gene for the S variant". *Biochemistry*;23:4828-37). Desempeña una función biológica de gran importancia ya que actúa a nivel sanguíneo y tisular protegiendo a los tejidos de ser dañados por la acción proteolítica de serin proteasas liberadas desde los glóbulos blancos (Gadek JE and Cristal RG, (1982): " α -1-Antitripsina deficiency". Ed. McGraw-Hill, Inc. New York pp 1450-1467).

15 El alelo más común en la población europea es el identificado como "M", con una frecuencia alélica de 0.95. El 90% de la población blanca europea posee el genotipo MM y muestran el fenotipo normal, no deficiente. Sin embargo, se conocen dos alelos mutantes, denominados S (*accession n°K02212*) y Z (*accession n°J021619*), con frecuencias alélicas que varían de unas áreas geográficas a otras. Así, mientras que el alelo Z presenta una prevalencia mayor en el noroeste de Europa (>15 por 1000), la prevalencia del alelo S es más alta en la Península Ibérica (supera el 90 por 1000) (Miravittles M, Vidal R, Barros-Tizon JC, Bustamante A, Espana PP, Casas F, Martínez MT, Escudero C, Jordi R. (1998), "Usefulness of a national registry of alpha-1-antitrypsin deficiency. The Spanish experience." *Respir Med.* 92(10):1181-7). Las combinaciones de estos dos alelos, SZ y ZZ, dan lugar a los fenotipos deficientes en la actividad de la alfa-1-antitripsina (A1 AT) que suelen presentar hepatitis y cirrosis, o bien un enfisema pulmonar, porque la alfa-1-antitripsina no está presente en concentración suficiente para inhibir la actividad de las proteasas, o bien porque la alfa-1-antitripsina se sintetiza con una alteración molecular que limitan su actividad normal (Gelehrter & Collins, (1990), "Principles of Medical Genetics" Ed. Williams & Wilkins).

20 Los alelos deficientes, S y Z, de la alfa-1-antitripsina son el resultado de sendas mutaciones puntuales en la región codificante del gen. Así, el alelo S surge como resultado de una transversión en el exón III (SEQ. ID. NO: 1), en la que el codón "gaa" en el alelo normal -M- cambia al codón "gta" en el alelo S, lo que se traduce en la aparición de un aminoácido valina en la posición 264, en la proteína S, mientras que para la proteína M presenta un resto glutámico (Long y col, 1984, *op. cit.*). Por otra parte el alelo Z surge por una transición en el exón V (SEQ. ID. NO: 4), en la que el codón "gaa" cambia para dar lugar al codón "aaa", lo que supone la sustitución del ácido glutámico 342 de la proteína M por una lisina en la proteína Z (Long, y col., 1984 *op. cit.*).

25 La propuesta clásica para la identificación fenotípica de los productos génicos S y Z es la combinación de isoelectrofoque y estudios familiares. Sin embargo, presenta las desventajas de la dificultad de establecer los patrones hereditarios, así como lo engorroso y tedioso de la técnica analítica, por la elevada variabilidad de patrones electroforéticos.

30 Kidd VJ; Wallace RB; Itakura K, Woo SL (1983): alpha 1-antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene. *Nature* 304:230-234; y posteriormente Nukiwa T, Brantly M, Garver R, Paul L, Courtney M, LeCocq JP, Crystal RG (1986): Evaluation of "at risk" alpha 1-antitrypsin genotype SZ with synthetic oligonucleotide gene probes *The Journal of Clinical Investigations*, 77:528-537, desarrollaron un primer procedimiento de genotipado de los pacientes deficientes en A1AT, utilizando sondas oligonucleotídicas, que bajo condiciones estrictas de hibridación, lograban una identificación de los alelos M, S y Z.

35 Más recientemente, se han desarrollado diversos procedimientos de asignación genotípica basados en la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, que frente al procedimiento anterior ofrece la ventaja de la mayor rapidez en la obtención del resultado, mejor practicabilidad en el laboratorio y la posibilidad del análisis con una pequeña fracción de muestra biológica. De entre todos ellos, los de mayor interés son los que utilizan la detección e identificación del producto amplificado en tiempo real utilizando sondas fluorescentes y determinando sus curvas de fusión (Von Ahsen N.; Oellerich M.; Schütz E (2000): Use of Two Reporter Dyes without Interference in a Single-Tube Rapid-Cycle PCR: α 1-Antitrypsin Genotyping by Multiplex Real-Time Fluorescence PCR with the LightCycler, *Clinical Chemistry* 46(2):156-161). Sin embargo, y pese a las ventajas del procedimiento (rapidez, detección en tubo cerrado, reducción del riesgo de contaminación cruzada, etc) presenta el inconveniente de su elevado coste, tanto en reactivos como en instrumento analítico, lo que limita su introducción y expansión en los laboratorios clínicos.

40 En esta invención proponemos un novedoso procedimiento para la asignación genotípica de los estados deficientes de alfa-1-antitripsina, basado en la detección de las mutaciones que dan lugar a los alelos S y Z mediante una digestión enzimática con enzimas de restricción de los fragmentos amplificados por PCR de los exones III y V del gen de la A1AT.

45 La identificación del alelo S se realiza en una incubación post-PCR con la enzima de restricción Sex AI (Figura 1) (SEQ. ID. NO: 7) y el correspondiente corte del producto de PCR en dos fragmentos de menor tamaño de 99 y 263 pares de bases. Para la diferenciación del alelo deficiente Z se utiliza la enzima Ava I, cuya secuencia de restricción

ES 2 228 217 B2

(SEQ. ID. NO: 8) es parcialmente soportada por uno de los cebadores de amplificación (SEQ. ID. NO: 5) y se completa cuando se amplifica el alelo no deficiente M. De tal modo que en presencia del alelo Z no se completa la secuencia de restricción y el producto de PCR no resulta digerido (Figura 2).

5 La visualización de los diferentes fragmentos se realiza por un fraccionamiento electroforético sobre geles submarinos de agarosa al 2% y se tiñe con bromuro de etidium 0.5 $\mu\text{g/mL}$.

Con este procedimiento de identificación de los alelos de alfa-1-antitripsina se reducen los errores de asignación que tienen lugar por el procedimiento de isoelectroenfoque, a la vez que mejora su practicabilidad. Frente a los procedimientos de amplificación en tiempo real requiere una menor inversión económica para su puesta en marcha y el coste por determinación también se reduce sensiblemente.

La identificación de los alelos M, S, o Z, con este procedimiento es susceptible de adaptación a termocicladores en tiempo real y determinado la temperatura de fusión (T_m) de los productos resultantes tras la digestión.

15 Descripción de las figuras

La Figura 1: esquema que representa el lugar de hibridación de dos cebadores AT3for (SEQ. ID. NO: 2) y AT3rev (SEQ. ID. NO: 3) en el exón III del gen de la alfa-1-antitripsina (SEQ. ID. NO: 1), así como el tamaño relativo del producto de la amplificación y de los fragmentos que resultan de la digestión con la enzima Sex AI (SEQ. ID. NO: 7).

La Figura 2: esquema que representa el lugar de hibridación de otros dos cebadores AT5for (SEQ. ID. NO: 5) y AT5rev (SEQ. ID. NO: 6) en el exón V del gen de la alfa-1-antitripsina (SEQ. ID. NO: 4), así como el tamaño relativo del producto de la amplificación y de los fragmentos que resultan de la digestión con la enzima Ava I (SEQ. ID. NO: 8).

La Figura 3: Distribución de bandas de las mezclas de reacción -S y -Z tratadas con las enzimas de restricción Sex AI (SEQ. ID. NO: 7) y Ava I (SEQ. ID. NO: 8), respectivamente, y que permite la asignación genotípica del paciente, tras la separación de los productos de digestión en un gel de agarosa al 2%.

30 Modo de realización

El procedimiento de diagnóstico supone cuatro etapas: A. obtención del DNA genómico a partir de células nucleadas del paciente; B. amplificación por reacción en cadena de la polimerasa; C. digestión con enzimas de restricción; D. visualización e identificación del alelo presente.

Ejemplo I

A. Obtención del DNA genómico de sangre total fresca

- 40 1. 1 mL de sangre venosa anticoagulada con EDTA.
2. Adicionar 1 mL de Ficoll Hypaque (Ammershan-Pharmacia).
- 45 3. Centrifugar a 1000 g durante 5 min.
4. Separar el sobrenadante para tubo limpio y volver a centrifugar como en 3.
- 50 5. El sedimento de células se resuspende en 150 μL de tampón TBS (Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5).
6. Se adiciona 150 μL de tampón de lisis (Tris HCl 400 mM, EDTA 100 mM, SDS 1% pH 8.0) y se agita uno o dos minutos.
- 55 7. Adicionar 25 μL de una disolución de proteinasa K (Boehringer Mannheim (10 mg/mL de agua) e incubar a 1 hora a 56°C.
8. Transferir 300 μL de la digestión de la etapa 7 a un tubo de vacío de 5 mL con gel separador (tipo Vacutainer o Venojet).
- 60 9. Incorporar 1 mL de una mezcla fenol:cloroformo (1:1) (Sigma) y agitar repetidas veces hasta conseguir una emulsión. Centrifugar a 1000 g 2 min.
10. Repetir el paso 9.
- 65 11. Incorporar 1 mL de cloroformo (Sigma), emulsionar y centrifugar como en 9.
12. Transferir 300 μL de la fase superior acuosa a un tubo limpio de 1.5 mL de capacidad.

ES 2 228 217 B2

13. Adicionar 30 μL de acetato amónico 3 M y 750 μL de etanol absoluto frío (-20°C). mezclar varias veces para lograr la precipitación del DNA.
14. Recoger el DNA con espátula estéril o por centrifugación 2 min a 5000 g y lavarlo sin resuspender en etanol frío al 70%. Centrifugar y eliminar el etanol desecando 10 min en concentrador de vacío (tipo Speed vac).
15. Resuspender el DNA en 50-100 μL de agua estéril. Cuantificar a 260 nm y ajustar la concentración a 100 ng/ μL .

10 B. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa

1. Preparar las mezclas de reacción en frío. En sendos tubos de 200 μL para termociclador, dispensar los componentes y volúmenes descritos a continuación para ensamblar una reacciones de 10 μL de volumen final:

	Mezcla-S	Mezcla-Z
a. Agua desionizada estéril	3.2 μL	2.2 μL
b. Tampón de amplificación 10 X	1.0 μL	1.0 μL
c. Cloruro magnésico 25 mM	0.6 μL	0.6 μL
d. Mezcla de dNTP 12 mM	0.2 μL	0.2 μL
e. Dimetilsulfóxido	----	1.0 μL
f. DNA genómico	2.0 μL	2.0 μL
g. Taq DNA polimerasa 0.5 UI/ μL	1.0 μL	1.0 μL

2. Colocar en el termociclador y calentar a 75°C , 1 min.

3. Adicionar las mezclas de cebadores 2.0 μL * 2.0 μL **

* En la Mezcla-S se incorpora 5 pmoles/2 μl de los cebadores SEQ. ID. NO: 2 y SEQ. ID. NO: 3.

** En la Mezcla-Z, se incorporan 5 pmoles/2 μl del cebador SEQ. ID. NO: 5 y 2.5 pmoles/2 μL del cebador SEQ. ID. NO: 6.

4. Programar los siguientes ciclos en un termociclador:

- a. Ciclo 1 (94°C , 1 min) una vez;
- b. Ciclo 2 (94°C , 10 s; 53°C , 2 s; 72°C 10 s); repetir 32 veces;
- c. Ciclo 3 (72°C 1 min); realizar una vez.

C. Digestión con enzimas de restricción

1. Separar 5 μL de la amplificación de la mezcla-S y se le adicionan 5 μL de la disolución de 1 UI de la enzima Sex AI (SEQ. ID. NO: 7) en tampón de trabajo 2X (Tris HCl 20 mM, NaCl 200 mM, MgCl_2 10 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, pH 8.0). Incubar 1 hora a 37°C .
2. Separar 5 μL de la amplificación de la mezcla-Z y se le adicionan 5 μL de la disolución de 1 UI de la enzima Ava I (SEQ. ID. NO: 8) en tampón de trabajo 2X (Tris HCl 20 mM, NaCl 200 mM, MgCl_2 10 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, pH 8.0). Incubar 1 hora a 37°C .

D. Visualización e identificación de los alelos presentes en la muestra

1. Preparar un gel de agarosa al 2% en tampón TBE:

- a. Pesar 1 g de agarosa (MS-8, Pronadisa).
- b. Añadir 50 ml de tampón TBE 0.5X (Tris borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).
- c. Calentar a 90°C hasta obtener una disolución transparente. Dejar enfriar lentamente hasta 60°C .
- d. Verter en un molde horizontal de 5X8 cm hasta conseguir un espesor de 0.5 cm de gel. Colocar un peine adecuado de 3X1 mm cada diente y a una distancia de 1 mm del fondo del gel. Dejar enfriar 30 min.
- e. Sumergir el gel en posición horizontal en una cubeta de electroforesis con tampón TBE 0.5X.

ES 2 228 217 B2

2. Mezclar 10 μL , de cada reacción de digestión, con 2 μL de tampón de carga 6X (tampón TBE 6X, glicerol 60%, azul de bromofenol 0.1%). Aplicar toda la mezcla a un pocillo del gel.
3. Cargar 5 μL del marcador de tamaños EZload 100 bp molecular ruler (BioRad).
4. Conectar los electrodos a una fuente y aplicar 6v/cm durante 20 min.
5. Sumergir el gel 10 min., en 100 mL de una disolución de bromuro de etidium 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
6. Visualizar por transiluminación con luz ultravioleta y digitalizar la imagen.
 - a. Verificar los tamaños de los productos digeridos o no.
 - b. Realizar la asignación genotípica atendiendo a la distribución de bandas que se recoge en la figura 3.

Ejemplo II

A. Obtención del DNA genómico a partir de células del epitelio bucal

1. Obtener células del epitelio bucal con un hisopo de algodón y resuspender las células en 800 μL de suero fisiológico (Cloruro sódico 0.9%) estéril.
2. Centrifugar a 1000 g durante 1 min. Eliminar todo el sobrenadante.
3. Resuspender el sedimento de células en 125 μL de tampón NaOH (10 mM).
4. Calentar la muestra a 95°C durante 5 min con agitación ocasional.
5. Dejar enfriar y centrifugar a 10 000 g durante 5 min.
6. Separar el sobrenadante a un tubo limpio. Utilizar 2 μL de la disolución de DNA para realizar la amplificación.

B. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa

1. Preparar las mezclas de reacción de 10 μL finales en sendos capilares para termociclador con detección en tiempo real:

	Mezcla-S	Mezcla-Z
	Capilar-1	Capilar-2
a. Agua desionizada estéril	5.0 μL	4.0 μL
b. FastStart Sybr Green* (Roche)	1.0 μL	1.0 μL
* Esta mezcla comercial integra todos los componentes necesarios para realizar una reacción de PCR estándar: dNTP, Taq DNA polimerasa, cloruro magnésico, tampón y reactivo de tinción Sybr Green.		
c. Dimetilsulfóxido	---	1.0 μL
d. DNA genómico	2.0 μL	2.0 μL
e. Adicionar las mezclas de cebadores	2.0 μL *	2.0 μL **

- * En la Mezcla-S se incorporan 5 pmoles/2 μL de los cebadores SEQ. ID. NO: 2 y SEQ. ID. NO: 3.
** En la Mezcla-Z, se incorporan 5 pmoles/2 μL del cebador SEQ. ID. NO: 5 y 2.5 pmoles/2 μL del cebador SEQ. ID. NO: 6.

2. Colocar en el termociclador y correr el programa siguiente:
 - a. Ciclo 1 (95°C, 10 min) una vez;
 - b. Ciclo 2 (95°C, 2 s; 53°C, 2 s; 72°C 15 s); repetir 35-40 veces.
3. Realizar un curva de fusión entre 60°C y 90°C para caracterizar el producto formado en la amplificación, registrando la fluorescencia a 595 nm.

ES 2 228 217 B2

C. Digestión con enzimas de restricción

1. Adicionar al capilar de la Mezcla-S 10 μ L de la disolución de enzima Sex AI (SEQ. ID. NO: 6) conteniendo 1 UI enzima y el tampón de trabajo 2X (Tris HCl 20 mM, NaCl 200 mM, MgCl₂ 10 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, pH 8.0).
5
2. Adicionar al capilar de la Mezcla-Z, 10 μ L de la disolución de la enzima Ava I (SEQ. ID. NO: 8) 1 UI enzima y el tampón de trabajo 2X (Tris HCl 20 mM, NaCl 200 mM, MgCl₂ 10 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, pH 8.0).
10
3. Incubar 1 hora a 37°C.
4. Realizar una nueva curva de fusión entre 40°C y 90°C para caracterizar los productos de la digestión.

D. Interpretación

1. La digestión completa del producto en la Mezcla-S por la enzima Sex AI identifica la presencia del alelo S en la reacción, mientras que la no digestión se interpreta con la presencia de alelo M o Z en la muestra del paciente. Si la digestión es parcial se interpreta como heterocigoto con uno de sus alelos S y se completa la asignación con la interpretación de la Mezcla-Z.
20
2. La digestión completa del producto en la Mezcla-Z por la enzima Ava I identifica la presencia del alelo M (o S) en la reacción, mientras que la no digestión supone la presencia de alelo Z. Si la digestión es parcial se interpreta como heterocigoto Z y se completa el genotipo con la interpretación de lo que sucede en la digestión de la Mezcla-S.
25

ES 2 228 217 B2

REIVINDICACIONES

5 1. Método para identificación de los alelos M, S y Z de alfa-1-antitripsina, basado en la utilización de las enzimas de restricción Sex AI (SEQ. ID. NO: 7) y Ava I (SEQ. ID. NO: 8) que comprende las siguientes etapas:

10 a) Amplificación por PCR de un fragmento de 352 pares de bases del exón III del gen de la alfa-1-antitripsina (SEQ. ID. NO: 1), delimitado por el cebador AT3for (SEQ. ID. NO: 2) 5'-actgtaagaa gctgtccagc -3' y el cebador AT3rev (SEQ. ID. NO: 3) 5'-cctcatggag catggatg-3', y que incluye el punto de mutación que da origen al alelo deficiente S frente al normal M.

15 b) Amplificación por PCR de un fragmento de 230 pares de bases del exón V del gen de la alfa-1-antitripsina presente en muestras de DNA genómico humano delimitado por los cebadores AT5for (SEQ. ID. NO: 5) 5'-cccctccagg cgtgcataa ggctgtgctg accatcctc-3' y el cebador AT5rev (SEQ. ID. NO: 6) 5'-aggggagggg ttgaggagcg-3', y que incluye el punto de mutación que da origen al alelo deficiente Z frente al normal M. Además, el primer cebador (SEQ. ID. NO: 5), en su extremo 3', soporta parte de la secuencia de restricción de la enzima Ava I (ctcgag) (SEQ. ID. NO: 8) que se completa al amplificarse el alelo normal M.

20 c) Digestión del producto obtenido del exón III con la enzima de restricción Sex AI (SEQ. ID. NO: 7); la obtención de dos fragmentos de tamaños 99 y 253 pares de bases identifica la presencia del alelo S, mientras la no digestión se corresponde con la presencia de los alelos M o Z.

25 d) Digestión del producto obtenido del exón V con la enzima de restricción Ava I (SEQ. ID. NO: 8). La obtención de dos fragmentos de tamaños 40 y 190 pares de bases identifica la presencia del alelo M o S, mientras la no digestión se corresponde con la presencia del alelo Z.

30 e) Los diferentes genotipos de alfa-1-antitripsina MM, MS, MZ, SS, SZ y ZZ se identifican en función de las combinaciones de los tamaños de los fragmentos de restricción con las dos enzimas propuestas.

35 2. Uso del método, según la reivindicación 1, para la identificación del genotipo de un paciente en laboratorios clínicos que permite establecer el diagnóstico del estado deficiente en alfa-1-antitripsina.

35

40

45

50

55

60

65

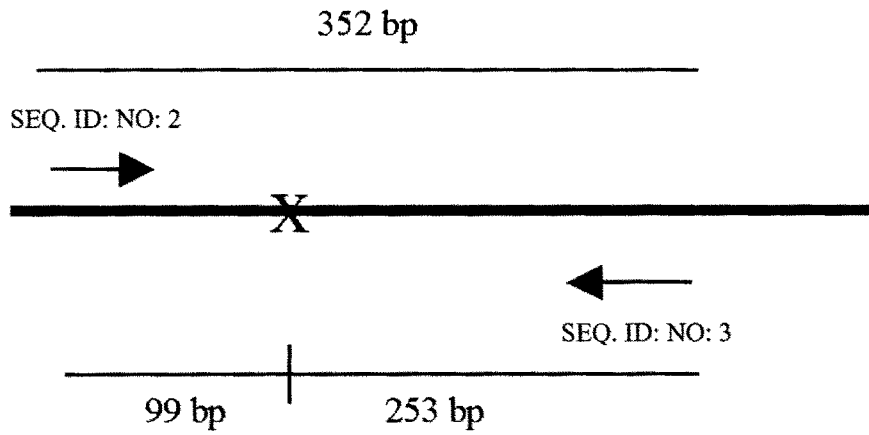


FIGURA 1

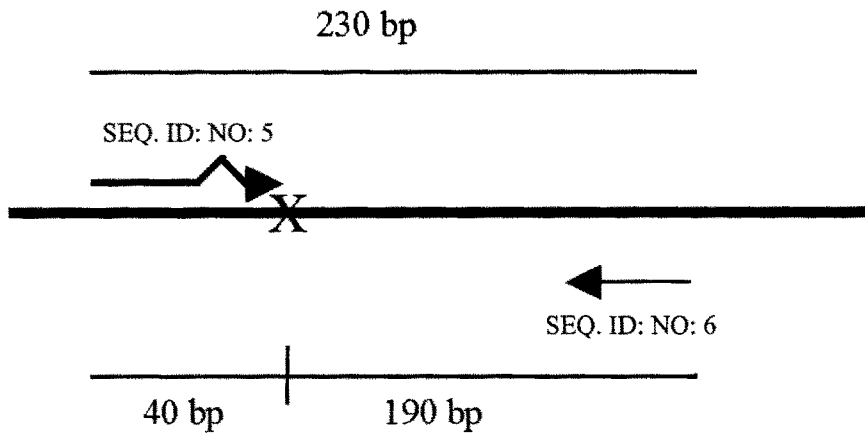


FIGURA 2

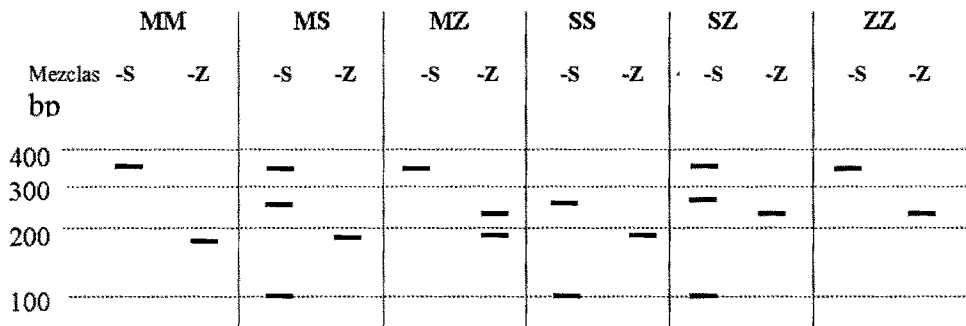


FIGURA 3

ES 2 228 217 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5 <120> Identificación de los alelos normal M y deficientes S y Z de la alfa-1-antitripsina con enzimas de restricción

<130> alfa-1-antitripsina enzimas de retricción

<150> P200201570

<151> 2002-07-04

10 <160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> SEQ. ID. NO: 1; Exón III alfa-1-antitripsina

15 <211> 502

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<300>

20 <308> K02212

<400> SEQ. ID. NO: 1

25 tttgaagtca aggacaccga ggaagaggac ttccacgtgg accaggtgac cacctggaag 60
 gtgcctatga tgaagcgttt aggcattgtt aacatccagc actgtaagaa gctgtccagc 120
30 tgggtgctgc tgatgaaata cctgggcaat gccaccgcca tcttcttctt gctgatgag 180
 gggaaactac agcacctggt aatgaactc acccagcata tcatcaccaa gttcctggaa 240
 aatgaagaca gaaggtgatt cccaacctg agggtgacca agaagctgcc cacacacctc 300
35 ttagccatgt tgggactgag gccatcagg actggccaga gggctgagga gggatgaacc 360
 cacatccctg ggtcactgct actctgtata aacttggtt ccagaatgag gccaccactg 420
40 agttcaggca gcgccatcca tgctccatga ggaggacagt acccagggatg aggaggtaaa 480
 ggctctgtcc ctggggactt cc 502

45 <210> SEQ. ID. NO: 2; oligonucleótido cebador para exon III

<211> 20

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

50 <400> SEQ. ID. NO: 2

actgtaagaa gctgtccagc

20

55 <210> SEQ. ID. NO: 3; oligonucleotido cebador reverso para exón III

<211> 18

<212> DNA

60 <213> *Homo sapiens*

<400> SEQ. ID. NO: 3

cctcatggag catggatg

18

65 <210> SEQ. ID. NO: 4; Exón V alfa-1-antitripsina

<211> 482

ES 2 228 217 B2

<212> DNA

<213> *homo sapiens*

<308> J02619

5 <400> SEQ. ID. NO: 4

	catcagccaa agccttgagg aggagcaagg cctatgtgac agggagggag aggatgtgca	60
10	gggccagggc cgtccagggg gagtgagcgc ttctggggag gtgtccacgt ggccttgct	120
	cgacgcctgg gatcagcctt acaacgtgtc tctgcttctc tcccctccag gccgtgcata	180
15	aggctgtgct gaccatcgac gagaaagggg ctgaagctgc tggggccatg ttttagagg	240
	ccatacccat gtctatcccc cccgaggtca agttcaacaa accctttgtc ttcttaatga	300
	ttgaacaaaa taccaagtct cccctcttca tgggaaaagt ggtgaatccc acccaaaaat	360
20	aactgcctct cgctcctcaa cccctcccct ccatccctgg cccctccct ggatgacatt	420
	aaagaagggt tgagctggtc cctgcctgca tgtgactgta aatccctccc atgttttctc	480
25	tg	482

<210> SEQ. ID. NO: 5; oligonucleótido cebador para exón V

<211> 39

30 <212> DNA

<213> *homo sapiens*

<400> SEQ. ID. NO: 5

35 cccctccagg ccgtgcataa ggctgtgctg accatcctc 39

<210> SEQ. ID. NO: 6; oligonucleótido cebador reverso para exón V

<211> 20

40 <212> DNA

<213> *homo sapiens*

<400> SEQ. ID. NO: 6

45 aggggagggg ttgaggagcg 20

<210> SEQ. ID. NO: 7; secuencia diana de la enzima de restricción Sex AI

<211> 7

50 <212> DNA

<213> *homo sapiens*

<400> SEQ. ID. NO: 7

55 acc(a,t)ggt 7

<210> SEQ. ID. NO: 8; secuencia diana de la enzima de restricción Ava AI

<211> 6

60 <212> DNA

<213> *homo sapiens*

<400> SEQ. ID. NO: 8

65 c(t,c)cg(a,g)g 6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 228 217

② Nº de solicitud: 200201570

③ Fecha de presentación de la solicitud: **04.07.2002**

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	ANDRESEN BRAGE S. et al. "Two Novel Nonradioactive Polymerase Chain Reaction-Based Assays of Dried Blood Spots, Genomic DNA or Whole Cells for Fast, Reliable Detection of Z and S Mutations in the alpha1-Antitrypsin Gene". Clinical Chemistry, Vol. 38, Nº 10, 1992, páginas 2100-2107.	1,2
A	EP 332435 A1 (IMPERIAL CHEMICAL IND. PLC) 09.03.1989, reivindicaciones 1-3; página 28, líneas 33-50.	1,2

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

28.02.2005

Examinador

L. Serifá Ramírez

Página

1/1