



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 447**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08749213 .8**

96 Fecha de presentación : **29.04.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2147119**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.01.2010**

54 Título: **Cuantificación del ARNm de células individuales con RT-PCR en tiempo real.**

30 Prioridad: **03.05.2007 EP 07008961**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.10.2011

73 Titular/es: **ROCHE DIAGNOSTICS GmbH**
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, DE
F. Hoffmann-La Roche AG. y
TATAA Biocenter AB.

72 Inventor/es: **Bengtsson, Martin;**
Kubista, Michael;
Stahlberg, Anders y
Stroembom, Linda

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Cuantificación del ARNm de células individuales con RT-PCR en tiempo real

5 Sector técnico

La presente invención da a conocer un método para la determinación del ARNm en células de mamífero individuales. Utilizando una PCR ("reacción en cadena de la polimerasa") cuantitativa, conjuntamente con procedimientos optimizados para la recolección, lisis y transcripción inversa de las células, el método permite el estudio del número, distribución, correlaciones e inducción génica de transcritos a nivel de células individuales.

Técnica previa

Las células de una población son en muchos aspectos singulares en sus características, incluso en un cultivo o tejido aparentemente homogéneo. Los niveles de expresión génica muestran grandes variaciones de una célula a otra, debido a factores de origen externo (extrínsecos) e interno (intrínsecos) [1]. Igualmente, cuando se exponen a estímulos idénticos, las células se comportan frecuentemente de forma estocástica [1-7]. Ello significa que no puede asumirse que los datos obtenidos de una población de células reflejan el comportamiento de las células individuales. Se ha sugerido que las células pueden responder a estímulos mediante salvas de actividad transcripcional y que funcionan como un conmutador binario [4-9]; es decir en forma de "todo o nada".

Para determinar si dos transcritos se expresan en paralelo (expresión elevada al mismo tiempo) en anti-paralelo (una es alta cuando la otra es baja), se requiere realizar un análisis de la transcripción a nivel de células individuales. Cuando se analizan grupos de células al mismo tiempo, se pierde información importante. Por ejemplo, no es posible discriminar entre un pequeño cambio en la transcripción génica, que se produce en todas las células y grandes cambios en unas pocas células. Además, la heterogeneidad celular en los tejidos hace que el análisis de tipos celulares específicos sea dificultoso. Estos problemas se resuelven realizando determinaciones a nivel de células individuales.

Una célula eucariota típica contiene aproximadamente 25 pg de ARN del cual menos del 2% es ARNm [10]. Ello corresponde a unos pocos centenares de miles de transcritos de ~10.000 genes que se expresan en cada célula en momento concreto. Las técnicas de imagen, tales como la hibridación in-situ fluorescente múltiplex (FISH), pueden monitorizar la actividad de transcripción génica dentro de una célula individual mediante el marcaje de ARNs específicos [3-4] y puede aplicarse a células vivas para proporcionar atisbos temporales de la complejidad de la maquinaria transcripcional. Se han determinado los niveles de proteínas en células individuales en bacterias [1, 7] y levaduras [6] utilizando proteínas informadoras fluorescentes. Para realizar un análisis completo del transcriptoma de una célula individual, se utilizan micromatrices (chips), precedidas de una amplificación no específica del ADNc.

El método más ampliamente utilizado para el análisis del ARNm de células individuales es la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa RT-PCR (RT-PCR), y la RT-PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR) correspondiente. Esta técnica ofrece una sensibilidad, exactitud y rango dinámico superiores en comparación con métodos alternativos de determinación del ARNm [12-13]. El número de transcritos que puede analizarse fácilmente en las células individuales es pequeño, pero la amplificación previa del ADNc incrementa de forma importante este número [13-14].

Sin embargo, los protocolos para el análisis de células individuales existentes hasta el momento en la técnica solamente son útiles para la detección de dianas con un nivel elevado de expresión. Estos métodos no proporcionan la sensibilidad necesaria para detectar ARNs diana, cuyo nivel de expresión es comparativamente bajo.

50 Descripción breve

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención versa sobre un método para realizar una RT-PCR para amplificar un ARN diana que comprende las etapas de:

- a) lisis de una muestra biológica formada solamente por unas pocas células que se supone que contiene dicho ARN diana con un tampón de lisis que contiene entre 0,05 M y 1 M de agente Caotrópico
- b) diluir dicha muestra hasta un nivel tal que el agente Caotrópico se halle durante la etapa c) a una concentración de aproximadamente 10 a 60 mM
- c) sin ninguna etapa de purificación intermedia realizar la transcripción inversa de dicho ARN en presencia de una mezcla de cebadores de síntesis de ADNc de la primera cadena, estando formada dicha mezcla por cebadores que se hibridan a una secuencia poli-A y/o cebadores aleatorios
- d) someter dicha muestra a múltiples ciclos de un protocolo de termociclado y monitorizar la amplificación

de dicha primera cadena de ADNc en tiempo real.

Este método es típicamente aplicable si la muestra comprende solamente un número limitado de células, es decir no más de 100 células, y preferentemente menos de 10 células. En concreto, el método es aplicable incluso si la muestra comprende solamente una sola célula.

Preferentemente, la etapa a) se realiza durante al menos 5 minutos a una temperatura entre aproximadamente 75 °C y 85 °C.

También preferentemente, dicho agente caotrópico es el tiocianato de guanidina. Alternativamente, dicho agente caotrópico puede seleccionarse del grupo formado por clorhidrato de guanidina, cianato potásico y sulfato amónico.

En una realización importante, dicha muestra biológica está formada por no más de 100 células o preferentemente no más de 10 células. En una realización importante específica, dicha muestra biológica es una sola célula.

Preferentemente, el tampón de lisis contiene entre aproximadamente 0,2 y 0,5 M de agente caotrópico.

También preferentemente, durante la etapa c), es decir, durante la reacción de la transcriptasa inversa, el agente caotrópico se halla presente en una concentración de aproximadamente 10-60 mM, más preferentemente entre 30 y 50 mM y de forma más preferente aproximadamente 40 mM.

Opcionalmente, la reacción de la transcriptasa inversa puede realizarse en presencia de 0,5 a 2% de NP 40.

La etapa de incubación a) a una temperatura entre aproximadamente 75 °C y 80 °C puede realizarse en algunos casos en presencia de proteinasa K a las concentraciones descritas más adelante.

Opcionalmente, la muestra se congela a una temperatura entre aproximadamente -20 °C y -80 °C entre las etapas a) y b).

Según la presente invención es altamente preferente, que dicha mezcla de cebadores de síntesis de ADNc comprenda ambos: cebadores que se hibridan a una secuencia poli-A así como cebadores aleatorios.

El cebador aleatorio es habitualmente un cebador hexámero aleatorio. Los cebadores que se hibridan a una secuencia poli-A son habitualmente cebadores oligo-dT u oligo-dU. En una realización preferente, dichos cebadores que se hibridan a una secuencia poli-A y los cebadores aleatorios están presentes en cantidades iguales. En otra realización preferente, que es compatible con la anterior, dichos cebadores que se hibridan a una secuencia poli-A y los cebadores aleatorios están ambos presentes a una concentración entre 1 µM y 5 µM. Son altamente preferentes concentraciones de aproximadamente 2,5 mM de ambos.

En una realización muy específica, adecuada para el análisis de muestras biológica multicelulares, el método según la presente invención comprende las etapas de

a) lisis de una muestra biológica que se supone que contiene dicho ARN diana con un tampón de lisis que contiene una concentración de tiocianato de guanidina entre 0,2 M y 1 M mediante

- incubación durante al menos 5 minutos a una temperatura entre aproximadamente 55 °C y 85 °C en presencia o ausencia de proteinasa K
- incubación entre aproximadamente 2 y 10 minutos a 95 °C
- congelación de dicha muestra a -25 °C

b) diluir dicha muestra hasta un nivel en el que el tiocianato de guanidina esté presente en una concentración de entre aproximadamente 20 y 60 mM

c) realizar una transcripción inversa en presencia de una mezcla de cebadores de síntesis de ADNc de la primera cadena, estando formada dicha mezcla por cebadores de secuencia aleatoria y cebadores que se hibridan a una secuencia poli-A

d) someter dicha muestra a múltiples ciclos de un protocolo de termociclado y monitorizar la amplificación de dicha primera cadena de ADNc en tiempo real.

En otra realización muy específica adecuada para el análisis de células individuales, el método según la presente invención comprende las etapas de

- a) lisis de una célula individual que se supone que contiene dicho ARN diana con un tampón de lisis que contiene una concentración de tiocianato de guanidina entre 0,2 M y 1 M mediante
 - incubación durante al menos 10 minutos a una temperatura entre aproximadamente 75 °C y 85 °C en presencia o ausencia de proteinasa K
 - congelación de dicha muestra a una temperatura entre -75 °C y -80 °C
- b) diluir dicha muestra hasta un nivel en el que el tiocianato de guanidina esté presente en una concentración de entre aproximadamente 30 y 50 mM
- c) realizar una transcripción inversa en presencia de una mezcla de cebadores de síntesis de ADNc de la primera cadena, estando formada dicha mezcla por cebadores que se hibridan a una secuencia poli-A y cebadores aleatorios
- d) someter dicha muestra a múltiples ciclos de un protocolo de termociclado y monitorizar la amplificación de dicha primera cadena de ADNc en tiempo real.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Visión global de la obtención del perfil de expresión génica de una célula individual utilizando la qRT-PCR. Las alternativas y aspectos importantes de cada etapa del procedimiento, abordados en este estudio, se muestran enmarcados por un cuadrado. Las etapas opcionales se muestran con flechas de puntos.

Figura 2: Evaluación de tampones de lisis. (A) determinación de la eficiencia de lisis. Cada barra indica el rendimiento relativo de Ins2 utilizando un islote pancreático individual (-2.000 células) como material de partida. Cada islote se trató con las concentraciones indicadas de o bien NP-40, con o sin tratamiento con proteinasa L (Prot K), o tiocianato de guanidina (GTC). Solamente la lisis con GTC 0,5 M presentó un efecto significativo en comparación con las concentraciones control ($p < 0,001$, $n = 3$). (B) Efecto de los tampones de lisis sobre el rendimiento de la reacción de RT. Como material de partida se utilizaron cantidades iguales de ARN total del islote purificado. Se analizaron los rendimientos relativos de cinco genes: Ins1, Gcg, Sst, Gapdh y Rps29. Se añadieron a la reacción de RT cantidades progresivamente mayores de tiocianato de guanidina. Se observa una diferencia significativa en todos los genes entre el control y las concentraciones 40mM y 120 mM ($p < 0,05$) pero no para la concentración 80 mM. Los valores son la media $\pm$ SEM (error estándar de la media) de 3 experimentos independientes.

Figura 3: Optimización de la reacción de RT. Se midieron cuatro genes: Ins1, Ins2, Rps29 y Hprt. (A) Determinación de la concentración óptima de cebadores RT utilizando u oligo(dT) o hexámeros aleatorios. (B) Comparación de estrategias de cebado de RT. Se muestran los rendimientos relativos de la reacción de RT de varias combinaciones de cebadores. Se utilizaron concentraciones 2 μ M de u oligo(dT) o de hexámeros aleatorios o de ambos. Los perfiles de temperatura utilizados fueron isotérmico (barras negras), gradiente (barras blancas) y ciclado (barras grises). Los valores son la media $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes.

Figura 4: Reproducibilidad técnica de la RT y la qPCR. (A) Se realizaron las reacciones de RT y qPCR por triplicado de diluciones de ARN total de islote purificado equivalentes a la cantidad hallada en una célula individual. Se muestra la desviación estándar (SD) de las determinaciones de tres genes (Ins1, Ins2 y Gcg), con la contribución de la qPCR (cuadrados negros) y la RT (círculos rojos). Se muestran como referencia la SD de reacciones de qPCR por triplicado basadas en cantidades predeterminadas de producto PCR purificado de Ins1, Ins2, Gcg, Rps29 y Hprt (línea negra continua). La variabilidad entre estos cinco ensayos se muestra en forma de barras de error (SD). (B) Se evaluaron células β individuales con reacciones de RT por triplicado y qPCR por duplicado para visualizar la variabilidad de las determinaciones de ARNm en células individuales. El número de copias Ins hace referencia al número de moléculas en la reacción de RT. Se analizó en cada reacción aproximadamente el 3% de la célula original.

Figura 5: Transcritos Ins2 cuantificados en 126 células β de islotes de Langerhans. (A) Nivel de expresión de Ins2 de cada célula β , incubada en glucosa 3, 6, 10 o mM, según se indica. (B) El histograma muestra que los niveles de expresión de Ins2 tiene una distribución lognormal. Los niveles de transcritos están centrados en la media para las cuatro concentraciones de glucosa.

Descripción detallada

El método según la presente invención permite obtener el perfil de expresión génica de sólo unas pocas células e incluso de una sola célula. Se cuantifican las especies de ARNm de células individuales o de pocas células se cuantifican mediante qRT-PCR. A nivel de población celular, los niveles de expresión génica habitualmente se normalizan respecto a genes de referencia [15]. La naturaleza estocástica de las células individuales invalida este

enfoque, haciendo de la cuantificación absoluta la mejor opción para comparar niveles de transcritos dentro de una célula y entre células. Por lo tanto, para mejorar los protocolos experimentales para optimizar la lisis celular y la accesibilidad al ARNm, se analizaron de forma sistemática el rendimiento de ARNm de la reacción de transcripción inversa y la calidad. El método se demostró en células individuales de islotes de Langerhans de ratón, poniendo de

Se recogieron células dispersadas con un capilar de vidrio, se vaciaron en tampón de lisis y se analizaron mediante qRT-PCR. La figura 1 describe el procedimiento experimental. Para evaluar la calidad, se generó una molécula de ARN artificial basada en el gen de la ciclofilina E (Ppie) mediante transcripción *in vitro*. Se añadió una cantidad igual de ARN Ppie junto con el tampón de lisis a todos los tubos antes de depositar en los mismos las células individuales. El ARN fue capaz de reducir la adsorción de la propia célula o de las ARNm de las células individuales a las superficies. Las muestras con valores de ciclo umbral (Ct), anómalos para el Ppie-ARN añadido, pueden ser debidas a la degradación por ARNasas. Estas muestras se analizaron de nuevo y, si el problema persistía, se excluyeron de los análisis ulteriores. La presencia de inhibidores puede reducir el rendimiento de ADNc.

El propósito del tampón de lisis es hacer que el ARNm sea accesible al enzima de la RT. Para este cometido se seleccionaron dos detergentes, uno débil, no caotrópico (Igepal CA-630, a.k.a. NP-40) y uno fuerte, caotrópico (tiocianato de guanidina GTC). Se evaluaron la eficiencia de la lisis y la influencia potencial sobre la consiguiente reacción de RT. Se evaluaron cinco condiciones de lisis diferentes en términos de su capacidad para lisar un islote pancreático (figura 2A). NP-40 no tuvo efecto alguno en comparación con el control (agua) cuando se utilizó a concentraciones del 0,5% y el 4%. La proteinasa K no tuvo efecto alguno cuando se añadió en presencia de NP-40 al 0,5%. El tampón de lisis con GTC proporcionó una lisis eficiente del islote utilizando una concentración de 0,5 M e incrementó el rendimiento de ARN 600 veces; un efecto que disminuyó de forma importante a la concentración 4 M.

A continuación, se compararon los tampones de lisis respecto a su efecto sobre la reacción de RT. Las concentraciones bajas (0,1 %) de NP-40, independientemente de la adición de proteinasa K, no tuvieron efecto alguno en comparación con las condiciones control. Sin embargo a una concentración del 1%, NP-40 provocó una mejora pequeña pero significativa de la eficiencia de la RT. En la figura 2B, se analizaron tres concentraciones de GTC (40 mM, 80 mM y 120 mM) sobre cinco genes. La eficiencia de la reacción mejoró significativamente (2 a 6 veces) para todos los genes analizados utilizando GTC 40 mM. Por el contrario, GTC 80 mM no tuvo efecto alguno mientras que la concentración de GTC 120 mM fue de hecho inhibidora. La adición de 2-mercaptoetanol a concentraciones del 0,5, 1 y 5% no mejoraron el rendimiento de la reacción de RT solo o conjuntamente con GTC (datos no mostrados) La formación de los productos de PCR correctos se confirmó mediante electroforesis en gel de azarosa. De los detergentes analizados, se seleccionó GTC debido a su mayor capacidad de lisis y su efecto positivo sobre la reacción de RT a una concentración de 40 mM.

La cuantificación adecuada de los transcritos raros requiere una generación eficiente de ADNc mediante transcripción inversa (RT). En la figura 3, se analizó el cebado de la reacción de RT mediante hexámeros aleatorios y nucleótidos oligo(dT) para cuatro genes: insulina 1 (Ins1), insulina 2 (Ins2), proteína ribosómica S29 (Rps29) e hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (Hprt). Se analizó el efecto de la concentración de cebadores de RT (figura 3A). La eficiencia de la RT generalmente aumentó con concentraciones crecientes de cebadores, aunque se observaron algunas diferencias entre los genes estudiados. El cebado con 2,0 μ M tanto de oligo(dT) como de hexámeros aleatorios dio lugar a un rendimiento elevado de ADNc. En la figura 3B, se analizó el efecto de la combinación de cebadores de RT y perfiles de temperatura. Se analizaron tres perfiles de temperatura diferentes (isotérmico, gradiente y ciclado) en combinación con estrategias de cebado con hexámeros aleatorios y oligo(dT). La combinación de ambos métodos de cebado fue superior o igual en todos los casos al mejor método de cebado individual utilizado. Puede realizarse la hipótesis de que la iniciación de la reacción de RT, etapa en la cual el cebador de RT se hibrida con su molécula de ARNm diana, es crítico. Una temperatura gradualmente creciente (gradiente) permitiría que los cebadores de RT de bajo punto de fusión se hibridaran a su diana, permitiendo a su vez la desnaturalización de estructuras secundarias fuertes en las etapas finales de la incubación. Se analizó también un perfil de temperatura ciclado, que se ha notificado recientemente que incrementa el rendimiento de ADNc para la cuantificación de microARN [14]. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el rendimiento o reproducibilidad entre los perfiles de temperatura analizados. Se observó una diferencia de 2-5 veces entre la peor y la mejor combinación cebador/temperatura. Puede concluirse que una combinación de 2,0 μ M oligo(dT) y 2,0 μ M de hexámeros aleatorios maximiza el rendimiento de la reacción de RT.

Además del cebado con oligo(dT) y hexámeros aleatorios, se evaluó el cebado de la RT con cebadores específicos de gen (GSP). Para algunos genes se observó la formación dependiente de la concentración de productos no específicos en la PCR subsiguiente. Este efecto fue más pronunciado al utilizar una mezcla de diferentes GSPs. Para determinar si era un efecto sobre la RT o sobre la PCR, los GSP se añadieron directamente a la PCR. Una concentración total de GSPs en la PCR superior a 0,4 μ M, dio lugar a la formación de productos de PCR erróneos. Sin embargo, la dilución del ADNc transcrito inversamente con GSP solamente eliminó parcialmente la formación de productos inespecíficos. Por lo tanto, las concentraciones elevadas de GSPs afectan negativamente tanto las reacciones de RT como de PCR.

En la figura 4A se presenta la reproducibilidad técnica de la RT y la qPCR. Se muestra la reproducibilidad de las reacciones de RT y qPCR, representadas por la desviación estándar de los valores Ct (SDRT y SDqPCR respectivamente), para una gama de número de copias inicial diferentes. Además, se calculó la SDqPCR de la dilución del producto PCR purificado. No existen diferencias entre la SDqPCR del ADNc o del producto de la PCR, indicando que la reproducibilidad técnica es intrínseca a la reacción qPCR en sí misma y no debida a la interferencia de factores de reacciones anteriores. Todas las reacciones son altamente reproducibles valores no inferiores a ~1.000 copias (Ct aproximado 28-30), y aceptables para valores no inferiores a ~100 copias. Para valores <100 copias la variabilidad de las reacciones de RT y PCR es un obstáculo considerable para una cuantificación precisa del ARNm. La figura 4B muestra la variación técnica en el contexto de las variaciones biológicas de célula a célula. Se recogieron células individuales de islotes de Langerhans de ratones y se analizaron mediante reacciones de RT por triplicado y qPCR por duplicado. La variación técnica está a la par con la observada en la figura 4A. Aunque la variación de célula a célula de las células β recolectadas fue relativamente pequeña, la variación técnica es aún menor, y permite la cuantificación absoluta con una precisión suficiente en la gama entre 100 y 200 moléculas.

Para analizar el perfil de expresión génica en células individuales del páncreas endocrino del ratón, se determinaron *Ins1*, *Ins2*, glucagón (*Gcg*), *Rps29* y cromogranina B (*Chgb*) en 158 células obtenidas de cuatro incubaciones con diferentes concentraciones de glucosa (3, 6, 10 y 20 mM). Los islotes de Langerhans del páncreas son heterogéneos y contienen entre 1.000 y 3.000 células comprendiendo al menos cuatro tipos de células endocrinas, siendo las más abundantes las células β productoras de insulina y las células α productoras de glucagón [18]. En base a la presencia de transcritos de insulina o glucagón, las células se clasificaron como células β (126 células, 83%), células α (25 células, 16%) o desconocido (1 célula, 0,7%). Seis muestras fueron negativas para todos los genes y se clasificaron como errores técnicos (tasa de éxito 96%). Se confirmó la distribución lognormal de todos los genes y se calcularon las medias geométricas tal como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 1: Parámetros estadísticos que describen la expresión génica en células pancreáticas α y β individuales

¹ N es el número de células que expresan el gen analizado. $N_{\text{tot}} = 158$				
² Un valor Shapiro-Wilk elevado refleja un buen ajuste, en este caso la distribución lognormal.				
Gen	N ¹	Media geométrica	Media geométrica log ₁₀ (SD)	Valor p de Shapiro-Wilk ²
Ins2	124	8.900	3,9 (0,5)	0,53
Ins1	100	3.100	3,5 (0,5)	0,57
Gcg	25	19.000	4,3 (0,3)	0,25
Rps29	102	230	2,4 (0,3)	0,98
Chgb	59	82	1,9 (0,5)	0,67

Los datos permitieron correlacionar los niveles de expresión de las células individuales como se muestra en la tabla siguiente. El factor de correlación de Pearson para *Ins1* e *Ins2* fue de 0,59, lo que indica correlación de las células individuales.

Tabla 2: Coeficientes de correlación de Pearson de los niveles de expresión en células individuales

	Ins2	Ins1	Gcg	Rps29	Chgb
Ins2	1				
Ins1	0,59	1			
Gcg	N.A.	N.A.	1		
Rps29	0,18	0,19	-0,25	1	
Chgb	0,08	0,14	0,06	0,31	1

Todas las poblaciones celulares mostraron una gran heterogeneidad en los niveles de transcritos. Por ejemplo, de las células β incubadas en glucosa 20 mM, las cuatro células con la expresión más elevada explicaron el 50% del total del ARNm de *Ins2* (figura 5A). Tal como se mostrado en los estudios de células agrupadas, el incremento de la concentración de glucosa posee un efecto estimulador en *Ins1*, *Ins2* y *Chgb* y un efecto ligeramente negativo sobre *Gcg*. Se observó un efecto más potente de la glucosa sobre insulina y glucagón en las células con niveles elevados de expresión. De las 14 células con los niveles más elevados de *Ins2* (el 20%) más elevado, 11 se incubaron en glucosa 20 mM y tres se incubaron en glucosa 3 mM. Los cocientes correspondientes entre las incubaciones en glucosa 20 mM y 3 mM fueron 12 a 1 para *Ins1* y 0 a 2 para *Gcg*. Los niveles de expresión presentaron una distribución lognormal para todos los genes en todas las concentraciones de glucosa.

Como en cualquier investigación de mecanismos pequeños y sensibles, obtener el perfil de transcripción de células individuales requiere de una cuidadosa preparación y de condiciones optimizadas de reacción para obtener un resultado exitoso. Los resultados del estudio dado a conocer permiten la definición de las condiciones óptimas que permitirán al investigador evitar errores utilizando los reactivos adecuados y las concentraciones ideales.

Mientras que el efecto sobre la lisis es esperado e incuestionable, es decir, GTC es superior para lisar el islote, su efecto sobre las reacciones de RT es más complejo. Mientras que concentraciones elevadas (> 100 mM) alteran gravemente la reacción, concentraciones bajas (-40 mM) poseen un efecto favorable sobre el rendimiento de la RT. El GTC es un detergente caotrópico fuerte. El efecto positivo de GTC puede deberse a la reducción de estructuras secundarias, permitiendo de este modo un mayor acceso de los cebadores y la transcriptasa inversa al ARNm.

De acuerdo con la presente invención, es preferente utilizar una combinación de hexámeros aleatorios y oligo(dT) en la reacción de RT independientemente del perfil de temperatura utilizado. De acuerdo con hallazgos anteriores [16], los resultados son altamente dependientes del gen y se requiere una optimización concienzuda para obtener una eficiencia de la RT lo mayor posible. Ocasionalmente, se utiliza en la cuantificación del ARNm el cebado de la RT con cebadores específicos de gen (GSP). Existen dos explicaciones para la formación de productos de PCR inespecíficos con cebado del ADNc con GSPs: En primer lugar, la concentración total de cebadores en el ADNc utilizado en la PCR puede alcanzar niveles cercanos a los de los cebadores de PCR. Ello podría interferir con la amplificación y generar productos inespecíficos. En segundo lugar, los GSPs se unen en gran medida de forma inespecífica al ARNm [16]. Por lo tanto el ADNc resultante será similar al del cebado con hexámeros aleatorios, pero con el cebador GSP en el extremo 3'.

En cinco determinaciones en una célula con 100 copias de un transcrito concreto, los resultados abarcarán aproximadamente entre 10 y 40 copias por reacción (correspondientes a 50-200 copias por célula). Esta diseminación es básicamente debida a la variación en la qPCR, y concuerda con la variación biológica entre células. La realización de las reacciones de qPCR por duplicado o triplicado proporciona un incremento de la precisión, y permite la cuantificación de niveles más bajos.

Además, se comparó la reproducibilidad de los resultados obtenidos con preparaciones de células individuales en NP40 en agua miliQ con preparaciones en GTC 0,3 M mediante el cálculo de las desviaciones estándar de 6 reacciones de RT-PCR de ambos supuestos.

Para este experimento, se dividió cada célula en tres replicados de RT y posteriormente se dividió cada uno de éstos en duplicados de PCR. Por lo tanto, la desviación estándar (SD) se basó en seis muestras. Los resultados mostraron que la desviación estándar era substancialmente más baja (y por lo tanto la reproducibilidad más alta) en las células preparadas en GTC 0,3 M. En resumen, según el método de la presente invención, las células se depositan en el detergente fuerte tiocianato de guanidina, opcionalmente, conjuntamente con una adición de ARN para evaluar la calidad. El tiocianato de guanidina a una concentración entre 30 mM y 50 mM es un potenciador potente de la reacción de transcripción inversa. Un cebado con una combinación de hexámeros aleatorios y oligo(dT) garantiza un rendimiento elevado de ADNc.

Ejemplos

Ejemplo1: Preparación y cultivo de las células

Se prepararon islotes pancreáticos de ratones hembra sanos de una edad entre 3 y 4 meses del National Maritime Research Institute (NMRI) (Bomholtgaard, Ry, Dinamarca) alimentados libremente con una dieta normal. Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical, y se aislaron los islotes pancreáticos mediante digestión con collagenasa P (Roche, Basilea, Suiza) seguida de la recolección manual de los islotes. Todos los procedimientos experimentales realizados con animales fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad de Lund. Para preparar células individuales dispersadas, se agitaron suavemente los islotes recolectados a una concentración extracelular de Ca^{2+} baja para disolver la estructura del islote [21]. Las células dispersadas se sembraron en placas de Petri de 35 mm (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en medio RPMI 1640 (SVA, Uppsala, Suecia) suplementado con FCS 10 %, penicilina 100 U ml^{-1} y estreptomycin 10 μgml^{-1} (todos los productos de Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) en presencia de varias concentraciones de glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Se mantuvieron las células en cultivo durante 18-24 horas para el experimento de estimulación con glucosa y durante 2-6 horas para los otros experimentos.

Las células MIN6 se cultivaron en glucosa 5 mM tal como se ha descrito previamente [2].

Ejemplo 2: Recolección de células individuales

Las células dispersadas y adheridas se lavaron dos veces con un tampón que contenía NaCl 138 mM, KCl 5,6 mM, MgCl_2 1,2 mM, CaCl_2 2,6 mM, HEPES 5mM (pH 7,4, con NaOH) y glucosa 3-20 mM (la misma concentración de

glucosa que en el cultivo) para eliminar las células muertas y los restos sueltos para permitir la recolección de células con pipetas de pinzamiento de membrana. Se colocó la placa con las células adheridas y aproximadamente 1 mL de tampón en un microscopio de luz invertida estándar (Zeiss Axiovert 135, Oberkochen, Alemania). Capilares de vidrio de borosilicato (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Alemania) con un diámetro externo de 1,6 mm y un grosor de pared de 0,16 mm se estiraron para obtener pipetas utilizando un tirador de pipetas de pinzamiento de membrana (Heka PIP5, Lambrecht, Alemania). El diámetro de la punta fue de aproximadamente 10 µm de media, substancialmente más amplio que el de las pipetas de pinzamiento de membrana estándar, y lo suficientemente grande para permitir el tránsito de células intactas. La pipeta de vidrio se montó en el microscopio en un micromanipulador hidráulico (Narishige, Toquio, Japón). Controlando la presión dentro de la pipeta fue posible recolectar células intactas o casi intactas con un volumen mínimo de solución extracelular.

Ejemplo 3: Lisis y purificación

Lisis de los islotes: Se colocaron islotes pancreáticos individuales de aproximadamente el mismo tamaño en 10 µl de varios tampones de lisis. Se utilizaron los detergentes Nonidet P-40 (NP-40, a.k.a. Igepal CA-630, Sigma-Aldrich) y tiocianato de guanidina (GTC, Sigma-Aldrich). Las muestras se incubaron a 60 °C u 80 °C durante 15 minutos (60 °C para las muestras que contenían proteinasa K (Invitrogen) 0,4 mg/mL), seguida de una incubación de 5 minutos a 95 °C y congelación a -25 °C para su análisis posterior. Las muestras se diluyeron 1:20 antes de la transcripción inversa para minimizar los posibles efectos inhibidores.

Lisis de células individuales: En los experimentos de células individuales, se vaciaron las pipetas de vidrio en tubos de plástico de 0,2 mL que contenían 2 µL de solución de lisis. Para el vaciado fue necesario utilizar un dispositivo hecho a la medida, formado por un soporte de tubos alineado con un micromanipulador burdo en el que se montó la pipeta. La pipeta se limpió cuidadosamente con tampón de lisis varias veces para garantizar que la célula entraba en el tubo. En la mayoría de casos, se rompió la punta de la pipeta en el tubo con suavidad para facilitar el lavado de la misma. A continuación, se situaron inmediatamente los tubos en un bloque de calentamiento con la tapa calentada a 80 °C durante 5 minutos. Se evaluaron varias composiciones del tampón de lisis, que contenían o NP-40 o GTC, a no ser que se indique lo contrario, los detergentes se diluyeron en agua purificada mQ, aunque ocasionalmente se utilizó un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, Na Cl 140 mM, MgCl₂ 1,5 mM (todos los productos de Sigma). Tras el tratamiento con calor, se congelaron inmediatamente las muestras con hielo seco (-78 °C) y se almacenaron a -80 °C para su transcripción inversa posterior.

Extracción de ARN total: Se realizaron algunos experimentos de optimización con ARN total de poblaciones celulares más grandes. El ARN total se purificó con el kit GenElute Mammalian Total (Sigma-Aldrich) y se midieron las concentraciones con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.).

Ejemplo 4: Transcripción *in vitro*

Para generar un ARN control artificial se utilizó el sistema de transcripción *in vitro* de la polimerasa ARN T7 (Takara, Shiga, Japón). Para la transcripción *in vitro* se utilizó como un ensayo de PCR de la ciclofilina E (*Ppie*). En primer lugar, se generó el producto de PCR de *Ppie* utilizando los mismos parámetros de los ensayos de PCR en tiempo real, excepto que se excluyeron todos los fluoróforos. El producto de la PCR se purificó utilizando el kit de purificación de PCR (Qiagen, Hilden, Alemania) y a continuación se amplificó de nuevo en una nueva reacción de PCR con un cebador de PCR directo extendido al que se añadió la secuencia promotor de la polimerasa ARN T7. El producto de PCR final se purificó tal como se ha descrito anteriormente y se utilizó en la reacción de transcripción *in vitro*, según las instrucciones del fabricante. La mezcla de 20 µL contenía: Tris-HCl (pH 8,0) 40 mM, MgCl₂ 8 mM, espermidina 2 mM, ditiotreitól 5 mM (todos de Takara), NTP 2 mM (Invitrogen), 20 U de RNaseOut (Invitrogen) y ~40 ng de molde de ADN. La reacción se incubó a 42 °C durante 1 hora.

Ejemplo 5: Transcripción inversa

En todo el estudio se utilizó la transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) [17]. Se incubaron a 65 °C durante 5 minutos 6,5 µL con ARN total o células individuales lisadas, dNTP 0,5 mM (Sigma-Aldrich), oligo(dT) 2,5 µM (Invitrogen), hexámeros aleatorios 2,5 µM (Invitrogen) y en los casos en los que se indica 0,5 µM de cebadores específicos de cada gen (idénticos al cebador inverso de PCR, Invitrogen o MWGBiotech, Ebersberg, Alemania). En los resultados se describen varias combinaciones de cebadores de RT utilizadas en este trabajo y estrategias alternativas. A continuación, se añadió Tris-HCl (pH 8,3) 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditiotreitól 5 mM, 20 U de RNaseOut y 100 U de SuperScript III (todos los productos de Invitrogen) hasta un volumen final de 10 µL. Los perfiles de temperatura utilizados fueron: isotérmico, 25 °C durante 5 minutos, 50 °C durante 45 minutos; gradiente, 25-40 °C a 1 minuto/°C, 41-65 °C a 5 minutos/°C; ciclado, 50 ciclos de 25 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 55 °C durante 5 segundos. Todas las reacciones se finalizaron a 70 °C durante 15 minutos. Para calcular la desviación estándar de la reacción de RT-qPCR, se utilizaron reacciones de RT y qPCR por triplicado sobre ARN total y purificado de islotes de ratón.

Ejemplo 6: PCR cuantitativa en tiempo real

Las determinaciones de PCR en tiempo real se realizaron con el sistema ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) En reacciones de 10 o 20 μ L. La mezcla de PCR contenía:

5 Tris (pH 8,3) 10 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 3 mM, dNTP 0,3 mM, 1 U de polimerasa Taq JumpStart (todos de Sigma-Aldrich), 0,5 x SYBR Green I (Invitrogen), 1 x Reference Dye (Sigma-Aldrich) y 400 nM de cada cebador (MWG-Biotech). La formación de los productos de PCR esperados se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa (2 %)

10 de productos de la PCR purificados (kit de purificación QIAquick, Qiagen) [12, 19]. Los números absolutos de copias de los productos de la PCR se calcularon utilizando los siguientes valores de capacidad de absorción molar (en $Moles^{-1}cm^{-1}$): dAMP, 15200; dTMP, 8400; dGMP, 12010; dCMP, 7050. La A260 se midió con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

Listado de abreviaturas utilizadas

Ct: ciclo umbral; GSP, cebador de RT específico de gen; qRT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa; RT, transcripción inversa; SD, desviación estándar

Listado de referencias

1. Elowitz, M.B., y otros, Science 297 (2002) 1183-1186
2. Bengtsson, M., y otros, Genome Res. 15 (2005) 1388-1392
3. Levsky, J.M., y otros, Science 297 (2002) 836-840
4. Raj, A., y otros, PLoS Biol. 4 (2006) e309
5. Ross, I., y otros, Immunol. Cell. Bio. 72(2) (1994) 177-185
6. Blake, W.J., y otros, Nature 422 (2003) 633-637
7. Cai, L., y otros, Nature 440(7082) (2006) 358-362
8. Weintraub, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85(16) (1988) 5819-5823
9. Schuit, F.C., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 (1988) 3865-3869
10. Kawasaki, E.S., Ann. N. Y. Acad. Sci. 1020 (2004) 92-100
11. Ginsberg, S.D., y otros, Methods 37(3) (2005) 229-237
12. Nolan, T., y otros, Nature Protocols, 1(3) (2006) 1559-1582
13. Peixoto, A., y otros, Genome Res. 14 (2004) 1938-1947
14. Tang, F., y otros, Nucleic Acids Res., 34 (2006) e9
15. Vandesompele, J., y otros, Genome Biol. 3(7) (2002) RESEARCH0034
16. Ståhlberg, A., y otros, Clin. Chem. 50 (2004) 509-515
17. Ståhlberg, A., y otros, Clin. Chem. 50 (2004) 1678-1680
18. Pickup, J.C., Williams, G., (Eds), Textbook of Diabetes 3rd ed. London, Blackwell Science (2003)
19. Bustin, S.A., J. Mol. Endocrinol 25 (2000) 169-193
20. Liss, B., Nucleic Acids Res. 30 (2002) e89
21. Olofsson, C.S., y otros, Pfluegers Arch. 444(1-2) (2002) 43-51

REIVINDICACIONES

1. Método para realizar una RT-PCR para amplificar un ARN diana que comprende las etapas de

- 5 a) lisar una muestra biológica que se supone que contiene dicho ARN diana con un tampón de lisis que contiene entre 0,05 M y 1 M de tiocianato de guanidina
- 10 b) diluir dicha muestra hasta un nivel en el que la concentración de tiocianato de guanidina presente en la etapa c) sea aproximadamente entre 10 y 60 mM
- 15 c) sin ninguna etapa intermedia de purificación, proceder a la transcripción inversa de dicho ARN diana en presencia de una mezcla de cebadores de síntesis de ADNc de la primera cadena, conteniendo dicha mezcla cebadores que se hibridan a una secuencia poli-A y/o cebadores aleatorios
- d) someter dicha muestra a múltiples ciclos de un protocolo de termociclado y monitorizar la amplificación de dicho ADNc de primera cadena en tiempo real,

en el que dicha muestra biológica está formada por no más de 100 células, preferentemente no más de 10 células y de forma más preferente por una célula individual.

20 **2.** Método según la reivindicación 1, en el que dicho tampón de lisis comprende entre aproximadamente 0,2 M y 0,5 M de tiocianato de guanidina.

25 **3.** Método según las reivindicaciones 1 a 2, en el que durante la etapa c) el tiocianato de guanidina está presente en una concentración entre aproximadamente 30 y 50 mM, preferentemente aproximadamente 40 mM.

4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa c) se realiza en presencia de 0,5 % a 2 % de NP 40.

30 **5.** Método según las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa a) se realiza durante al menos 5 minutos a una temperatura entre aproximadamente 75 °C y 85 °C.

6. Método según las reivindicaciones 1 a 5, en el que la incubación de la etapa a) a una temperatura entre aproximadamente 75 °C y 85 °C se realiza en presencia de proteinasa K.

35 **7.** Método según las reivindicaciones 1 a 6, en el que entre las etapas a) y b) la muestra se congela a temperaturas entre aproximadamente -20 °C y -80 °C.

8. Método según las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha mezcla de síntesis de ADNc comprende cebadores que se hibridan a una secuencia poli-A y cebadores aleatorios.

40 **9.** Método según la reivindicación 8, en el que los cebadores que se hibridan a una secuencia poli-A y los cebadores aleatorios están presente en cantidades molares esencialmente iguales.

45 **10.** Método según las reivindicaciones 8 a 9, en el que dichos cebadores que se hibridan a una secuencia poli-A y dichos cebadores aleatorios se encuentran ambos presentes a una concentración entre 1 µM y 5 µM.

11. Método según la reivindicación 9, en el que dichos cebadores que se hibridan a una secuencia poli-A y dichos cebadores aleatorios se encuentran ambos presentes a una concentración de aproximadamente 2,5 µM.

Fig. 1

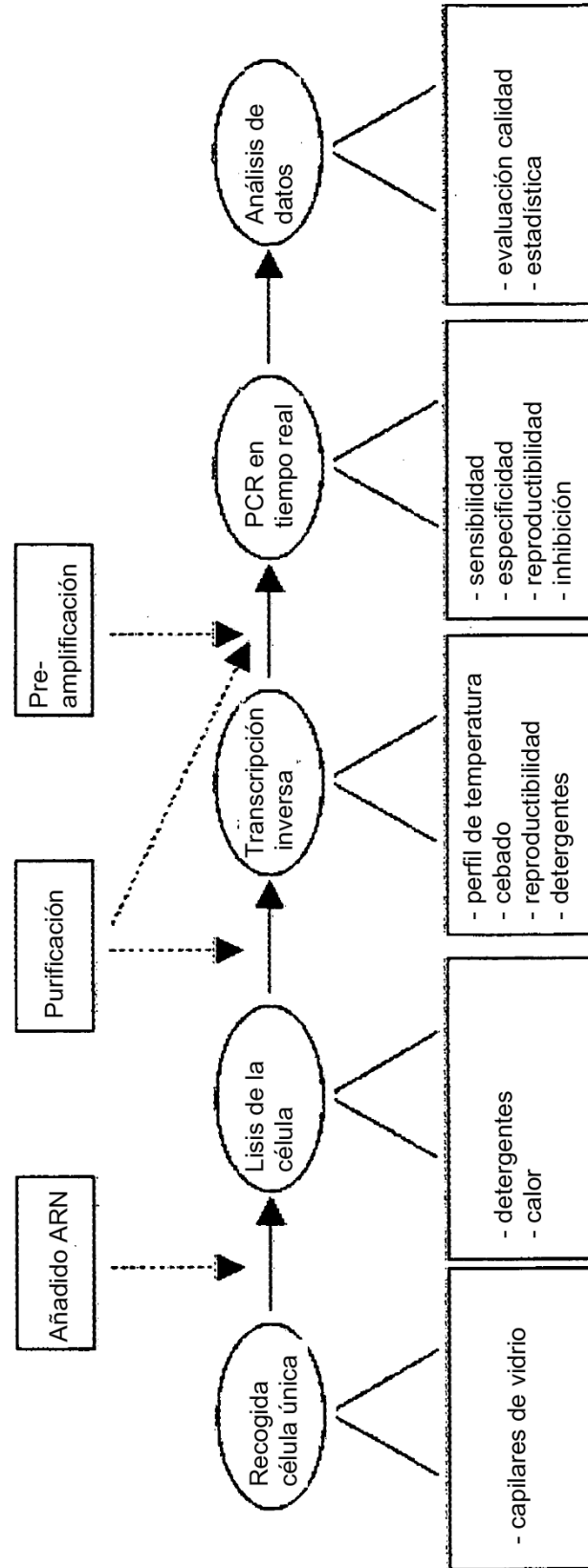


Fig. 2

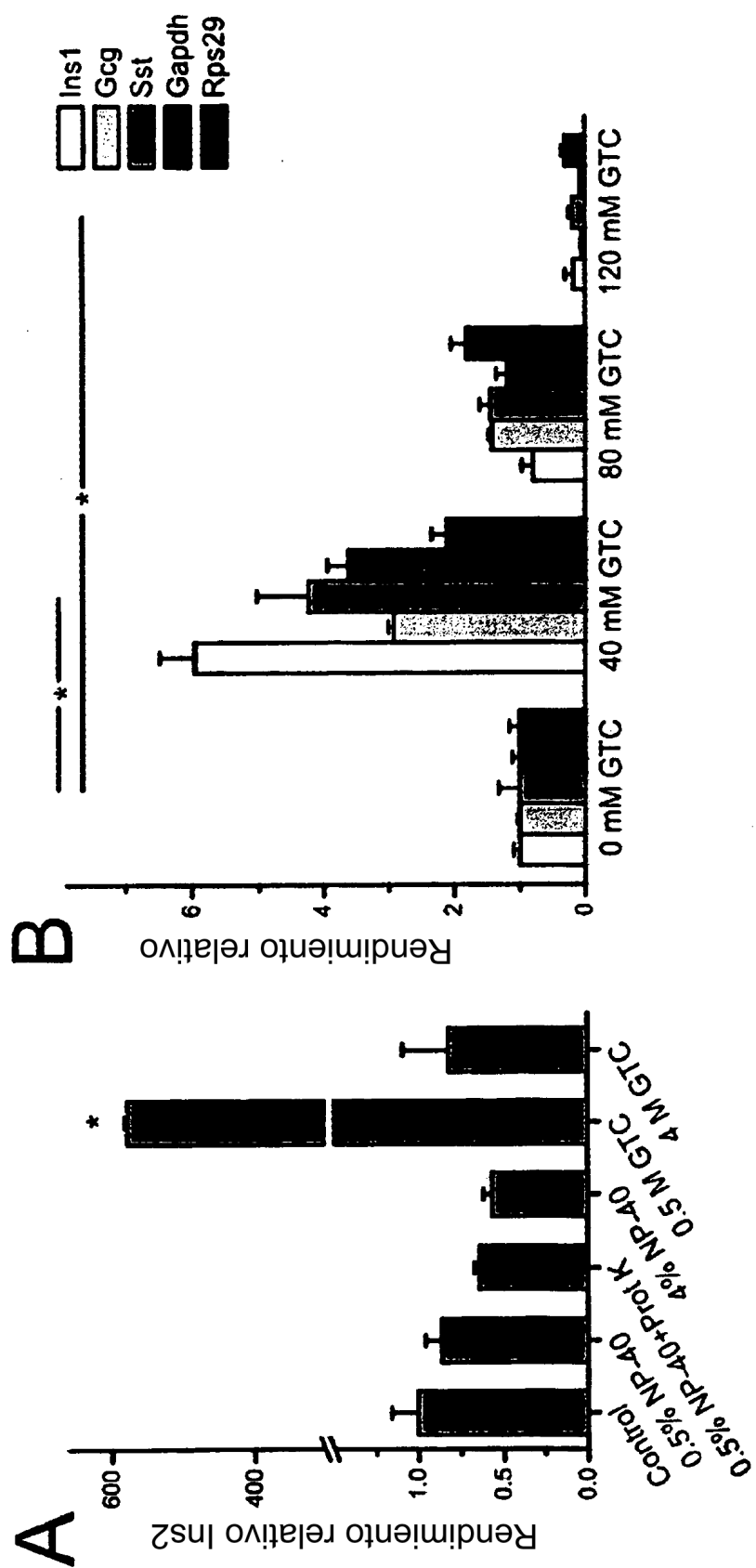
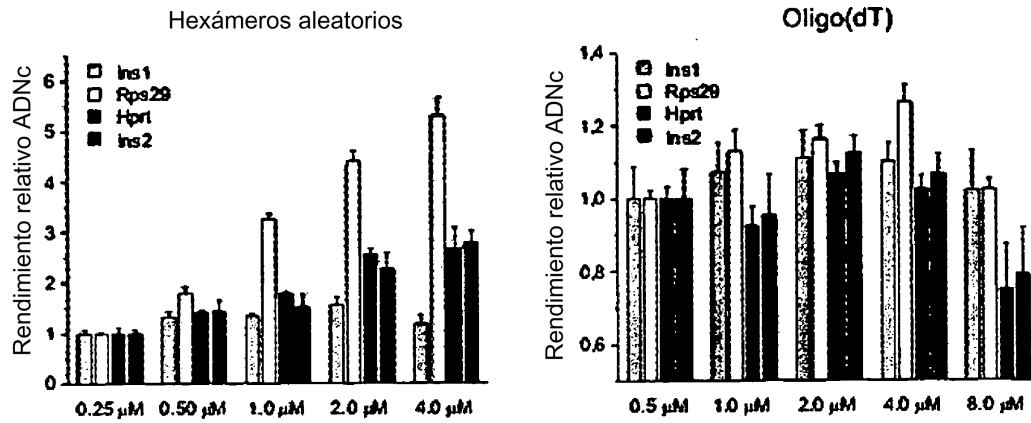
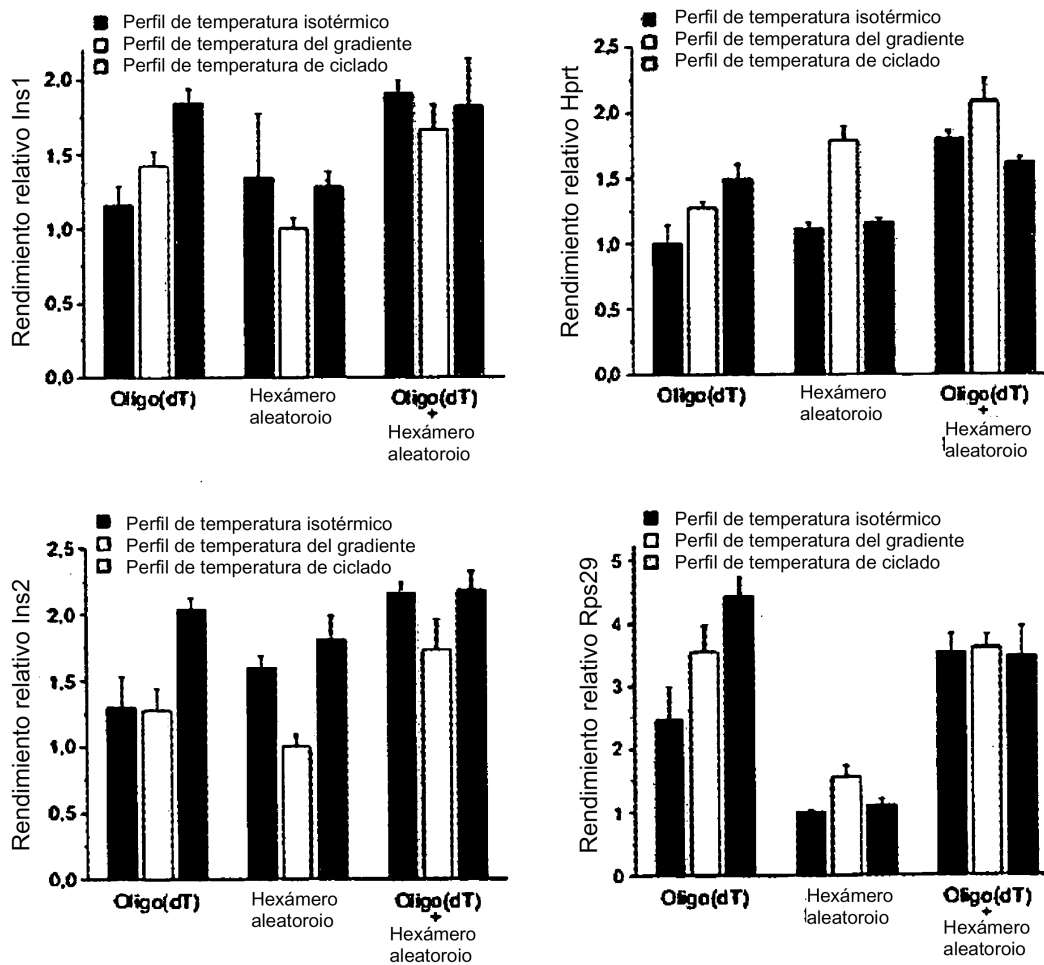


Fig. 3

A



B



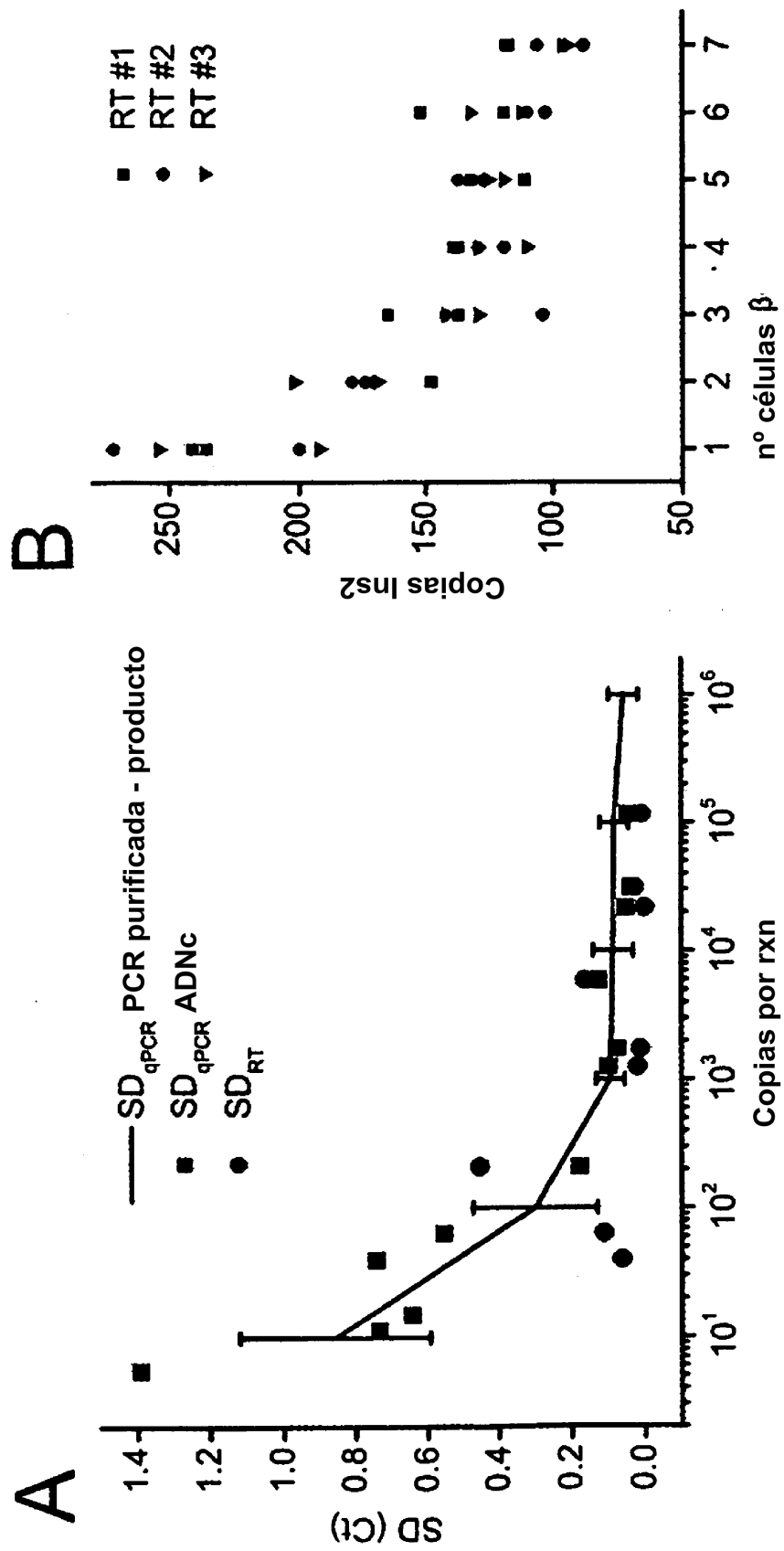


Fig. 4

Fig. 5

