

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 113**

51 Int. Cl.:
G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09749839 .8**
- 96 Fecha de presentación: **19.05.2009**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2283350**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2011**

54 Título: **Electroforesis en gel bidimensional de emisión de resolución temporal acumulativa**

30 Prioridad:
19.05.2008 US 54300
15.05.2009 US 454334

73 Titular/es:
Hikari Bio Ab
Gyllenborgsgatan 5
112 43 Stockholm, SE

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.06.2012

72 Inventor/es:
WHEELOCK, Åsa

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.06.2012

74 Agente/Representante:
No consta

ES 2 382 113 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

Electroforesis en gel bidimensional de emisión de resolución temporal acumulativa.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método y a una nueva tecnología de adquisición de imágenes para la detección y cuantificación en gel de proteínas. Esta nueva plataforma, denominada electroforesis en gel bidimensional de emisión de resolución temporal acumulativa (CuTEDGE), utiliza diferencias en los tiempos de vida de fluorescencia para diferenciar entre fluorescencia de marcadores proteicos específicos y fluorescencia de fondo no específica, que da como resultado una espectacular mejora tanto en la sensibilidad como en el rango dinámico en comparación con la tecnología existente.

10 Antecedentes de la invención

“Proteómica” se refiere al estudio del complemento proteico del genoma (proteoma), un término acuñado por Marc Wilkins en 1994. Durante la pasada década, se han desarrollado y utilizado muchas metodologías para la cuantificación simultánea de miles de proteínas en una célula o un tejido para, por ejemplo, el descubrimiento de biomarcadores o estudios mecanísticos de procesos celulares. La electroforesis en gel bidimensional (2-DGE) fue el primer método que se adaptó para el análisis proteómico, y todavía constituye una pieza maestra en la investigación proteómica. El método de 2-DGE implica la separación de muestras proteicas complejas según la carga en la primera dimensión y según el tamaño en la segunda dimensión, dando como resultado un mapa 2-D de manchas de proteína en el que de manera ideal cada mancha corresponde a una única especie de proteína. Las manchas de proteína se visualizan entonces con tinciones de proteínas que se unen estequiométricamente a las proteínas, proporcionando así una tercera dimensión que corresponde a la abundancia de proteínas, lo que facilita el análisis proteómico cuantitativo.

25 Se han tratado los problemas de grandes variaciones de un gel a otro asociados con la técnica de 2-DGE original a través de la incorporación de un patrón interno, tal como las técnicas de electroforesis diferencial en gel (DIGE) y de patrón interno marcado con Alexa (ALIS). Ambos conceptos se basan en proteínas de muestra y proteínas de patrón interno que se marcan con fluorocromos separados espectralmente, y se separan conjuntamente en el mismo gel de 2-DGE. Mediante normalización radiométrica, pueden corregirse las variaciones entre geles, mejorando así enormemente los aspectos cuantitativos y el poder estadístico global de la técnica de 2-DGE.

30 La principal restricción que queda en la metodología de 2-DGE actual son las limitaciones en la sensibilidad de detección. El hecho de que las abundancias de proteínas en muestras biológicas puedan abarcar hasta doce órdenes de magnitud impone grandes exigencias tanto sobre la sensibilidad como sobre el rango dinámico de las tinciones de proteínas usadas en 2-DGE cuantitativa. Para este fin, las tinciones fluorescentes con rangos dinámicos de 3-4 órdenes de magnitud han sustituido el uso de métodos de tinción colorimétrica clásicos, tales como tinciones de plata y Commassie con rangos dinámicos limitados normalmente a 1-2 órdenes de magnitud (figura 1).

35 Están disponibles colorantes fluorescentes tanto para el marcaje covalente antes de la separación mediante 2-DGE (por ejemplo CyDyes™, colorantes Alexa), así como para procedimientos de tinción tras electroforesis, no covalentes (por ejemplo, SYPRO Ruby™, Deep Purple™). Sin embargo, incluso las sondas fluorescentes de mejor rendimiento para la visualización de proteínas actualmente en el mercado sólo cubren una parte muy pequeña del posible rango fisiológico puesto que las abundancias de proteínas fisiológicas oscilan entre unas cuantas moléculas hasta concentraciones micromolares, mientras que los límites de detección para el método de DIGE mínima del estado de la técnica se limitan normalmente a nanogramos de proteína (figura 1).

45 En la utilización actual de fluorescencia para la detección y cuantificación de proteínas en 2-DGE, la excitación del flúor y la medición de la emisión resultante se producen simultáneamente. Siendo eficaz en cuanto al tiempo y práctico desde un punto de vista técnico, este enfoque se utiliza tanto en dispositivos de exploración de fluorescencia como en instrumentos de adquisición de imágenes de 2-DGE basados en cámaras CCD. Sin embargo, las mediciones directas de fluorescencia no utilizan el potencial completo de estos fluorocromos. Las muestras biológicas contienen numerosos componentes autofluorescentes, y la propia matriz de poliacrilamida emite fluorescencia de fondo en cierto grado. Para optimizar la relación señal a ruido, por tanto es esencial disminuir las perturbaciones de fluorescencia de fondo y autofluorescencia.

50 En la tecnología de 2-DGE actual, se realizan matemáticamente intentos de eliminar el fondo resultante a través de algoritmos de software usados en el análisis cuantitativo asistido por ordenador tras la electroforesis. Sin embargo, se ha mostrado anteriormente que la mayoría de estos algoritmos de sustracción y corrección de fondo alteran los datos e introducen una varianza adicional en la cuantificación de volúmenes de manchas de proteínas, así como contribuyen a una distribución no normal, sesgada (1-4).

55 A través de fluorescencia de resolución temporal (TRF), puede derivarse el origen de un fotón a través de separación de las curvas de decaimiento de las diversas especies fluorescentes presentes en un píxel dado. La TRF se usa actualmente en varias aplicaciones en campos relacionados, principalmente aplicaciones en microscopía para visualizar la localización, dinámica de plegamiento o movimiento de proteínas en disolución (5, 6). Varios de los

fluorocromos usados actualmente en 2-DGE se han utilizado en aplicaciones de fluorescencia de resolución temporal en estos campos relacionados (por ejemplo, CyDyes™ disponible de GE Healthcare, Uppsala, Suecia, y colorantes Alexa así como quelatos de rutenio tales como SYPRO Ruby™, ambos disponibles de Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU. (7, 8)). Sin embargo, la falta de esta característica en equipo moderno de adquisición de imágenes mediante 2-DGE está prohibiendo actualmente el uso y el desarrollo de TRF en 2-DGE.

Descripción de la técnica relacionada

La mayoría de la técnica anterior en el campo se refiere a técnicas transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para el estudio de interacciones intermoleculares, estabilidad molecular o cambios conformacionales intramoleculares, y parte se refiere al uso de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM). Éstas incluyen la monitorización de productos de reacción en cadena polimerizados (PCR) (Rintamaki S. *et al*, Journal of microbiological methods, (agosto de 2002) Vol. 50, n.º 3, págs. 313-8), y otros para la asignación de bases en la secuenciación de ADN (Lassiter S J *et al*, Analytical chemistry, 1 de noviembre de 2000, Vol. 72, n.º 21, págs. 5373-82). Estos autores han modificado la cabeza del microscopio en un secuenciador automático de ADN para permitir mediciones de tiempo de vida de fluorescencia de resolución temporal en el infrarrojo cercano. Por consiguiente, el diseño, las capacidades y la utilización de este instrumento fueron de una naturaleza completamente diferente a la de la invención en el presente documento. Las modificaciones del instrumento realizadas por este grupo se diseñaron para fines de clasificación con el fin de mejorar la precisión y velocidad de secuenciación de ADN. En esencia, se utilizaron imágenes de tiempo de vida para distinguir entre dos fluorocromos con diferentes tiempos de vida, que representan la presencia de diferentes fragmentos de ADN que se fraccionaron a través de electroforesis en gel plano. En estudios de seguimiento, los autores ampliaron la tecnología de secuenciación a una plataforma de microchip de polímero con un fin similar (Llopis S D *et al*, Electrophoresis, noviembre de 2004, Vol. 25, n.º 21-22, págs. 3810-9) así como para la lectura de firmas fluorescentes de microalineamientos de ADN (Stryjewski *et al* Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering (2002), 4626 (Biomedical Nanotechnology Architectures and Applications), 201-209). El uso de fluorescencia de resolución temporal multidimensional para la sustracción del fondo de la invención en el presente documento, nunca se usó en ninguna de estas aplicaciones. En cambio, los autores hicieron todo lo posible por investigar qué matriz de soporte de polímero daba lugar a la menor cantidad de fluorescencia de fondo con el fin de mantener un flujo de trabajo monoexponencial, o alternativamente usaron métodos de corrección de fondo convencionales tales como regulación temporal o sustracción de la intensidad de manchas de control negativo. Como tal, el uso de fluorescencia de resolución temporal multiexponencial para la sustracción específica del fondo en mediciones en gel (proteína) de esta invención representa un efecto sorprendente y una tecnología novedosa.

Un objetivo de la invención es proporcionar una nueva plataforma para la detección y cuantificación en gel de proteínas marcadas de manera fluorescente en estudios proteómicos globales. La invención implica la utilización de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM). Otros objetos y ventajas resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Sumario de la invención

Una realización fundamental de la tecnología de CuTEDGE implica la excitación de un fluorocromo unido a una proteína (covalentemente o mediante fuerzas iónicas) con un dispositivo de exploración de láser pulsado. Los dispositivos de exploración de láser de fluorescencia del estado de la técnica usados actualmente para la adquisición de imágenes en 2-DGE cuantitativa utilizan una fuente de luz constante para la excitación. La iluminación constante del gel no utiliza las diferencias en el tiempo de vida de fluorescencia, y la emisión detectada corresponde a la emisión máxima conjunta del fluorocromo y la fluorescencia de fondo. En cambio, la exploración con un láser pulsado, utilizando la invención descrita en el presente documento, proporciona mediciones de FLIM a un nivel píxel por píxel (figuras 2A-2C). El láser, presumiblemente un láser de diodo, puede alojarse internamente dentro de un recinto del dispositivo de exploración sellado, o conectarse externamente a través de salidas de cable de fibra óptica para proporcionar una flexibilidad óptima en cuanto a las longitudes de onda de excitación, es decir los láseres de diodo específicos, que van a usarse. Como tal, la tecnología puede proporcionarse como una mejora para la instrumentación existente, o como un sistema de dispositivo de exploración completamente encerrado.

Una realización adicional de la invención incluye la utilización de un ajuste multiexponencial de la curva de decaimiento de fluorescencia para separar la fluorescencia que se origina de la especie de proteína marcada con el fluorocromo de la fluorescencia que se origina de otras fuentes tales como la propia matriz de gel, disoluciones o partículas presentes en el gel, o efectos de dispersión. La separación de las curvas de decaimiento de fluorescencia proporciona la sustracción del fondo al nivel de fotones tal como se ilustra en las figuras 2A-2C. Además, esta realización de la tecnología de CuTEDGE reduce la necesidad de algoritmos de sustracción del fondo asistidos por software en el posterior análisis de imágenes, y el aumento de la varianza experimental que se sabe que se introduce por estos algoritmos. La distribución de los tiempos de vida de fluorescencia en una imagen de 2-DGE se ejemplifica mediante la figura 4A-4B, que ilustra una imagen de tiempo de vida pseudocoloreada de una Cy2.

Aún otra realización de la invención en el presente documento implica el uso secuencial de múltiples longitudes de onda de láser para la excitación para facilitar una combinación de TRF con separación espectral de fluorocromos. Se usa la separación espectral en protocolos de 2-DGE actuales para facilitar la corrección de variaciones entre geles

en los patrones de separación a través de multiplexación, tales como los enfoques DIGE (9) y ALIS (10). Los protocolos de multiplexación para la incorporación de un patrón interno en 2-DGE son vitales para la corrección de las variaciones de un gel a otro inherentes en el método de 2-DGE, y están bien establecidos en el campo de la proteómica basada en gel. Como tal, la inclusión de esta realización hace que el instrumento de CuTEDGE sea fácil de implementar en flujos de trabajo de proteómica existentes usando protocolos actuales para un patrón interno en 2-DGE. El uso de multiplexación a través de separación espectral en vez de a través de TRF también disminuye la complejidad de los espectros de decaimiento de tiempo de vida, mejorando así la capacidad de sustracción del fondo del método de CuTEDGE. Sin embargo, las mediciones dobles de FLIM también pueden incluirse en casos en los que la longitud de onda de excitación y los tiempos de vida de fluorescencia de los fluorocromos incorporados son compatibles, como es el caso para el par de colorantes Cy2/Cy3 (ejemplo 4).

La incorporación de un detector de fotones de suficiente sensibilidad así como el rango dinámico representa aún otra realización crucial de la invención. Tradicionalmente, se ha usado la tecnología de tubo fotomultiplicador (PMT) en instrumentos de adquisición de imágenes para 2-DGE para garantizar un amplio rango dinámico de detección. Sin embargo, las limitadas eficiencias cuánticas (QE) de los detectores de PMT pueden comprometer la sensibilidad de detección en la aplicación de CuTEDGE. Como tal, los detectores de fotodiodo de avalancha (APD), con QE de hasta el 90% en el rango visible, pueden demostrar ser ventajosos en cuanto a la sensibilidad, con el inconveniente de posibles limitaciones en el rango dinámico de detección. Como tal, pueden diseñarse diferentes variantes del instrumento de CuTEDGE equipado con detectores que se ajustan a las necesidades individuales del usuario tal como se conoce en la técnica.

La integración de la curva de decaimiento de fluorescencia de intensidad específica para el fluorocromo para calcular el área bajo la curva (AUC) representa aún otra realización fundamental de la invención. Se estima que el uso del AUC (correspondiente al recuento total de fotones para la componente de fluorocromo) como el formato de salida en vez de la contribución de la amplitud de la componente proporciona una mejora adicional de 1-2 órdenes de magnitud en el rango dinámico.

La automatización y facilidad de uso con un componente central del instrumento de CuTEDGE, particularmente en cuanto a cálculos gráficos y cuantitativos de imagen de 2-DGE adquirida. Se incluyen protocolos automatizados para análisis de FLIM, sustracción de las componentes de fondo y exportación de imágenes de intensidad para la(s) componente(s) de fluorocromo para los fluorocromos patrón usados en 2-DGE. Con el fin de facilitar el uso de software de análisis de imágenes de 2-DGE existente, se representa por tanto el AUC como una intensidad monodimensional (Z) en la imagen exportada resultante. El uso de un formato de archivo de imágenes con etiquetas (TIFF) de 32 bits o equivalente en sustitución del formato de 16 bits usado actualmente proporciona un rango dinámico digital de aproximadamente 10 órdenes de magnitud, facilitando así el rango dinámico completo de intensidades de píxel logrado a través de la tecnología de CuTEDGE.

Para maximizar la automatización, la invención también facilita la programación de la exploración secuencial de múltiples protocolos diferentes según se define por el usuario, por ejemplo la exploración secuencial de múltiples fluorocromos usados para multiplexación.

Dada la amplia gama de tiempos de vida de fluorescencia disponible en las diversas sondas fluorescentes usadas en la proteómica basada en gel de hoy en día, los diodos láser pulsados de frecuencia variable para la optimización de los tiempos de exploración representan otra realización de la invención.

Por tanto, se han expuesto en líneas generales, más que ampliamente, las características más importantes de la invención con el fin de que pueda entenderse mejor la descripción detallada de la misma, y con el fin de que la presente contribución a la técnica pueda apreciarse mejor. Hay características adicionales de la invención que se describirán más adelante en el presente documento.

A este respecto, antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, ha de entenderse que la invención puede presentar otras realizaciones y ponerse en práctica y llevarse a cabo de diversas maneras que resultan obvias para el experto en la técnica. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología empleada en el presente documento son para el fin de descripción y no deben considerarse limitativas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la abundancia de proteínas detectada frente a la abundancia de proteínas real con mediciones con tinciones de plata (línea continua fina) y DIGE de fluorescencia del estado de la técnica (líneas de puntos) así como la comparación de mediciones de prueba de concepto inicial usando fluorocromos de DIGE con instrumentación de TRF inferior a la óptima (líneas de trazos) con mediciones que usan la invención en el presente documento (líneas continuas gruesas).

La figura 2A muestra un ejemplo de las curvas de decaimiento de fluorescencia (recuento de fotones frente al tiempo) que resulta de mediciones en gel de proteínas marcadas con CyDye.

La figura 2B muestra un ejemplo de ajuste multiexponencial de las curvas de decaimiento de fluorescencia (recuento de fotones frente al tiempo) usando fluorocromos con un tiempo de vida de fluorescencia más largo, indicándose la ventana óptima para las mediciones con regulación temporal (líneas de trazos).

5 La figura 2C es un gráfico que compara la contribución de fluorescencia de fondo acumulada con la fluorescencia total. Se indican los niveles de emisión durante mediciones sin resolución temporal, convencionales (línea de trazos)

La figura 3A muestra un gráfico tridimensional de fluorescencia relativa, longitud de onda y tiempo para Cy3 y Cy5 durante la excitación con una fuente de luz constante.

La figura 3B muestra un gráfico tridimensional de fluorescencia relativa, longitud de onda y tiempo para Cy3 y Cy5 durante mediciones de resolución temporal, es decir excitación con un láser pulsado.

10 La figura 3C es una representación bidimensional de la fluorescencia y las componentes de longitud de onda mostradas en la figura 3A, que muestran las curvas de excitación (línea continuas) y emisión (líneas de trazos) para Cy3 y Cy5.

La figura 3D es una representación bidimensional de la componente de tiempo y las componentes de recuento de fotones de la figura 3B, que muestra las curvas de emisión de tiempo de vida para Cy3 y Cy5.

15 La figura 4A muestra una imagen de tiempo de vida pseudocoloreada que presenta la distribución de las diferentes componentes de tiempo de vida en un gel de 2-DGE que contiene proteínas marcadas con Cy2. Se presenta la escala temporal en la esquina superior derecha, representando el color blanco los tiempos de vida más largos y el color negro los más cortos. El aspecto de "sal y pimienta" en las regiones sin manchas de la imagen resulta de una componente de fondo muy corta (0,2 ns) mezclada con la componente de fondo más larga (4,2 ns) asociada con la matriz de acrilamida (véase la figura 5).

20

La figura 4B muestra que el patrón de manchas de proteínas de la correspondiente imagen de 2-DGE convencional que presenta intensidades de fluorescencia total (sin separación de tiempo de vida) se corresponde bien con la imagen de tiempo de vida, indicando que las componentes de fondo del gel de poliacrilamida pueden en efecto separarse de forma distinta de la de los fluorocromos CyDye a través de aplicaciones de fluorescencia de tiempo de vida.

25

La figura 5 es un gráfico del recuento de fotones frente a las concentraciones de acrilamida para la componente de fondo principal larga (4,2 ns) en un gel de gradiente unidimensional.

La figura 6 es un esquema sobre un posible diseño instrumental de CuTEDGE.

30 La figura 7 muestra las tres dimensiones que contribuyen al volumen de manchas usado para la cuantificación de proteínas.

Descripción detallada de la invención

La invención en el presente documento proporciona una nueva plataforma para la detección y cuantificación en gel de proteínas marcadas de manera fluorescente en estudios proteómicos globales y básicamente tiene las siguientes realizaciones tal como se comenta en más detalles en el presente documento: el diseño general del instrumento de CuTEDGE se explica en líneas generales en la figura 6. Un diodo láser pulsado, alojado internamente dentro de un recinto del dispositivo de exploración sellado o conectado externamente a través de un cable de fibra óptica, se usa para la excitación en gel de proteínas marcadas con fluorocromos (covalentemente o mediante fuerzas iónicas). Un mecanismo de dispositivo de exploración, proporcionado a través del movimiento de la platina de vidrio que sostiene el gel o alternativamente, moviendo espejos dicróicos bajo la platina del gel, facilita la exploración por píxeles del gel. La fluorescencia emitida que pasa a través del filtro dicróico móvil/estacionario se dirigirá a través de un filtro de emisión de elección y además a través de un cable de fibra óptica hasta un detector alojado internamente o conectado externamente, dependiendo de si el diseño instrumental se refiere a un sistema de dispositivo de exploración encerrado o un kit de mejora externo. El panel de recuento de fotones exporta y transfiere los datos a un módulo de software, que está diseñado para el ajuste de tiempo de vida multiexponencial totalmente automatizado de la curva de decaimiento de fluorescencia para separar la fluorescencia que se origina de la especie de proteína marcada con el fluorocromo de la fluorescencia que se origina de otra fluorescencia de fondo no deseada. La curva de decaimiento de fluorescencia integrada específica para el fluorocromo se exporta como una imagen de intensidad por fluorocromo, en un formato compatible con el análisis de imágenes de 2-DGE cuantitativa adicional.

35

40

45

50 La invención en el presente documento, utilizando las diferencias intrínsecas en los tiempos de decaimiento de fluorescencia de fluorocromos y fluorescencia de fondo, respectivamente, puede mejorar significativamente tanto la intensidad de señal global como las relaciones señal a ruido en proteómica basada en gel. A través del uso de láseres pulsados, pueden medirse las curvas de decaimiento en la totalidad del tiempo de vida de fluorescencia, tal

como se ilustra en las figuras 3A-3D. Se usará un mecanismo para mover el pulso láser y el detector a lo largo del gel para facilitar una exploración por píxeles del gel. Una solución implica un controlador de motor paso a paso para mover un conjunto de espejos bajo una plataforma de vidrio estacionaria que sostiene el gel para evitar el movimiento de la plataforma de gel real. Esta configuración invertida ayuda a mantener los geles planos estacionarios para evitar la rotura de los geles de poliacrilamida frágiles, particularmente en geles de gran formato. La distancia variable resultante producida por los espejos móviles se corregirá mediante la colocación apropiada de generadores de retardo. Además, esta solución facilita un recinto robusto para permitir la inmersión en agua de los geles planos, que de otro modo pueden secarse durante la exploración secuencial de alta resolución requerida para la multiplexación. Una solución alternativa implica el movimiento gradual del panel del dispositivo de exploración que sostiene el gel. De manera importante, cualquier configuración proporciona un fácil cambio del láser de diodo pulsado para facilitar la flexibilidad en la elección de las longitudes de onda de excitación.

La utilización más sencilla de TRF es para calcular el tiempo de vida promedio a partir de la curva de emisión de fotones detectada. Se utilizan principalmente mediciones de TRF menos sofisticadas en las que se omite el ajuste multiexponencial para determinar la ausencia o presencia de un fluorocromo conocido. En sistemas complejos tales como la detección en gel de proteínas marcadas con Cy2 ejemplificada en la figura 2A, la contribución de las componentes de fondo no pueden distinguirse de la emisión derivada del fluorocromo. Las mediciones distintas a TRF que usan una fuente de luz constante dan como resultado un nivel de emisión constante correspondiente al nivel máximo de la fluorescencia total (línea continua), y en semejanza a las mediciones de TRF monoexponenciales, las componentes de fondo individuales no pueden distinguirse de la fluorescencia total.

El ajuste monoexponencial resultante no facilita la separación de múltiples componentes fluorescentes, y como resultado la emisión de fondo y el fluoróforo se resumen en una única curva (figura 2C; línea continua). Como tal, las mediciones de FLIM monoexponenciales resultantes se adaptan mejor para la discriminación entre la presencia/ausencia de fluorocromos de tiempos de vida conocidos, tal como se ejemplifica mediante el instrumento de TRF monoexponencial mencionado en la "Descripción de la técnica relacionada" construido para la clasificación binaria de nucleótidos en la secuenciación y detección de nucleótidos de ADN de Sanger en microalineamientos (11, 12). La aplicación a imágenes de gel de 2-DGE pretendida por la tecnología de CuTEDGE representa numerosos retos en comparación con las aplicaciones previas de TRF para microalineamientos de ADN. De la manera más importante, se conocen las ubicaciones de mancha y tamaños de mancha en los microalineamientos, haciendo que sea fácil predefinir los límites de mancha. En cambio, no se conocen ni el tamaño de mancha ni las ubicaciones de mancha en 2-DGE puesto que el patrón de manchas se basa en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas. Grandes variaciones entre geles en los patrones de separación de manchas se añaden adicionalmente a la complejidad de la detección y cuantificación de manchas en imágenes de 2-DGE. Las superficies sólidas usadas en microalineamientos son mucho más homogéneas que la matriz de gel de poliacrilamida usada en 2-DGE. La ubicación en el gel de las proteínas en 2DE da como resultado una fluorescencia de fondo más compleja que la de la hibridación superior utilizada para la detección de nucleótidos en microalineamientos. Como tal, se requiere un sistema mucho más robusto en cuanto a la detección y sustracción del fondo para la adquisición de imágenes de 2-DGE en comparación con sistemas de imágenes de microalineamientos.

Puesto que la fluorescencia de fondo no puede cuantificarse en aplicaciones de fluorescencia convencionales, ha de estimarse la emisión de fondo a través de la evaluación de la intensidad de los píxeles que rodean la molécula marcada de manera fluorescente. Los algoritmos disponibles actualmente para la sustracción del fondo en imágenes de 2-DGE no son muy precisos, y se ha mostrado previamente en varias publicaciones que estos algoritmos carecen de robustez en cuanto a la reproducibilidad, y como tal introducen una cantidad significativa de varianza en el análisis cuantitativo (1-4).

Dado que existe una separación suficiente en el tiempo de vida de la fluorescencia de fondo y el fluorocromo, aplicaciones de TRF monoexponencial pueden proporcionar una mejora con respecto a las mediciones con iluminación constante porque puede reducirse el ruido de fondo a través de mediciones con retardo temporal (figura 2B). Sin embargo, la regulación temporal que tiene como objetivo excluir la emisión de fondo generalmente da como resultado también la exclusión del pico de emisión principal del fluoróforo (figura 2B). En los casos en los que el tiempo de vida del fluorocromo es sustancialmente más largo que las componentes de fondo, puede usarse mediciones con regulación temporal para excluir la fluorescencia de fondo de la cuantificación. Aunque esta estrategia comprometerá algo las mejoras en la relación señal a ruido, puede excluirse la necesidad de complejos algoritmos de ajuste una vez que se conocen los tiempos de vida de las componentes existentes. Por consiguiente, la ganancia en sensibilidad y rango dinámico es limitativa, tal como se evidencia por los intentos anteriores de aplicar enfoques con retardo temporal monoexponenciales a microalineamientos (12).

Además, los fluoróforos basados en cianinas usados con la mayor frecuencia en 2-DGE hoy en día (CyDyes para DIGE) tienen tiempos de vida de fluorescencia que son mucho más cortos que los de la matriz de poliacrilamida circundante (~1 ns frente a ~4 ns; figura 2A), excluyendo así la estrategia de regulación temporal. Como tal, el uso de algoritmos de deconvolución para el decaimiento multiexponencial es un aspecto fundamental de la tecnología de CuTEDGE para facilitar la sustracción del fondo basada en FLIM también para estos fluorocromos de corto tiempo de vida.

En la figura 2A que muestra fluorescencia de resolución temporal (TRF), se utiliza un láser pulsado para la excitación (tiempo 0), se cuantifica la posterior curva de decaimiento de fluorescencia. El ajuste multiexponencial de la curva de decaimiento que resulta de la detección en gel de proteínas marcadas con Cy2 reveló una componente de fondo corta (0,2 ns) y una componente de fondo larga (4,2 ns) además de la componente del fluorocromo (1 ns). La figura 5 muestra la fuerte correlación entre la intensidad de la componente de fondo principal (4,2 ns) y la concentración de acrilamida en un gel de gradiente de poliacrilamida ($R^2 = 0,67$), lo que indica que la matriz de poliacrilamida es la fuente de esta componente de fondo. El tiempo de vida de la componente permaneció estable en la totalidad del gradiente de poliacrilamida, y sólo se alteró la intensidad de la componente. Como tal, la estrategia de sustracción del fondo que va a usarse en la tecnología de CuTEDGE es un método robusto aplicable a geles de gradiente así como geles isocráticos de concentraciones variables. El ajuste multiexponencial facilita la sustracción de las componentes de fondo, lo que da como resultado una relación señal a ruido aumentada significativamente.

Los experimentos de prueba de concepto que usan un conjunto multiplexado de orden 3 de fluorocromos para DIGE (Cy2, Cy3 y Cy5) mostraron una diferencia distinta en la distribución de tiempos de vida de las componentes de fondo y el propio fluorocromo (figuras 4A). Una comparación entre la imagen de intensidad tradicional y una imagen de tiempo de vida pseudocoloreada demuestra claramente que el patrón de separación de manchas de proteínas es superponible. El ajuste multiexponencial por píxeles y la posterior extracción de la componente del fluorocromo facilita por tanto la sustracción del fondo al nivel de fotones. Las mediciones de prueba de concepto revelaron aumentos de más de 10 veces en las relaciones señal a ruido con respecto a los dispositivos de exploración de láser de primera línea existentes, aunque se utilizase instrumentación inferior a la óptima (un microscopio de TRF modificado que permite una profundidad de medición máxima de $\sim 1 \mu\text{m}$, en comparación con un dispositivo de exploración Typhoon que mide la profundidad total de 1 mm del gel). Tal como se muestra en la figura 1, el intervalo de abundancias de proteínas fisiológicas (eje x) se representó gráficamente frente al intervalo de detección lineal para diversas tinciones de proteínas usadas en 2-DGE (eje y). Los métodos colorimétricos tales como tinción con plata (línea continua clara) ofrecen normalmente un rango dinámico de 1-2 órdenes de magnitud, mientras que los métodos fluorescentes tales como DIGE mínima (línea de puntos) proporcionan rangos dinámicos lineales de 3-4 órdenes de magnitud. Las mediciones de prueba de concepto que usan instrumentación de TRF existente (línea de trazos) mostraron una mejora de 3 órdenes de magnitud en el rango dinámico cuando se aplicó TRF en mediciones de DIGE convencionales (línea continua gruesa). Tras la implementación de las realizaciones explicadas en términos generales para el instrumento de CuTEDGE novedoso, se estima que el rango dinámico y la sensibilidad de detección mejoran con 2-3 órdenes de magnitud adicionales (recuadro de línea continua). Como tal, se espera que esta realización fundamental sola proporcione mejoras de varios órdenes de magnitud en la sensibilidad y el rango dinámico con respecto a las técnicas de adquisición de imágenes existentes para 2-DGE. El aumento resultante en la especificidad en la medición no sólo proporciona una mayor sensibilidad, sino que también elimina factores de confusión de efectos de dispersión u otras especies fluorescentes presentes en el gel, incluyendo la propia matriz de gel, disolventes, partículas o residuos celulares que quedan en el gel. Además de mejoras en la relación señal a ruido de la detección, el enfoque de FLIM multiexponencial también contribuye por tanto a reducir los problemas con la segmentación (detección de manchas) y el registro (correspondencia de manchas) en el posterior análisis de imágenes. Tales problemas representan actualmente otro cuello de botella importante en el flujo de trabajo de DGE cuantitativa, ya que es necesaria hoy en día una extensa edición manual de la detección y correspondencia automatizada de manchas. El fondo más limpio producido por la tecnología de CuTEDGE mejorará por tanto la automatización de la alineación de imágenes y reducirá en última instancia la subjetividad del análisis de imágenes. La varianza inducida por el software introducida por los algoritmos de sustracción del fondo usados actualmente en el software de análisis de 2DGE también se elimina, puesto que tales algoritmos ya no son necesarios.

La multiplexación a través del uso de fluorocromos separados espectralmente es un enfoque bien establecido para compensar las grandes variaciones de un gel a otro inherentes en la técnica de separación de 2-DGE. Sin embargo, en la mayoría de aplicaciones de TRF, se logra la multiplexación a través del uso de fluorocromos con diferentes tiempos de vida de fluorescencia, mientras que se solapan los espectros de excitación y emisión. Para maximizar la versatilidad de la metodología de CuTEDGE, se combinará la separación espectral y temporal en una aplicación. Como tal, se usarán múltiples longitudes de onda de láser para la excitación tal como se ilustra en el ejemplo 2. Esto facilita una combinación de TRF con la separación espectral usada actualmente en, por ejemplo, los enfoques de DIGE (9) y ALIS (10), haciendo así que el instrumento de CuTEDGE se implemente fácilmente en flujos de trabajo de proteómica existentes usando protocolos actuales para un patrón interno en 2-DGE. En multiplexación que usa instrumentación de adquisición de imágenes existente, un tiempo de adquisición más largo no tendrá ningún efecto apreciable sobre la cuantificación.

Las figuras 3A-3D muestran esto gráficamente. Durante la excitación con una fuente de luz constante (figura 3A), como es el caso en dispositivos de exploración de láser existentes usados en proteómica basada en gel, las curvas de excitación (figura 3C, líneas continuas) y curvas de emisión (figura 3C, líneas de puntos) han de estar lo suficientemente separadas para evitar la extinción o el solapamiento entre fluorocromos. Debido a la excitación constante, el solapamiento sigue siendo igual en la totalidad de la medición (figura 3A). Por consiguiente, una ventana de medición prolongada da como resultado una amplificación de señales específicas y no específicas (fondo) similares. Durante la excitación con un láser pulsado (figura 3B), la fuente de excitación se separa

temporalmente (figura 3D) así como espectralmente (figura 3C) de la emisión. Estas características espectrotemporales añaden otra dimensión de distinción entre diferentes especies fluorescentes, y proporcionan medios para la sustracción del fondo al nivel de fotones (véase la figura 2).

5 Puesto que se usa una fuente de luz constante para la excitación, el solapamiento espectral entre los espectros de excitación y emisión permanece (figura 3A), haciendo obligatorio el uso de un filtro de paso banda estrecho. En cambio, la separación espectrotemporal proporcionada por la tecnología de CuTEDGE separa los espectros de excitación y emisión en el tiempo (figura 3B), haciendo así posible usar un filtro de paso banda más ancho con mejoras resultantes en el rango dinámico y la sensibilidad. El uso de multiplexación a través de separación espectral en vez de a través de TRF también disminuye la complejidad de los espectros de decaimiento de tiempo de vida, mejorando así la capacidad de sustracción del fondo del método de CuTEDGE. El método de separación espectral también puede utilizarse para la medición simultánea de múltiples sondas en casos en los que la longitud de onda de excitación coincide. Estas mediciones de prueba de concepto indican que éste es el caso para el par de sondas Cy2 y Cy3, que pueden excitarse ambas de forma suficiente mediante un láser de diodo de 490 nm. La detección separada de las emisiones puede facilitarse entonces mediante un uso de filtros dicróicos y detectores duales (véase el ejemplo 4). Tras el desarrollo de conjuntos de fluorocromos novedosos para TRF-multiplexación con diferencias suficientemente grandes en los tiempos de vida de manera que pueda lograrse un ajuste adecuado tanto de las componentes de fluorocromo y como de fondo, pueden omitirse los métodos de separación espectral.

La instrumentación de adquisición de imágenes existente utiliza un PMT para la detección de los fotones emitidos por el fluorocromo excitado. Aunque un PMT proporciona una alta amplificación de la señal (hasta de 10^6), la eficiencia del recuento de fotones es generalmente baja (QE~ 10%). Aunque los detectores de APD presentan eficiencias cuánticas de hasta el 90% en el rango visible, su uso en instrumentación de adquisición de imágenes se ha visto dificultado anteriormente por su largo tiempo de inactividad tras cada fotón detectado. Nuevos métodos para la extinción activa de los detectores de APD contrarrestan este problema, y el uso de un detector de APD puede ofrecer por tanto mejoras significativas en la sensibilidad y el rango dinámico. Sin embargo en los casos en los que se requiere un amplio rango dinámico, las limitadas tasas de recuento máximas de los detectores de tipo APD puede ser todavía un factor limitante. Por consiguiente, existe una gama de detectores adecuados para el instrumento de CuTEDGE, y el rango dinámico de detección se perjudicará frente a la sensibilidad de detección en el diseño de instrumentos de CuTEDGE individuales dependiendo de la aplicación deseada.

La extracción de las características espectrotemporales de cada fluorocromo usado en CuTEDGE abre el paso a nuevos enfoques para la cuantificación de la señal. En aplicaciones de FLIM existentes, la amplitud de la señal para cada componente se utiliza generalmente para cuantificar la contribución de cada componente en un píxel. En la aplicación de CuTEDGE, se usará en su lugar toda el área bajo la curva (AUC) para fines de cuantificación. El uso del AUC, correspondiente al recuento de fotones ajustado para cada componente específica, contribuirá a un aumento de la sensibilidad de detección así como del rango dinámico. En la adquisición de imágenes tradicional, cuando se aplica excitación constante, la integración del AUC no mejora el rango dinámico de la medición de manera notable con respecto a mediciones de amplitud, puesto que se convolucionan todos los factores de confusión con la señal de la sonda, y por tanto se amplifican junto con la señal específica. Dada la deconvolución de las curvas de decaimiento multiexponencial usadas en CuTEDGE, puede calcularse el AUC específico para el fluorocromo. Puesto que la separación espectrotemporal también facilita el uso de un filtro de emisión de paso banda más ancho, se aumentarán adicionalmente las mejoras de señal a ruido del cálculo del volumen bajo la curva (VUC) resultante.

La necesidad de una asistencia manual compleja y evaluaciones de los algoritmos de ajuste del tiempo de vida disponibles en software de FLIM existente impone grandes exigencias sobre el usuario en cuanto a un conocimiento profundo del campo. En cambio, el concepto de CuTEDGE proporcionará un alto nivel de automatización para permitir que investigadores de proteómica sin experiencia en el campo de la fluorescencia de resolución temporal realicen mediciones precisas de manera eficiente en cuanto al tiempo. Dado que los tiempos de vida de las componentes fluorescentes en 2-DGE permanecen constantes a la luz de tampones y concentraciones de poliacrilamida alterados, se incluirán protocolos automatizados para el ajuste del tiempo de vida por píxeles y la posterior exportación de imágenes de intensidad para la componente relevante, para los fluorocromos patrón usados en 2-DGE hoy en día. Con el fin de facilitar el uso de software de análisis de imágenes de 2-DGE existente, el AUC se representará por tanto como una intensidad unidimensional (Z) en la imagen exportada resultante (véase la figura 7). El uso de un formato de archivo de imagen en escala de grises de 32 bits en sustitución del formato de 16 bits usado actualmente proporciona un rango dinámico digital de aproximadamente 10 órdenes de magnitud, facilitando así mejoras de múltiples órdenes de magnitud en el rango dinámico logradas a través de la tecnología de CuTEDGE. Para proporcionar máxima flexibilidad del instrumento, también se proporcionará software para el ajuste guiado por el usuario así como la construcción de rutinas para la exploración automatizada, para permitir una fácil implementación de protocolos para matrices de gel o fluorocromos novedosos.

Los aspectos que llevan tiempo de 2-DGE limitan a menudo su capacidad de utilización en estudios de proteómica a gran escala hoy en día, y la automatización es de suma importancia en cualquier plataforma de proteómica. Además del ajuste automatizado del tiempo de vida y el posterior cálculo de la imagen de intensidad para la componente de fluorocromo descrita anteriormente, la exploración secuencial automatizada de múltiples protocolos según se define por el usuario será por tanto una característica convencional en el instrumento de CuTEDGE. Además de la

eficiencia temporal, esta característica también contribuye a minimizar la exposición a la luz de los diversos fluorocromos. Exploraciones secuenciales facilitan la multiplexación, tal como se ejemplifica mediante el protocolo de DIGE mínima (ejemplo 2). Otras aplicaciones de exploraciones secuenciales incluyen la detección de proteína total con SYPRO™ Ruby tras DIGE de saturación (ejemplo 5), o multiplexación de orden cuatro con un CyDye adicional (ejemplo 4).

El instrumento de CuTEDGE se equipará con láseres pulsados de frecuencia variable (por ejemplo, de 0,1-40 MHz) para permitir el ajuste fino del método usado para la detección y cuantificación de la amplia gama de fluorocromos usados actualmente en 2-DGE. Por ejemplo, los tiempos de vida extremadamente largos de ~350-500 ns notificados para complejos de rutenio (7, 8, 13) exigirían un enfoque de medición acumulativa, con retardo temporal (figura 2B, ejemplo 1), mientras que las duraciones de vida mucho más cortas de, por ejemplo, los CyDyes (~1 ns (8)) sugieren que FLIM con posterior sustracción de la curva de decaimiento derivada del fondo (figura 2A, ejemplo 2) es más apropiado para lograr una sensibilidad máxima para estos fluorocromos. El modo de frecuencia variable proporcionará un tiempo de exploración mucho más corto para esto último.

Con respecto a la descripción anterior entonces, ha de tenerse en cuenta que las relaciones dimensionales óptimas para las partes de la invención, para incluir variaciones en tamaño, materiales, conformación, forma, función y manera de funcionamiento, montaje y uso, se consideran fácilmente evidentes y obvias para un experto en la técnica.

Por tanto, se considera lo anterior como una descripción de los principios de la invención. Además, puesto que se le ocurrirán fácilmente numerosas modificaciones y cambios a los expertos en la técnica, no se desea limitar la invención a la construcción y funcionamiento exactos mostrados y descritos.

EJEMPLO 1

En este ejemplo, se aíslan en primer lugar proteínas de vías respiratorias de rata a través de lisis-lavado (14), un método de aislamiento que solubiliza instantáneamente el proteoma epitelial de las vías respiratorias en un tampón de lisis basado en urea compatible con 2-DGE (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4% p/v, Triton-X 100 al 0,5%, cóctel de inhibidor de proteasas al 2% v/v). Se determina la concentración de proteínas de las muestras usando el método de Bradford, y se separan usando 2-DGE. Se diluye una alícuota de 400 µg de proteína/muestra hasta 350 µl con tampón de lisis, y se añade tampón IPG para el intervalo de pH hasta una concentración final del 1% v/v. Se cargan las muestras de proteínas sobre la tira IPG (GE Healthcare) a través de rehidratación a temperatura ambiente durante la noche, y se realiza isoelectroenfoque (IEF) usando una unidad de electroforesis Multiphor II y una fuente de alimentación EPS 3501 XL a 20°C con el siguiente protocolo de gradiente: 0-50 V, 1 min.; 50 V, 1 h; 50-1000 V, 3 h; 1000-3500 V, 3 h; 3500 V, 19 h (total 74,9 kWh). Tras el IEF, se incuban las tiras 2x15 min. en tampón de equilibración (tris-HCl 50 mM pH 8,8, urea 6 M, glicerol al 30%, SDS al 2%). Se realiza reducción y alquilación de los sulfhidrilos a través de incorporación de DTT 65 mM en la primera incubación, y yodoacetamida 10 mM en la segunda. Entonces se cargan las tiras sobre geles de SDS-PAGE de 10%T de 20 cm x 25 cm y se sellan usando agarosa IsoGel al 0,5%. Se realiza la separación en la segunda dimensión en un sistema de electroforesis Ettan Dealt (GE Healthcare) a 10°C, 14 mA/gel hasta que el frente de colorante ha migrado 18 cm (~18 h) en Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1%.

Entonces se retira el gel de poliacrilamida del cartucho de vidrio, y se visualizan las proteínas usando la tinción SYPRO Ruby™ según el protocolo del fabricante (Molecular Probes, Eugene, OR). Brevemente, se fijan los geles de 2-DGE en ácido acético al 7% y etanol al 10% durante 2x 30 min., luego se incuban en disolución de tinción SYPRO™ Ruby al 100% durante la noche. Posteriormente, se destiñen los geles de 2-DGE en metanol al 100% durante 5 min. con el fin de eliminar las partículas de tinción sobre la superficie del gel, luego se equilibran en agua durante 2 x 15 min.

Se coloca el gel de 2-DGE teñido con SYPRO™ Ruby directamente sobre la platina de vidrio del dispositivo de exploración de CuTEDGE, y se visualizan las proteínas usando un régimen de medición de tiempo de vida con retardo temporal con un tamaño de píxel de 20-100 µm. Se realiza la excitación a través de un láser de diodo pulsado de longitud de onda de 490 nm, y una baja tasa de pulsos de 0,1-0,5 MHz (ciclos de 2-10 µs) para permitir el decaimiento completo de los tiempos de vida extremadamente largos del complejo de Ru fluorescente en SYPRO™ Ruby.

Se detecta la emisión usando un detector de PMT y se aplica un filtro de emisión de paso banda de 610±50 nm (610bp100), alternativamente un filtro de paso largo de 600 nm. Se exportan los datos a un módulo de software de ajuste de decaimiento de fluorescencia multiexponencial fluorescencia que puede ajustar hasta cuatro algoritmos de decaimiento diferentes simultáneamente. Basándose en el tiempo de vida de fluorescencia extremadamente largo de la molécula de tris(batofenantrolinadisulfonato)rutenio II (RuTBS) usada en la tinción de proteínas SYPRO™ Ruby, se utiliza un enfoque de medición con retardo temporal para excluir la fluorescencia de fondo (figura 2B). Se calcula el área bajo la curva (AUC) de la curva de decaimiento para la molécula de RuTBS con el intervalo de tiempo de 10-500 ns, y se define como la intensidad de píxel para las coordenadas X, Y dadas de la posición del dispositivo de exploración (véase la figura 7).

Las mediciones con retardo temporal facilitan una selectividad mantenida con un filtro de emisión de paso banda más ancho en comparación con el usado normalmente para la tinción SYPRO™ Ruby (610bp30), puesto que la mayoría de la autofluorescencia de la matriz y biomoléculas se produce durante los primeros 5 ns. El filtro de paso banda más ancho permite la detección del grueso del pico de emisión ancho para RuTBS, con un aumento de la sensibilidad como resultado. Tras la finalización de la exploración, los valores de AUC resultantes para cada coordenada X, Y respectiva se fusionan en un archivo tiff en escala de grises de 32 bits que puede analizarse mediante un software de análisis de 2-DGE de elección.

EJEMPLO 2

Se solubilizan macrófagos aislados mediante lavado broncoalveolar de sujetos humanos fumadores y que nunca han fumado, usando tampón de lisis de 2-DGE (véase el ejemplo 1). Se crea un patrón interno a través de la combinación de cantidades iguales de proteína de todos los sujetos incluidos en el estudio, y se marca con Cy2 conjugada con éster de NHS (reactivo de DIGE mínima) según las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Se aleatorizan las muestras de proteínas de los sujetos humanos fumadores y que nunca han fumado en dos grupos, que se marcan con los reactivos de DIGE mínima, Cy3 y Cy5, respectivamente. El patrón interno marcado con Cy2 se separa conjuntamente con una muestra marcada con Cy3 y una con Cy5 en un gel de 2-DGE según el protocolo descrito en el ejemplo 1. Se visualizan los tres marcadores de proteínas diferentes en una secuencia automatizada de tres protocolos de exploración diferentes usando una combinación de fluorescencia de resolución espectral y temporal tal como sigue:

A) Se excita el fluorocromo Cy2 (patrón interno) a través de un láser de diodo pulsado de longitud de onda de 490 nm, y una tasa de pulsos de 40 MHz (ciclos de 25 ns). Se detecta la emisión usando un detector de APD con una tasa de respuesta de 50 ps, y se aplica un filtro de emisión de paso banda de 52020 nm (520bp40).

B) Se excita el fluorocromo Cy3 (muestra) a través de un láser de diodo pulsado de longitud de onda 532 nm, y una tasa de pulsos de 40 MHz (ciclos de 25 ns). Se detecta la emisión usando un detector de APD con una tasa de respuesta de 50 ps, y se aplica un filtro de emisión de paso banda de 58010 nm (580bp20).

C) Se excita el fluorocromo Cy5 (muestra) a través de un láser de diodo pulsado de longitud de onda 640 nm, y una tasa de pulsos de 40 MHz (ciclos de 25 ns). Se detecta la emisión usando un detector de APD con una tasa de respuesta de 50 ps, y se aplica un filtro de emisión de paso banda de 67010 nm (670bp20).

Se exportan los datos de cada uno de los procedimientos de exploración a un módulo de software de ajuste de decaimiento de fluorescencia multiexponencial que puede ajustar múltiples algoritmos de decaimiento simultáneamente. Debido a los tiempos de decaimiento relativamente cortos de los CyDyes (0,9-1,5 ns) se calcula el AUC bajo toda la curva de decaimiento correspondiente al respectivo CyDye para cada píxel (figura 2A). El ajuste multidimensional de las curvas de decaimiento facilita la sustracción de la emisión de fondo al nivel de fotones en cada una de las longitudes de onda específicas, que se proporciona como una característica automatizada en el módulo de software (figura 6). Los valores de AUC resultantes para cada coordenada X, Y respectiva se fusionan en tres archivos de imagen en escala de grises de 32 bits distintos superponibles adecuados para el análisis con un software de análisis de 2-DGE con capacidad para DIGE.

EJEMPLO 3

Como etapa adicional al protocolo descrito en el ejemplo 2, se realiza tinción con SYPRO™ Ruby para facilitar la cuantificación del contenido de proteína total en el gel de DIGE. En la tecnología existente, no es posible utilizar los fluorocromos de DIGE y SYPRO™ Ruby en los mismos geles de 2-DGE debido al solapamiento espectral, particularmente en cuanto a las curvas de emisión de SYPRO™ Ruby, Cy3 y Cy5. Las realizaciones de esta invención utilizan la dimensión temporal para facilitar la fusión de estos a protocolos convencionales (tal como se ejemplifica en la figura 3). Tras la finalización de los procedimientos explicados en términos generales en el ejemplo 2, se realiza la tinción posterior con tinción SYPRO™ Ruby para cuantificar el contenido de proteína total según las etapas B y C o explicadas en términos generales en el ejemplo 1.

EJEMPLO 4

La presente invención facilita el análisis de DIGE con multiplexación de orden cuatro a través del uso de un CyDye adicional, tal como Cy5.5 o Cy7. Se marca una cuarta muestra con el conjugado de éster de NHS de CyDye adicional, y se separa conjuntamente con el patrón interno marcado con Cy2 y las muestras marcadas con Cy3 y Cy5 según se describe en el ejemplo 2. En el caso de incorporación del fluorocromo Cy7, se añade una etapa de visualización adicional al ejemplo 2 a través de excitación con un láser de diodo pulsado de longitud de onda de 735 nm, una tasa de pulsos de 40 MHz (ciclos de 25 ns), y un filtro de emisión de 780±30 nm (780bp60). En el caso de incorporación de Cy5.5, puede aplicarse un método alternativo que usa detectores duales para reducir enormemente el tiempo de exploración total: las mediciones de prueba de concepto han mostrado que el solapamiento en las longitudes de onda de excitación de Cy2 y Cy3 es suficiente para permitir la excitación de ambos fluorocromos con un único láser de diodo de 490 nm.

A través de la aplicación de un filtro dicróico para dividir el haz de luz emitido basándose en la longitud de onda, puede detectarse simultáneamente la emisión de ambos fluorocromos mediante el uso de detectores duales. Puesto que el solapamiento espectral de Cy5 y Cy5.5 se asemeja al del par de colorantes Cy2/Cy3, puede aplicarse un único método de exploración/ detección dual también para este par de colorantes usando un láser pulsado de 640 nm y un filtro dicróico apropiado en combinación con los filtros de emisión 670BP20 y 710BP40 nm, respectivamente. Se exportan los datos de cada detector/protocolo de exploración a un módulo de software de ajuste de decaimiento de fluorescencia multiexponencial. Se calcula el AUC bajo la curva de decaimiento ajustada correspondiente al respectivo CyDye para cada píxel. El ajuste multidimensional de las curvas de decaimiento facilita la sustracción de la emisión de fondo al nivel de fotones en cada una de las longitudes de onda específicas (figura 6). Los valores de AUC resultantes para cada coordenada X, Y respectiva se fusionan en cuatro archivos tiff en escala de grises de 32 bits distintos superponibles adecuados para el análisis con un software de análisis de 2-DGE con capacidad para DIGE.

EJEMPLO 5

Este ejemplo implica una alteración del método recientemente publicado para la determinación del estado redox de tioles de proteína, en el que Spiess *et al.* (15) utilizaron multiplexación de DIGE de saturación para detectar la oxidación o formación de aducto de cisteínas tras la exposición a oxidantes. Brevemente, se aíslan proteínas epiteliales de las vías respiratorias a través de lisis-lavado usando tampón de lisis sin tiourea (14), y se incuban con un exceso de marcador Cy3 conjugado con maleimida (Cy3 250 nM/mg de proteína; > exceso de 10 veces) para el marcaje de los tioles reducidos. Se realizaron incubaciones de 16 horas para garantizar la hidrólisis completa del marcador Cy3 libre (en exceso). Posteriormente, se añade tributilfosfina hasta una concentración final de 24 mM para reducir los enlaces disulfuro. Se realiza una segunda reacción de marcaje de saturación usando Cy5-maleimida con el fin de marcar las cisteínas de los enlaces disulfuro reducidos. Se separan las muestras de proteínas marcadas de manera diferencial mediante 2-DGE según se describe en el ejemplo 1. En el método original, se cuantificaron los niveles de Cy3 y Cy5 usando un dispositivo de exploración de fluorescencia Typhoon 8600 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, parte de GE Healthcare) que utiliza una fuente de luz constante para la excitación. Se usó el contenido de proteína total determinado a través de tinción con plata (véase la figura 1) para la normalización.

Por medio de la presente invención, pueden mejorarse la sensibilidad, especificidad y rango dinámico del método descrito anteriormente mediante una combinación de los protocolos descritos en el ejemplo 2 y el ejemplo 3. Brevemente, esto incluye la visualización de los CyDyes usando la tecnología de CuTEDGE según se describe en el ejemplo 2, seguido por cuantificación del contenido de proteína total usando el protocolo de CuTEDGE SYPRO™ Ruby descrito en el ejemplo 3.

EJEMPLO 6

Se analizan proteínas procedentes de líquido de lavado broncoalveolar (BAL) de pacientes asmáticos así como sujetos control sanos para determinar el contenido de IL-13 a través de inmunotransferencia. Brevemente, se concentran las proteínas de líquido BAL usando un filtro centrífugo BioMax según las instrucciones del fabricante (Millipore, Bedford, OR) y se separan con 2-DGE según se describe en el ejemplo 1. Tras la electroforesis, se someten a transferencia las proteínas en membranas de poli(fluoruro de vinilo) (PVDF) Sequiblot™ (0.2 µm de tamaño de poro) usando el sistema ISO-DALT a 10°C, 250 mA durante 19 horas en Tris25 mM, glicina 192 mM, metanol al 10% (v/v). Posteriormente, se realiza el bloqueo de la membrana con proteína láctea, y se incuban las membranas de PVDF con un anticuerpo primario monoclonal anti-IL-13. Se detecta el anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Cy5.

Se visualiza el marcador Cy5 a través de excitación con un láser de diodo pulsado de 640 nm (40 MHz), y se cuantifica la fluorescencia a través de un detector de APD con una tasa de respuesta de 50 ps y un filtro de emisión 670bp20. Se exportan los datos a un módulo de software de ajuste de decaimiento de fluorescencia multiexponencial que puede ajustar simultáneamente múltiples algoritmos de decaimiento. Se calcula el AUC bajo toda la curva de decaimiento para cada píxel. El ajuste multidimensional de las curvas de decaimiento facilita la sustracción de la emisión de fondo al nivel de fotones en cada una de las longitudes de onda específicas. Los valores de AUC resultantes para cada coordenada X, Y respectiva se fusionan en un archivo tiff en escala de grises de 32 bits adecuado para el análisis con un software de análisis de 2-DGE.

Aunque se ha descrito la invención con referencia a realizaciones específicas, se apreciará que son posibles numerosas variaciones, modificaciones y realizaciones, y por consiguiente, todas de tales variaciones, modificaciones y realizaciones han de considerarse que están dentro del espíritu y alcance de la invención.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wheelock AM, Goto S. 2006. Effects of post-electrophoretic analysis on variance in gel-based proteomics. *Expert Rev.Pwteomics*. 3: 129-142
2. Wheelock AM, Buckpitt AR. 2005. Software-induced variance in two-dimensional gel electrophoresis image analysis. *Electrophoresis* 26: 4508-4520

3. Wheelock AM, Wheelock CE. 2008. Bio informatics in gel-based proteomics. In Plant Proteomics: Technologies, Strategies and Applications, ed. R Rakwal, G Agrawal, pp. 107-125. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Inc.
4. Silva E, O'Gorman M, Becker S, Eklund A, Grunewald J, Wheelock AM. In the eye of the beholder: Does the Master see the SameSpots as the novice? *Journal of Proteome Research*: Under revision
- 5 5. Suhling K, French PM, Phillips D. 2005. Time-resolved fluorescence microscopy. *Photochem Photobiol Sci* 4: 13-22
6. Wallrabe H, Periasamy A. 2005. Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Curr Opin Biotechnol* 16: 19-27
- 10 7. Handl HL, Gillies RJ. 2005. Lanthanide-based luminescent assays for ligand- receptor interactions. *Life Sci.* 77: 361-371
8. Clapp AR, Medintz IL, Fisher BR, Anderson GP, Mattoussi H. 2005. Can luminescent quantum dots be efficient energy acceptors with organic dye donors? *J.Am.Chem Soc.* 127: 1242-1250
9. Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I. 2003. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two- dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics.* 3: 36-44
- 15 10. Wheelock AM, Morin D, Bartosiewicz M, Buckpitt AR. 2006. Use of a fluorescent internal protein standard to achieve quantitative two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 6: 1385-1398
11. Lassiter SJ, Stryjewski W, Legendre BL, Jr., Erdmann R, Wahl M, Wurm J, Peterson R, Middendorf L, Soper SA. 2000. Time-resolved fluorescence imaging of slab gels for lifetime base-calling in DNA sequencing applications. *Anal Chem* 72: 5373-5382
- 20 12. Stryjewski W, Soper SA, Lassiter SJ, Davis L. 2002. Multiplexed analysis using time-resolved near-IR fluorescence for the detection of genomics material. *Proceedings of SPIE* 4626: 201 -209
13. Bartolome A, Bardliving C, Rao G, Tolosa L. 2005. Fatty acid sensor for low-cost lifetime-assisted ratiometric sensing using a fluorescent fatty acid binding protein. *Anal.Biochem.* 345: 133-139
- 25 14. Wheelock AM, Zhang L, Tran MU, Morin D, Penn S, Buckpitt AR, Plopper CG. 2004. Isolation of rodent airway epithelial cell proteins facilitates *in vivo* proteomics studies of lung toxicity. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 286: L399-L410
15. Spiess PC, Morin D, Jewell WT, Buckpitt AR. 2008. Measurement of protein sulfhydryls in response to cellular oxidative stress using gel electrophoresis and multiplexed fluorescent imaging analysis. *Chem Res Toxicol* 21: 1074-1085
- 30

REIVINDICACIONES

1. Método de adquisición de imágenes de electroforesis en gel mono y bidimensional, **caracterizado por** excitar un fluorocromo unido a una proteína con un dispositivo de exploración de láser pulsado para proporcionar mediciones mediante imágenes de tiempo de vida de fluorescencia para la detección y cuantificación de proteínas a un nivel píxel por píxel y utilizar un ajuste multiexponencial de la curva de decaimiento de fluorescencia para separar la fluorescencia que se origina de la especie de proteína marcada con el fluorocromo de la fluorescencia que se origina de otras fuentes seleccionadas del grupo que consiste en, tales como, la propia matriz de gel, disoluciones o partículas presentes en el gel, o de efectos de dispersión, para la posterior sustracción del fondo.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la detección y cuantificación de proteínas comprende la cuantificación de fluorescencia tras una etapa de transferencia.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de exploración de láser pulsado es un láser de diodo alojado internamente dentro de un recinto del dispositivo de exploración sellado.
4. Método según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de exploración de láser pulsado se conecta externamente a través de salidas de cable de fibra óptica para proporcionar una flexibilidad óptima en cuanto a las longitudes de onda de excitación que van a usarse.
5. Método según la reivindicación 1, en el que el método se realiza con la instrumentación existente mejorada.
6. Método según la reivindicación 1, en el que el método se realiza con un sistema de dispositivo de exploración completamente encerrado.
7. Método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además utilizar ajuste multiexponencial de la curva de decaimiento de fluorescencia para separar la fluorescencia que se origina de la especie de proteína marcada con el fluorocromo de la fluorescencia que se origina de otras fuentes tales como una membrana de transferencia, para la posterior sustracción del fondo.
8. Método según la reivindicación 1, que comprende además el uso secuencial de múltiples longitudes de onda de láser para la excitación para facilitar una combinación de fluorescencia de resolución temporal con separación espectral de fluorocromos, usando multiplexación a través de separación espectral para disminuir la complejidad de los espectros de decaimiento de tiempo de vida.
9. Método según la reivindicación 8, en el que hay mediciones dobles mediante imágenes de tiempo de vida de fluorescencia.
10. Método según la reivindicación 1, que comprende además integrar una curva de decaimiento fluorescente de la intensidad específica para el fluorocromo para calcular el área bajo la curva.
11. Método según la reivindicación 1, que comprende además incorporar características de automatización y de uso fácil.
12. Método según la reivindicación 11, en el que las características de automatización y de uso fácil incluyen al menos uno de cálculos gráficos y cuantitativos de electroforesis en gel mono o bidimensional adquirida, protocolos automatizados para el análisis de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia, sustracción de las componentes de fondo y exportación de imágenes de intensidad para la(s) componente(s) del fluorocromo para los fluorocromos patrón usados en electroforesis en gel bidimensional.
13. Método según la reivindicación 1, que comprende además maximizar la automatización, facilitar la programación de exploración secuencial de múltiples protocolos diferentes según defina el usuario, incluyendo la exploración secuencial de múltiples fluorocromos usados para multiplexación.
14. Método según la reivindicación 1, que comprende además usar sondas fluorescentes usadas en proteómica basada en gel y diodos láser pulsados de frecuencia variable para la optimización de los tiempos de exploración.

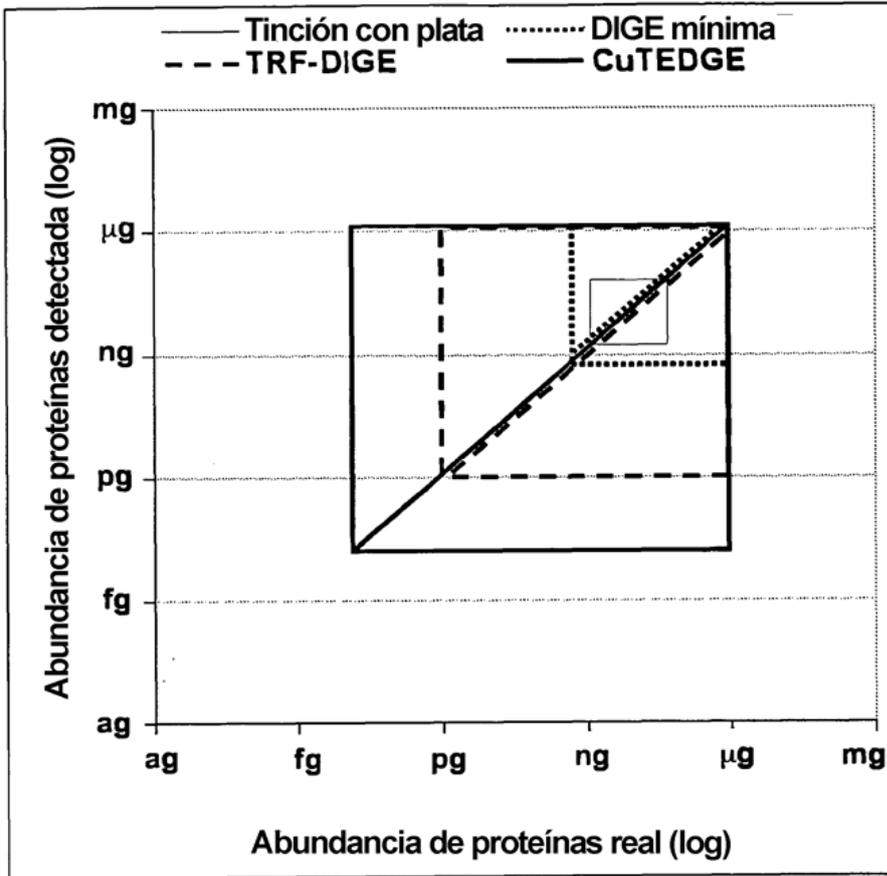


Figura 1

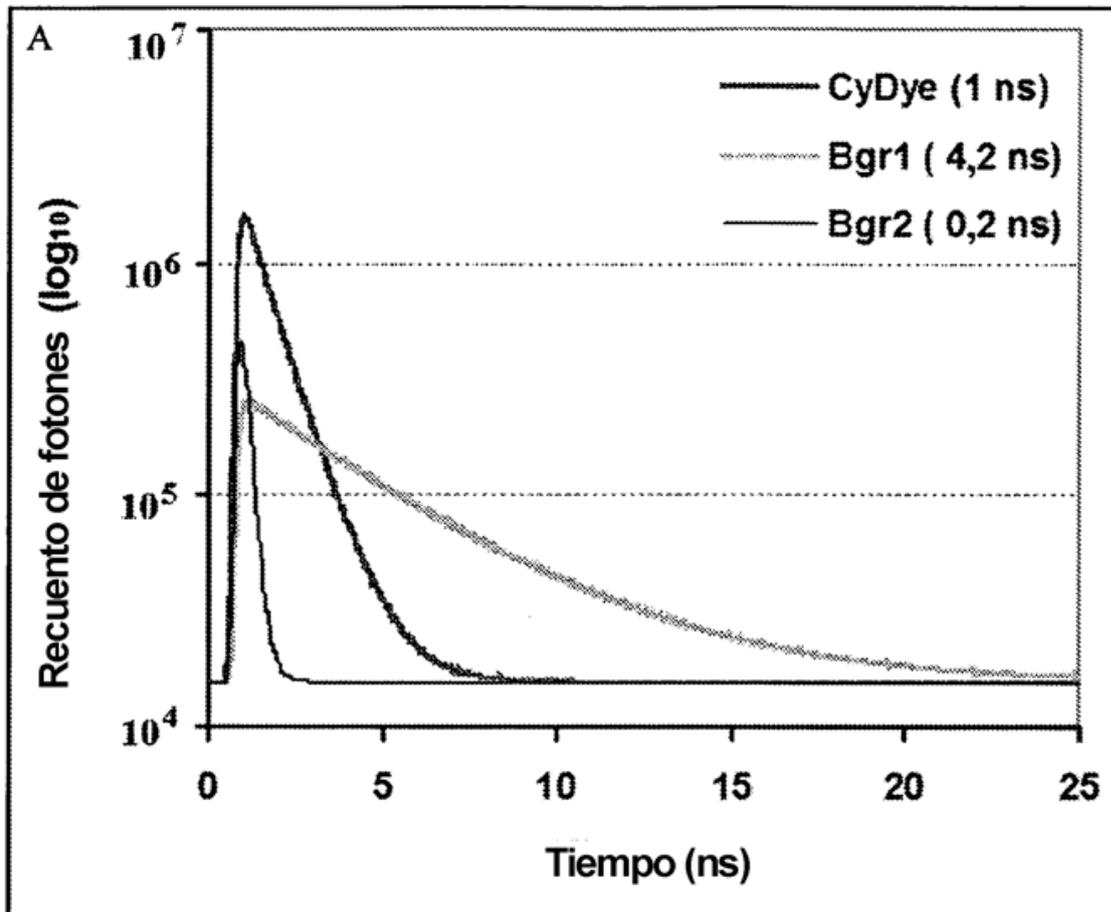


Figura 2A

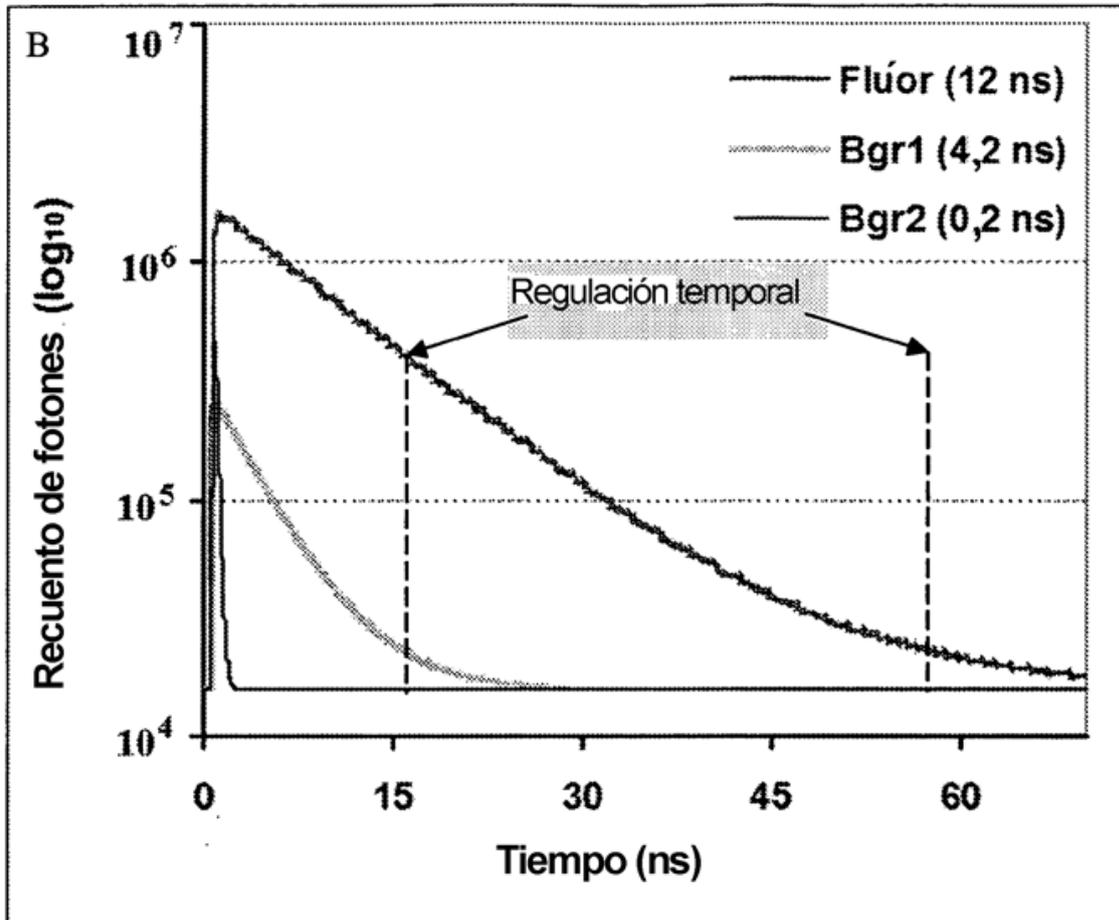


Figura 2B

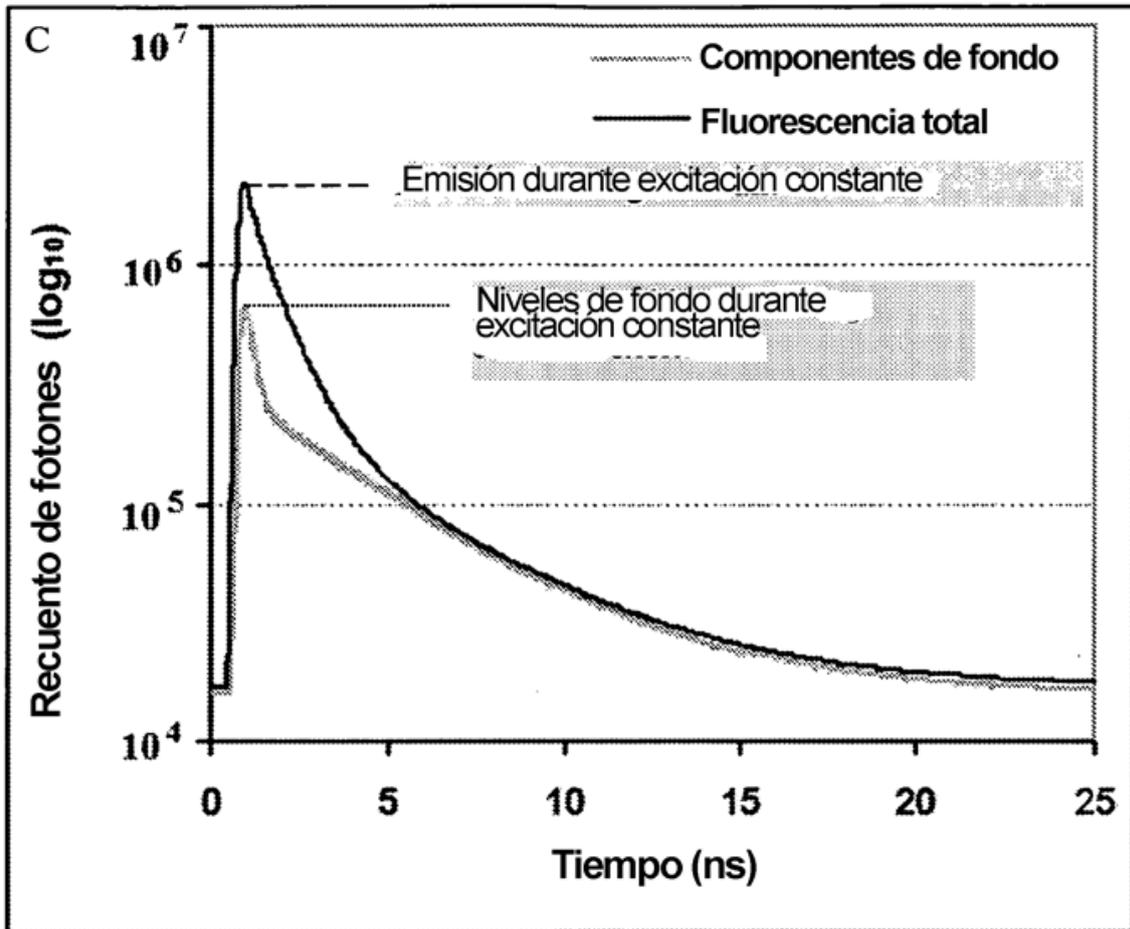


Figura 2C

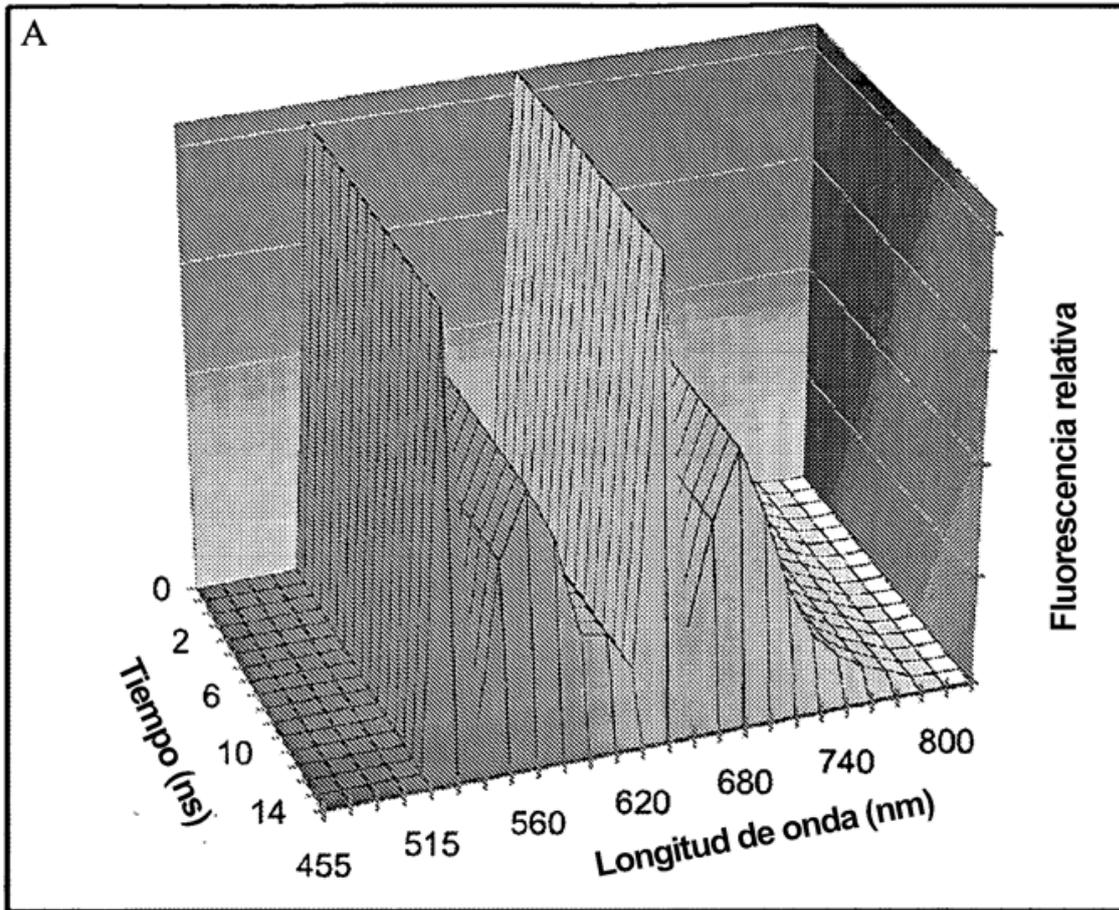


Figura 3A

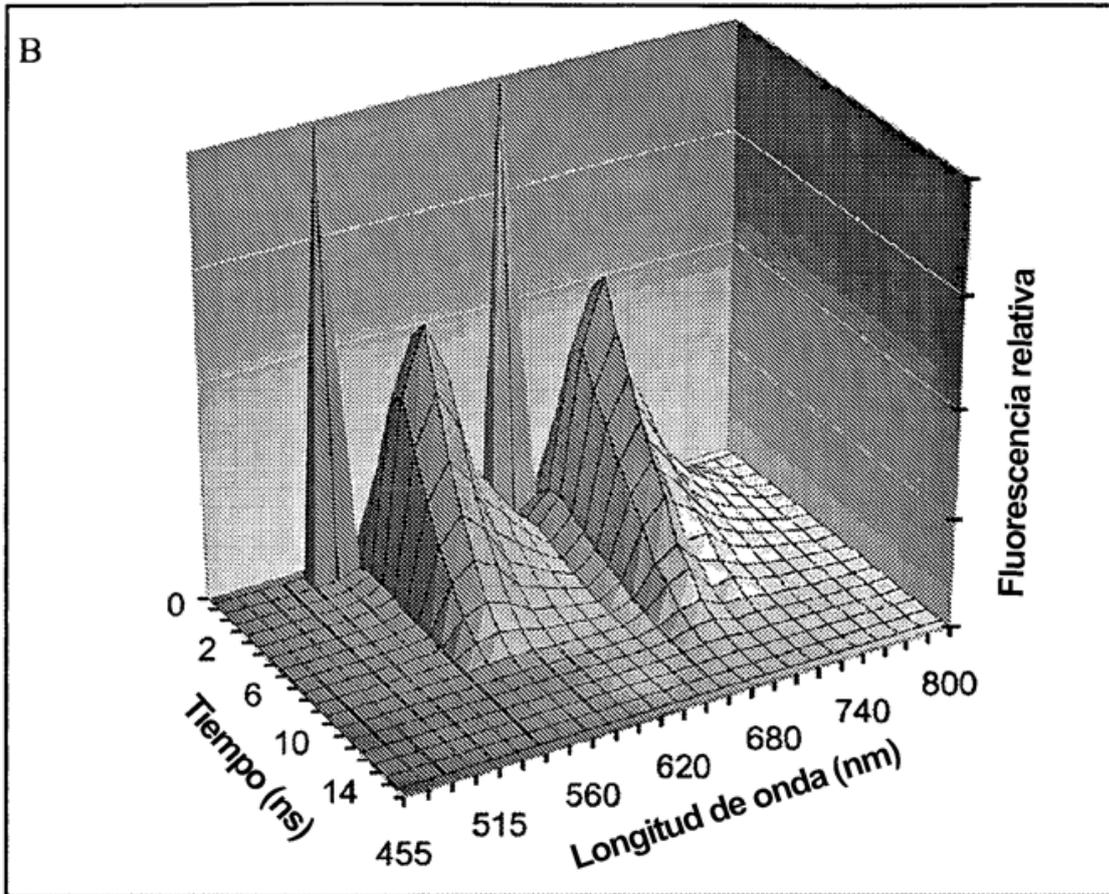


Figura 3B

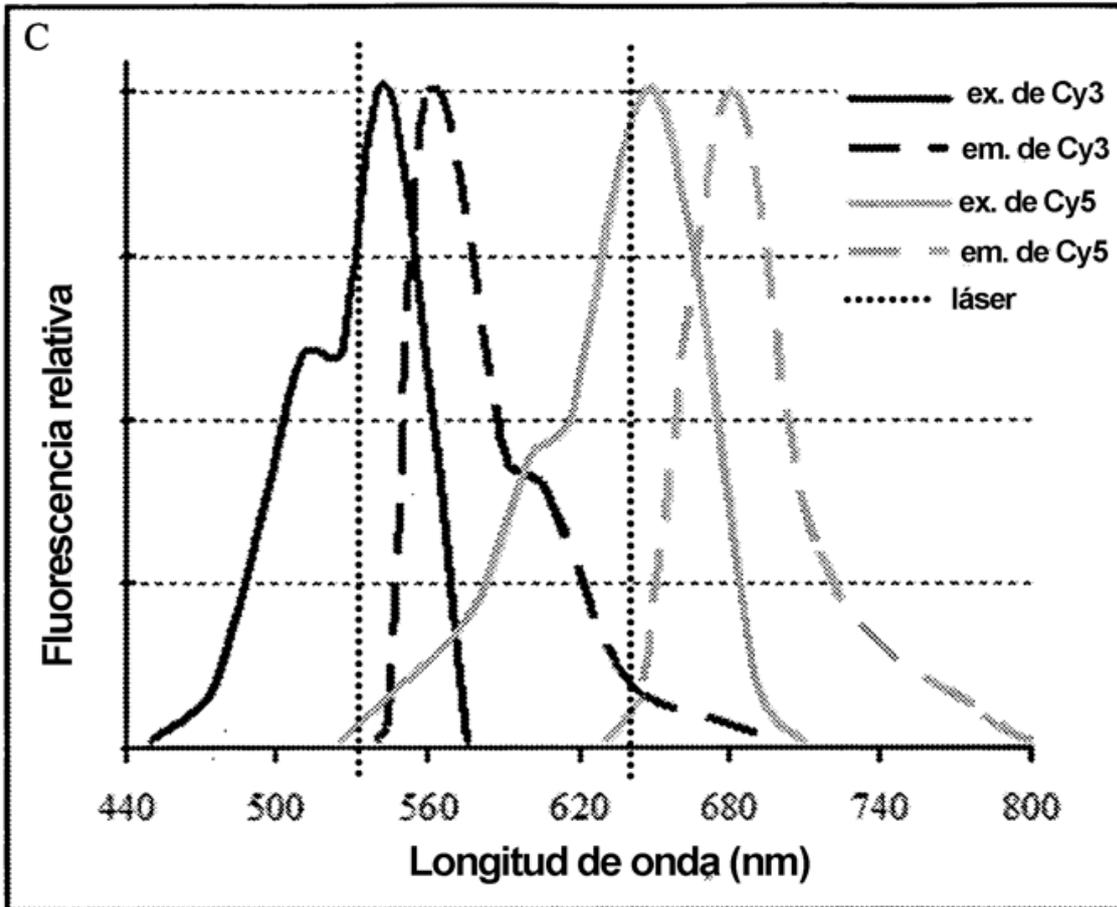


Figura 3C

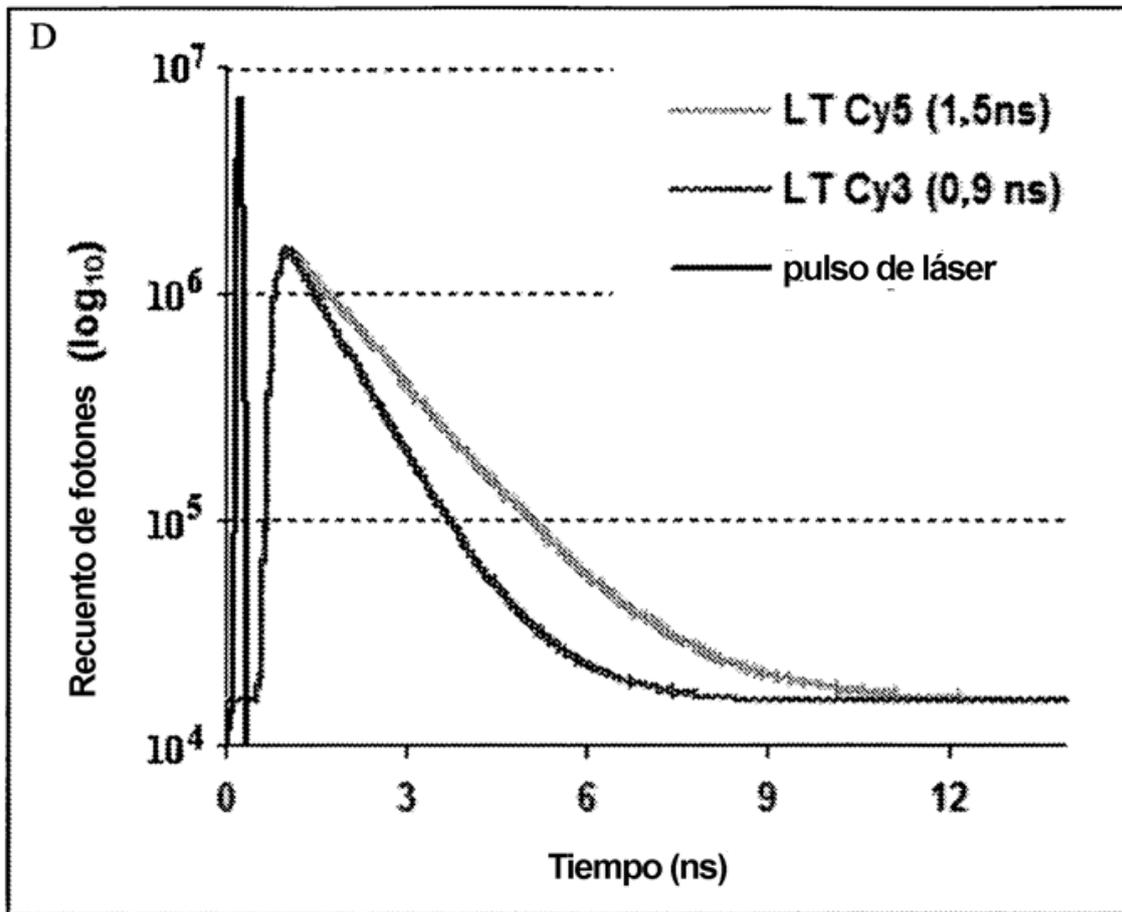


Figura 3D

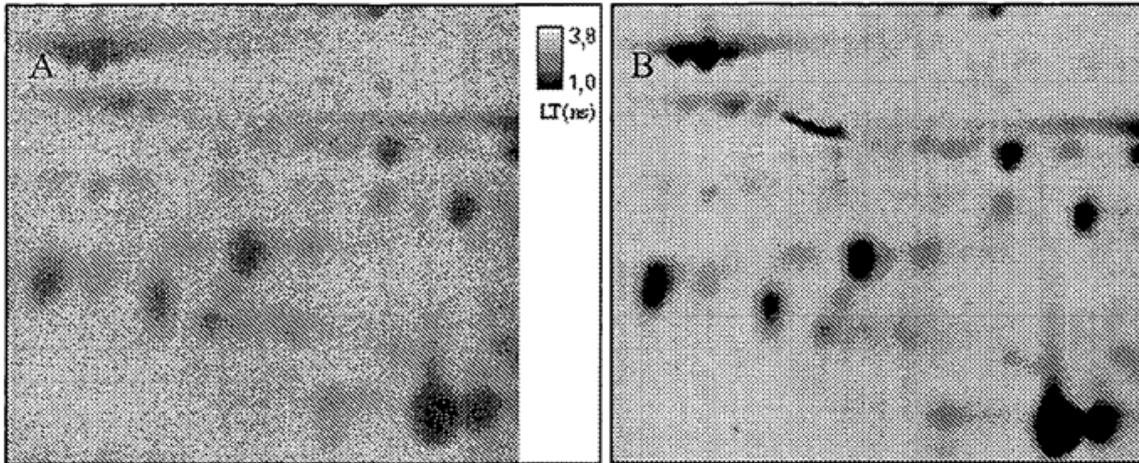


Figura 4

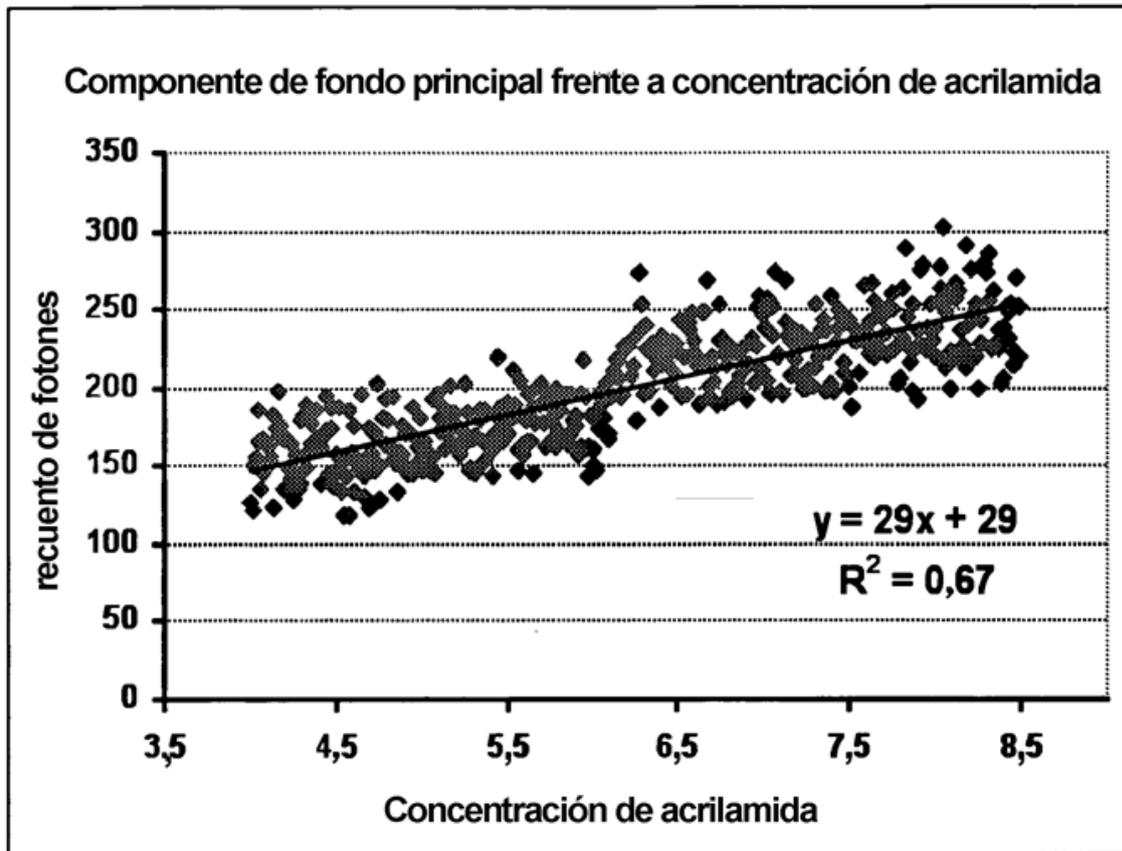


Figura 5

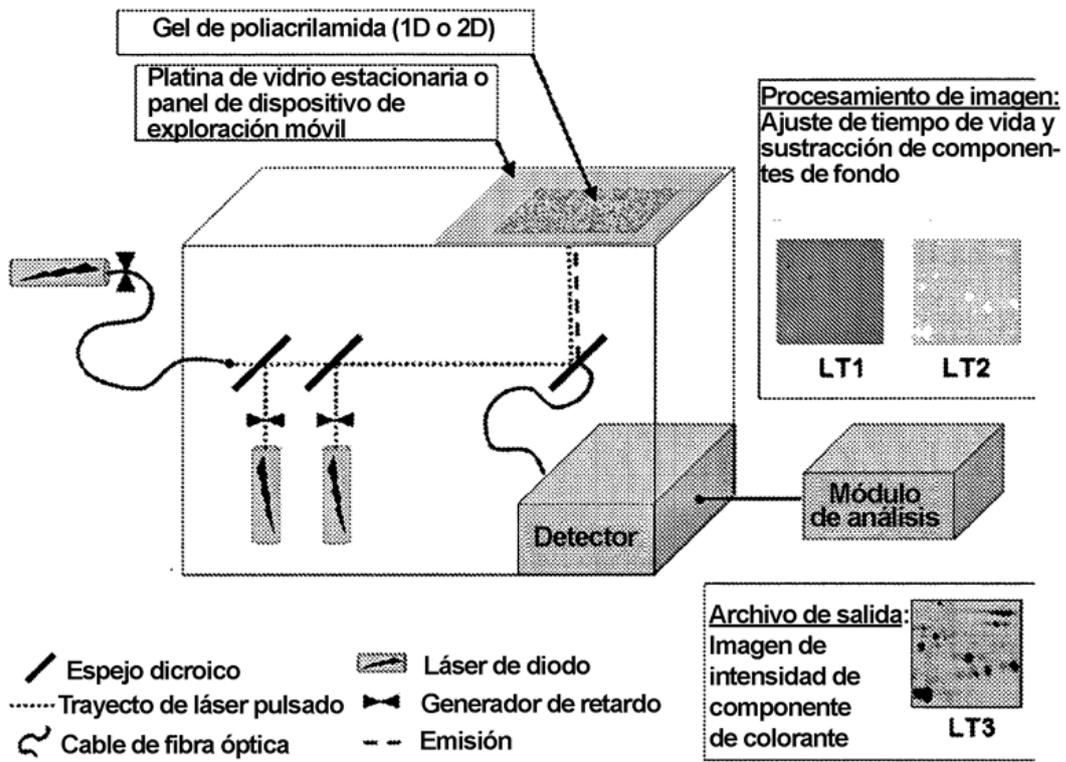


Figura 6

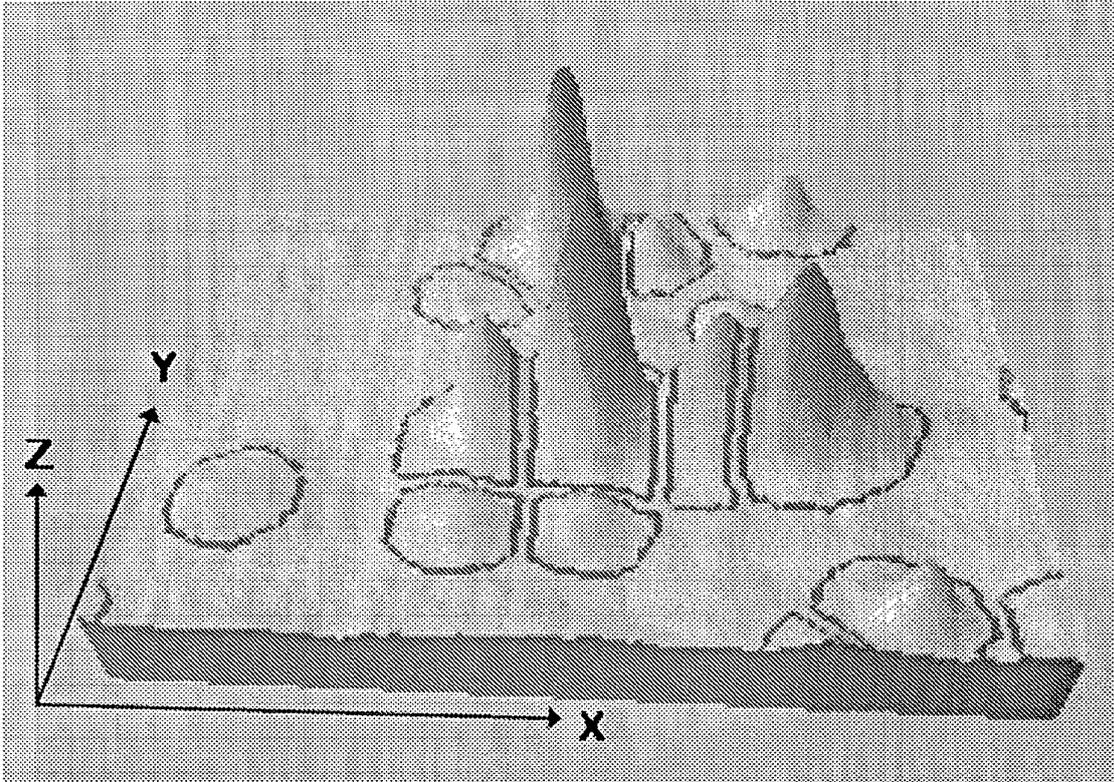


Figura 7