



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 360 776**

⑫ Número de solicitud: 200900051

⑬ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑮ Fecha de presentación: **31.12.2008**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.2011**

Fecha de la concesión: **09.01.2012**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
26.07.2011

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **19.01.2012**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
19.01.2012

⑲ Titular/es: **Universidad de Málaga**
c/ Severo Ochoa, 4 (PTA)
29590 Campanillas, Málaga, ES
Universidad Austral de Chile

⑳ Inventor/es: **Páez González, Patricia;**
Jiménez Lara, Antonio;
Roales Buján, Ruth;
Matas, Isabel María;
Bátiz, Luis Federico;
Fernández-Figares Pérez, José Manuel;
Rodríguez Pérez, Luis Manuel;
Ramos Rodríguez, Cayo Juan y
Rodríguez Cairo, Esteban Martín

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Método para el genotipado de ratones *hyh* mutantes para la proteína α -Snap.**

㉓ Resumen:

Método para el genotipado de ratones *hyh* mutantes para la proteína α -SNAP.

La presente invención pertenece al campo del genotipado de mamíferos mutantes. En concreto se refiere a un método para el genotipado de ratos *hyh* mutantes para la proteína α -SNAP así como a un kit de genotipado para llevar a cabo dicho método y unos oligonucleótidos específicamente diseñados para ser utilizados en dicho método.

ES 2 360 776 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método para el genotipado de ratones *hyh* mutantes para la proteína α -Snap.

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo del genotipado de mamíferos mutantes en concreto se refiere a un método para el genotipado de ratones *hyh* mutantes para la proteína α -Snap así como a un kit de genotipado para llevar a cabo dicho método y unos oligonucleótidos específicamente diseñados para ser utilizados en dicho método.

10 **Antecedentes de la invención**

El ratón mutante *hyh* (*hydrocephalus with hop gait*), desarrolla una hidrocefalia congénita debido a una mutación autosómica recesiva localizada en el cromosoma 7 (Bronson and Lane, 1990). Las diferencias fenotípicas externas han servido hasta el momento para identificar al animal mutante, aunque los signos de hidrocefalia solo son apreciables a partir del nacimiento. Histológicamente se aprecian diferencias fenotípicas desde los 12 días de gestación, pero en edades anteriores son indistinguibles (Pérez-Fígares *et al.*, 1998; 2001; Jiménez *et al.*, 2001; Batiz *et al.*, 2006).

La mutación que presentan los ratones *hyh* corresponde a una mutación puntual en el gen α -Snap (*alpha soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein*), que origina una sustitución de una guanina (G) por una adenina (A), lo que produce una sustitución de la metionina en la posición 105 por una isoleucina (M105I) en la proteína α -Snap (Chae *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2004). Esta es una posición altamente conservada a lo largo de la evolución en las distintas especies de mamíferos.

La proteína α -Snap interviene en el tráfico vesicular celular y en la fusión de las membranas vesicular y diana mediante la interacción con el factor sensible a la N-etilmaleimida (NSF), su ATP-asa, y el complejo SNARE, formado por t-SNARE y v-SNARE (Hong *et al.*, 2004). α -Snap se expresa de forma constitutiva en todas las células del organismo y juega un papel muy importante en el tráfico intercompartimental de proteínas mediado por vesículas, incluyendo el transporte de proteínas de un compartimento celular a otro y hacia la membrana plasmática (Clary *et al.*, 1990; Stenbeck, 1998) desempeñando por ello un papel fundamental en la polaridad celular. La alteración del tráfico vesicular hacia la membrana plasmática afecta al transporte de proteínas de adhesión y/o proteínas de la misma membrana celular.

Hasta el momento, el interés de esta cepa de ratones mutantes ha estado centrado exclusivamente en las investigaciones sobre las alteraciones neuropatológicas asociadas a la hidrocefalia congénita (Bronson and Lane, 1990; Pérez-Fígares *et al.*, 1998; 2001; Jiménez *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2003; Batiz *et al.*, 2006) ya que es un buen modelo animal para estudiar la etiología de esta enfermedad en humanos (Domínguez-Pinos *et al.*, 2005; Batiz *et al.*, 2006). Sin embargo, a partir de los trabajos de Chae *et al.* (2004) y Hong *et al.* (2004), en los que se identifica a la proteína mutada, la cepa *hyh* se ha convertido en uno de los pocos modelos animales para investigar fenómenos celulares tales como: i) tráfico vesicular (véase: Rothman and Warrent, 1994; Woodman, 1997; Nichols, 1998; Ungerma?n *et al.*, 2005); ii) polaridad celular y biología de las células madre, por alteración de la división celular simétrica y asimétrica (véase: Ikonen *et al.*, 1995; McDonald, 2004); iii) fertilidad por afectación de la reacción acrosomal (vease: Tomes *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2006); vi) alteraciones corticales (véase: Chae *et al.*, 2004); v) exocitosis (véase: Goda, 1997; Sollner, 2003) etc. Es más, una revisión reciente (Andreeva *et al.* 2006) propone a α -Snap como un futuro blanco terapéutico en patologías como diabetes, cáncer, y enfermedades del sistema nervioso central, y destaca la potencialidad del modelo *hyh* para aproximarse a esta problemática. En este contexto, es de esperar que el interés científico en el modelo *hyh* irá en aumento durante los próximos años.

Hasta el año 2004, los animales homocigotos para el gen mutado, solo se podían distinguir fenotípicamente por los rasgos hidrocefálicos (Bronson y Lane, 1990; Bátiz *et al.* 2006) e histológicamente por el denudamiento ependimario que presentan desde edades embrionarias (Pérez-Fígares *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 2001). A partir del 2004, con la identificación del gen mutado, la identificación de los animales homocigotos ha sido posible únicamente mediante amplificación del fragmento que contiene la secuencia y secuenciación. Si bien, esta técnica permite genotipar los ratones *hyh*, exige (1) purificar los fragmentos de PCR y (2) secuenciar los productos obtenidos a partir de cada animal de experimentación, con lo cual los tiempos y costos se hacen poco apropiados.

Además, no ha sido posible genotipar a los ratones *hyh* por PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) debido a la ausencia de un enzima de restricción cuya diana permita diferenciar el alelo silvestre (snap+), del alelo mutado (snap-). Ante esta dificultad, y con el objetivo de genotipar a estos ratones, los autores de la presente invención han diseñado unos cebadores que no solo permiten amplificar una secuencia que incluye el *locus* de la mutación *hyh* sino que son capaces de crear un nuevo sitio de restricción en el fragmento amplificado a partir del alelo snap+, pero no en el amplificado a partir del snap-, lo cual permite distinguir entre los distintos genotipos (snap+/+; snap+/-; snap-/-) de una manera sencilla fiable y poco costosa.

65 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1: la figura representa como la base desapareada del cebador snap-forward permite crear una diana de restricción para el alelo snap+ (A) pero no para el alelo snap - (B). La presencia de dicha diana de restricción en los

ES 2 360 776 B2

fragmentos amplificados a partir del alelo snap+ permite diferenciar los alelos snap+ y snap- mediante separación por tamaños en electroforesis tras digestión con la enzima de restricción.

Figura 2: Gel de agarosa en el que se aprecian los resultados del producto amplificado por PCR. La primera calle corresponde al marcador de pesos moleculares pUC 18 DNA Msp I Digest. La segunda corresponde a la amplificación a partir de DNA de un animal hidrocefálico (H), la tercera a la de un animal normal (N) y la cuarta a la de un heterocigoto (Het).

Figura 3: Gel de agarosa en el que se aprecian los resultados de la restricción con BspHI de los productos amplificados por PCR. La primera calle corresponde a la restricción de los fragmentos amplificados a partir de DNA de un animal hidrocefálico (H), la segunda a la de un animal normal (N), la tercera a un heterocigoto (Het), y la última calle corresponde al marcador de pesos moleculares pUC 18 DNA Msp I Digest.

Objeto de la invención

Un primer objeto de la invención es un método para el genotipado de ratones mutantes *hyh* para la proteína α -Snap basado en el uso de unos cebadores específicos capaces de crear una diana de restricción en el locus de la mutación en uno de los dos alelos, ya sea el alelo silvestre o el mutante, al ser amplificados.

Un segundo objeto de la invención consiste en un kit de genotipado para llevar a cabo el método de la invención. Los elementos fundamentales de este kit son los cebadores capaces de crear las dianas de restricción así como la enzima de restricción capaz de reconocer dicha diana y cortar los fragmentos que las posean.

Por último, son también objeto de la invención los oligonucleótidos con secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2 cuyo uso como cebadores para PCR permite obtener un sitio nuevo de restricción para la enzima BspHI cuando se amplifica el alelo silvestre (snap+).

Descripción detallada de la invención

El primer aspecto de la invención se refiere a un método para el genotipado de ratones mutantes *hyh* para la proteína α -Snap que comprende:

- amplificar en el ADN del ratón una secuencia que incluye el locus de la mutación *hyh* con unos cebadores diseñados para crear un nuevo sitio de restricción en dicho locus para el alelo silvestre o para el alelo mutado.
- someter el producto de amplificación de a) a digestión con la enzima de restricción para la cual se ha creado supuestamente el sitio de restricción.
- identificar la presencia de cada uno de los alelos mediante la separación por tamaños del producto digerido en b) por electroforesis para establecer el genotipo.

Cualquier cebador diseñado para crear un sitio nuevo de restricción en el locus de la mutación *hyh* de la proteína α -snap y que permita diferenciar por tamaños tras su amplificación y digestión los alelos silvestre y mutado es válido para los fines de la presente invención. En una realización preferida los cebadores creados se definen por las secuencias SEQ ID NO 1 (*snap forward*) y SEQ ID NO 2 (*snap reverse*). El cebador SEQ ID NO 1 tiene una base desapareada que no le impide llevar a cabo la amplificación tanto de los alelos snap + como snap - (figura 1). Sin embargo, aquellos fragmentos amplificados a partir del alelo silvestre snap + con el cebador SEQ ID NO 1 incorporan un nuevo sitio de restricción para la enzima BspHI que no es incorporado cuando el alelo amplificado es el snap -. El sitio de restricción debe ser creado o incorporado en el producto de amplificación en un lugar tal que permita tras ser digerido, dar lugar a fragmentos de tamaño suficiente para poder ser separados por tamaños en una electroforesis. En una realización preferida, tras la digestión con BspHI de los fragmentos amplificados con SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2 se obtienen fragmentos de 108 pb (alelo mutado) y 91 pb (alelo silvestre). Esta diferencia de 17 pb entre los fragmentos silvestre y mutado es suficiente para separar ambos fragmentos en una electroforesis en gel de agarosa. Esto permite su identificación inequívoca como alelos snap- o snap+.

Otro aspecto de la invención lo constituye un kit para el genotipado de ratones mutantes *hyh* para la proteína α -Snap que comprende:

- los cebadores diseñados para crear un nuevo sitio de restricción y,
- una enzima de restricción capaz de reconocer y cortar dicho nuevo sitio de restricción.

En una realización preferida dichos cebadores son los cebadores SEQ ID NO 1 (*snap forward*) y SEQ ID NO 2 (*snap reverse*) y dicha enzima de restricción es la enzima BspHI. Los cebadores y la enzima de restricción son los elementos fundamentales para llevar a cabo el método antes descrito sin embargo, como resultará obvio para cualquier experto el kit puede incorporar todos los elementos necesarios para llevar a cabo la PCR y la digestión subsiguiente. Para la reacción de amplificación el kit de la presente invención puede incorporar dNTPs, tampón concentrado, Cl_2Mg

ES 2 360 776 B2

y Taq-Polimerasa. Para la reacción de digestión con la enzima el kit puede también incorporar un tampón para que la enzima de restricción ejerza adecuadamente su función.

El último aspecto de la invención se corresponde con los cebadores SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2 diseñados para llevar a cabo la amplificación y la creación de los nuevos sitios de restricción en los fragmentos amplificados a partir del alelo silvestre de la proteína α -snap (snap+).

Ejemplo

I. Materiales y método

1. Extracción del DNA genómico

La extracción del DNA genómico se realizó a partir de muestras correspondientes a los tres posibles genotipos: homocigotos para el alelo mutante (fenotipo hidrocefálico), homocigotos para el alelo silvestre y heterocigotos (fenotipo normal). La identificación fenotípica de los animales hidrocefálicos, se realizó por diferentes signos clínicos tales como menor talla corporal, deformación craneal, y alteraciones motoras (*hop gait*). En el caso de los animales normales y los heterocigotos, que no presentan ningún síntoma clínico externo, se identificaron por análisis mendeliano de la descendencia.

Se utilizaron dos métodos de extracción del DNA genómico. En el primero, se cortaron y pesaron 0.02 g de tejido, se añadieron 80 μ l de tampón de proteinasa K (NH_4Cl 0.375M, EDTA 0.12M, pH8), 40 μ l de proteinasa K (10 mg/ml), 40 μ l de SDS 10% y 250 μ l de H_2O bidestilada, y se incubó en agitación a 55°C toda la noche. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadieron 100 μ l de acetato amónico 7.5M para precipitar las proteínas y se agitó suavemente. Se centrifugaron las proteínas precipitadas a 15.000 rpm durante 10 min y se recogió el sobrenadante. A éste, se le añadió 1 ml de etanol 100° frío y se dejó precipitar el DNA moviendo el tubo suavemente hasta la aparición un precipitado blanco. Se centrifugó a 15.000 rpm durante 10 min y se desechó el sobrenadante, obteniendo en el fondo del tubo el DNA precipitado. Se lavó con 500 μ l de etanol de 70° y se centrifugó a 15.000 rpm durante 5 min. Se retiró el etanol y se dejó secar al aire. Una vez que se evaporó todo el resto del alcohol se resuspendió el DNA en 50 μ l de H_2O bidestilada.

En el segundo método, se colocó una pequeña muestra (2 mm) de cola o dedo de ratón en un tubo de 1.5 ml y se añadieron 100 μ l de tampón de lisis (NaOH 25 mM; EDTA 0.02 mM). Se abrió un orificio en el tapón con una aguja para evitar que exploten los tubos al hervirlos y se incubaron las muestras en agua hirviendo durante 20 min. Posteriormente, se centrifugaron las muestras durante 1 min a 14.000 rpm y, sin separar el sobrenadante, se añadieron 100 μ l de tampón de neutralización (Tris-HCl: 40 mM no tamponado) mezclándose bien con un vortex. Finalmente, se centrifugaron las muestras durante 3 min a 14.000 rpm. Usando 1 μ l del sobrenadante se obtuvo el mismo resultado al realizar la PCR que con el protocolo de extracción anterior, siendo este último más rápido y económico.

La concentración de DNA y la calidad de la extracción se calcularon a partir de la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm.

2. PCR

Se amplificó sin inespecificidades la secuencia de 108 pb delimitada por los cebadores *snap-forward* (SEQ ID NO 1) y *snap-reverse* (SEQ ID NO 2). Se utilizó la siguiente mezcla de reacción para la PCR:

- DNA 1 μ l (100 ng/ μ l)
- Cebadores (SEQ ID NO1+ SEQ ID NO 2) 0.5 μ l + 0.5 μ l (100 pmol/ μ l)
- dNTPs 1 μ l (10 mM)
- Tampón 5 μ l (10x)
- Cl_2Mg 7 μ l (25 mM)
- Taq-Polimerasa 0.5 μ l
- H_2O bidestilada 34.5 μ l
- Volumen final de reacción 50 μ l.

El termociclador se programó con los siguientes parámetros:

- Temperatura de desnaturalización 96°C (4 min)
- 35 ciclos 94°C (30 s)

- Alineamiento 55.5°C (30 s)
- Elongación 72°C (30 s)
- Elongación final 72°C (10 min).

3. Mezcla de restricción

La restricción de los fragmentos se realizó en un volumen final de 20 µl. Para ello, se incubó durante 3 h una mezcla compuesta por 10 µl del producto de la PCR, 8 µl de H₂O bidestilada, 0.15 µl de enzima de restricción BspH I (Ref. *New England BioLab* R0517S) y 2 µl del tampón 10x para el enzima.

4. Control positivo para la PCR y para la restricción

En un vector, pGEN®-T *easy vector system* (Ref. Promega A1380), se clonaron fragmentos amplificados a partir de muestras de animales silvestres y homocigotos para la mutación. Posteriormente, se transformaron por choque térmico células competentes de *E. coli*. El sitio de clonación múltiple del vector está dentro del gen *LacZ*, que permite diferenciar las colonias blancas, transformadas con un vector en el que se haya insertado algún fragmento, de las colonias azules, que habrán sido transformadas con un vector sin inserto. Las colonias blancas seleccionadas se crecieron en medio LB líquido.

Posteriormente, se extrajo el vector y se comprobó que se amplificase correctamente el inserto por PCR. Igualmente, se comprobó que el enzima de restricción BspH I reconoce la secuencia del fragmento silvestre y no la mutada. Los fragmentos clonados se secuenciaron a través del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga.

II- Resultados

1. PCR: amplificación de fragmentos de DNA de ratón *hyh* que incluyan el locus de la mutación α -Snap

El producto de PCR se resolvió en un gel de agarosa al 3.5% en tampón TBE a 60 V (Fig. 2). En este gel se observan bandas a la altura de la banda de 110 pb del marcador de pesos moleculares, lo que concuerda con los 108 pb de longitud del fragmento que se pretendía amplificar. Como marcador de pesos moleculares se utilizó pUC 18 DNA Msp I Digest (Ref. Sigma 92526).

2. Restricción diferencial de los alelos

El producto obtenido tras la restricción de material genético procedente de animales silvestres, heterocigotos e hidrocefálicos, se resolvió en un gel de agarosa al 3.5% en tampón TBE a 60 V (Fig. 3). La electroforesis de los productos de PCR obtenidos de animales hidrocefálicos (snap-/-), y digeridos con BspH I, permite observar una única banda (108 bp), próxima a la altura de la banda de 110 pb del marcador de pesos moleculares, por lo que se puede deducir que no ha sido cortada por el enzima de restricción. Sin embargo, el patrón electroforético obtenido con la digestión de los productos de PCR derivados del DNA de animales silvestres (snap+/+), permite identificar una única banda (91 pb) próxima a la altura de la banda de 89 pb del marcador, indicando que todos los productos de PCR han sido cortados por el enzima de restricción (Fig. 3). Por último, en la electroforesis de productos obtenidos de muestras de animales heterocigotos (snap+/-) y digeridos con BspH I, se identifican dos bandas: una próxima a la altura de la banda control de 110 pb (108 pb), que no ha sido cortada por el enzima, y otra próxima a la de 89 pb (91 pb), que sí ha sido cortada (Fig. 3).

Bibliografía

- Andreeva A V, Kutuzov M A, Voyno-Yasenetskaya T A (2006) A ubiquitous membrane fusion protein alpha SNAP: a potential therapeutic target for cancer, diabetes and neurological disorders? *Expert Opin Ther Targets* 10: 723-733.
- Batiz L F, Páez P, Jiménez A J, Rodríguez S, Wagner C, Pérez-Fígares J M, and Rodríguez E M (2006) Heterogeneous expression of hydrocephalic phenotype in the *hyh* mice carrying a point mutation in alpha-SNAP. *Neurobiol Dis* 23: 152-168.
- Bronson R T and Lane P W (1990) Hydrocephalus with hop gait (*hyh*): a new mutation on chromosome 7 in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 54: 131-136.
- Chae T H, Kim S, Marz K E, Hanson P I and Walsh C A (2004) The *hyh* mutation uncovers roles for alpha Snap in apical protein localization and control of neural cell fate. *Nat Genet* 36: 264-270.
- Clary D O, Griff I C, Rothman J E (1990) SNAPS, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 18:709-721.

- Domínguez-Pinos M D, Páez P, Jimenez A J, Weil B, Arraez M A, Pérez-Fígares J M, and Rodríguez E M (2005): Ependymal denudation and alterations of the subventricular zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 595-604.
- 5 - Goda Y (1997) SNAREs and regulated vesicle exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94: 769-772.
- Hong H K, Chakravarti A, and Takahashi J S (2004) The gene for soluble Nethylmaleimide sensitive factor attachment protein alpha is mutated in hydrocephaly with hop gait (hyh) mice. *Proc Natl Acad Sci* 101: 1748-1753.
- 10 - Ikonen E, Tagaya M, Ullrich O, Montecucco C and Simons K (1995) Different Requirements for NSF, SNAP, and Rab Proteins in Apical and Basolateral Transport in MDCK Cells. *Cell*, Vol. 81: 571-580.
- Jiménez A J, Tome M, Páez P, Wagner C, Rodríguez S, Fernández-Llebrez P, Rodríguez E M and Pérez-Fígares J M (2001) A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 1105-19.
- 15 - McDonald D (2004) A SNAP decisión in neural cell fate. *Nature Cell Biology* Vol. 6:187.
- Nichols B J and Pelham H R B (1998) SNAREs and membrane fusión in the Golgi apparatus. *Biochimica et*
- 20 *Biophysica Acta* 1404: 9-31.
- Pérez-Fígares J M, Jiménez A J, and Rodríguez E M (2001) Subcommissural organ, cerebrospinal fluid circulation, and hydrocephalus. *Microsc Res Tech* 52: 591-607.
- 25 - Pérez-Fígares J M, Jiménez A J, Pérez-Martín M, Fernández-Llebrez P, Cifuentes M, Riera P, Rodríguez S, and Rodríguez E M (1998) Spontaneous congenital hydrocephalus in the mutant mouse hyh. Changes in the ventricular system and the subcommissural organ. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 188-202.
- Rothman J E and Warrent G, (1994) Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Current Biology*, Vol 4: 220-234.
- 30 - Sollner T H (2003) Regulated exocytosis and SNARE function (Review). *Molecular Membrane Biology* Vol. 20: 209-220.
- 35 - Sousa A P M, Gomes-Santos C S S and Ramalho-Santos J (2006) Localization of SNARES, NSF and Caveolin1 in human spermatozoa. Relationship with seminal parameters. *Archives of Andrology*, 52: 347-353.
- Stenbeck G (1998) Soluble NSF-attachment proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30: 573-577.
- 40 - Tomes C. N., De Blas G. A., Michaut M. A., Farre E. V., Cherhitin O., Visconti P. E. and Mayorga L. S. (2004) α -SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction. *Molecular Human Reproduction* vol. 11:43-51.
- 45 - Ungermann C and Langosch D (2005) Functions of SNAREs in intracellular membrane fusión and lipid bilayer mixing. *Journal of Cell Science* 118: 3819-3828.
- Wagner C, Batiz L F, Rodríguez S, Jiménez A J, Páez P, Tome M, Pérez-Fígares J M, and Rodríguez E M (2003) Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of hyh mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 1019-40.
- 50 - Woodman P G (1997) The roles of NSF, SNAPs and SNAREs during membrane fusión. *Biochim Biophys Acta*. 1357(2): 155-72.

REIVINDICACIONES

1. Método para el genotipado de ratones mutantes *hyh* para la proteína α -Snap que comprende:

- a) amplificar en el ADN del ratón una secuencia que incluye el locus de la mutación *hyh* con unos cebadores que tiene la secuencia SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2, diseñados para crear un nuevo sitio de restricción en dicho locus para el alelo silvestre o para el alelo mutado, siendo la diana creada la de la enzima de restricción BspHI.
- b) someter el producto de amplificación de a) a digestión con la enzima de restricción para la cual se ha creado supuestamente el sitio de restricción.
- c) identificar la presencia de cada uno de los alelos mediante la separación por tamaños del producto digerido en b) por electroforesis para establecer el genotipo.

2. Método de acuerdo con la reivindicación anterior donde la creación del nuevo sitio de restricción se produce en el alelo silvestre.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 donde la separación por tamaños se hace por electroforesis en gel de agarosa.

4. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 donde el tamaño tras la digestión del alelo silvestre es de 91 pb y el del alelo mutado de 108 pb.

5. Kit para el genotipado de ratones mutantes *hyh* para la proteína α -Snap que comprende:

- los cebadores con secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2, diseñados para crear un nuevo sitio de restricción, siendo la diana creada la de la enzima de restricción BspHI; y,
- una enzima de restricción capaz de reconocer y cortar dicho nuevo sitio de restricción, siendo dicha enzima BspHI.

6. Oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO 1.

7. Oligonucleótido de secuencia SEQ ID NO 2.

FIGURA 1

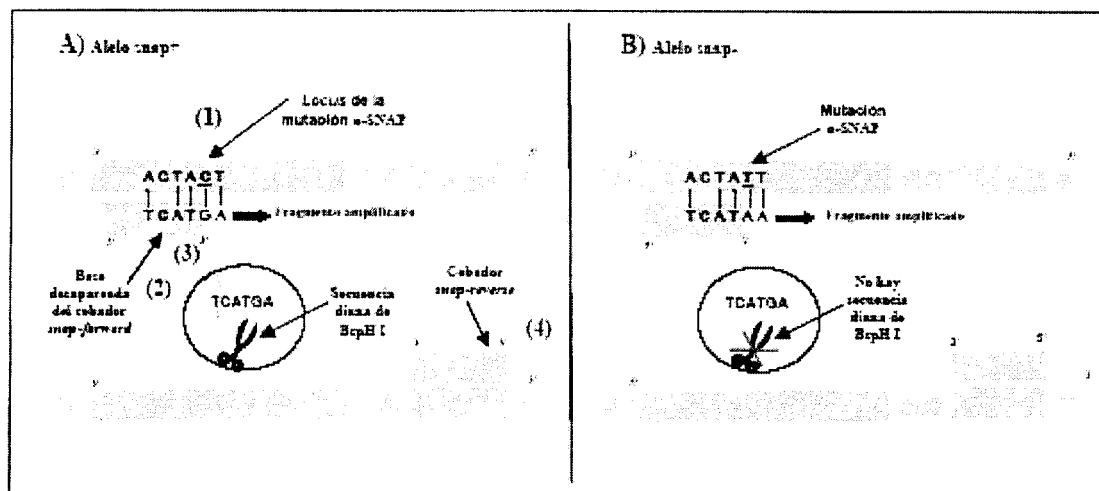


FIGURA 2

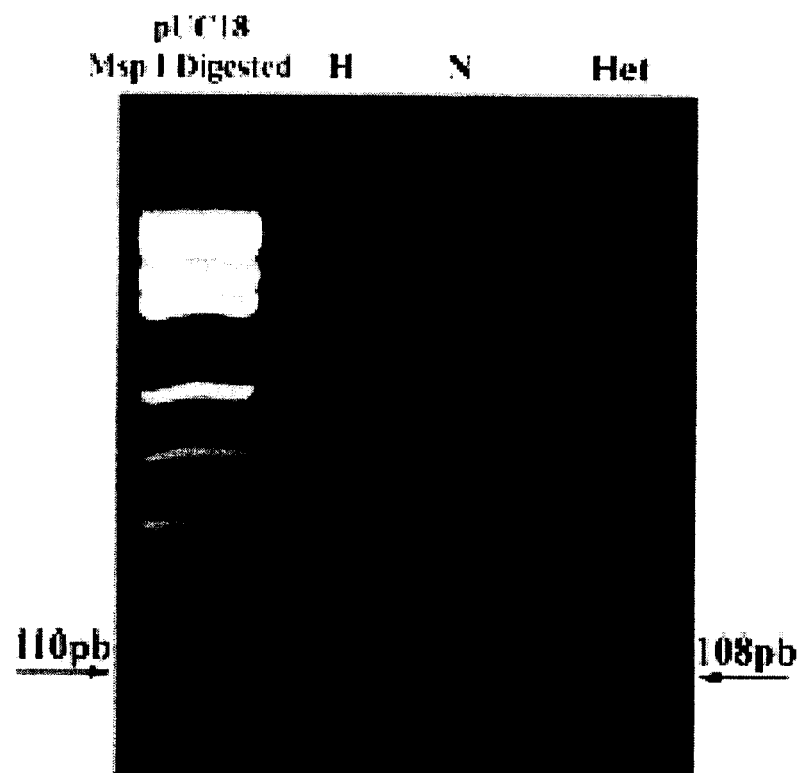
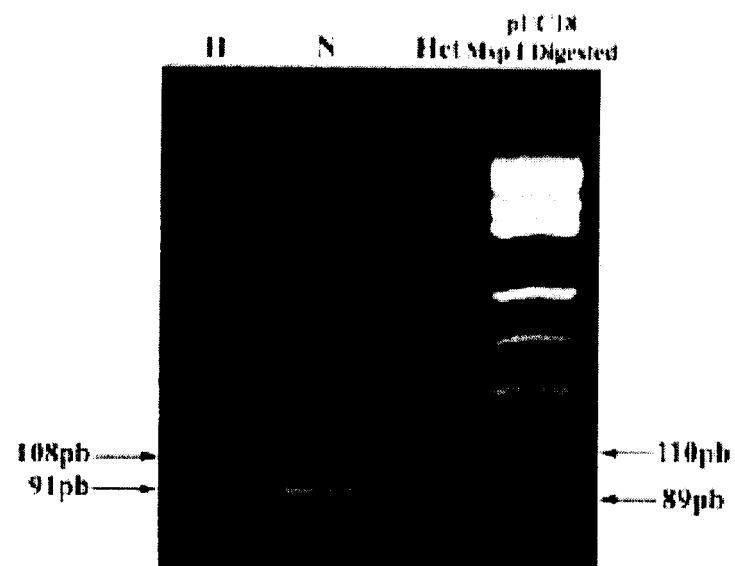


FIGURA 3



ES 2 360 776 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE MÁLAGA Y UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

5 <120> MÉTODO PARA EL GENOTIPADO DE RATONES hyh MUTANTES PARA LA PROTEÍNA alfa-SNAP

<130> hyh

10 <160> 2

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1

<211> 20

<212> DNA

20 <213> Artificial

<220>

<223> cebador snap forward

25 <400> 1

qaggccatta actgtctcat

20

30

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

35 <213> Artificial

<220>

40 <223> cebador snap reverse

<400> 2

ctaaagcaca gcataaacag g

21

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200900051

②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.12.2008

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HONG H-K. et al., "The gene for soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein alpha is mutated in hydrocephaly with hop gait (hyh) mice." PNAS (2004), vol. 101, no. 6, pág. 1748-1753.	1-10
X	HOSSEINI S. Y. et al., "A novel accurate ACRS-PCR method with a digestion internal control for identification of wild type and YMDD mutants of hepatitis B virus strains." Journal of Virological Methods (2006), vol. 137, no. 2, pág. 298-303.	1,6
A		2-5,7-10

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
10.05.2011

Examinador
M. Hernández Cuellar

Página
1/4

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

C12Q

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

EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, REGISTRY, CAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.05.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 2-5, 7-10	SI
	Reivindicaciones 1,6	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HONG H-K. et al., "The gene for soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein alpha is mutated in hydrocephaly with hop gait (hyh) mice." PNAS (2004), vol. 101, no. 6, pág. 1748-1753.	2004
D02	HOSSEINI S. Y. et al., "A novel accurate ACRS-PCR method with a digestion internal control for identification of wild type and YMDD mutants of hepatitis B virus strains." Journal of Virological Methods (2006), vol. 137, no. 2, pág. 298-303.	2006

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

La invención de la presente solicitud se refiere a un método de genotipado de ratones hyh mutantes para la proteína α -SNAP así como a un kit para llevar a cabo dicho método y unos oligonucleótidos específicamente diseñados para ser utilizados en dicho método. En particular estos oligonucleótidos se utilizan como cebadores de amplificación en un ensayo PCR y además de amplificar son capaces de generar un nuevo sitio de restricción para la enzima BspH I en el fragmento amplificado a partir del alelo snap+ pero no en el amplificado a partir del alelo snap-, lo cual permite distinguir entre los distintos fenotipos (snap+/+; snap+/-; snap-/-).

1.- NOVEDAD

En el estado de la técnica establecido por la búsqueda no se ha localizado un método de genotipado de ratones hyh mutantes basado en un ensayo- ACRS-PCR-RFLP. Por otra parte tampoco se han recuperado oligonucleótidos cebadores iguales o similares a los oligonucleótidos correspondientes a las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 reivindicadas en la presente invención. En consecuencia las reivindicaciones 1-10 cumplen con el requisito novedad según el Art. 6.1 LP.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

La invención de la presente solicitud plantea el problema de genotipar ratones mutantes hyh para la proteína α -SNAP mediante un sistema PCR-RFLP. En el gen hyh no hay dianas de restricción que permitan diferenciar el alelo silvestre (snap+) del alelo mutado (snap-). La solución aportada en la invención consiste en los oligonucleótidos correspondientes a las secuencias SEQ ID NO: 1 y 2 capaces de generar un sitio de restricción BspH I.

El estado de la técnica más cercano a la invención queda establecido por los documentos D01 y D02. El documento D01 describe la identificación de la mutación en los ratones mutantes hyh responsable de la hidrocefalia congénita que desarrollan dichos ratones. Esta mutación corresponde a una mutación puntual en el gen α -Snap, que origina una sustitución de una guanina (G) por una adenina (A), lo que produce una sustitución de la metionina en la posición 105 por una isoleucina (M105I) en la proteína α -Snap. Por su parte el documento D02 describe el método ACRS _PCR (artificial created restriction sites) utilizado para la identificación de cepas salvajes y mutantes YMDD del virus de la hepatitis B.

La reivindicación 1 se trata de una mera reivindicación de deseo que formula las etapas generales de un ensayo ACRS-PCR-RFLP sin proporcionar una solución concreta. En este sentido, y a la vista de la información técnica aportada por D02, esta Oficina considera que las reivindicaciones 1 y 6 carecen de actividad inventiva de acuerdo al Art. 8.1 LP.

Por otra parte esta Oficina considera que las reivindicaciones 2-5 y 7-10 soportadas en la provisión de los oligonucleótidos cebadores correspondientes a las secuencias SEQ ID NO: 1 y 2 si cumplen con el requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP.