



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 277 536**

(21) Número de solicitud: **200502458**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación: **13.12.2005**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2007**

Fecha de la concesión: **12.05.2008**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **16.06.2008**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

(73) Titular/es: **Universidad de Málaga
Plaza de El Ejido, s/n
29071 Málaga, ES**

(72) Inventor/es: **Porta Pelayo, Javier;
Porta Pelayo, José María y
Álvarez Herrero, María del Carmen**

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Método molecular para el estudio genético de poblaciones y el análisis de pedigrí de la dorada (*Sparus aurata*) y kit correspondiente (*Sparus aurata genotyping and paternity tool kit*).**

(57) Resumen:

Método molecular para el estudio genético de poblaciones y el análisis de pedigrí de la dorada (*Sparus aurata*) y kit correspondiente (*Sparus aurata genotyping and paternity tool kit*).

Se presenta una herramienta molecular basada en marcadores microsatélites, consistente en la coamplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y el análisis de 10 loci, permitiendo, de una forma rápida y fiable, la obtención de suficientes datos de un individuo o grupo de individuos para llevar a cabo estudios de poblaciones, establecer relaciones de parentesco o de pedigrí con gran precisión. Esta información permite controlar e incluso mejorar las características de los stocks reproductores de dorada. Además, este protocolo ha sido adecuado para la detección y análisis automático en equipos de secuenciación AB (Applied Biosystem). Se presenta asimismo un kit con tres posibles formatos que permite la estandarización y automatización del método de forma sencilla y completamente reproducible.

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

DESCRIPCIÓN

Método molecular para el estudio genético de poblaciones y el análisis de pedigrí de la dorada (*Sparus aurata*) y kit correspondiente (*Sparus aurata genotyping and paternity tool kit*).

5

Sector de la técnica

Tipificación genética; Identificación por genotipado, pedigrí y parentesco molecular.

10 **Estado de la técnica**

La dorada (*Sparus aurata*), es una especie ampliamente distribuida por el mar Mediterráneo y la costa Atlántica desde las Islas Británicas hasta la Isla de Cabo Verde e Islas Canarias. Además, la dorada representa una de las especies con mayor importancia en acuicultura marina, sobre todo en área del Mediterráneo. Los principales productores son 15 Grecia, Turquía, España, Italia y Francia. Otras producciones menores se dan en Portugal, Croacia, Chipre, Israel, Malta, Egipto, Túnez y Marruecos, mientras que hay producciones incipientes en Albania, Argelia y Libia. En España, la evolución del consumo aparente de dorada crecerá en el periodo 2003-2006 de un 18% a un 22,1% anualmente, según se den las condiciones de crecimiento de renta y oferta de pescado blanco en un escenario medio u optimista, para superar en 2006 las 37.000 ó 43.000 Tm respectivamente, sin tener en cuenta el efecto positivo que tendría la 20 posible comercialización de transformados y de nuevas presentaciones de las especies.

El éxito de la acuicultura moderna se basa en el control sobre la reproducción de las especies, en el mejor conocimiento de su biología, y en las innovaciones tecnológicas. Sin embargo, en el cultivo de Dorada son muchas las 25 dificultades que surgen en el control y manejo de los *stocks* reproductores, debido fundamentalmente al elevado número de individuos que se manejan, la dificultad para identificar a los padres o de identificar huevos o larvas en los primeros meses de desarrollo. Estos y otros aspectos imposibilitan un control integral de la reproducción de esta especie en cautividad y por tanto, de su domesticación. De la misma forma el control de la trazabilidad supone un reto para garantizar la seguridad alimenticia de los productos derivados de la explotación comercial de esta especie, tanto de su origen cultivado como procedente de la pesca.

30 Llegados a este punto, resulta imprescindible contar con herramientas precisas que nos permitan conocer y evaluar la estructura genética de las poblaciones tanto salvajes como cultivadas y así trascender de una forma objetiva a la conservación genética de sus recursos. En la actualidad se pueden encontrar en distintas bases de datos, abundante 35 información sobre secuencias de ADN descritas para *S. aurata*. Esta información permite llevar a cabo la tipificación de individuos de formas muy variadas. Sin embargo hasta la actualidad, no se han estandarizado ningún método para llevar a cabo dicha tipificación genética para la dorada.

40 Se presenta una nueva herramienta molecular basada en marcadores microsatélites. Esta herramienta consiste en la coamplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de 10 loci conjuntamente, de manera que, de una forma rápida y fiable se obtienen suficientes datos de un individuo o grupo de individuos como para llevar a cabo estudios de poblaciones, establecer relaciones de parentesco o de pedigrí con una gran precisión. Además, demostramos la utilidad de esta herramienta en la caracterización genética de poblaciones naturales y cultivadas, así como en la reconstrucción del pedigrí en puestas obtenidas en una empresa del sector. Esta información 45 permite controlar e incluso mejorar las características de los *stocks* reproductores de dorada.

45 La selección de los marcadores empleados, la optimización de las condiciones de 2 reacciones de PCR (Reacción A y reacción B), la caracterización de los loci empleados y su adaptación al análisis automático, suponen el sustrato de la presente solicitud. Además, este protocolo ha sido adecuado para la detección y análisis automático en equipos de secuenciación AB (Applied Biosystem). A partir de estos resultados se presenta un kit con tres posibles formatos 50 comercializables que permite la estandarización y automatización de la técnica de genotipado de una forma sencilla y completamente reproducible.

55 El empleo del protocolo desarrollado o de los productos derivados de este (*kit*) presentan entre otras las siguientes ventajas:

- El método implementado de PCR múltiplex reduce el tiempo y coste de la técnica, minimizando el riesgo de errores de manejo, ya que reduce considerablemente la manipulación.
- Metodología sencilla, sólida y reproducible que asegura unos resultados precisos.
- Para realizar estos análisis tan solo es necesario una pequeña cantidad de ADN (aprox. 50 ng), que puede obtenerse de cualquier tipo de muestra que contenga células nucleadas, sin causar daño al animal, tales como huevos, larvas, trozo de aleta, sangre, trozos de tejidos de peces muertos o despiezados e incluso procesados.
- Estandarización de los loci empleados y posible comparación de resultados de distintos trabajos realizados con esta herramienta.

- Los loci empleados son altamente informativos y han sido probados en la identificación de individuos, en estudios de pedigrí y caracterización de poblaciones con resultados muy satisfactorios.

Si bien se han descrito métodos de genotipado desarrollados para otros organismos (humanos y otras especies 5 domésticas de animales como caballos, perros, vacas, etc.), no existe antecedente alguno para peces y en concreto para el caso de la dorada. Por otra parte, para realizar análisis similares a los que se pueden llevar a cabo con esta herramienta, se podrían usar otros de los muchos loci existentes en la bibliografía, bien mediante la estrategia de PCR sencilla o de múltiple. No obstante, ello conllevaría un importante esfuerzo adicional consistente en: a) elegir en cada 10 caso loci con un alto polimorfismo y que presenten patrones amplificables bien definidos; b) ajustar las condiciones de la PCR; c) investigar la posible ocurrencia de alelos nulos; d) probar su utilidad con muestras reales.

Descripción detallada de la invención

Los marcadores moleculares tipo microsatélite son secuencias de ADN repetido que se distribuyen aleatoriamente 15 a lo largo del genoma de los organismos y que constituyen zonas muy variables y por tanto, distintas de unos individuos a otros. Estudiando estas regiones podemos distinguir a un individuo del resto de individuos de la misma especie con una altísima precisión. Esto es lo que significa la tipificación genética o genotipado de un individuo. La herramienta propuesta permite también realizar estudios de pedigrí para identificar los padres biológicos de un individuo concreto. Cuanto más numerosas y variables son estas regiones que estudiamos, mayor precisión se obtiene.

20 La invención consiste en un protocolo optimizado para el estudio de 10 de estos marcadores en la dorada, *Sparus aurata* (*Sparus aurata* genotyping and paternity tool). Se describe la coamplificación (PCR multiplex), mediante 2 reacciones simultáneas (denominables como A y B) de 10 marcadores microsatélites (loci) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando para ello cebadores específicos de cada microsatélite. Se incluye 25 la selección de loci, la composición de cada una de las reacciones (A amplifica 6 loci y la B, 4 loci), las condiciones bajo las que se llevan a cabo, así como su adaptación para el análisis automático mediante fluorescencia. Ambas reacciones pueden emplearse bien de forma individual o conjunta.

Los objetivos finales de la detección automática consisten en optimizar las condiciones para hacer el análisis en 30 secuenciadores automáticos del tipo AB 310, 3100, 3130 y 3130 Avance (Applied Biosystem). No obstante, cambiando el marcaje con fluorocromos, esta herramienta podría igualmente ser empleada con otros equipos de análisis de marcadores genéticos.

35 Esta método se puede llevar a cabo mediante un producto comercializable consistente en un *kit* con tres presentaciones posibles que permiten la estandarización y automatización de la técnica de genotipado de una forma sencilla y completamente reproducible.

Estas tres presentaciones o formatos consisten en reacciones de PCR de varios loci, cuyas disoluciones principales 40 se suministran preparadas en proporciones óptimas. A partir de estas soluciones y del ADN del individuo se llevan a cabo las reacciones siguiendo un protocolo detallado. Se contempla también la posibilidad de presentaciones comercIALIZABLES adicionales en las que los componentes del *kit* se proporcionen liofilizados y sólo se requiera añadir la muestra e hidratar la mezcla para que se puedan desarrollar las reacciones. Las principales presentaciones del *kit*, independientemente de que comprendan reactivos en una u otra forma, son: *Sparus aurata genotyping and paternity tool kit sixplex*, en la que se amplifican conjuntamente 6 loci (anteriormente nos hemos referido a ella como Reacción 45 A y lo seguiremos haciendo a fin de simplificar su lectura). *Sparus aurata genotyping and paternity tool kit fourplex* (a la que nos referiremos como Reacción B), en la que se amplifican conjuntamente 4 loci y *Sparus aurata genotyping and paternity tool kit six+fourplex* (como Reacción A+B) en la que se comercializan ambas reacciones. El modo de empleo irá descrito en un protocolo detallado.

50 Este método se ha probado con excelentes resultados, en la identificación de individuos y determinación del pedigrí en individuos nacidos en una granja de doradas, aspecto de singular importancia en el cultivo de peces en los que no es posible hacer un seguimiento de los reproductores que realmente participan en las puestas, a menos que se haga fecundación artificial. Además esta herramienta se ha probado en la caracterización genética de una población de 50 individuos procedentes del medio natural.

55 Este método se puede emplear para controlar la estructura genética de los *stocks* y así mantener niveles de variabilidad acordes con una óptima eficiencia biológica, aplicar métodos de selección y/o facilitar un seguimiento preciso de los procesos de reproducción, cría, comercialización y trazabilidad. Este control de los *stocks* cultivados permitiría evitar posibles desastres ecológicos en las poblaciones naturales, tras posibles escapes o repoblación.

60 El desarrollo de la metodología y el empleo de los productos se detallan a continuación:

- Selección de los loci y sus correspondientes cebadores
- Condiciones de las PCR tipos A y B.
- Caracterización de los loci empleados el las PCR A y B.

ES 2 277 536 B1

- Condiciones requeridas para su análisis automático mediante fluorescencia
- Desarrollo de un producto *kit* comercializable
- 5 - Sensibilidad del método.

Selección de los loci y cebadores

De un total de 20 loci probados, se seleccionaron 10 loci, por sus características de amplificación y tamaño. 10 Finalmente, se emplean 20 cebadores (2/locus), 12 para la reacción A, donde se amplifican 6 loci y 8 para la reacción B donde se amplifican 4 loci. En la siguiente tabla se muestra el nombre del los 10 loci del conjunto, el número de acceso a la base de datos Genebank, reacción en la que se incluye la secuencia de los cebadores (*Forward* y *Reverse*), así como los autores que los describieron.

15	Locus	Nº Acceso	Reacción	Secuencia 5'- 3'	SEQ ID NO	Autores
20	Sau E82	AY173035	A	Forward- ATTGGGTGGCAGTTAGTAGG Reverse-CACTGCGATGAGTGACCC	1 2	Launey et al., 2003
25	Sal 12	AY322108	A	Forward-ACGGTATGGAGTCAACTGC Reverse-CCCCTTTGGTACATCATAG	3 4	Brown et al., No publicado
30	Sau K140	AY173042	A	Forward- TTTCACTGAGCTGGAGACTTG Reverse-AGAGTTGAGTCTGTTGCATGC	5 6	Launey et al., 2003
35	Sal 15	AY322110	A	Forward- ACACTGTCTTCTGTCCTCACAC Reverse-GAGTAACACAGCCTCAGTTGAAGC	7 8	Brown et al., No publicado
40	Sau AN	AY173032	A	Forward- TGTTGGAGCTTGTGGTACAC Reverse-GAGCTGTAAACCGCTCAGG	9 10	Launey et al., 2003
45	Sau I47	AY173041	A	Forward- ACAGTACCCCCTGTCTCC Reverse-CCATATCATTACACTGTGGC	11 12	Launey et al., 2003
50	pSAGT26	Y17266	B	Forward- GCCTCTCAACCGTATGTAG Reverse-TGGTGATATTTATGCATCTAG	13 14	Batargias et al., 1999
55	Sal 19	AY322111	B	Forward- ATTCTTCACAGGGCCAAACACAAA Reverse-GAAAACACCGGGCCCAGTACGA	15 16	Brown et al., No publicado
60	Sal 10	AY322107	B	Forward- TCACGGGGGACCAAGACTG Reverse-CTCACACTGCCTAATTAGCACAGA	17 18	Brown et al., No publicado
65	Sau E97	AY173036	B	Forward- ACATTCATGTGTAATCGG Reverse-TTGGAAAGAACAGAAATCTAATG	19 20	Launey et al., 2003

Condiciones de las PCR tipos A y B

Las condiciones son las generales de cualquier protocolo de amplificación por PCR, entre las que figuran la presencia de polimerasa termoestable, dNTPs (desoxirribonucleosido trifosfato); condiciones de fuerza iónica [CIMg²⁺] y un pH adecuados para la actividad de la enzima. Sin embargo, para la amplificación óptima y equilibrada de los distintos *loci* son necesarios unas condiciones de ciclo y proporciones de reactivos y cebadores muy específicas.

Los resultados de la optimización de las reacciones A y B se describen a continuación (entre paréntesis se presentan las concentraciones de partida de las soluciones stock de cada reactivo):

Reacción A

- Condiciones de ciclo: 5 minutos a 95°C, 20 ciclos de (30 segundos 95°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos 72°C.
- Proporción de reactivos: 1 μ l de ADN (50 - 500 ng), 1 μ l de Buffer (10X), 1 μ l de CIMg₂ (15 mM), 1 μ l de dNTPs (2 mM), 3 μ l de primer mix A (5 pmol/ μ l), 3 μ l de H₂O bidestilada estéril, 0.2 μ l de Taq Gold (5 U/ μ l; Applied Biosystem).
- Proporciones de cebadores (*primer mix A*): 6 de Sal 15 (5 pmol/ μ l), 2 de Sal 12 (5 pmol/ μ l), 2.5 de Sal 147 (5 pmol/ μ l), 4 de Sau K140 (5 pmol/ μ l), 6 de Sau AN (5 pmol/ μ l) y 3 de Sau E82 (5 pmol/ μ l).

Reacción B

- Condiciones de ciclo: 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de (30 segundos 95°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C), seguido de 7 minutos 72°C.

ES 2 277 536 B1

- Proporción de reactivos: 1 μ l de ADN (50 - 500 ng), 1 μ l de Buffer (10X), 1 μ l de ClMg₂ (15 mM), 1 μ l de dNTPs (2 mM), 3 μ l de primer mix B (5 pmol/ μ l), 3 μ l de H₂O bidestilada estéril, 0,2 μ l de Taq Gold (5 U/ μ l; Applied Biosystem).

5 - Proporción de cebadores (*primer mix B*): 8 de Sau E97 (5 pmol/ μ l), 4 de SaI 10 (5 pmol/ μ l), 8 de pSAGT26 (5 pmol/ μ l) y 1.5 de SaI 19 (5 pmol/ μ l).

Caracterización de los loci empleados en las Reacciones A y B

10 Para la caracterización de los 10 loci se realizó un estudio en muestras de DNA de 50 doradas obtenidas del medio natural. Los resultados se detallan a continuación. La probabilidad de identidad representa la inversa del número de individuos que deben ser analizados antes de encontrar el mismo genotipo en una muestra seleccionada al azar. El poder de exclusión se refiere a la probabilidad de que un adulto escogido al azar sea excluido como parental de un descendiente.

15

Locus	Repetición	Nº alelos	Rango de alelos	Prob. Alelos nulos	Poder de exclusión	Probabilidad de identidad
pSAGT26	GT	18	200-258	-0.0407	0.656	0.0033
20 Sau E82	GT	10	154-182	0.0062	0.669	0.0034
SaI 12	GT	23	104-152	0.0197	0.702	0.0033
SaI 19	GT	19	226-282	-0.0084	0.766	0.0017
25 SaI 10	GT	17	194-224	-0.0539	0.744	0.002
Sau K140	GT	14	127-161	-0.0123	0.660	0.0028
30 Sau E97	GT	21	161-203	0.0274	0.723	0.0022
SaI 15	GT	29	96-160	0.0031	0.892	0.0007
Sau AN	GT	9	145-165	-0.0016	0.403	0.013
35 Sau I47	GT	10	117-137	-0.0232	0.360	0.012
Reacción A		95	96-224		0.998612	2.37 x 10 ⁻¹¹
Reacción B		75	161-282		0.994304	3.16 x 10 ⁻¹⁵
Reacción A+B		170	96-282		0.999992	2.13 x 10 ⁻³¹

Sensibilidad del método

40 El alto poder de exclusión de esta herramienta permite que en muchos estudios no sea necesario el empleo de los diez loci. Por ello, el método se divide en dos reacciones A (de 6 loci) y B (de 4 loci) que además pueden ser empleadas conjuntamente A+B (6+4 loci) para conseguir el mayor poder discriminatorio.

45 Mediante *Sparus aurata genotyping and paternity tool kit A+B* se consigue un valor Mp de 2.13048 e⁻³¹, lo que indica que la probabilidad de que dos individuos presenten la misma huella de identidad es prácticamente cero.

Además, *Sparus aurata genotyping and paternity tool kit A+B* permite realizar estudios de pedigrí mediante métodos de exclusión molecular. La exclusión directa de la paternidad significa que cuando un hijo tiene una información genética que no tiene ni la madre ni el presunto padre, ambos deben ser excluidos como padres biológicos. El poder de exclusión de estas herramientas se puede medir mediante estimadores de exclusión (Valor de Exclusión 1 cuando ninguno de los parentales es conocido y Valor de Exclusión 2 cuando al menos conocemos uno de los padres). *Sparus aurata genotyping and paternity tool kit* proporciona valores de exclusión 1 y 2 de 0.999789 y 0.999998, respectivamente, lo que evidencia. De la misma forma la siguiente tabla muestra la sensibilidad de las reacciones A, B y A+B.

Reacciones	Mp	V. de Exclusión 1	V. de Exclusión 2
B	2,37469 e ⁻¹¹	0.969	0.9943
A	3,16078 e ⁻¹⁵	0.9860	0.99861
A+B	2.13048 e ⁻³¹	0.999789	0.999998

Condiciones requeridas para su análisis automático mediante fluorescencia

65 Para el análisis automático de las muestras mediante fluorescencia es necesario marcar uno de los cebadores de cada pareja con una molécula fluorescente. Existen varias empresas que suministran cebadores marcados hasta con 5 rangos de fluorescencia, lo cual permite discernir moléculas de loci distintos aunque tengan el mismo tamaño.

ES 2 277 536 B1

En las reacciones A y B, los distintos cebadores deben presentar diferentes señales de fluorescencia. En el siguiente cuadro y de forma general, se muestran como 1, 2, 3, y 4 los diferentes marcas. El tipo de moléculas para el marcaje depende del tipo de aparato secuenciador empleado.

5

10

15

20

25

30

35

45

50

55

60

65

Locus	Etiquetas	Reacción
Sau E82	4	A
SaI 12	4	A
Sau K140	1	A
SaI 15	3	A
Sau AN	2	A
Sau I47	2	A
pSAGT26	4	B
SaI 19	1	B
SaI 10	1	B
Sau E97	3	B

Desarrollo de un producto (kit) comercializable

Este protocolo permite la estandarización y automatización de la técnica de tipificación o genotipado de forma sencilla y completamente reproducible. Los kits desarrollados se basan en la metodología descrita con anterioridad, con la particularidad de que los cebadores están marcados con etiquetas fluorescentes específicas para el análisis en secuenciadores automáticos tipo AB 310, 3100, 3130 y 3130 Avance (Applied Biosystem).

Las etiquetas fluorescentes descritas anteriormente son las siguientes: 1 corresponde a 6-FAM (Applied Biosystem), 2 corresponde a NED (Applied Biosystem), 3 corresponde a PET (Applied Biosystem) y la 4 corresponde a VIC (Applied Biosystem).

Descripción de los dibujos

Fig. 1. Esquema simplificado del método objeto de protección.

Fig. 2. Esquema simplificado de un modo de realización preferido (determinación del pedigrí). Contrastación de la huella de ADN de un individuo con la de sus supuestos progenitores (método de exclusión). Estos análisis permiten determinar la paternidad de un individuo con una fiabilidad prácticamente del 100%. Los círculos indican loci excluyentes.

Modos de realización de la invención

Para el caso de un modo o ejemplo de realización consistente en el tipificado o genotipado de una muestra se describe el siguiente protocolo. La exposición que sigue no pretende ser limitativa en su alcance.

Muestras y obtención de ADN genómico

Para llevar a cabo la tipificación de un individuo es necesaria una pequeña cantidad de ADN genómico, en un rango de 50 a 500 ng. Este protocolo se ha ensayado con distintos métodos de extracción: mediante precipitación salina y resinas de Chelex®, así como con distintos tipos de muestras: huevos (24 horas o más), larvas, sangre, músculo y aleta caudal. Todos estos métodos proporcionan ADN cualitativa y cuantitativamente idóneo para la obtención resultados altamente fiables, si bien combinando muestras y estrategias alternativas, es posible optimizar los resultados.

ES 2 277 536 B1

PCR de las reacciones

Reacción A;		Reactivos	Concentración	Volumen
Temperatura	Tiempo			
95 °C 95 °C 58 °C 72 °C 72 °C	5 min	20 ciclos	DNA	50-500 ng/μl
	30 seg		Buffer	10 X
	30 seg		ClMg	15 mM
	30 seg		dNTP	2 mM
	30 seg		Primer mix	5 pmol/μl
	7 min		H2O	3 μl
			Taq	5 U/μl
		Total		0,2 μl
				10 μl

Reacción B;		Reactivos	Concentración	Volumen
Temperatura	Tiempo			
95 °C 95 °C 58 °C 72 °C 72 °C	5 min	25 ciclos	DNA	50-500 ng/μl
	30 seg		Buffer	10 X
	30 seg		ClMg	15 mM
	30 seg		dNTP	2 mM
	30 seg		Primer mix	5 pmol/μl
	7 min		H2O	3 μl
			Taq	5 U/μl
		Total		0,2 μl
				10 μl

Preparación de los productos de la Reacción A, B y A+B para su carga en el secuenciador

Preparación de la Reacción A; Añadir 0,5 μl de la Reacción A, 0,5 μl de 500 LIZ™ Size Standard (Applied Biosystem) y 10 μl de formamida desionizada. Desnaturalizar 10 minutos a 94°C y poner en frió hasta su carga en el aparato.

Preparación de la Reacción B; Añadir 2 μl de la Reacción B, 0,5 μl de 500 LIZ™ Size Standard (Applied Biosystem) y 10 μl de formamida desionizada. Desnaturalizar 10 minutos a 94°C y poner en frió hasta su carga en el aparato.

Preparación de la mezcla de reacciones A y B; Añadir 0,5 μl de la reacción A, 2 μl de la reacción B, 0,5 μl de 500 LIZ™ Size Standard (Applied Biosystem) y 10 μl de formamida desionizada. Desnaturalizar 10 minutos a 94°C y poner en frió hasta su carga en el aparato.

50 Parámetros de separación electroforética y obtención automática de los datos

Módulo: GS STR POP4 (1 ml) G5.md5

55 Matriz: Matrix standard set DS33

Parámetros: GS500Analysys.gsp

Voltaje de carrera: 15000 voltios

60 Voltaje de inyección: 15000 voltios

Duración de inyección: 7 segundos

Temperatura: 60°C

65 Poder del láser: 9 mWatos

REIVINDICACIONES

5 1. Método molecular para el estudio genético de poblaciones y el análisis de pedigrí de la dorada (*Sparus aurata*) **caracterizado** porque consiste en el análisis de 10 marcadores microsatélites o loci (con los oligonucleótidos correspondientes) a través de su coamplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

10 2. Método molecular para el estudio genético de poblaciones y el análisis de pedigrí de la dorada (*Sparus aurata*) según la reivindicación anterior que consiste en la coamplificación de 10 loci (Sau E82, SaI 12, Sau K140, SaI 15, Sau AN, Sau 147, pSAGT26, SaI 19, SaI 10 y Sau E97), usando cebadores específicos para cada uno de ellos (SEQ ID NO 1 a 20), marcados con “etiquetas fluorescentes” que permitan el análisis automática de las muestras mediante fluorescencia.

15 3. Método molecular para el estudio genético de poblaciones y el análisis de pedigrí de la dorada (*Sparus aurata*) según la reivindicación anterior en la que dicha coamplificación comprende 2 reacciones, denominables como “reacción A” y “reacción B”, en las que se amplifican separadamente 6 (Sau E82, SaI 12, Sau K140, SaI 15, Sau AN y Sau 147) y 4 loci (pSAGT26, SaI 19, SaI 10 y Sau E97), respectivamente, pudiendo emplearse ambas reacciones de forma individual o conjunta.

20 4. Método molecular para el estudio genético de poblaciones y el análisis de pedigrí de la dorada (*Sparus aurata*) según la reivindicación anterior **caracterizado** porque la denominable “reacción A” comprende las siguientes características técnicas:

- 25 - Condiciones de ciclo: 5 minutos a 95°C, 20 ciclos de (30 segundos 95°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C, seguido de 7 minutos 72°C).
- 30 - Proporción de reactivos: 1 μ l de ADN (50 - 500 ng), 1 μ l de tampón (10X), 1 μ l de ClMg₂ (15 mM), 1 μ l de dNTPs (2 mM), 3 μ l de “primer mix A” (5 pmol/ μ l), 3 μ l de H₂O bidestilada estéril, 0,2 μ l de Taq Gold (5 U/ μ l; Applied Biosystem).
- 35 - Proporciones de cebadores (*primer mix A*): 6 de SaI 15 (5 pmol/ μ l), 2 de SaI 12 (5 pmol/ μ l), 2,5 de Sau I47 (5 pmol/ μ l), 4 de Sau K140 (5 pmol/ μ l), 6 de Sau AN (5 pmol/ μ l) y 3 de Sau E82 (5 pmol/ μ l).

40 5. Método molecular para el estudio genético de poblaciones y el análisis de pedigrí de la dorada (*Sparus aurata*) según la reivindicación 3 **caracterizado** porque la denominable “reacción B” comprende las siguientes características técnicas:

- 45 - Condiciones de ciclo: 5 minutos a 95°C, 25 ciclos de (30 segundos 95°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C), seguido de 7 minutos 72°C.
- 50 - Proporción de reactivos: 1 μ l de ADN (50 - 500 ng), 1 μ l de tampón (10X), 1 μ l de ClMg₂ (15 mM), 1 μ l de dNTPs (2 mM), 3 μ l de “primer mix B” (5 pmol/ μ l), 3 μ l de H₂O bidestilada estéril, 0,2 μ l de Taq Gold (5 U/ μ l; Applied Biosystem).
- 55 - Proporción de cebadores (*primer mix B*): 8 de Sau E97 (5 pmol/ μ l), 4 de SaI 10 (5 pmol/ μ l), 8 de pSAGT26 (5 pmol/ μ l) y 1,5 de SaI 19 (5 pmol/ μ l).

60 6. Método molecular para el estudio genético de poblaciones y el análisis de pedigrí de la dorada (*Sparus aurata*) según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5 en el que los cebadores específicos están marcados con las siguientes “etiquetas fluorescentes”: 6-FAM (loci Sau K140, SaI 19 y SaI 10), NED (loci Sau AN y Sau I47), PET (loci SaI 15 y Sau E97) y VIC (loci Sau E82, SaI 12 y pSAGT26).

65 7. Kit desarrollado para llevar a cabo el método molecular para el estudio genético de poblaciones y el análisis de pedigrí de la dorada (*Sparus aurata*) descrito en las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque comprende set de cebadores, tampón de reacción, mezcla de dNTPs, muestra de ADN control, y enzima ADN polimerasa.

8. Kit desarrollado para llevar a cabo el método molecular para el estudio genético de poblaciones y el análisis de pedigrí de la dorada (*Sparus aurata*) según la reivindicación anterior que comprende la presentación de los componentes del mismo en estado liofilizado.

9. Kit desarrollado para llevar a cabo el método molecular para el estudio genético de poblaciones y el análisis de pedigrí de la dorada (*Sparus aurata*) según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 que comprende tres presentaciones o formatos comercializables **caracterizadas** por permitir desarrollar las reacciones de amplificación de forma individual o conjunta [*Sparus aurata* genotyping and paternity tool kit sixplex (“reacción A”), *Sparus aurata* genotyping and paternity tool kit fourplex (“reacción B”), y *Sparus aurata* genotyping and paternity tool kit six+fourplex (“reacción A” + “reacción B”)].

Dibujos

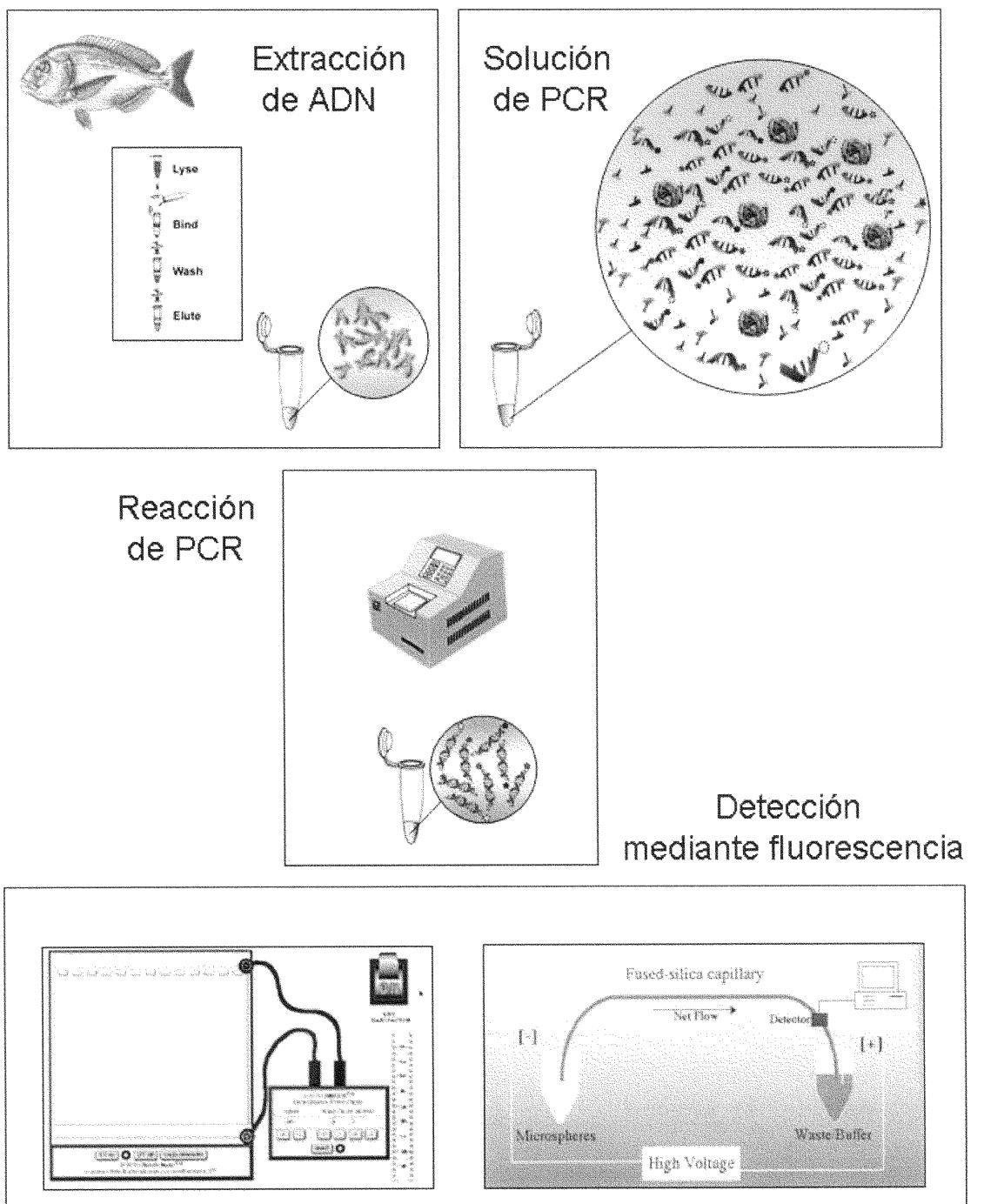


Fig. 1

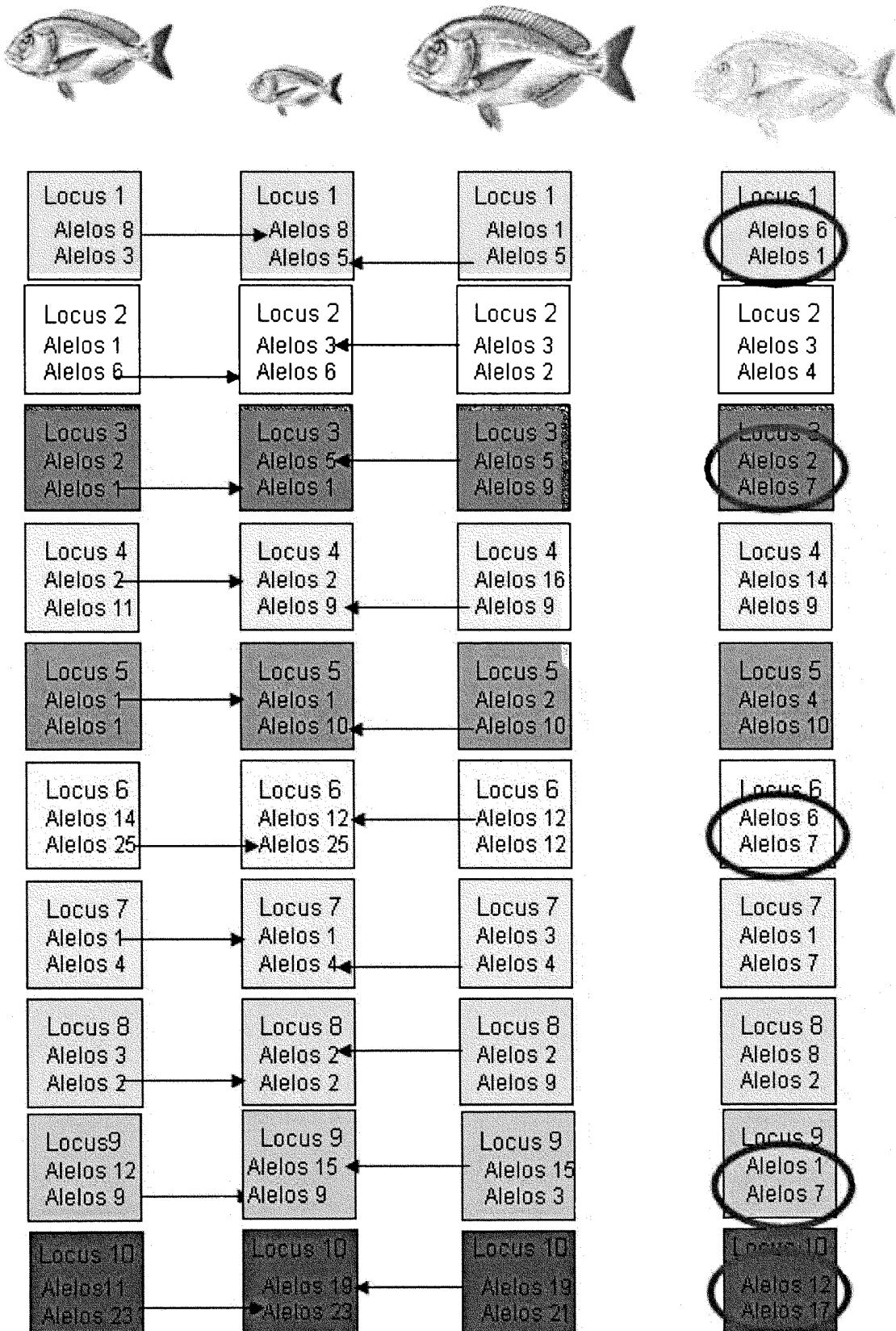


Fig. 2

ES 2 277 536 B1

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Universidad de Málaga
5 <120> Método molecular para el estudio genético de poblaciones y el análisis de pedigrí de la dorada (*Sparus aurata*)
y kit correspondiente (*Sparus aurata genotyping and paternity tool kit*)
10 <140> P200502458
10 <141> 04/10/2005
10 <160> 20
15 <140> P200502458
15 <141> 04/10/2005
15 <210> 1
15 <211> 21
20 <212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
20 <223> Oligonucleótido cebador
25 <400> 1

attgggtggc agtttagtag g

30 <140> P200502458
30 <141> 04/10/2005
30 <210> 2
30 <211> 18
35 <212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
35 <223> Oligonucleótido cebador
40 <400> 2

cactgcgatg agtgaccc

45 <140> P200502458
45 <141> 04/10/2005
45 <210> 3
50 <211> 19
50 <212> ADN
50 <213> Secuencia artificial
50 <223> Oligonucleótido cebador
55 <400> 3

acggtatgga gtcaactgc

60 <140> P200502458
60 <141> 04/10/2005
60 <210> 4
65 <211> 20
65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
<223> Oligonucleótido cebador

5 <400> 4

cccctttgg tacatcatag

10 <140> P200502458

<141> 04/10/2005

<210> 5

<211> 21

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido cebador

20 <400> 5

tttcactgag ctggagactt g

25 <140> P200502458

<141> 04/10/2005

<210> 6

30 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido cebador

35 <400> 6

agagttgagt ctgttgcatg c

40 <140> P200502458

<141> 04/10/2005

<210> 7

45 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 7

acactgtctt tctgtccctc acac

55 <140> P200502458

<141> 04/10/2005

<210> 8

60 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <223> Oligonucleótido cebador

ES 2 277 536 B1

<400> 8

gagtaacaca gcctcagttg aagc

5 <140> P200502458
<141> 04/10/2005

<210> 9
10 <211> 21

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 9

tgtggagct tgggttaca c

20 <140> P200502458
<141> 04/10/2005

<210> 10
25 <211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
30 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 10

35 gagctgtaaa ccgctcagg

<140> P200502458
<141> 04/10/2005
40 <210> 11
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
45 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 11

50 acagtacccc actgtctcc

<140> P200502458
<141> 04/10/2005
55 <210> 12
<211> 20
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial
<223> Oligonucleótido cebador

<400> 12

65 ccatatcatt acactgtggc

ES 2 277 536 B1

<140> P200502458
<141> 04/10/2005
<210> 13
5 <211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 13

15 gcctctcaac cgtatgtag

<140> P200502458
<141> 04/10/2005
20 <210> 14
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
25 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 14

30 tggatatt tatgcattca g

<140> P200502458
<141> 04/10/2005
35 <210> 15
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
40 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 15

45 attttcaca ggcccaacac aaa

<140> P200502458
<141> 04/10/2005
50 <210> 16
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
55 <223> Oligonucleótido cebador

<400> 16

60 gaaaacacccg gcccagtacg a

<140> P200502458
65 <141> 04/10/2005
<210> 17
<211> 19

ES 2 277 536 B1

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<223> Oligonucleótido cebador
5
<400> 17

tcacggggca ccaagactg

10
<140> P200502458
<141> 04/10/2005
<210> 18
15 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20 <223> Oligonucleótido cebador
<400> 18

ctcacactgc ctaattagca caga

25
<140> P200502458
<141> 04/10/2005
30 <210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35 <223> Oligonucleótido cebador
<400> 19

40 acattcatgt gtaaaatcgg

<140> P200502458
<141> 04/10/2005
45 <210> 20
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50 <223> Oligonucleótido cebador
<400> 20

55 ttggaagaac agaaatctaa tg

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

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

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LAUNAY S. et al. "Twelve new microsatellite markers for gilted seabream (Sparus aurata L.): Characterization, polymorphism and linkage." Molecular Ecology Notes. Septiembre 2003. Vol. 3, Nº 3, páginas 457-459.	1-9
X	DE INNOCENTIIS S. et al. "Microsatellite markers reveal population structure in gilthead sea bream Sparus auratus from the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea". Fisheries Science. Octubre 2004. Vol. 70, Nº 5, páginas 852-859.	1-9
X	BROWN R C. et al. "Additional microsatellites for Sparus aurata and cross-species amplification within the Sparidae family". Molecular Ecology Notes. Septiembre 2005. Vol. 5, Nº 3, páginas 605-607.	1-9
A	BROWN R C. et al. "Factors influencing effective population size in commercial populations of gilthead seabream, Sparus aurata". Aquaculture. Junio 2005. Vol. 247, Nº 1-4, páginas 219-225.	1-9
A	CHISTIAKOV D. et al. "Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics". Aquaculture. Junio 2006. Vol. 255, Nº 1-4, páginas 1-29.	1-9
A	WO 03060160 A3 (GENOMAR ASA) 24.07.2003	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 13.06.2007	Examinador J. Manso Tomico	Página 1/1
--	-------------------------------	---------------