



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 355 899**

⑤① Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨⑥ Número de solicitud europea: **04752605 .8**
⑨⑥ Fecha de presentación : **18.05.2004**
⑨⑦ Número de publicación de la solicitud: **1631685**
⑨⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2006**

⑤④ Título: **Procedimientos, kits y dispositivos de tratamiento de ácidos nucleicos.**

③⑩ Prioridad: **19.05.2003 US 471895 P**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2011

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2011

⑦③ Titular/es: **BRANDEIS UNIVERSITY**
415 South Street
Waltham, Massachusetts 02454-9110, US

⑦② Inventor/es: **Wangh, Lawrence, J. y**
Hartshorn, Cristina

⑦④ Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 355 899 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN**CAMPO TÉCNICO**

5 La presente invención se refiere a la preparación de una o más moléculas ácido nucleicas, ADN o ARN, como matrices liberadas de las proteínas unidas, y disponibles para utilizaciones posteriores, que comprenden la detección, la modificación y/o la manipulación, interviniendo o no la amplificación de las secuencias en el interior de dichas moléculas ácido nucleicas.

ANTECEDENTES

10 Las moléculas ácido nucleicas, ARN y ADN, que se encuentran tanto en muestras celulares como no celulares, se asocian a menudo con proteínas u otras macromoléculas, cuya unión interfiere con la detección o la manipulación enzimática de los ácidos nucleicos. Debido a esto, la mayoría de los protocolos concebidos para detectar o utilizar los ácidos nucleicos, comienzan con una o varias etapas de purificación y/o aislamiento que se llevan a cabo antes de cualquier manipulación posterior, tal como la amplificación de secuencias diana particulares o la replicación de secuencias informativas.

15 Los procedimientos que se utilizan para preparar los ácidos nucleicos deben ser compatibles con las etapas bioquímicas posteriores. Además, resulta preferido realizar la purificación en las más escasas etapas fiables, y con el número más pequeño posible de recipientes, con el fin de reducir pérdidas. Constituyen importantes características de los ensayos la exactitud cuantitativa y la conveniencia de la utilización, que pueden llevarse a cabo sobre grandes cantidades de muestras pequeñas, por ejemplo, muestras compuestas solamente de una célula, o de un número relativamente pequeño de células, o de muestras compuestas de una pequeña parte tisular, una fracción de una célula, o de un pequeño volumen de un extracto celular u homogenizado, o de muestras no celulares de ácidos nucleicos. La manipulación y el tratamiento, particularmente de las muestras pequeñas, no deberá comportar la pérdida, degradación o contaminación de dichas muestras de los ácidos nucleicos dentro de dichas muestras.

25 Los procedimientos tradicionales para la purificación o el aislamiento del ADN o del ARN de las células y de la separación de las moléculas de ADN de las moléculas de ARN, comprenden típicamente, de manera no limitativa: a) interrupción/desnaturalización de la muestra en presencia de potentes agentes desnaturalizantes tales como sales de guanidina, urea, detergentes, álcalis potentes, o una combinación de los anteriores; b) separación de ácidos nucleicos de interés a partir de proteínas desnaturalizadas y/o de otros ácidos nucleicos, mediante extracción con un líquido no acuoso, tal como el fenol:cloroformo (que se utiliza para la separación total del ADN y del ARN), o mediante adsorción a una matriz (resina, perlas o fibras, que se utilizan para la extracción selectiva del ARNm y para otras aplicaciones), o mediante la neutralización con un tampón alcalino y centrifugación (utilizado para el aislamiento del ADN plasmídico); c) recuperación de los ácidos nucleicos mediante precipitación con un alcohol o con un catión monovalente, tal como el sodio o el amonio, o el cloruro de litio, y resuspensión en un volumen apropiadamente pequeño o, alternativamente, elución de los ácidos nucleicos en un volumen apropiadamente pequeño. El volumen en el que los ácidos nucleicos purificados están contenidos determina la fracción de ácidos nucleicos que puede analizarse en un ensayo. El volumen es de importancia particular cuando el análisis se lleva a cabo en muestras muy pequeñas tales como células únicas o en muy pocas células. En la técnica es conocido que ciertas muestras iniciales requieren la utilización de condiciones más severas para romper las células. Pueden seleccionarse las condiciones para degradar selectivamente o digerir el ADN o el ARN para recuperar las otras. Las moléculas de ARN son mucho más sensibles a la degradación que las moléculas de ADN, debido a su sensibilidad a las condiciones alcalinas, a la temperatura elevada y a la presencia omnipresente de las ARNasas. Así, muchos protocolos para el aislamiento del ARN requieren condiciones más suaves e incluyen la presencia de agentes concebidos para inhibir a las ARNasas.

45 Los ejemplos de procedimientos conocidos para la purificación, aislamiento, o separación de ADN o ARN genómicos, incluyen la utilización de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y una alta concentración salina (Jones, A.S. (1963). Use of Alkyltrimethylammonium Bromides for the Isolation of Ribo- and Deoxyribo-Nucleic Acids, Nature 199:280-282); escasa concentración salina bajo presión hidrostática, hiperbárica (patente US nº 6.111.096); precipitación salina suave (y digestión proteásica opcional); unión irreversible a matrices cubiertas de óxido de aluminio (patente US nº 6.291.166); preparación del ARN mediante lisis de tiocianato de guanidinio seguido por centrifugación a través de un amortiguador de Cs-Cl (Chirgwin, J.M. *et al.* (1979), Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease, Biochemistry 18: 5294-5299); varias modificaciones y mejoras del procedimiento del tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Chomczynski, P. y Sacchi N. (1987): Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction, Anal Biochem 162:156-159), ampliado posteriormente para incluir el aislamiento del ADN (Chomczynski, P.(1993) A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples, Biotechniques 15:532-537); unión del ARN o ADN total a matrices tales como filtros de fibras de vidrio, membranas de gel de sílice, perlas magnéticas o matrices basadas en celulosa.

60 El documento WO 97/05248 A (13 febrero de 1997), describe un procedimiento para aislar ARN, ADN y proteínas a partir de una muestra única de material biológico que comprende la homogeneización de un material biológico en una solución que incluye por lo menos un agente caotrópico con una concentración de 2 M-7 M y un tampón para mantener el pH a aproximadamente 6-12, formando así una mezcla que comprende el agente caotrópico, proteínas degradadas y desnaturalizadas y moléculas de ADN y ARN, y, a la cual mezcla, con el fin de, por ejemplo, la

utilización subsiguiente en tratamientos enzimáticos tales como RT-PCR, se añaden disolventes orgánicos para precipitar el ARN, entonces el ADN, y después, las proteínas.

5 La extracción específica de las moléculas de ARNm se lleva a cabo solamente mediante la interacción de sus colas poly(A) con oligo(dT) unido a la celulosa o a las resinas que contienen un complejo estreptavidínico; y la precipitación selectiva de las moléculas de ARNm con sondas Poly T PNA y estreptavidina. No siempre se encuentra presente, probablemente, una cola poly(A) intacta, particularmente para moléculas de ARN muy largas tales como Xist ARNm (Hong. Y.K. *et al.* (1999). A New Structure for the Murine Xist Gene and its Relationship to Chromosome Choice/Counting During X-Chromosome Inactivation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:6829-6834).

10 Un ejemplo de aislamiento y purificación *in situ* lo constituye la hibridación fluoresceínica *in situ* (FISH). Los procedimientos implican típicamente la fijación de la muestra, durante la cual las proteínas que están unidas son desnaturalizadas, seguido por etapas de lavado en presencia de un detergente que elimina, por lo menos, algunas proteínas. Todas estas manipulaciones requieren una inversión considerable de tiempo y de trabajo. Además, todas pueden conducir a la pérdida de moléculas ácido nucleicas durante el procedimiento de purificación/extracción o a una detección más pobre de las secuencias diana. Esto último puede constituir un problema, ya que las sondas FISH necesitan reconocer y visualizar en la información básica mencionada anteriormente un número muy pequeño de moléculas diana.

20 Recientemente, los procedimientos de amplificación de las dianas en tiempo real, por ejemplo, las técnicas PCR en tiempo real, han proporcionado una poderosa herramienta para la cuantificación precisa del número de copias del ARN, posibilitando el estudio de las modulaciones delicadas de los niveles de expresión génica. Tal como se ha mencionado anteriormente, sin embargo, el aislamiento del ARN representa un considerable reto, a causa, tanto de las características fisicoquímicas de este tipo de molécula como de su sensibilidad con respecto a la acción de múltiples ARNasas, que están presentes intracelularmente o que se introducen fácilmente debido a la contaminación medioambiental. Típicamente, el ADN es eliminado de las preparaciones de ARN mediante procedimientos químicos, físicos o enzimáticos. Todas las manipulaciones anteriores han contribuido a disipar la duda con respecto a la veracidad de las estimaciones de las copias obtenidas del ARN con los protocolos disponibles, particularmente cuando se analizan muestras muy pequeñas (véase Klein C.A. *et al.* (2002), Combined Transcriptome and Genome Analysis of Single Micrometastatic Cells., Nat. Biotechnol. 20:387-392).

30 Se han concebido estrategias para obtener la captura, la transcripción inversa y la amplificación PCR del ARNm en el mismo recipiente reactivo, limitando así, la pérdida de las moléculas ácido nucleicas (o el daño que se las pudiera producir) durante la purificación. Para su captura, se utilizan, por ejemplo, placas multipocillo revestidas con oligo (dT), o tubos PCR revestidos con estreptavidina, para ser utilizados en conjunción con oligo (dT)₂₀ marcado con biotina. El cizallamiento de los ácidos nucleicos puede ser menor con dichos procedimientos, y se evita la pérdida de material debida a la transferencia a un nuevo recipiente reactivo, pero la exactitud de la cuantificación del ARN depende todavía de la eficiencia de la unión del ARNm a las moléculas capturantes.

35 La preparación del ARN total, más que del ARNm, es una alternativa para plantear (la utilización) de un tubo único (o recipiente reactivo único, si se utilizan microchips), a condición de que la eliminación de las proteínas unidas a los ácidos nucleicos se consiga de una forma que no interfiera en las etapas subsiguientes de la transcripción inversa (RT) y de PCR, y de que no afecte a la integridad del ARN.

40 La lisis celular mediante un simple ciclo de congelación-descongelación ni separa proteínas de los ácidos nucleicos, ni inactiva las ARNasas celulares. La lisis (que se obtiene) hirviendo las células bacterianas, conduce de forma segura a la hidrólisis del ARN.

45 Un kit Cells-to-cDNA II de Ambion, Inc. (Austin, Texas, USA), utiliza un tampón de Lisis Celular II compatible con RT y PCR. Las copias de ARN pueden ser así amplificadas en un tubo, mientras el ADN es degradado mediante digestión con ADNasa, tal como sugiere el fabricante. Se llevan a cabo secuencialmente, entonces, RT y PCR, añadiendo los tampones y reactivos apropiados a la muestra lisada. La relación Tampón II de Lisis Celular/Tampón RT PCR tolerada por el ensayo, sin embargo, es baja, de forma que sólo una fracción de la muestra lisada puede utilizarse para cada ensayo RT-PCR. Esta técnica, por tanto, no es apropiada para el análisis de muestras muy pequeñas, compuestas de escasas o células únicas. Los detergentes no iónicos, tales como Tritón[®] X-100 o NP-40, se utilizan en diversos protocolos para lisar las membranas plasmáticas celulares y liberar los conjuntos de ARN citoplásmico. Estos detergentes, a concentraciones apropiadas, son compatibles con reacciones enzimáticas, y las muestras citoplásmicas preparadas con este procedimiento pueden utilizarse directamente en ensayos RT-PCR o en otras manipulaciones de las moléculas ARN con el fin de su detección y/o cuantificación (Brady, G. e Iscove, N.N. (1993), Construction of cDNA Libraries from Single Cells, Methods Enzymol, 225:611-623; Hansis, C *et al.*, (2001). Analysis of Oct-4 Expression and Ploidy in Individual Human Blastomeres, Mol. Hum. Reprod. 7: 155-161). El ADN genómico y el ARN nuclear, tal como Xist ARN, no pueden prepararse, sin embargo, con estos procedimientos.

60 El laboratorio desarrolló un ensayo para medir copias, tanto del ADN como del ARNm genómicos de genes de interés en embriones o blastómeros de ratones únicos (Hartshorn, C., Rice J.E., Wangh, L.J. (2002), Developmentally-Regulated Changes of Xist RNA Levels in Single Preimplantation Mouse Embryos, as Revealed by Quantitative Real-Time PCR, tal como se revelan mediante PCR cuantitativa en tiempo real, Mol. Reprod. Dev. 61: 425-436; Hartshorn, C., Rice, J.E., Wangh, L.J. (2003), Differential Pattern of Xist RNA Accumulation in Single Blastomeres Isolated from 8-

cell Stage Mouse Embryos Following Laser Zona Drilling, Mol. Reprod. Dev. 64:41-51; Hartshorn, C., Rice J.E., Wangh, L.J. Optimized Real-Time RT-PCR for Quantitative Measurements of DNA and RNA in Single Embryos and Blastomeres, en: Bustin S.A., editor, A-Z of Quantitative PCR, páginas 675-702, International University Line, en impresión). El conteo de copias del ADN genómico en muestras muy pequeñas proporciona un estándar interno ideal para la recuperación de ácidos nucleicos y para la eficiencia de PCR. Además, no es necesario utilizar ADNasas y la inactivación térmica que acompaña al enzima, durante la cual algunos ARN pueden ser hidrolizados (la degradación del ARN es potenciada por la presencia de magnesio, que es necesario para la actividad ADNasa). Fracasó la adaptación del kit Cells-to-cDNA II de Ambion a la RT-PCR del ARN y del ADN procedentes de embriones/células únicos, debido probablemente a la cantidad más alta que la recomendada que debía utilizarse del Tampón de Lisis Celular para ensayar el conjunto de las muestras, más que una alícuota de éstas. Aunque el ARN fue medido a los niveles esperados en muestras que lo expresaban intensamente, el ADN genómico, presente en un número bajo de copias, muy a menudo fue indetectable.

Resultan conocidos y están comercializados ejemplos de tampones líticos que tienen sólo como objetivo la preparación de matrices de ADN y son compatibles con el análisis PCR en el mismo recipiente reactivo. Generalmente, estos procedimientos no permiten el análisis simultáneo/paralelo de las moléculas de ADN y ARN a partir de idénticas muestras, porque el ARN se degrada durante el procedimiento de extracción. El Release-IT™ (CPG, Inc., Lincoln Park, NJ, USA) constituye un reactivo patentado que libera ADN a partir de sangre completa, cultivos celulares, colonias bacterianas y otras muestras biológicas. La lisis tiene lugar directamente en el tubo de amplificación en un ciclador térmico, y los reactivos PCR se añaden posteriormente al lisado, iniciándose la amplificación. El Release-IT™ secuestra los productos de la lisis celular que pudieran inhibir la PCR. De forma distinta a otros procedimientos descritos anteriormente, esto permite la recuperación del ARN y la transcripción inversa de pequeñas alícuotas de la muestra para RT-PCR (puede utilizarse la muestra entera para la PCR del ADN genómico). Sin embargo, se cree que el ciclo de calentamiento inicial que se requiere para la acción de Release-IT™ es perjudicial para el ARN, porque incluye un total de 4 minutos a 97°C y una etapa de mantenimiento a 80°C. Además, el reactivo Release-IT™ no se recomienda para la amplificación de pocas copias del ADN, sin un enriquecimiento celular.

El análisis de los ácidos nucleicos en muestras muy pequeñas, que incluyen las células únicas o una parte de una célula única, presenta diversos retos. Aunque diversos kits comerciales ofrecen una sensibilidad de RT-PCR que alcanza el nivel de una célula individual, esta exigencia implica a menudo la recuperación de una muestra más grande, de la cual se utiliza sólo una parte para cada ensayo. Se espera de algunos kits una extracción eficiente de ácidos nucleicos a partir de las células individuales actuales, pero la recogida de las mismas muestras individuales es a menudo difícil y deberá llevarse a cabo cuidadosamente para preservar el contenido de ARN (Hartshorn, C., Rice, J.E., Wangh, L.J. (2003)). Recientemente, la microdissección por captura de láser (LCM) y el catapultado de presión mediante láser (LPC) han posibilitado la escisión precisa de células únicas, o de compartimientos de células únicas. Además, se han desarrollado ya dos técnicas para dibujar el perfil de la expresión génica de células únicas, que se basa en la poliadenilación de las moléculas de ARNm para su detección directa en un lisado celular, sin necesidad de la purificación del ARN (amplificación del extremo 3', o TPEA, y amplificación global de las copias ADNc de todos los ARNm poliadenilados, o PolyAPCR) (revisado por Brady, G. (2000), Expression Profiling of Single Mammalian Cells--Small is Beautiful, Yeast 17: 211-217). Ambas técnicas se limitan a mediciones del ARN citoplásmico y no se amplían al ADN o ARN nucleares.

Un aspecto de la presente invención consiste en un procedimiento para la preparación de moléculas de ADN o ARN o de ambas, para la amplificación y detección, o para otros tratamiento enzimáticos de mezclas de moléculas de ADN y ARN que han sido separadas de proteínas unidas, incluyendo dichas mezclas moléculas de ADN y ARN separadas, con un agente caotrópico, y con proteínas degradadas y desnaturalizadas, que comprende la dilución de la mezcla, de forma que se reduzca la concentración del agente caotrópico a menos de 0,05 M, preferentemente menos de 0,01 M, sin eliminar o aislar las moléculas de ADN y ARN entre ellas o de otros componentes de la mezcla.

Otro aspecto de la presente invención consiste en la preparación de la mezcla anterior, antes de diluirla, incubando una muestra que contenga moléculas de ADN y ARN unidas a proteínas con un reactivo de interrupción concentrado que contenga por lo menos 2 M del agente caotrópico.

Otro aspecto de la presente invención consiste en la amplificación de una o más secuencias de ADN o ARN en la mezcla diluida, sin separar físicamente las moléculas de ADN y ARN de la mezcla diluida.

Otro aspecto de la presente invención consiste en llevar a cabo las diluciones y amplificaciones mencionadas anteriormente en un único recipiente y, preferentemente, preparar también la mezcla en éste.

Todavía otro aspecto que se describe consiste en un dispositivo útil para separar las moléculas ADN y ARN de las proteínas unidas, que comprende un reactivo seco o semisecho de interrupción que contiene un reactivo caotrópico que se adhiere a una superficie de un recipiente o de una parte de éste, tal como el tapón de un tubo o una superficie en el interior de un recipiente dotado con múltiples cámaras.

Otro aspecto que se describe consiste en los kits que incluyen el dispositivo mencionado anteriormente, y reactivos y materiales adicionales para llevar a cabo la dilución y tratar ulteriormente las mezclas diluidas, por ejemplo, las reacciones de amplificación y secuenciación.

SUMARIO

5 Se describen procedimientos, dispositivos y reactivos para la preparación de moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) para la amplificación y detección u otros tratamientos enzimáticos, sin aislar físicamente los ácidos nucleicos de las proteínas desnaturalizadas, o aislar físicamente un tipo de ácidos nucleicos (ADN o ARN) de otros. Los procedimientos de preparación según la presente invención pueden llevarse a cabo en un recipiente único, sin ninguna transferencia de material que contenga muestras. Un tratamiento adicional, tal como la amplificación y la detección, pueden realizarse en el recipiente, manteniendo los ácidos nucleicos preparados, también sin ninguna transferencia de material que contenga muestras. Los procedimientos según la presente invención incluyen la preparación, amplificación y detección de ácidos nucleicos en un recipiente único, por ejemplo, un tubo de 200 µl apropiado para la utilización con instrumentos habituales de ciclación térmica. Los procedimientos según la presente invención reducen o minimizan el cizallamiento de los ácidos nucleicos reduciendo o eliminando la transferencia, lavado y resuspensión de los ácidos nucleicos, reduciendo de esta forma el problema del cebado incorrecto en las reacciones de amplificación, particularmente las amplificaciones que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa.

15 Los orígenes de muestras de ácidos nucleicos a los cuales pueden aplicarse los procedimientos de la presente invención incluyen células únicas, grupos de células (embriones, muestras tisulares), lisados celulares, u otros orígenes de ácidos nucleicos, por ejemplo, los citoplasmas absorbidos a partir de las células. Si el origen es una o varias células, la preparación incluye la lisis celular, que no es necesaria si un lisado constituye el origen. Las muestras a las cuales dichos procedimientos de la presente invención se aplican contienen ácidos nucleicos a las cuales se unen proteínas.

20 La primera etapa en los procedimientos según la presente invención consiste en liberar los ácidos nucleicos de las proteínas unidas e inactivar las nucleasas. Si la muestra es celular, la primera etapa incluye también lisar la célula o células. Para la primera etapa la muestra se trata con un reactivo al que se hace referencia convenientemente como un reactivo de fragmentación. El componente esencial del reactivo de fragmentación es un agente caotrópico que desnaturaliza o degrada todas las proteínas, incluyendo las nucleasas. Los agentes caotrópicos apropiados incluyen sales de guanidinio, tales como isotiocianato de guanidina o clorhidrato de guanidina, y yoduro potásico. El agente preferido en el contexto de la presente invención es el isotiocianato de guanidina. La primera etapa se lleva a cabo en un volumen pequeño, inferior a 10 µl del reactivo de fragmentación, preferentemente inferior a 1 µl y, para las formas de realización que incluyen la amplificación en un único tubo, más preferentemente 20-50 nl, de forma que puedan realizarse diluciones en serie sin exceder la capacidad de un tubo estándar de 200 µl. La primera etapa se lleva también a cabo con una alta concentración del agente caotrópico, suficiente para obtener por lo menos una concentración 2 M del catión monovalente. Trabajando a temperatura ambiente, el isotiocianato de guanidina a altas concentraciones tiende a precipitar (y a obstaculizar pipetas de pequeño calibre que son apropiadas para dispensar cantidades de nanolitros). Para que se pueda trabajar con una concentración preferida de isotiocianato de guanidina 4 M, por ejemplo, se añaden uno por ciento o más por volumen de dimetilsulfóxido (DMSO), un disolvente miscible en agua que evita la precipitación pero que puede evaporarse durante una etapa subsiguiente de secado. Si el reactivo de fragmentación no se seca antes de utilizarlo en el tratamiento de los ácidos nucleicos, la presencia de dimetilsulfóxido presenta el beneficio añadido de potenciar la permeabilidad de las membranas celulares a las sustancias químicas del exterior, tales como el agente caotrópico.

40 Tal como se ha indicado anteriormente, es necesaria la lisis en la primera etapa, si la muestra es de una o más células. El reactivo de fragmentación puede incluir, con esta finalidad, un detergente. Se ha utilizado sarcosil como detergente, obtenido de Stratagene, La Jolla, California, USA. Los ingredientes adicionales que pueden incluirse en el reactivo de fragmentación incluyen un agente reductor, preferentemente uno que se evapore durante el secado, tal como el βmercapto-etanol, un agente quelante, y un tampón neutro, tal como citrato sódico.

45 El reactivo de fragmentación puede utilizarse como un líquido, o puede secarse y reconstituirse durante su utilización. Se ha secado con éxito y entonces, reconstituido a su volumen original, 20 nl del siguiente reactivo de fragmentación: sarcosil (detergente) al 0,25%, isotiocianato de guanidina 2 M (agente caotrópico), DMSO (disolvente) al 1% (vol/vol), 100 mM βmercapto-etanol (agente reductor), y 0,01 M citrato sódico, pH 7,0 (tampón).

50 La primera etapa en los procedimientos según la presente invención, comprende la incubación de una muestra con un reactivo de fragmentación durante un tiempo y con una temperatura suficientes para desnaturalizar permanentemente las proteínas presentes. En las formas de realización preferidas, la primera etapa incluye el calentamiento para concentrar la mezcla mediante evaporación. Esto eleva significativamente la concentración del reactivo caotrópico, asegurando, por lo tanto, una desnaturalización proteica permanente. Aunque no resulta preferido, la concentración inicial del reactivo caotrópico puede reducirse, porque, si se incluye el calentamiento, la evaporación concentrará el agente hasta o por encima de la concentración requerida de 2 M. Muy preferentemente, el calentamiento se lleva a cabo con prontitud después de que la muestra y el Agente de Fragmentación (reconstituido al volumen original, si está seco) se mezclen. Resulta preferido que el calentamiento sea suficiente para evaporar la mezcla a un producto seco o semisecho (sólido húmedo). Dicho calentamiento evaporará el DMSO y el βmercapto-etanol, si está presente. La duración e intensidad del calentamiento se ajustan experimentalmente, de forma que se evite la pérdida de la secuencia (o secuencias) diana ácido nucleicas de un ensayo, o se evite, por lo menos, una pérdida que exceda el 25%. El producto seco y semisecho de la primera etapa puede utilizarse inmediatamente o almacenarse, en espera de

un tratamiento adicional.

La segunda etapa en los procedimientos según la presente invención es diluir el producto líquido, seco o semiseco procedente de la primera etapa, previamente a, o como parte, de un tratamiento adicional de los ácidos nucleicos en la mezcla. A título ilustrativo, se describe con mayor detalle el tratamiento de los ácidos nucleicos separados (liberados de las proteínas), empezando con la transcripción inversa (RT). Es importante que antes de, o, por lo menos, en esta primera etapa enzimática, la dilución de la mezcla resultante de la primera etapa, sea suficiente, de modo que los reactivos, en la mezcla, en este momento, (incluyendo particularmente el agente caotrópico), se reduzcan a una concentración tan baja que no afecten adversamente al tratamiento. En todos los casos, la cuantía de la dilución para un tratamiento adicional debe ser suficiente para disminuir la concentración del agente caotrópico a menos de 0,05 M. Para el tratamiento ilustrativo de la transcripción inversa, se ha descubierto que la dilución reducirá la concentración de nuestro agente caotrópico preferido, isotiocianato de guanidina, hasta por debajo de 0,05 M, preferentemente significativamente inferior, más preferentemente inferior a 0,01 M. Como puede apreciarse a partir de los ejemplos, se utilizó con éxito la dilución hasta 0,004 M de isotiocianato de guanidina. El grado requerido de dilución para el tratamiento particular puede determinarse experimentalmente con facilidad. En las formas de realización que se lleven a cabo manualmente, resulta preferida la utilización de volúmenes de dilución de por lo menos 1 μ l, ya que es difícil pipetear de modo preciso volúmenes menores. Esto no ocurrirá con las formas de realización (en las que se manejen chips), que pueden incluir un preciso control del aparataje, prefiriendo en dichas formas de realización minimizar volúmenes para que los costes de los reactivos y dispositivos sean menores en la medida de lo posible.

Tal como se ha indicado, la dilución de la segunda etapa puede llevarse a cabo, bien como dilución única, o como una serie de diluciones. Para ilustrarlo, el procedimiento para la transcripción inversa puede llevarse a cabo en dos diluciones: en primer lugar, añadiendo agua que contiene cebadores para la transcripción inversa, calentando hasta fundir las dobles cadenas y enfriando entonces para hibridar los cebadores RT; seguido por una segunda dilución con la transcriptasa inversa en tampón RT. Utilizando este procedimiento, resulta preferido que la primera dilución en sí misma sea por lo menos de 50:1, más preferentemente superior, por ejemplo, sea por lo menos tan alta como 300:1, y que la segunda dilución, incluyendo la transcriptasa inversa y el tampón RT, complete la dilución. Asimismo, tal como se considera con mayor detalle a continuación, pueden llevarse a cabo con diluciones, sean únicas, o sea una serie de diluciones, otros tratamientos enzimáticos apropiados (por ejemplo, con ADNasa o una glucosidasa tal como celulasa, amilasa, β -glucosidasa o lisozima). En los ejemplos, se demostró actividad enzimática con las diluciones de 200:1 y 500:1.

Después de la finalización de la segunda etapa, se prepara y dispone la muestra para un tratamiento adicional. El tratamiento adicional puede incluir ensayos de amplificación y detección. Dichos ensayos pueden incluir la amplificación exponencial de moléculas diana o informadoras, utilizando, por ejemplo, procedimientos conocidos en la técnica, tales como el proceso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (patentes US nº 4.683.202, nº 4.683.195, nº 4.965.188), la amplificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos (Heim, A. *et al.* (1998), Highly Sensitive Detection of Gene Expression of an Intronless Gene: Amplification of mRNA, but not Genomic DNA by Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA), *Nucleic Acid Res*, 26:2250-2251, amplificación por desplazamiento de las cadenas (SDA), amplificación mediada por la transcripción (TMA), amplificación por círculo rodante (RCA) (Daubendiek, S.L. y Kool, E.T. (1997), Generation of Catalytic RNAs by Rolling Transcription of Synthetic DNA Nanocircles, *Nat. Biotechnol*, 15:273:273-277), y metodología de la ramificación-amplificación (RAM). A causa de que la PCR constituye la técnica de amplificación más ampliamente utilizada, se utiliza en la presente memoria con propósitos explicativos. Los expertos en la materia podrán aplicar las explicaciones a otras técnicas de amplificación.

Las secuencias seleccionadas de los ácidos nucleicos, tanto del ADN como del ARN procedentes de la segunda etapa, pueden tratarse adicionalmente mediante un ensayo de amplificación PCR. Para amplificar el ARN, se convierte en primer lugar a ADNc mediante transcripción inversa. A continuación, pueden amplificarse el ADN - el ADN genómico y el ADNc-. Un procedimiento preferido consiste en calentar la mezcla de la segunda etapa para fundir las secuencias ácido nucleicas bicatenarias y enfriar entonces la mezcla, de forma que no se desnaturalice la enzima transcriptasa inversa. La enzima transcriptasa inversa y su tampón se añaden entonces a la mezcla de la segunda etapa, junto con los cebadores, si éstos ya no están presentes. Al llevar a cabo la transcripción inversa, se prefirió no diluir posteriormente más de lo necesario el producto, preferentemente no más de 6:1 e incluso más preferentemente, no más de 2:1 por la razón expuesta anteriormente.

En este momento, se puede eliminar opcionalmente el ARN de la mezcla, debido a que las moléculas de ARN pueden interferir con cierto tratamiento del ADN genómico y del ADNc. Con esta finalidad, añadimos ARNasa H a la mezcla, de forma que se degrade el ARN de los híbridos ARN:ADNc. Se prefirió, otra vez, minimizar el aumento en el volumen de esta adición, limitando el aumento al 5%. La mezcla se incubó durante un tiempo y temperatura suficientes para la digestión ARNásica de las cadenas de ARN en los híbridos.

A continuación, se añadió a la mezcla una mezcla de amplificación PCR que contiene los reactivos necesarios para amplificar una o más secuencias diana seleccionadas, mediante el procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa, incluyendo todos los cebadores, precursores, enzima polimerásica, controles y tampón PCR. El procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa puede constituir una amplificación PCR simétrica tradicional, que utiliza cebadores directos e inversos en cantidades equimolares; una amplificación PCR asimétrica, que utilice un cebador en exceso; o una amplificación PCR-POSTERIOR, tal como se da a conocer en la solicitud de patente US nº

de serie 10/320.893 en trámite, registrada el 17 de diciembre de 2002 y en la solicitud publicada de patente internacional WO 03/054233. Tanto la amplificación asimétrica como la PCR-POSTERIOR incluyen amplificación exponencial seguida por amplificación lineal. Asimismo, pueden utilizarse procedimientos alternativos de amplificación basados en la PCR, por ejemplo, el Análisis en serie de la expresión génica (SAGE) (Velculescu, V.E. *et al.* (1995), Serial Analysis of Gene Expression, Science 270:484-487). Los expertos en la materia apreciarán que los reactivos para otros sistemas de amplificación se añaden en las etapas apropiadas al procedimiento. Para la amplificación por círculo rodante, por ejemplo, se pueden añadir una o varias secuencias informadoras a la mezcla en la segunda etapa, y llevar a cabo una unión enzimática en lugar de la transcripción inversa en la etapa siguiente.

Los ensayos de amplificación pueden ser ensayos de criterio de valoración o ensayos en tiempo real, en los que la mezcla de amplificación incluye por lo menos un informador, por ejemplo, un colorante que se intercala, tal como el SYBR verde o sondas de hibridación fluorescentes marcadas dualmente tales como sondas lineales marcadas en un extremo para el ensayo de la 5' nucleasa (patente US nº 5.538.848), sondas baliza moleculares (patente US nº 5.925.517), pares de sondas FRET o sondas ying-yang. Li. Q. *et al.* (2002), "A New Class of Homogeneous Nucleic Acids Probes Based on Specific Displacement Hybridization," Nucl. Acid. Res. 30: (2) e5). Las sondas pueden sustituir a los cebadores (Nazarenko, I. *et al.* (1997) A Closed Tube Format for Amplification and Detection of DNA Based on Energy Transfer, Nucl. Acids Res. 15: 2516-2521).

Los procedimientos de amplificación pueden también utilizarse para generar cantidades de productos ácido nucleicos bicatenarios o monocatenarios para un tratamiento adicional, por ejemplo, la secuenciación, el análisis de fragmentos, o el uso en un ensayo tal como el ensayo de unión oligonucleótida (OLA).

El reactivo de fragmentación puede prepararse y proporcionarse en forma seca, por ejemplo un punto ("LysoDot") o como una película ("LysoFilm") sobre la superficie de un recipiente o parte de éste que vaya a utilizarse para preparar los ácidos nucleicos. Puede aplicarse un LysoDot o un LysoFilm a un tubo, pocillo, o recubrimiento, tales como una tapa, una parte superior o un tapón del recipiente. El recipiente puede consistir en un tubo PCR, un tubo de microcentrífuga, una placa de microtitulación o un chip con pocillos, por ejemplo. El reactivo de fragmentación puede proporcionarse en forma líquida, incluyendo preferentemente un disolvente tal como DMSO, en una pipeta de cuerpo fino apropiada para dispensar pequeños volúmenes, particularmente cantidades de nanolitros. El reactivo de fragmentación puede también proporcionarse como un sedimento seco o como una composición seca sobre un soporte sólido tal como una fibra o una matriz o una perla, que son inertes y no se unen a los ácidos nucleicos.

Un chip u otro dispositivo microfluídico puede fabricarse para llevar a cabo las primera y segunda etapas de la preparación del ácido nucleico en distintas cámaras, y puede incluir una o más cámaras adicionales para el tratamiento subsiguiente.

Los kits reactivos pueden incluir el reactivo de fragmentación seco, preferentemente recipientes que incluyan LysoFilm o LysoDot o partes del recipiente, en combinación con la totalidad de o algunos reactivos, para llevar a cabo, por lo menos, un tratamiento enzimático. Los kits pueden incluir, por ejemplo, algunos o todos los reactivos RT (cebadores, dNTP, tampón, enzima, inhibidor de la ARNasa, agente reductor). Puede incluirse una ADNasa. De modo similar, pueden incluirse algunos o todos los reactivos de amplificación (cebadores, dNTP, tampón, polimerasa), como lo pueden hacer reactivos de detección (sondas de hibridación, que pueden ser sondas de hibridación fluorescentes marcadas dualmente, o colorantes fluorescentes de intercalado), o reactivos para el tratamiento de postamplificación, por ejemplo la secuenciación (enzima, cebador para secuenciación). Otros enzimas pueden incluirse, si resulta apropiado.

Los detalles de una o más formas de realización de la invención se exponen en las figuras adjuntas y en la descripción siguiente. Otras características, objetivos, y ventajas de la invención, podrán apreciarse a partir de la descripción, de las figuras y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es un gráfico de los resultados de los ensayos PCR para una primera secuencia diana, ensayos que se llevaron a cabo sobre muestras duplicadas de ácidos nucleicos preparados según la invención.

La figura 2 es un gráfico de los resultados de los ensayos PCR para una segunda secuencia diana, ensayos que se llevaron a cabo sobre muestras duplicadas de ácidos nucleicos preparados según la invención.

La figura 3 es una representación gráfica de la secuencia de los resultados del ensayo PCR y de la segunda secuencia diana con cantidades estándares de muestras de ácidos nucleicos.

La figura 4 es una vista en perspectiva de un recipiente, que incluye una LysoDot.

La figura 5 es una vista en sección transversal de un chip que contiene una primera cámara para llevar a cabo la primera etapa de la preparación según la presente invención, y una segunda cámara para llevar a cabo la segunda etapa según la presente invención.

Los símbolos idénticos de referencia en las distintas figuras indican elementos idénticos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El reactivo de fragmentación según la presente invención comprende un agente caotrópico, por ejemplo, una sal de guanidinio tal como el isotiocianato de guanidina o el clorhidrato de guanidina, o yoduro de potasio. El hidróxido sódico o el hidróxido de potasio pueden sustituirse como equivalentes sólo para las preparaciones de ADN solo, pues este reactivo destruye el ARN. El agente caotrópico preferido en el contexto de la presente invención, isotiocianato de guanidina, tiende a precipitarse, a bajas temperaturas, a concentraciones de alrededor de 2 M y más elevadas. Para mantener líquido al reactivo durante la dispensación, más que calentar este agente caotrópico y un dispositivo de dispensación tal como la pipeta, puede incluirse, en menor cantidad, en el reactivo de fragmentación por ejemplo 1% (vol/vol) un disolvente no acuoso miscible en agua tal como el dimetilsulfóxido (DMSO). Este reactivo de fragmentación contiene adicionalmente un reactivo de lisis celular, si el origen de la muestra puede incluir células intactas. Se utilizó el detergente sarcosil al 0,25%, aunque también pueden utilizarse otros, tal como apreciarán los expertos en la materia. Pueden incluirse opcionalmente ingredientes adicionales en el reactivo de fragmentación. Tal como se ha indicado, el reactivo de fragmentación preferido incluye 100 mM de agente reductor, específicamente β mercapto-etanol, y 0,01 M de tampón neutro, específicamente, citrato sódico, pH 7,0.

Tal como se ha indicado, el reactivo de fragmentación puede suministrarse para su uso en forma líquida o seca, como un "Lyso-Dot" o "Lyso-Film" como parte de un recipiente, en determinadas formas de realización preferidas. Un ejemplo de una forma de realización en la cual pueda resultar preferido dispensar el reactivo de fragmentación en forma líquida, es empezar con muestras que incluyen células en cultivo, tales como células que crecen en pocillos de placas de microtitulación. En este caso, puede añadirse reactivo de fragmentación en forma líquida a las células para formar la mezcla reactiva. Si las células se encuentran relativamente en grandes cantidades, es decir, en número de centenares o de miles, se puede reducir la muestra después de la interrupción o ruptura celular hasta una parte que represente por lo menos una, y preferentemente menos de 100 células. Algo de la mezcla puede eliminarse, dejando la parte deseada en el recipiente para un tratamiento adicional, o la parte deseada puede dirigirse a un segundo recipiente para tratamiento adicional. La parte mayor que no se ha utilizado puede guardarse o someterla a otro tratamiento. La reducción a una parte mediante cualquier técnica puede llevarse también a cabo después de la segunda etapa de preparación del ácido nucleico.

Los procedimientos según la presente invención son particularmente adaptables a muestras que contienen un número escaso de células, por ejemplo, una fracción de una célula hasta 200 células, o 1 a 100 células, o cantidades equivalentes de materiales de muestras no celulares. Los procedimientos según la presente invención son particularmente adaptables a tratamientos que minimicen la transferencia física de mezclas que contengan muestras, incluyendo la realización de preparaciones ácido nucleicas y la amplificación y detección ácido nucleicas en un recipiente único. Para diseñar procedimientos según la presente invención, es conveniente el cálculo retrógrado. Si un ensayo en tiempo real va a realizarse, por ejemplo, en un recipiente para ensayo de 100 μ l (los instrumentos de ciclación térmica disponibles habitualmente utilizan típicamente tubos de 200 μ l que presentan una capacidad de ensayo de 100 μ l), se consideran las diluciones que van a realizarse, bien una dilución única combinada o, por lo menos, dos y a menudo tres diluciones en serie. En el procedimiento anteriormente descrito de dilución en serie, la dilución final tiene lugar con la adición de los reactivos de amplificación y detección, por lo menos, una dilución de 9:1 aproximadamente. La primera dilución se produce en la segunda etapa de los procedimientos según la presente invención, e incluye una dilución de, por lo menos, 50:1. Puede existir, por lo menos, una dilución intermedia significativa tal como la de la transcripción inversa, de hasta 6:1, preferentemente, no superior a 2:1. Calculando de manera retrógrada, se llega a un volumen apropiadamente pequeño del reactivo de fragmentación para la primera etapa del procedimiento. La cantidad del reactivo de fragmentación es la cantidad del reactivo de fragmentación en forma líquida antes de cualquier proceso de secado para preparar, por ejemplo, un LysoDot. Aplicando el principio de diseño mencionado anteriormente al trabajo con tubos PCR de 200 μ l y 100 μ l, se seleccionó un volumen del reactivo de fragmentación de 20-50 nl como volumen inicial apropiado. Por supuesto, volúmenes más pequeños podrían ser también apropiados. Con isotiocianato de guanidina a una concentración de 2 M, 20 nl del reactivo de fragmentación son suficientes para hasta aproximadamente 100 células.

La liberación de los ácidos nucleicos se lleva a cabo con una concentración del agente caotrópico de, por lo menos, 2 M. Si se añade el reactivo de fragmentación en forma líquida, resulta preferido que la concentración del agente caotrópico sea de 2-8 M en el reactivo de fragmentación. Si éste se somete a secado y se rehidrata durante su utilización, es reconstituido con el mismo orden de concentración. Si se utiliza la evaporación como parte de la primera etapa de la reacción, el volumen del reactivo de fragmentación añadido como un líquido o rehidratado a partir del sólido seco, puede aumentar, y la concentración del reactivo caotrópico, disminuir, antes de la evaporación. La concentración mínima de 2 M puede alcanzarse a través de la evaporación acuosa y de los componentes volátiles, tal como el DMSO y del β mercapto-etanol. Más formas de realización preferidas se inician con el reactivo de fragmentación conteniendo por lo menos 2 M del agente caotrópico para minimizar el tiempo de calentamiento para evaporación.

En los procedimientos preferidos, la primera etapa incluye la incubación con calor para reducir la mezcla de muestra y reactivo de fragmentación a un sólido húmedo, o sólido semiseco, o, incluso, a un sólido seco, procurando no perder los ácidos nucleicos o, por lo menos, mantener las pérdidas por debajo del 25%. Resulta preferido dicho calentamiento debido a tres razones: en primer lugar, lleva al agente caotrópico a una concentración muy alta, asegurando la liberación de los ácidos nucleicos. En segundo lugar, reduce el tiempo de incubación necesario y asegura visualmente que se ha completado la liberación. En tercer lugar, elimina los agentes volátiles que podrían

afectar adversamente el tratamiento subsiguiente. Para las preparaciones de laboratorio, se abrió típicamente el tubo al final de la etapa de calentamiento y se situó el tapón que sostiene la muestra lisada bajo un microscopio para inspección. Este procedimiento no sería preferido para aplicaciones en las que es particularmente importante evitar la contaminación, tal como en el tratamiento de muestras humanas.

5 La segunda etapa en los procedimientos según la presente invención constituye una etapa de dilución importante. En determinadas formas de realización preferidas, esto se lleva a cabo en el mismo recipiente. En las formas de realización en las que el recipiente incluye canales de flujo, tal como un chip, la mezcla desde un primer compartimento tal como un pocillo, en el que se lleva a cabo la primera etapa, puede fluir hacia un compartimento separado para dilución. En todos los casos, la segunda etapa se realiza sin separar primero los ácidos nucleicos de las proteínas degradadas. Excepto en ciertas formas de realización en las que se desea eliminar bien el ARN o bien el ADN, la segunda etapa se realiza sin separar las moléculas de ADN de las moléculas de ARN. El grado de dilución es por lo menos del 50:1 de la cantidad de reactivo de fragmentación que contiene 2 M del reactivo caotrópico. Así, si la primera etapa se llevó a cabo con un volumen de reactivo de fragmentación líquido con 2 M de agente caotrópico, la dilución es por lo menos de 50:1 en una base volumen-a-volumen. Si la primera etapa se realizó iniciándose con un volumen mayor del reactivo de fragmentación líquido con 1 M de agente caotrópico que se concentró durante la primera etapa, la dilución es por lo menos de 25:1 en una base volumen-a-volumen, y así sucesivamente. Después de la dilución, se prepara la mezcla. La mezcla está preparada para un tratamiento adicional de los ácidos nucleicos ADN o ARN, o de ambos, sin eliminar las proteínas degradadas y el reactivo de fragmentación. En los ejemplos, se muestran ilustraciones sobre utilización.

20 El reactivo de fragmentación puede suministrarse en forma seca como parte de un recipiente, tal como se ha mencionado anteriormente. En la figura 4, se muestra una forma de realización. Para las preparaciones de laboratorio propias, incluyendo el ejemplo 1 a continuación, se han secado simplemente los LysoDots al aire, que es mucho más lento que utilizar un bloque de calentamiento como se muestra en la figura 4, y las muestras lisadas sobre una rejilla situada en un baño acuoso conservado a aproximadamente 75°C. La figura 4 muestra un recipiente 41, un tubo PCR, más específicamente, un tubo PCR de 200 µl. El recipiente 41 comprende el cuerpo 42 y la tapa 43 precintada. El reactivo de fragmentación seco, en la forma de realización LysoDot 44, se adhiere a la tapa 43. La preparación de la parte 43 del recipiente con el LysoDot 44 adherido, se llevó a cabo de la forma siguiente: una pequeña cantidad 20 nl del reactivo de fragmentación, se añadieron a la tapa 43, permaneciendo en la concavidad 45 del bloque de calentamiento 46. El reactivo de fragmentación se calentó hasta que secó a LysoDot 44, adhiriéndose a la tapa 43. LysoDot 44 pudo situarse igualmente en el cuerpo 42 y ser sometido entonces a secado. Se seleccionó su disposición en la tapa 43, debido sólo a la facilidad para llevar a cabo el pipeteo manual del reactivo de fragmentación sobre el centro de la tapa 43. Se llevó a cabo la primera etapa de los procedimientos según la presente invención en la tapa 43, añadiendo a ella una muestra, por ejemplo, células embrionales en solución isotónica, principalmente solución salina tamponada de fosfato (PBS), rehidratando de esta forma el reactivo de fragmentación seco. El tubo 41 puede entonces cerrarse para llevar a cabo la incubación y evaporar la mezcla a un sólido seco o semiseco. En este momento, la mezcla puede utilizarse inmediatamente, o puede congelarse o refrigerarse. Se lleva a cabo el calentamiento/evaporación bajo condiciones que eviten la contaminación cruzada de las muestras. Cerrar el tubo 41 es una manera de evitar que esto ocurra. Resultarán evidentes para los expertos en la materia otras maneras.

40 A continuación, la solución con una dilución de cincuenta, se añadió a la tapa 43, teniendo abierto el tubo 41 si era necesario. En este momento, es deseable utilizar el tubo 41 en posición vertical, de forma que se precintó otra vez y se obligó a que la mezcla se desplazara al cuerpo 42. Puede utilizarse la centrifugación para facilitar la transferencia. Se llevó a cabo un tratamiento adicional en el tubo, en su posición vertical.

45 Otro dispositivo que contiene "Lyso-Dot" o "Lyso-Film" es representado en la figura 5. La figura 5 muestra un dispositivo 50, a través del cual se desplazan los reactivos, bajo control, durante el tratamiento. El dispositivo 50 puede consistir, por ejemplo, en un chip que posee pocillos y cámaras. El chip 50 incluye un pocillo 59 que contiene el reactivo de fragmentación seco, en este caso Lyso-Film 518. Puede añadirse una muestra al pocillo 59, que puede entonces cerrarse con la tapa 52. La muestra, que ahora contiene el reactivo de fragmentación licuado, podría trasladarse a la cámara 510 a través del canal 519, controlado por medios (no representados), mediante una presión que se aplica a través del puerto 57 o 58. La cámara 510 puede conectarse a una fuente de reactivo para dilución mediante medios de los canales 54, 56, 514. Alternativamente, la incubación y el calentamiento (secado) puede llevarse a cabo en el pocillo 59, después de lo cual, la mezcla podría licuarse y ser suministrada a la cámara 510 mediante la totalidad o algunos de los reactivos de dilución. La mezcla preparada podría suministrarse entonces, mediante unos medios controlables (no representados), o mediante presión suministrada a través del puerto 57 o 58, a una o varias cámaras 511, 512 o 513, etc., para un tratamiento adicional. Las cámaras 511, 512 o 513, pueden conectarse a las fuentes de suministro del reactivo mediante canales adicionales, por ejemplo, 515 o 516. Una fracción del material de la cámara 511 puede desplazarse mediante el canal 55. La presión gaseosa positiva en el sistema puede liberarse a través del canal 517 que contiene un filtro 523 para evitar el escape de las moléculas que no son gaseosas. En un diseño, el bloque, 51, en el cual están construidos estos canales y pocillos, se compone de un material que puede calentarse y enfriarse rápidamente y, en el caso más preferido, puede calentarse y enfriarse de forma diferente para distintos pocillos y cámaras. En otro diseño, el bloque 51 está compuesto por material aislado que no se calienta o enfría fácilmente, y los cambios de temperatura se detectan a través, por lo menos, de una superficie de cada cámara, mediante unos medios (no representados). En otro diseño, aún, el bloque 51 entero es enfriado continuamente y la temperatura se eleva con unos medios (no representados), por ejemplo, mediante calentamiento

5 por resistencia a través de la superficie de cada cámara o haciendo pasar luz infrarroja en cada cámara. En los diseños preferidos, una superficie, por lo menos, de cada cámara, es transparente, para permitir la transmisión de luz en el interior de la cámara. En los diseños preferidos, todas las superficies dentro de la cámara están realizadas o revestidas con materiales inertes que no se unen a los ácidos nucleicos o a otras sustancias químicas o proteínas. En los diseños preferidos, las cámaras y canales se diseñan para minimizar la turbulencia o la resistencia al movimiento de los líquidos que fluyen. En la presente invención, se incluyen numerosas variaciones de las preparaciones LysoDot. Además de tapas o cubiertas removibles, los LysoDots pueden adherirse a cualquier superficie que sea apropiada para utilizar en llevar a cabo la primera etapa del procedimiento, por ejemplo, tapas o cuerpos adheridos de los tubos PCR, portas o cubreobjetos de microscopía, pocillos de bandejas multipocillo. El reactivo de fragmentación puede, asimismo, 10 suministrarse como un sedimento seco o como una composición que se sometió a secado sobre un soporte sólido, tal como una fibra o una matriz, o perla, que es inerte y no se une a los ácidos nucleicos. En el contexto de la presente invención, dicho soporte sólido se considera un recipiente o una parte de un recipiente para la utilización apropiada.

15 Son posibles numerosas variaciones, después de la primera etapa, en los procedimientos según la presente invención. La incubación de la primera etapa incluye el calentamiento hasta sequedad de la mezcla, después de lo cual puede almacenarse congelada a, por ejemplo, -20°C, durante períodos largos de tiempo o incluso, guardarse a temperatura ambiente durante períodos significativos. Además, la utilización de la mezcla resultante de la primera etapa de incubación de la preparación, puede llevarse a cabo mediante una serie de etapas separadas, tal como se ha indicado anteriormente, o pueden combinarse dos o más etapas. Por ejemplo, los reactivos para la transcripción inversa y la amplificación pueden incluirse en un único reactivo que se diluye, como mínimo, mediante un factor de nueve, aproximadamente. La segunda etapa, una dilución de por lo menos cincuenta veces, puede combinarse con etapas subsiguientes en casos apropiados. Se apreciará que las enzimas térmicamente estables, son necesarias para llevar a cabo el tratamiento a las altas temperaturas que se requieren, por ejemplo, para la fusión de las cadenas.

25 Si se desea utilizar sólo el ARN, el ADN puede degradarse mediante una ADN endonucleasa, por ejemplo, ADNasa I. La degradación puede seguir a la segunda etapa de purificación, o la ADN endonucleasa puede incluirse en el reactivo de dilución que se utiliza en la segunda etapa, junto con sales que son necesarias para la actividad de la ADN endonucleasa que se utilice. Tras la eliminación del ADN, se añade un agente quelante a una concentración suficiente para evitar la hidrólisis del ARN que depende del magnesio, calentándose la mezcla, por ejemplo, durante 10 minutos a 65°C, para inactivar la endonucleasa antes de la transcripción inversa de ARN a ADNc.

30 Particularmente, para aplicaciones tales como el análisis en microsoporte, se utilizó una etapa de digestión ADNásica precediendo a la transcripción inversa en el formato de un único tubo para el análisis de Xist/Sry, del que se informa a continuación en el ejemplo 1. Analizamos la eficiencia con la cual se degradó el ADN genómico en el estadio de mórula del embrión murino. En las quince muestras masculinas analizadas, determinamos que el 96% del ADN se había degradado. En las diez muestras femeninas analizadas, la recuperación del ARN fue menor que en las muestras no tratadas. Se esperaban algunas pérdidas de ARN (debido a) una etapa ADNásica. La recuperación de ARN, sin embargo, fue considerablemente más alta que la obtenida con la extracción tradicional del ARN, utilizando, bien un kit de Aislamiento de Micro ARN (Stratagene, La Jolla, CA, USA), o bien un kit RNeasy Mini (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) acoplado a la digestión ADNásica. Otros tratamientos enzimáticos pueden incluirse en, o después de la segunda etapa, si es apropiado. Por ejemplo, se pueden someter a digestión las paredes de células vegetales u otros componentes utilizando una enzima glicosidásica, o se pueden someter a digestión paredes de células bacterianas utilizando lisozima. 40

Otra variación del tratamiento consiste en evitar la transcripción inversa para la totalidad o una parte de una mezcla preparada. Por ejemplo, una mezcla procedente de la segunda etapa, puede dividirse en dos partes. Una parte puede tratarse ulteriormente mediante RT-PCR, para cuantificar el ADNc total más el ADN genómico. La otra parte puede tratarse ulteriormente sin la transcripción inversa, de forma que sólo se amplifique el ADN genómico. La transcripción inversa puede evitarse de cualquier forma apropiada, que incluye la omisión de la transcriptasa inversa, la omisión de los cebadores para la transcripción inversa, o destruyendo los ARN con una ARNasa. 45

La división de la mezcla que sigue a la segunda etapa o posterior en el tratamiento, puede llevarse a cabo por otras razones. Por ejemplo, más que llevar a cabo un ensayo multiplexico con múltiples pares de cebadores y múltiples sondas de hibridación, una mezcla puede dividirse para ensayos paralelos no multiplexicos.

50 Pueden utilizarse también otras variaciones del tratamiento. Por ejemplo, los ARN pueden prepararse según la presente invención, marcados directamente o como ADNc transcrito inversamente, y sometido a hibridación y análisis en un microsoporte de oligonucleótidos inmovilizados.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Ensayos

55 Se llevó a cabo la preparación de las muestras según la presente invención, seguido por ensayos multiplexicos PCR en tiempo real en un tubo único de ensayo. El tratamiento subsiguiente a la preparación, es decir, después de la segunda etapa, utilizó los materiales y procedimientos de ensayo que se mencionan en Hartshorn, C. *et al.*, (2002), Developmentally-Regulated changes of Xist RNA Levels in Single Preimplantation Mouse Embryos, as Revealed by Quantitative Real-Time PCR, Mol. Reprod. Dev. 61: 425-436; y Hartshorn, C. *et al.* (2003), Differential

Patterns of Xist RNA Accumulation in Single Blastomeres Isolated from 8-Cell Stage Mouse Embryos Following Laser Zona Drilling, *Mol. Reprod. Dev.* 64: 41-51. Se desarrollaron seis embriones murinos hasta el estadio de blastocisto, tal como se detalla en la primera publicación mencionada anteriormente. Se llevaron a cabo rigurosamente todos los procedimientos experimentales, siguiendo las precauciones dirigidas a evitar o destruir la contaminación medioambiental ARNásica, tal como se describe en las dos publicaciones anteriormente citadas. Se prepararon LysoDots varios días antes de la recolección de los embriones, suministrando alícuotas de 20 nl del reactivo de fragmentación a las tapas de los tubos de ensayo para reacción. Se obtuvo la medición exacta del tamaño de las gotitas siguiendo el procedimiento descrito previamente por Wagh (Wagh, L.J. (1989). Injection of Xenopus Eggs Before Activation, Achieved by Control of Extracellular Factors, Improves Plasmid DNA Replication after Activation, *J. Cell Sci.* 93: (1-8). La composición del reactivo de fragmentación fue:

- 5 Sarcosil al 0,25%
- Isotiocianato de guanidina 2 M
- β mercapto-etanol 100 mM
- Dimetilsulfóxido al 1% (vol/vol)
- 15 Citrato sódico 0,01 M, pH 7,0

Se dejó que los LysoDots de 20 nl se secaran, situando los tubos abiertos bajo una campana, en condiciones estériles. La mayoría de las gotitas se secaron por la noche, pero algunas necesitaron 48 horas para que tuviera lugar la cristalización. No se observaron diferencias entre estas muestras, en términos de resultados experimentales. Los tubos se cerraron y guardaron hacia abajo a temperatura ambiente, hasta que se utilizaron.

20 Inmediatamente después de la recuperación, los embriones individuales se dispusieron en 3 ml de PBS de Dulbecco. Se aspiró entonces cada embrión en un capilar de vidrio que presentaba un diámetro interno de 0,2 mm, y presentaba un extremo estrecho, de forma que el volumen interior contenía aproximadamente 20 nl. El estrechamiento se obtuvo disponiendo los capilares de vidrio en un extractor de micropipetas (puller) (Industrial Science Associates, Inc., Ridgewood, NY). Se obtuvo entonces un extremo cónico redondeado, retirando suavemente la parte más delgada de la punta con una piedra abrasiva. Para un suministro óptimo del embrión al LysoDot, se aspiró el PBS al interior de la pipeta, ligeramente más allá del extremo cónico. Se dejó que el embrión se desplazara hacia la punta de la pipeta, expeliéndose entonces directamente sobre el LysoDot seco, en un volumen de PBS que era lo más cercano posible a 20 nl (quedándose en la pipeta algo de PBS). Este procedimiento completo se llevó a cabo bajo un microscopio, de forma que pudiera controlarse la posición del embrión en el interior de la pipeta. La observación microscópica hizo también que fuera posible comprobar una disolución completa e inmediata de los cristales de LysoDot, después de la adición del PBS que contenía al embrión.

35 Se cerraron los tubos hacia abajo, y se transfirieron en esta posición a una rejilla que estaba situada en un baño cerrado que se había calentado hasta 75-77°C. Se realizó la incubación durante 5 minutos. Después de esta etapa, las mezclas que contenían la muestra se secaron parcial o en completamente, debido a la evaporación. Los tubos se conservaron boca abajo a una temperatura de -20°C, hasta la próxima etapa.

40 Se llevó a cabo a continuación la segunda etapa de la preparación. En este caso, a causa de que el ejemplo incluye la transcripción inversa, el reactivo de dilución contenía oligonucleótidos además de agua. Se abrieron otra vez los tubos de ensayo bajo el microscopio y cada gotita seca se volvió a solubilizar añadiendo 6 μ l de una mezcla de hexámeros aleatorios (4,2 ng/ μ l) en agua tratada con DEPC (todos los reactivos provenían de un kit ThermoScript™ RT-PCR System, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Los tubos se cerraron y dispusieron brevemente, todavía hacia abajo, en un vórtice. Las muestras se centrifugaron entonces, se mezclaron otra vez en el vórtice (hacia arriba) y se hicieron girar durante un rato más.

45 Los tubos cerrados que contenían las muestras ácido nucleicas preparadas, se calentaron a 65°C durante 5 minutos para fundirlas moléculas del ARN bicatenario, enfriando entonces para hibridar los cebadores oligonucleótidos a las secuencias en el interior de las moléculas de ARN. Entonces, se abrieron los tubos para añadir 4 μ l de la solución de transcriptasa inversa, que diluyó la muestra, produciéndose un aumento volumétrico de alrededor de 1,7. La solución contenía 0,5 μ l de transcriptasa inversa ThermoScript (15 U/ μ l), 1 μ l de Mezcla de 10 mM dNTP, 0,5 μ l de ARNasaOUT™ (40 U/ μ l) y 2 μ l de Tampón de síntesis 5X ADNc (250 mM Tris acetato, pH 8,4, 375 mM acetato potásico, 40 mM acetato de magnesio). Se cerraron los tubos y se incubaron durante 10 minutos a 25°C, seguido por 50 minutos a 55°C, para preparar copias ADNc de ARN. La reacción finalizó calentando los tubos cerrados durante 5 minutos a 85°C, lo que desnaturalizó la transcriptasa inversa. A continuación, se enfriaron los tubos en hielo, se centrifugaron brevemente y se abrieron para añadir 0,5 μ l de ARNasa H de *E. coli* (2 U/ μ l). La incubación se llevó a cabo durante 20 minutos a 37°C para degradar las moléculas de ARN que se encontraban en la muestra. Las muestras se enfriaron y centrifugaron otra vez, y se guardaron a 20°C hasta la próxima etapa.

55 En un experimento, el volumen completo de cada muestra se transfirió a un tubo PCR en el que se mezcló con 89,5 μ l de reactivos PCR completos de amplificación y detección. Los reactivos comprendían 54,3 μ l de PCR- grado acuoso, 4 μ l de Mezcla de 10 mM dNTP (2'-desoxinucleósido 5'-trifosfatos), 10 μ l de 1 mM Tris cloruro, pH 8,3, 16 μ l de

25 mM cloruro de magnesio, 3 μ l de una mezcla de 10 μ M que incluye los cebadores superiores e inferiores para la amplificación de una secuencia de ADN y ARN del gen Xist, y los cebadores superiores e inferiores para la amplificación de una secuencia del gen Sry, sondas baliza moleculares para el amplicón del gen Sry (0,3 μ l cada una de las soluciones 100 μ M), y 1,6 μ l de una mezcla conteniendo 4 U de Taq polimerasa (Promega, Madison, WI) en forma de complejo con el anticuerpo Taq Platino (Invitrogen, Carlsbad, CA), que se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, antes de la adición a la solución PCR. La amplificación y detección se llevaron a cabo en un Detector Secuencial ABI Prism 7700. El perfil de ciclación fue: 95°C durante 5 minutos, 10 ciclos que consistieron en las tres etapas siguientes: 95°C (20 segundos), 57°C (60 segundos), 72°C (30 segundos), y 45 ciclos con las tres etapas siguientes: 95°C (20 segundos), 53°C (60 segundos), 72°C(30 segundos).

10 Los resultados del ensayo se muestran en las figuras 1 y 2. Haciendo referencia a la figura 1, puede apreciarse que tres embriones (Círculo 11) presentaban una señal Sry, y por tanto, eran del género masculino, mientras que otros tres embriones (Círculo 12) no presentaban señal Sry y, por tanto, eran del género femenino.

15 Es conocido que los blastocistos femeninos expresan altos niveles de Xist ARN, que es responsable de la inactivación de un cromosoma X, mientras que los embriones masculinos no tienen virtualmente Xist. Los resultados que se obtuvieron con la preparación según la presente invención, confirmaron plenamente estas expectativas. Haciendo referencia a la figura 2, puede apreciarse que la totalidad de los tres embriones femeninos (Círculo 21) generaron señales detectables por encima del "ruido de fondo", aproximadamente 6 círculos térmicos antes que los embriones masculinos (Círculo 22).

20 Tal como se ha indicado anteriormente, no se llevó a cabo tratamiento de las muestras entre la transcripción inversa y la PCR. Los resultados demuestran la efectividad de la presente invención para preparar directamente muestras para la amplificación, y demostrar posteriormente que todo el tratamiento podría llevarse a cabo en un único tubo. En otros experimentos, todas las etapas se realizaron con éxito en un tubo PCR, a cuya tapa se había añadido inicialmente un LysoDot. Por ejemplo, se utilizó el ensayo con el tubo único en las muestras siguientes: embriones murinos de 2, 3, 4 y 8 células y en embriones murinos en el estadio de blastocisto, blastómeros únicos aislados de embriones murinos de cuatro y ocho células, y embriones murinos tratados con ADNasa (véase el ejemplo 3 a continuación).

EJEMPLO 2. Cuantificación

30 Las reacciones de control que contienen cantidades decrecientes de ADN genómico de ratones masculinos (desde 10.000 genomas a 10), se utilizaron para construir representaciones gráficas lineales del número de genomas con respecto a C_T , el ciclo térmico al cual la señal se vuelve detectable por encima del ruido de fondo. Los resultados se representan en la figura 3. Las representaciones gráficas para las señales, tanto de Xist (curva 31) como de Sry (curva 32), se encuentran sobre las líneas rectas que virtualmente se solapan. La comparación de los valores C_T de las curvas del Círculo 21 en la figura 2, que presenta una C_T de aproximadamente 19, con la curva estándar 31 de la figura 3 y las curvas del Círculo 22, que muestran una C_T de aproximadamente 25, con la curva estándar 31 de la figura 3, permite calcular que cada embrión contiene aproximadamente 100 genomas y que cada embrión femenino contiene aproximadamente varios miles de copias del Xist ARN (ADNc). Estos resultados son muy similares a los hallazgos previos, de los que se informó en las referencias bibliográficas mencionadas anteriormente, basados en un enfoque tradicional de la extracción de ácidos nucleicos a partir de los embriones murinos.

40 Ninguno de los embriones masculinos que se ensayaron con el procedimiento de preparación de las muestras de la presente invención, como parte de un ensayo en un tubo único, presentaba niveles de Xist ADN superiores a los de Sry ADN. Esto se aprecia comparando los valores C_T de las curvas en el Círculo 11 (figura 1) con los valores C_T de las curvas en el Círculo 22 (figura 2). Este resultado coincide con la ausencia de expresión del gen Xist embriones masculinos y la presencia de un cromosoma X (un gen Xist) y de un cromosoma Y (un gen Sry) en cada célula masculina. Dos de los embriones masculinos presentan aproximadamente 100 genomas, tal como se esperaba, mientras que el tercer embrión masculino estaba compuesto probablemente de menos células (un hallazgo que no es inusual para los embriones cultivados). En los embriones femeninos, la presencia de Xist ARN además de su ADN genómico, conduce a la detección de miles de copias matriciales de Xist en cada muestra.

EJEMPLO 3. Tratamiento con ADNasa

50 Se ensayó la eficiencia del tratamiento con ADNasa en las muestras preparadas con el procedimiento de la presente invención, de la forma siguiente:

55 Treinta y cinco embriones murinos en el estadio de mórula (con aproximadamente 16-32 células) se recogieron individualmente sobre "Lyso-Dots", fragmentándose tal como se detalla para el ejemplo 1, con la diferencia de que se obtuvieron congelados los embriones con 8 células, en vez de los que presentaban 2. Cada ensayo se llevó a cabo desde el principio al final en el mismo tubo PCR de 200 μ l (microAmp Optical Tubes, Applied Biosystems, Foster City, CA), aunque las tapaderas (Optical Caps, Applied Biosystems) se reemplazaron cada vez que los tubos se abrían, con el fin de evitar la contaminación. Las muestras se procesaron completamente como en el ejemplo 1, que, por lo tanto, contendrían al final del ensayo tanto ADN genómico como ADNc, y a las que se designó como controles. En las 25 muestras restantes, la segunda etapa de preparación se modificó para permitir la degradación del ADN genómico, tal como se expone a continuación, de forma que en este protocolo la transcripción inversa llegara a convertirse en la

tercera etapa de preparación y la PCR, en la cuarta (etapa). Se cuidó particularmente la asignación de embriones a los grupos de Control y a los tratados con ADNasa que presentaran características morfológicas y de desarrollo equivalentes.

5 Cada muestra fragmentada y calentada (seca o parcialmente seca) se volvió a suspender en la tapadera que contenía originariamente el LysoDot con 4 µl de Mezcla de ADNasa, que mostraba la siguiente composición:

Mezcla de ADNasa (ración de reactivos por 10 µl):

1 µl Tampón de reacción 10X (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), conteniendo 200 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 20 mM MgCl₂, y 500 mM KCl

0,5 µl ADNasa I (2 U/µl) (Ambion, Inc., Austin, TX)

10 8,5 µl H₂O libre de Nucleasa (Ambion)

Se obtuvo así, en esta etapa, una dilución de 200 veces los reactivos que comprendían originariamente el LysoDot, consiguiendo de esta forma que la concentración de guanidina en la etapa de digestión con la ADNasa fuera de 10 mM (2 M diluidos 200:1), a cuya concentración la reacción enzimática no fue inhibida.

15 Se cerraron los tubos, sometidos al vórtice en posición invertida, u se centrifugaron, tal como se describe en el ejemplo 1. La digestión del ADN genómico en las muestras se llevó a cabo durante 20 minutos a temperatura ambiente, finalizando la reacción añadiendo 1 µl/ensayo de una solución 10 mM EDTA (grado biología molecular, Invitrogen) y calentando a 65°C durante 10 minutos. Como es conocido por los expertos en la materia, es necesaria la adición de un agente quelante para evitar la escisión de las cadenas de ARN dependiente del magnesio durante la etapa de calentamiento que desnaturaliza la ADNasa, que bloquea, por lo tanto, su actividad ulterior cuando se produce el ADNc durante la transcripción inversa del ARN.

20 Después del tratamiento con ADNasa, cada muestra recibió 2 µl de una mezcla de cebadores hexámeros aleatorios, preparada de la manera siguiente:

0,5 µl hexámeros aleatorios (50 ng/µl)

0,5 µl H₂O tratada con DEPC

25 (Ambos reactivos procedentes de Invitrogen, tal como se describe en el ejemplo 1)

El volumen total de cada ensayo entonces era de 6 µl. Después de la incubación de los cebadores con ARN, tal como se detalla en el ejemplo 1, se añadieron los reactivos de la transcripción inversa en un volumen de 4 µl, llevándose a cabo también todas las etapas restantes de transcripción inversa y PCR tal como se describe en el ejemplo 1.

30 Los resultados indicaron que, en promedio, se recuperaron 42,6 copias por embrión del ADN genómico Xist + Sry de las muestras de control masculinas, que correspondían a un número promedio de 21,3 células por embrión, y que confirmaban el número esperado de células por embrión en el estadio de mórula, basado en que una célula masculina contiene una copia de cada uno de estos dos genes. Después del tratamiento con ADNasa, sólo 1,6 copias por embrión del ADN genómico Xist + Sry permanecieron en las muestras masculinas, o sea, un 4% del valor de control, indicando que la actividad ADNásica (en presencia de 10 mM de guanidina, y bajo las condiciones experimentales utilizadas), fue óptima, degradando el 96% del ADN presente. (En un experimento paralelo, en el que se llevó a cabo la incubación ADNásica durante 15 minutos y no durante 20, se consiguió una degradación del 90% del ADN genómico en las muestras masculinas). Se consideró que este nivel de efectividad era muy alto, porque es conocido que la ADNasa I fragmenta de forma bastante ineficiente el ADN a baja concentración, poseyendo escasa afinidad por su sustrato.

De forma no inesperada, la recuperación del ARN resultó parcialmente afectada por la presencia de la etapa ADNásica. Tal como se expone ampliamente en la literatura, no existe un procedimiento ideal que permita una digestión completa del ADN sin alterar la recuperación del ARN.

45 En el presente ensayo, el promedio de recuperación del Xist ARN a partir de las muestras femeninas tratadas con ADNasa fue inferior a la recuperación del Xist ARN de los controles femeninos. La amplificación de las matrices de ADN durante la PCR, no resultó afectada por la presencia de los reactivos de la Mezcla ADNásica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para tratar enzimáticamente moléculas ácido nucleicas en una mezcla que incluye un agente caotrópico, proteínas degradadas y desnaturalizadas y moléculas de ADN y ARN liberadas de las proteínas unidas, que comprende la dilución de dicha mezcla con por lo menos un reactivo acuoso para reducir la concentración del agente caotrópico a menos de 0,05 M, preferentemente a menos de 0,01 M, y someter por lo menos algunas de dichas moléculas de ARN y ADN a por lo menos un tratamiento enzimático sin extraer o aislar dichas moléculas de ARN y ADN unas de otras, o de los otros componentes de la mezcla de reacción.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha mezcla incluye por lo menos un componente seleccionado de entre el grupo constituido por un detergente que lisa células, un agente reductor, un disolvente miscible en agua, un agente quelante, y un tampón neutralizante.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la dilución se lleva a cabo mediante la adición en serie de por lo menos dos reactivos acuosos.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho por lo menos un tratamiento enzimático incluye la amplificación exponencial del ácido nucleico.
- 15 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha amplificación es un proceso de reacción en cadena de la polimerasa o una transcripción inversa.
- 20 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se incluye una enzima para llevar a cabo dicho por lo menos tratamiento enzimático en dicho por lo menos un reactivo acuoso; en el que opcionalmente dicha enzima es seleccionada de entre el grupo constituido por una ADNasa, una transcriptasa inversa, una ADN polimerasa y una glucosidasa.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la dilución y dicho por lo menos un tratamiento enzimático se llevan a cabo en el mismo recipiente; en el que opcionalmente dicho recipiente es seleccionado de entre el grupo constituido por un tubo, una placa de microtitulación y un dispositivo microfluídico.
- 25 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha mezcla se prepara incubando una muestra que contiene moléculas de ARN y ADN unidas a proteínas y un agente de fragmentación que contiene un agente caotrópico a una concentración del agente caotrópico de por lo menos aproximadamente 2 M.
- 30 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la incubación de la muestra y el reactivo de fragmentación incluye el calentamiento, siendo así el agente caotrópico concentrado, en el que preferentemente dicho calentamiento es suficiente para que la mezcla resultante sea por lo menos semiseca, y en el que opcionalmente la mezcla resultante se conserva antes de su utilización.
10. Procedimiento según la reivindicación 8 ó 9, en el que la incubación y la dilución se llevan a cabo en el mismo recipiente.
- 35 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho reactivo de fragmentación es un reactivo seco; en el que opcionalmente dicho reactivo de fragmentación seco se prepara a partir de una mezcla que incluye un disolvente miscible en agua y/o en el que dicho reactivo de fragmentación seco se prepara a partir de una mezcla que incluye por lo menos un componente seleccionado de entre el grupo constituido por un detergente que lisa las células, un agente reductor, un agente quelante y un tampón neutralizante.
- 40 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicho reactivo seco se adhiere a una superficie de un recipiente, por ejemplo, siendo dicha superficie la superficie interior de un tubo, una tapa de tubo, un pocillo de una placa de microtitulación, o una cubierta de una placa de microtitulación.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que dicha muestra comprende desde una fracción de una célula hasta 200 células.
- 45 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en el que la cantidad del reactivo de fragmentación es suficiente para proporcionar una concentración de 2 M a 8 M del agente caotrópico en un volumen de 20 a 50 nl.
15. Procedimiento de recipiente único, para la síntesis de ADNc a partir del ARN en una muestra biológica utilizando una transcriptasa inversa amplificando y detectando por lo menos una secuencia seleccionada de dicho ADNc, que comprende:
- 50 a) combinar dicha muestra biológica con un reactivo de fragmentación, que comprende una sal caotrópica que presenta una concentración de por lo menos 2 M durante un tiempo y a una temperatura suficientes para desnaturalizar o degradar las proteínas para producir una muestra fragmentada que contiene ARN liberado de las proteínas unidas e inactivar las nucleasas con una pérdida de ARN no superior al veinticinco por ciento;

- b) reducir la concentración de la sal caotrópica en dicha muestra fragmentada a menos de 0,05 M diluyendo sin lavar la muestra fragmentada con por lo menos un reactivo acuoso antes de añadir la transcriptasa inversa;
- c) incubar con transcriptasa inversa la muestra diluida y fragmentada para transcribir dicho ARN a ADNc;
- d) amplificar por lo menos una secuencia seleccionada de dicho ADNc; y

5 e) detectar dicha por lo menos una secuencia amplificada del ADNc

en el que las etapas b) a e) se llevan a cabo sin separar inicialmente el ARN de las proteínas degradadas o de dicha sal caotrópica.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicho reactivo de fragmentación comprende un detergente que lisa las células.

10 17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que dicha muestra biológica comprende por lo menos una célula.

18. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que la etapa a) comprende el calentamiento para concentrar la sal caotrópica después de combinar la muestra biológica con el reactivo de fragmentación.

15 19. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que en la etapa b) la concentración de la sal caotrópica se reduce a menos de 0,01 M.

20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que la sal caotrópica es un reactivo seco que es reconstituido durante su utilización.

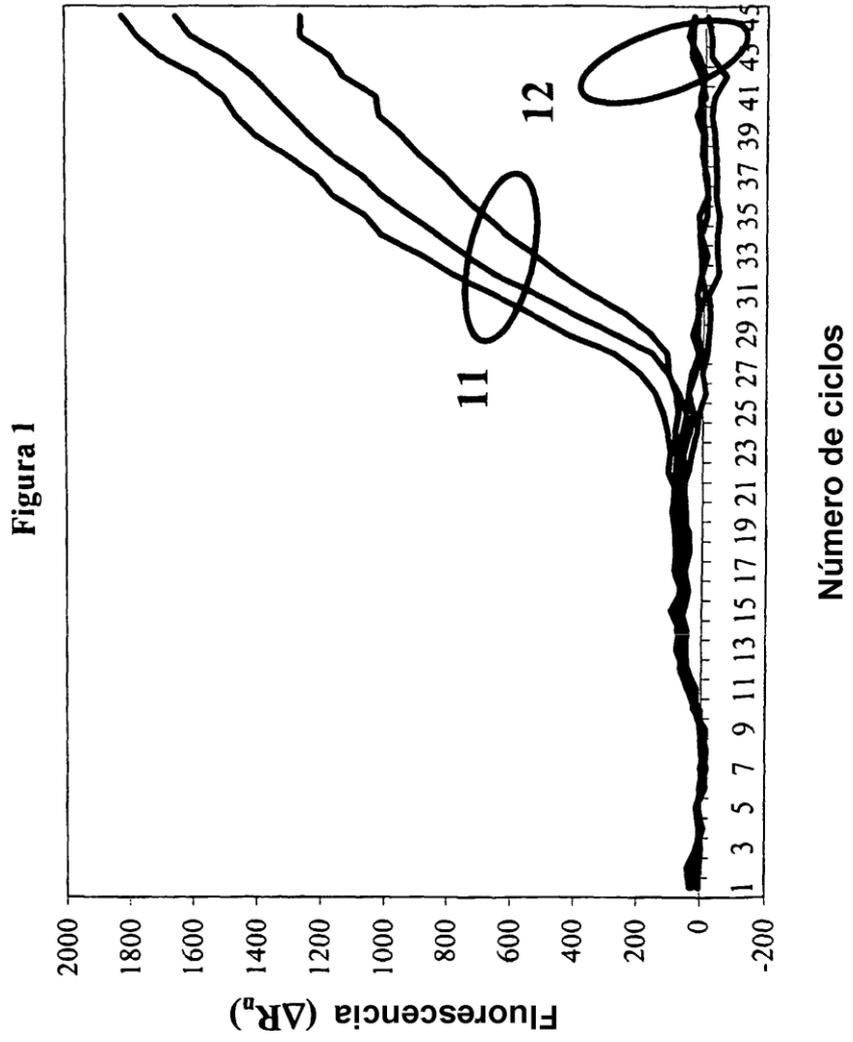
20 21. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que la etapa b) comprende la dilución con agua que comprende hexámeros aleatorios, calentar para desnaturalizar las cadenas dobles, y el enfriamiento para hibridar los hexámeros aleatorios al ARN.

22. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que la etapa c) comprende la adición de la transcriptasa inversa y el tampón RT en una cantidad que no diluye además, por más de un factor de seis, la muestra fragmentada y diluida procedente de la etapa b).

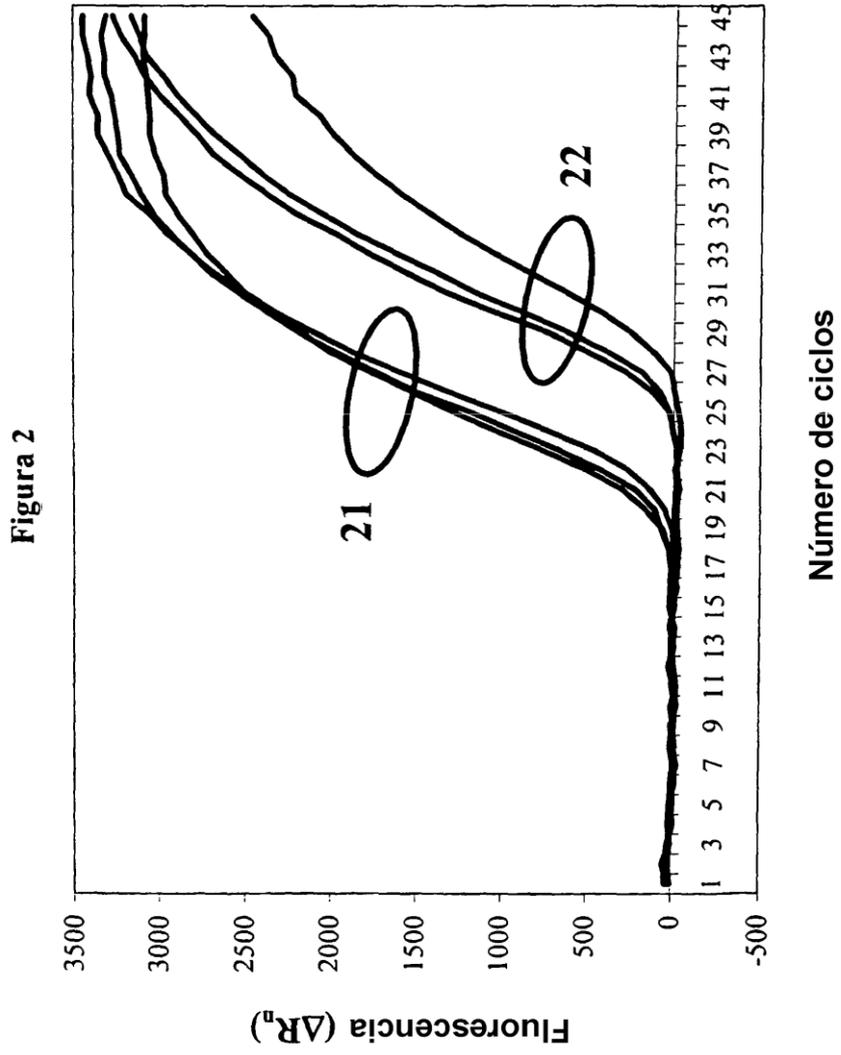
25 23. Procedimiento según la reivindicación 22, en el que en la etapa d) la amplificación se lleva a cabo en un tampón de amplificación que es añadido en esta etapa, y en el que esta adición diluye el ADNc por un factor de por lo menos nueve.

24. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que las proteínas que son desnaturalizadas o degradadas comprenden las nucleasas.

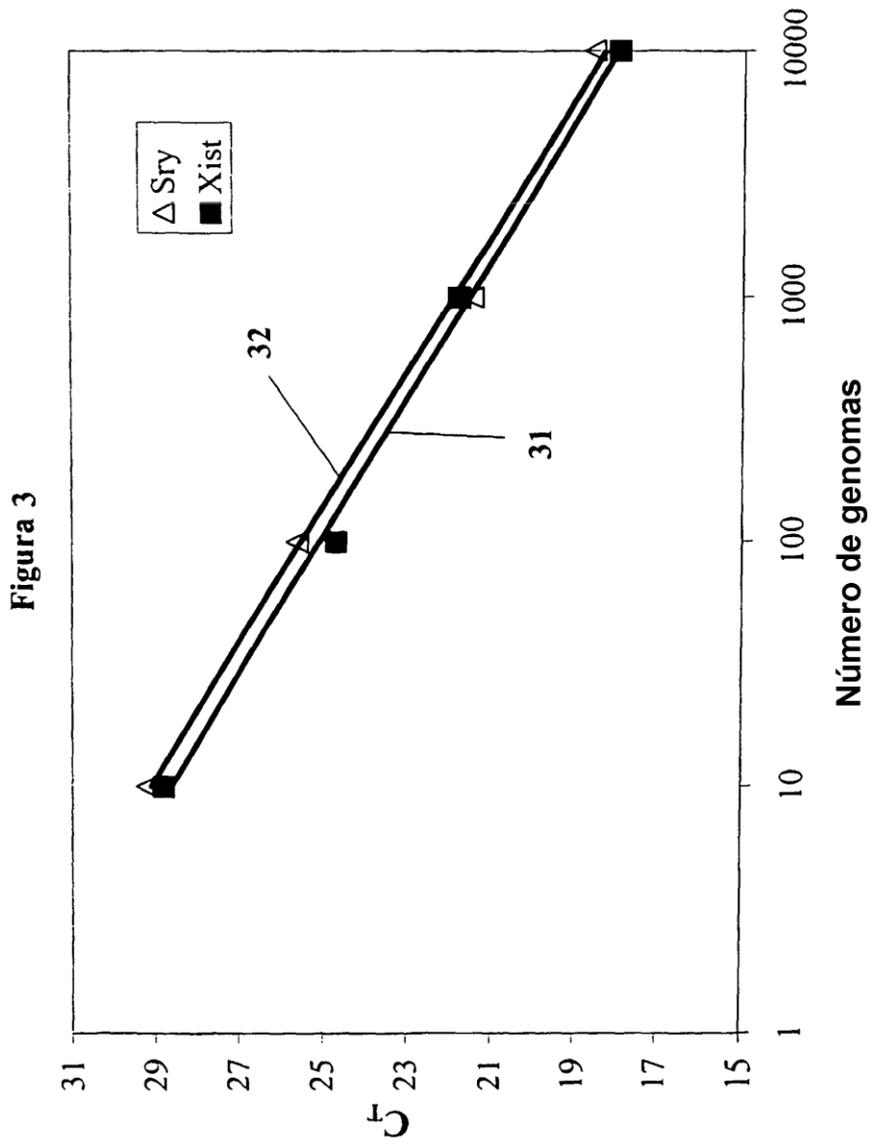
1 / 5



2 / 5



3 / 5



4 / 5

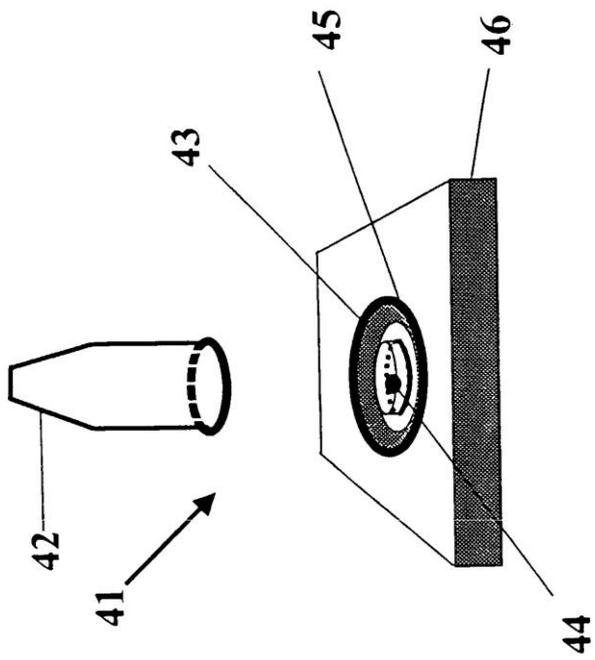


Figura 4

5 / 5

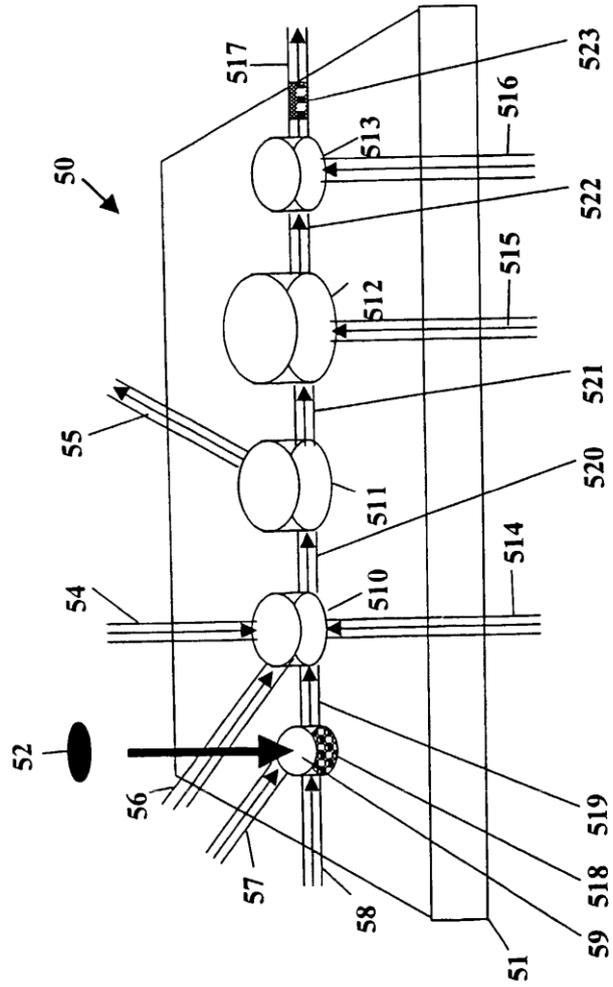


FIGURA 5