

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 395**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/66 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08845502 .7**
96 Fecha de presentación: **29.10.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2222870**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2010**

54 Título: **Métodos, reactivos y kits para el ensayo de luciferasa**

30 Prioridad:
29.10.2007 US 983443 P
27.12.2007 EP 07150428

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.11.2012

73 Titular/es:
PERKINELMER HEALTH SCIENCES B.V. (100.0%)
RIGAWEG 22
9723 TH GRONINGEN, NL

72 Inventor/es:
VAN LUNE, HARRY

74 Agente/Representante:
DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 390 395 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).

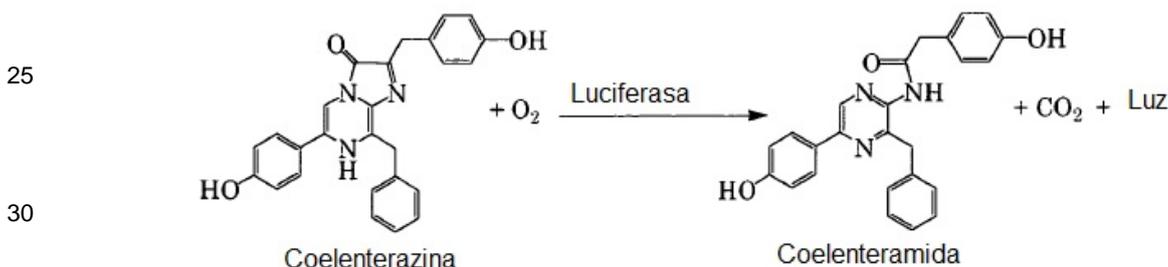
DESCRIPCIÓN

Métodos, reactivos y kits para el ensayo de luciferasa

5 La presente invención se refiere a métodos, reactivos y kits para detectar la actividad de enzimas utilizando bioluminiscencia. En particular, se refiere a un nuevo sistema de ensayo de luciferasa con una luminiscencia de base reducida para permitir un incremento de la sensibilidad de la detección.

10 Las luciferasas son enzimas utilizadas habitualmente como informadoras cuando se analizan sucesos moleculares en las células. Cuando se utilizan como informadoras, la cantidad de luciferasa en una célula puede ser indicativa de un suceso celular o afección particular. Por lo tanto, se han desarrollado muchos ensayos para medir la cantidad de luciferasa contenida en muestras biológicas. Estos ensayos implican habitualmente la evaluación de la cantidad de luciferasa presente en la muestra mediante la medición de la cantidad de actividad enzimática de luciferasa, y la actividad enzimática de luciferasa se refleja por la destrucción de sustrato enzimático de luciferasa o la creación de un producto de reacción correspondiente. Las luciferasas pueden reaccionar con un sustrato adecuado para producir luz como uno de los productos de reacción. La cantidad de luz de esta reacción luminiscente se puede medir y utilizar para determinar la presencia o la cantidad de luciferasa en una muestra.

20 Las luciferasas que utilizan coelenterazina como sustrato para producir luminiscencia incluyen *Renilla*, *Gaussia*, *Metridia* y *Obelia*. Estas luciferasas catalizan la oxidación de coelenterazina para producir coelenteramida, CO₂ y luz. Esta reacción se muestra a continuación:



35 Es conocido que la coelenterazina se puede oxidar y producir luz en ausencia de luciferasa. La luminiscencia producida de este modo se denomina autoluminiscencia. Esta autoluminiscencia crea una señal de base y, de este modo, reduce la sensibilidad de los ensayos de detección de la luciferasa. En particular, la autoluminiscencia de la coelenterazina reduce la capacidad de detectar pequeñas cantidades de luciferasa, tales como cuando la señal de autoluminiscencia es de magnitud similar a la señal luminiscente generada por la luciferasa.

40 La autoluminiscencia de la coelenterazina no deseada se puede incrementar mediante ciertos componentes de ensayo, que incluyen componentes de la muestra a analizar y componentes de ensayo deseados, tales como detergentes y proteínas. Por ejemplo, los detergentes no iónicos se utilizan a menudo como agentes de lisis celular para solubilizar la luciferasa y hacer que el sustrato sea accesible, mientras que las proteínas están habitualmente presentes en muestras a analizar (por ejemplo, células, medios de cultivo celular complementados con suero). De este modo, bajo muchas condiciones de ensayo deseadas, la autoluminiscencia de la coelenterazina puede reducir la sensibilidad de los ensayos de luciferasa.

50 Por lo tanto, la presente invención se dirige a reducir dicha autoluminiscencia de coelenterazina no deseada, incrementando de este modo la sensibilidad del ensayo de detección de la luciferasa y permitiendo la detección de cantidades inferiores de luciferasa. Tal como se describe en el presente documento, se han identificado las condiciones para reducir la autoluminiscencia de la coelenterazina y análogos de la misma. De manera específica, se ha observado que la adición de yoduro a una mezcla de reacción de luciferasa puede reducir de manera significativa la autoluminiscencia de la coelenterazina.

55 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método de detección de la actividad de la luciferasa en una muestra que comprende luciferasa utilizando coelenterazina o un análogo de la misma como sustrato, que comprende: (a) iniciar la producción de luminiscencia catalizada por luciferasa mediante el contacto de dicha muestra con un reactivo de detección de luciferasa para producir una mezcla de reacción, comprendiendo dicho reactivo coelenterazina y, como mínimo, una fuente de yoduro en una cantidad suficiente para generar de 0,02 a 100 mM de yoduro, (b) incubar dicha mezcla de reacción bajo condiciones adecuadas para producir luminiscencia y (c) medir la luminiscencia producida.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “fuente de yoduro” se refiere a cualquier compuesto capaz de proporcionar iones yoduro en una solución acuosa. Un ion yoduro es un átomo de yodo con una carga -1 . De este modo, los compuestos con yodo en estado de oxidación formal -1 se denominan yoduros. Entre éstos se incluyen compuestos iónicos, tales como sales de yoduro. En vista de la compatibilidad requerida con las condiciones de ensayo, naturalmente es preferente la utilización de una fuente de yoduro que sea soluble bajo condiciones acuosas. La mayoría de los yoduros iónicos son solubles, con la excepción del yoduro de plata amarillo y el yoduro de plomo amarillo. Una prueba química para un compuesto de yoduro es acidificar el compuesto acuoso mediante la adición de algunas gotas de ácido, para eliminar cualquier ion carbonato presente, a continuación la adición de nitrato de plomo, produciendo un precipitado amarillo brillante de yoduro de plomo. La fuente particular de yoduro será a elección del usuario y se puede seleccionar en base a factores, tales como la solubilidad, la toxicidad y la disponibilidad de sales de yoduro. Entre las fuentes de yoduro de ejemplo se incluyen sales de yoduro, tales como NaI, KI, LiI, NH₄I y similares, y en cualquier combinación entre sí. También para utilizar en la realización de la presente invención están los compuestos de yoduro que se disocian en cierto grado para producir yoduro libre en solución.

Tal como se ejemplifica en los siguientes ejemplos, la autoluminiscencia de la coelenterazina y sus análogos se reduce de manera significativa cuando una mezcla de reacción de luciferasa que comprende coelenterazina también comprende, como mínimo, una fuente de yoduro. Se observó que la capacidad del yoduro para reducir la autoluminiscencia de la coelenterazina y sus análogos era independiente del tipo de luciferasa analizado, de manera que este efecto se observó cuando se analizaron luciferasas *Renilla* y *Gaussia*. Además, el yoduro era eficaz para reducir la autoluminiscencia de nueve análogos diferentes de coelenterazina (ejemplo 6). Por lo tanto, en una realización, la coelenterazina utilizada, según la presente invención, se selecciona del grupo que comprende coelenterazina nativa y análogos de coelenterazina, tales como coelenterazina *cp*, coelenterazina *f*, coelenterazina *fcp*, coelenterazina *h*, coelenterazina *hcp*, coelenterazina *i*, coelenterazina *ip* y coelenterazina *n*. La coelenterazina o análogos de la misma se pueden utilizar en una concentración utilizada normalmente. En una realización, la coelenterazina o un análogo de la misma está presente en la mezcla de reacción en una concentración de 2-5 μ M, preferentemente en presencia de un agente quelante metálico, por ejemplo, una solución tampón de EDTA 1-10 mM que tiene un pH entre 7,2-8,0. Las mezclas de reacción de luciferasa que comprenden una fuente de yoduro son conocidas en la técnica. El documento WO96/4098 se refiere a agentes desactivadores y ensayos para la luminiscencia mediada por enzima. Da a conocer un método para reducir la “comunicación entrecruzada refractiva” (“refractive cross talk”) entre pocillos de muestras diferentes utilizando un reactivo desactivador que se añade a la mezcla de reacción después del inicio y la detección de la producción de luminiscencia catalizada por luciferasa. De este modo, se evita la comunicación entrecruzada no deseada de la muestra con los pocillos de muestras circundantes en que la reacción de la luciferasa no se ha iniciado aún. Se da a conocer un experimento en que se permite que la luciferasa *Renilla* reaccione con coelenterazina, después de lo cual se añade NaI como agente desactivador. De este modo, a diferencia de la presente invención en la que se inicia una reacción de la luciferasa mediante la combinación de la muestra y un sustrato en presencia de una fuente de yoduro, en el método de la técnica anterior el yoduro añadido a la muestra por separado del sustrato después de la medición de la luminiscencia producida. El yoduro está ausente durante la fase de inicio e incubación de la reacción de la luciferasa. En otro ejemplo, el documento WO96/4098 da a conocer el inicio de una reacción de la luciferasa utilizando un reactivo que comprende coelenterazina y una fuente de yoduro. Es una solución de sustrato de *Renilla* que comprende Na₄PPi 15 mM (pH 5,5) y bencil coelenterazina 2 μ M en combinación con una de las diversas concentraciones de los reactivos de análisis. Uno de los reactivos de análisis produjo una concentración de NaI en el ensayo de 0,4 M. Por consiguiente, no se da a conocer en la técnica un reactivo de detección que comprende coelenterazina y una fuente de yoduro en una cantidad suficiente para generar yoduro de 0,02 a 100 mM, pero no enzima luciferasa. Se obtienen buenos resultados en la reducción de la autoluminiscencia de coelenterazina, según el método de la presente invención, cuando el yoduro está presente en el reactivo de detección de la luciferasa o la mezcla de reacción final de luciferasa (por ejemplo, una muestra mezclada con reactivo de detección de luciferasa) en una concentración de yoduro de aproximadamente 0,02 mM a aproximadamente 100 mM. A continuación, se ejemplifica la eficacia de las concentraciones de yoduro de 0,25 mM (ejemplos 4 y 5); 0,5 mM (ejemplo 6); 2,5 mM (ejemplo 1); y 50 mM (ejemplos 2 y 3). De este modo, en una realización de la presente invención, el inicio de la reacción de la luciferasa con un reactivo de detección de luciferasa, que comprende coelenterazina (análogo) y, como mínimo, una fuente de yoduro, se realiza en presencia de yoduro de aproximadamente 0,02 mM a aproximadamente 100 mM, tal como de 1 a 100 mM o de 10 a 100 mM. En un aspecto específico, la mezcla de reacción de luciferasa contiene de 0,02 a 100 mM de una sal de yoduro, preferentemente KI.

De este modo, la presente invención da a conocer la utilización de un compuesto de yoduro como un componente nuevo e inventivo en un reactivo de detección de luciferasa. Habitualmente, un reactivo de detección no comprende una luciferasa, ya que la enzima se proporcionará (si está presente) en la muestra a analizar. Un ejemplo de reactivo de detección de luciferasa comprende coelenterazina o un análogo de la misma en combinación con una fuente de yoduro en una cantidad suficiente para generar yoduro de 0,02 a 100 mM, en el que dicho reactivo no comprende una luciferasa. En las condiciones de reacción de ejemplo dadas a conocer en el presente documento se dan a conocer otros componentes. En general, para detectar luciferasa en una muestra que contiene células, un reactivo

de detección de luciferasa incluye sustrato de luciferasa, tal como coelenterazina; un sistema tampón para mantener el pH (por ejemplo, tampones de Good, fosfato, tampones basados en Tris, y similares); un detergente no iónico (por ejemplo, Tergitol NP-9, Igepal CA-630, Thesit, Triton X100, y similares) para lisar las células y/o para inhibir la actividad de luciferasa (para incrementar la vida media de la luminiscencia). Entre los componentes útiles adicionales se pueden incluir, por ejemplo, un agente quelante de metales (por ejemplo, EDTA) para evitar la degradación de la luciferasa mediante la supresión de la actividad de proteasas dependientes de metales; y un agente reductor (por ejemplo, tiosulfato de sodio, TCEP, DTT y similares) para reducir la degradación de la coelenterazina en el reactivo de detección de la luciferasa. En un ejemplo, se incluyen un reactivo de detección de luciferasa que comprende coelenterazina o un análogo de la misma en combinación con una fuente de yoduro y que comprende además un sistema tampón, detergente no iónico, un agente quelante de metales y/o un agente reductor, en el que el reactivo no comprende una luciferasa.

Un aspecto adicional se refiere a un kit de ensayo para realizar un método de la presente invención. Dicho kit para detectar luciferasa en una muestra comprende un primer recipiente que comprende un reactivo de detección de luciferasa tal como se describe en el presente documento, un segundo recipiente que comprende otro componente útil para el ensayo, tal como un reactivo tampón o un patrón de luciferasa, y/o instrucciones para utilizar el kit. Cada reactivo puede tener su propio recipiente o varios reactivos se pueden mezclar previamente o se pueden envasar juntos en un recipiente. En una realización, la coelenterazina en el kit de ensayo se selecciona del grupo que comprende coelenterazina nativa y análogos de coelenterazina, que incluyen coelenterazina *cp*, coelenterazina *f*, coelenterazina *fcp*, coelenterazina *h*, coelenterazina *hcp*, coelenterazina *i*, coelenterazina *ip* y coelenterazina *n*.

Como es evidente a partir de lo anterior, se pueden utilizar varios tipos de compuestos de yoduro para reducir la autoluminiscencia de la coelenterazina. Un kit de ensayo de ejemplo comprende una sal de yoduro, preferentemente seleccionada del grupo que comprende NaI, KI, LiI, y NH₄I. Otros componentes útiles del kit son conocidos en la técnica. Mediante la utilización de yoduro en combinación con coelenterazina (análogo), este kit de ensayo produce resultados lineales fiables con una autoluminiscencia de base mínima y una sensibilidad superior.

También se da a conocer la utilización de una fuente de yoduro para reducir la autoluminiscencia de la coelenterazina o un análogo de la misma, para mejorar la sensibilidad de la detección en un sistema de ensayo de bioluminiscencia que utiliza coelenterazina o un análogo de la misma como sustrato. Dicho sistema de ensayo es preferentemente un sistema de ensayo para luciferasa. El efecto sorprendente del yoduro tal como se da a conocer en el presente documento se puede utilizar en cualquier situación *in vitro*, *in situ* y/o *in vivo* en que la coelenterazina o un análogo de la misma se utiliza como sustrato.

Leyendas de las figuras

Figura 1: La presencia de una fuente de yoduro (KI) en una mezcla de ensayo de luciferasa mejora la detección de la actividad de luciferasa *Renilla*. Se analizaron diferentes cantidades de luciferasa tal como se describe en el ejemplo 1.

Figure 2. El yoduro de potasio (KI) y el tiosulfato de sodio pentahidratado (Na₂S₂O₃) reducen la autoluminiscencia de la coelenterazina, permitiendo la detección de menos de 0,1 pg de luciferasa. Para más detalles, véase el ejemplo 2.

Figura 3: Se analizó la actividad de la luciferasa *Renilla* en presencia o ausencia de KI (véase el ejemplo 4).

Figura 4: Se analizaron los sobrenadantes de células CHO que expresan luciferasa *Gaussia* (positivo) o células CHO transfectadas con vector de control (negativo) en presencia (panel 4A) o ausencia (panel 4B) de una fuente de yoduro. Para más detalles, véase el ejemplos 5.

Figura 5: La adición de yoduro reduce la autoluminiscencia tanto de la coelenterazina como de los análogos de coelenterazina.

Sección experimental

Los ejemplos siguientes describen composiciones para el ensayo de luciferasa en las que aumentó la sensibilidad de la detección de la luciferasa mediante la reducción de la autoluminiscencia del sustrato de luciferasa, coelenterazina. Aunque se utilizó yoduro de potasio como fuente de yoduro en los siguientes ejemplos, cabe indicar que otras sales de yoduro producirán de manera sustancial el mismo resultado.

Ejemplo 1

Este ejemplo muestra que la presencia de una fuente de yoduro en una mezcla de reactivos de luciferasa mejora la detección de la actividad de la luciferasa *Renilla*.

Los componentes del reactivo de detección de luciferasa analizado utilizados para obtener una mezcla de reacción que contenía yoduro se muestran en la tabla 1 siguiente. Como control negativo se preparó un reactivo de detección de luciferasa de control correspondiente que carecía de una fuente de yoduro.

Tabla 1

Componente	Vendedor/nº de catálogo	Concentración en el reactivo de detección
HEPES	Sigma/H9136	25 mM
Tergitol NP-9	Sigma/NP-9	0,5 %
KI	Sigma/P8256	5 mM
Coelenterazina	Biosynth AG/C-7000	14 µM
pH ajustado a 7,0 con NaOH		

5 En general, se añadió la coelenterazina a partir de una solución madre de coelenterazina 1,4 mM en etanol acidificado. Esta solución madre se preparó de la siguiente manera: a 1 ml de etanol absoluto se añadieron 25 µl de HCl 2 M. Se añadió coelenterazina (3 mg) a esta solución y se disolvió. En lo sucesivo, la solución se complementó con 4 ml de etanol absoluto dando lugar a la solución madre de coelenterazina. Como muestra de luciferasa, se utilizó una luciferasa *Renilla* fusionada a GST de Chemicon (nº del catálogo: 4400). La luciferasa *Renilla* se disolvió en 1 ml de PBS de Dulbecco/BSA al 0,1% para preparar una solución madre a 7,3 µg/ml. Se añadieron 10 µl de esta solución madre a 10 ml de medio de cultivo celular (DMEM sin rojo fenol complementado con FBS al 10%, L-glutamina 2 mM y piruvato 1 mM, todos de Invitrogen) dando lugar a una concentración de luciferasa de 7,3 ng/ml. Esta solución de luciferasa se diluyó en serie (1 sobre 2) para preparar una serie de diluciones de luciferasa *Renilla* en un medio que variaban desde 7,3 ng/ml bajando hasta 110 pg/ml. Las diluciones en serie se añadieron a 100 µl por pocillo a un blanco de 96 placas de cultivo (PerkinElmer nº de catálogo: 6005680) por triplicado para cada solución de detección de luciferasa. A estos pocillos, se añadió el reactivo de detección de luciferasa o la solución de control a 100 µl por pocillo para iniciar la producción de luminiscencia. Las mezclas de reacción resultantes se incubaron consiguientemente para permitir la producción de luminiscencia catalizada por luciferasa. Después de agitar brevemente la placa para mezclar el contenido de los pocillos, la placa se cargó en un contador de centello y luminiscencia TopCount NXT (PerkinElmer) y se midió la luminiscencia después de 5 minutos de retraso en el recuento.

En la figura 1 se muestran los resultados de este experimento. Estos resultados demuestran que en presencia de KI 2,5 mM, se pueden detectar cantidades inferiores de luciferasa en las muestras, como resultado de la autoluminiscencia reducida de la coelenterazina.

Ejemplo 2

En esencia, se realizó el mismo experimento que en el ejemplo 1. Los componentes del reactivo de detección de luciferasa analizado se muestran en la tabla 2 siguiente.

Tabla 2

Componente	Vendedor/nº de catálogo	Concentración en el reactivo de detección
HEPES	Sigma/H9136	25 mM
Tergitol NP-9	Sigma/NP-9	0,5 %
KI	Sigma/P8256	100 mM
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O (tiosulfato de sodio pentahidratado)	Sigma/S8503	10 mM
Coelenterazina	Biosynth AG/C-7000	14 µM
pH ajustado a 7,0 con NaOH		

35 También se preparó un reactivo de detección de luciferasa de control correspondiente, que carecía tanto de yoduro como de tiosulfato de sodio pentahidratado.

En este experimento, se diluyó en serie la luciferasa *Renilla* (1 sobre 5) en medio de cultivo celular (DMEM sin rojo fenol complementado con FBS al 10%, L-Glutamina 2 mM y piruvato 1 mM, todos de Invitrogen).

Al igual que antes, el reactivo de detección de luciferasa o solución de control se añadió a 100 µl por pocillo para inicial la producción de luminiscencia. Las mezclas de reacción resultantes se incubaron consiguientemente para permitir la producción de luminiscencia catalizada por luciferasa. Después de agitar brevemente la placa para mezclar el contenido de los pocillos, la placa se cargó en un contador de centelleo y luminiscencia TopCount NXT (PerkinElmer) y se midió la luminiscencia después de 5 minutos de retraso en el recuento.

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 2. Estos resultados muestran una autoluminiscencia de coelenterazina significativamente reducida en presencia de KI 50 mM y tiosulfato de sodio pentahidratado 5 mM. Bajo estas condiciones, se puede detectar menos 0,1 pg por pocillo de luciferasa.

5 **Ejemplo 3**

En esencia, se realizó el mismo experimento que en el ejemplo 1. Los componentes del reactivo de detección de luciferasa analizado se muestran en la tabla 3 siguiente. También se preparó un reactivo de detección de luciferasa de control correspondiente sin yoduro.

10

Tabla 3

Componente	Vendedor/nº de catálogo	Concentración en el reactivo de detección
HEPES	Sigma/H9136	50 mM
Tergitol NP-9	Sigma/NP-9	0,5 %
EDTA	Sigma/ED2SS	5 mM
KI	Sigma/P8256	100 mM
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O (tiosulfato de sodio pentahidratado)	Sigma/S8503	10 mM
Coelenterazina	Biosynth AG/C-7000	21 µM
pH ajustado a 7,8 con NaOH		

15

Se utilizó en este experimento como muestra luciferasa *Renilla*, diluida en serie (1 sobre 5) en medio de cultivo celular (véase el ejemplo 2). Los resultados (figura 3) muestran una reducción significativa en la autoluminiscencia de coelenterazina en presencia de KI 50 mM. Bajo estas condiciones, se pueden detectar menos de 0,1 pg por pocillo de luciferasa.

20 **Ejemplo 4**

En este ejemplo se utiliza un reactivo para el ensayo de luciferasa para detectar luciferasa *Gaussia*. Los componentes del reactivo de detección de luciferasa analizado se muestran en la tabla 4 siguiente. Se prepararon dos reactivos de detección de luciferasa de control correspondientes: uno que carecía de yoduro y uno que carecía de yoduro de potasio y el agente reductor tiosulfato de sodio pentahidratado (Na₂S₂O₃·5H₂O).

25

Tabla 4

Componente	Vendedor/nº de catálogo	Concentración en el reactivo de detección
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Merck/1.06580	100 mM
Ácido cítrico · H ₂ O	Sigma/C1909	93 mM
Tergitol NP-9	Sigma/NP-9	0,5 %
KI	Sigma/P8256	0,5 mM
Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O (tiosulfato de sodio pentahidratado)	Sigma/S8503	1 mM
Coelenterazina	Biosynth AG/C-7000	7 µM
pH 5,15		

30

La coelenterazina se añadió de una solución madre 1,4 mM en etanol acidificado (véase el ejemplo 1).

Muestras de luciferasa *Gaussia* utilizadas:

Sobrenadantes (la luciferasa *Gaussia* se secreta de las células) de células CHO 24 horas después de la transfección (medio: MEM + rojo fenol complementado con L-Glutamina y FBS al 5%).

O Positivo: células CHO transfectadas con CMV-GLUC (6 µg de ADN)

35

O Negativo: células CHO transfectadas con GLUC básico (control negativo)

Estos sobrenadantes se diluyeron 100 veces en medio (MEM + rojo fenol/FBS al 5%) dando lugar a las muestras finales de luciferasa *Gaussia*. (MEM: Invitrogen nº de catálogo: 41090). Se añadieron las muestras positivas, de control negativo y el medio natural como blanco a 100 µl por pocillo a 96 placas de cultivo blancas. A estos pocillos se añadieron 3 soluciones diferentes de detección de luciferasa a 100 µl por pocillo para iniciar la producción de luminiscencia. Las mezclas de reacción resultantes se incubaron consiguientemente para permitir la producción de luminiscencia catalizada por luciferasa. Después de agitar brevemente la placa para mezclar el contenido de los

40

pocillos, la placa se cargó en un TopCount NXT y se midió la luminiscencia después de 15 minutos de retraso en el recuento.

Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 5.

5

Tabla 5

Solución de detección	Cuentas por segundo CPS [TopCount NXT]		
	Muestra positiva	Control negativo	Blanco (medio)
Con KI y Na ₂ S ₂ O ₃	510772	582	303
Sin KI con Na ₂ S ₂ O ₃	455958	3864	3609
Sin KI ni Na ₂ S ₂ O ₃	446965	4225	4141

10 Claramente, la presencia de una fuente de yoduro en la mezcla de reacción reduce de manera amplia la luminiscencia de base. Este efecto fue mucho más pronunciado que el efecto del agente reductor tiosulfato de sodio.

Ejemplo 5

15 En este ejemplo se utiliza un reactivo para el ensayo de luciferasa para detectar luciferasa *Gaussia*. Los componentes del reactivo de detección de luciferasa analizado se muestran en la tabla 6 siguiente. También se preparó un reactivo de detección de luciferasa de control correspondiente que carecía de yoduro.

Tabla 6

Componente	Vendedor/nº de catálogo	Concentración en el reactivo de detección
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Merck/1.06580	100 mM
Ácido cítrico · H ₂ O	Sigma/C1909	93 mM
Tergitol NP-9	Sigma/NP-9	0,5 %
KI	Sigma/P8256	0,5 mM
Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O	Sigma/S8503	1 mM
Coelenterazina	Biosynth AG/C-7000	21 µM
pH 5,15		

20 Las muestras de luciferasa *Gaussia* (positiva y negativa) se diluyeron en serie (1 sobre 5) en medio MEM/FBS al 5%. Estas diluciones se añadieron a los pocillos de una placa de cultivo blanca de 96 pocillos a 100 µl por pocillo. Posteriormente, se añadieron a estos pocillos 100 µl de los diferentes reactivos de detección de luciferasa para iniciar la producción de luminiscencia. Las mezclas de reacción resultantes se incubaron consiguientemente para permitir la producción de luminiscencia catalizada por luciferasa. Después de agitar brevemente la placa, ésta se cargó en un TopCount NXT y se midió la luminiscencia después de 15 minutos de retraso en el recuento.

25

Los resultados de las dos soluciones de detección diferentes se muestran en las figuras 4A y 4B. Demuestran la sensibilidad de detección mejorada en presencia de una fuente de yoduro.

30

Ejemplo 6

Este ejemplo muestra que la utilización de una fuente de yoduro también es útil para reducir la autoluminiscencia de los análogos de coelenterazina.

35

Se analizó el efecto del yoduro en la autoluminiscencia de nueve análogos diferentes de coelenterazina. Los componentes del reactivo de detección de luciferasa analizado se muestran en la tabla 7 siguiente. También se preparó un reactivo de detección de luciferasa de control correspondiente que carecía de una fuente de yoduro.

Tabla 7

Componente	Vendedor/nº de catálogo	Concentración en el reactivo de detección
HEPES	Sigma/H9136	50 mM
Tergitol NP-9	Sigma/NP-9	0,5 %
KI	Sigma/P8256	1 mM y 0 mM
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O (tiosulfato de sodio pentahidratado)	Sigma/S8503	1 mM
Análogos de coelenterazina	Biotium/10123	2,5 µg/ml
pH ajustado a 7,8 con NaOH		

Análogos de coelenterazina analizados:

5 coelenterazina nativa, coelenterazina *cp*, coelenterazina *f*, coelenterazina *fcp*, coelenterazina *h*, coelenterazina *hcp*, coelenterazina *i*, coelenterazina *ip* y coelenterazina *n*.

Los análogos de coelenterazina se disolvieron en etanol a 25 µg/50 µl. A 1 ml de solución de detección se añadieron 5 µl de las soluciones madre de coelenterazina dando lugar a una concentración de coelenterazina de 2,5 µg/ml de solución de detección.

10 Se analizaron las soluciones de detección (con y sin KI) con los 9 análogos diferentes de coelenterazina. A los pocillos de una placa de cultivo blanca de 96 pocillos, se añadieron 100 µl de PBS de Dulbecco (Invitrogen nº de catálogo 14040) complementado con BSA al 0,1% (Sigma A7030). Posteriormente, se añadieron a estos pocillos 100 µl de las soluciones de detección para iniciar la producción de luminiscencia. Las mezclas de reacción

15 resultantes se incubaron consiguientemente para permitir la producción de luminiscencia catalizada por luciferasa. A continuación, la placa se agitó brevemente para mezclar el contenido de los pocillos. A continuación, se cargó la placa en el TopCount NXT y se midió la luminiscencia después de 5 minutos de retraso en el recuento.

20 Los resultados ilustrados en la figura 5 muestran que la adición de yoduro reduce la autoluminiscencia de todos los análogos de coelenterazina analizados.

REIVINDICACIONES

1. Método de detección de la actividad de luciferasa en una muestra que comprende luciferasa utilizando coelenterazina o un análogo de la misma como sustrato, que comprende:
- 5 a) iniciar la producción de luminiscencia catalizada por luciferasa mediante el contacto de dicha muestra con un reactivo de detección de luciferasa para producir una mezcla de reacción, comprendiendo dicho reactivo coelenterazina y, como mínimo, una fuente de yoduro en una cantidad suficiente para generar yoduro de 0,02 a 100 mM,
- 10 b) incubar dicha mezcla de reacción bajo condiciones adecuadas para producir luminiscencia, y
c) medir la luminiscencia producida.
2. Método, según la reivindicación 1, en el que dicha, como mínimo, una fuente de yoduro es una sal de yoduro, preferentemente seleccionada del grupo que comprende NaI, KI, LiI y NH₄I, o cualquier combinación de las mismas.
- 15 3. Método, según la reivindicación 1 ó 2, en el que la coelenterazina se selecciona del grupo que comprende coelenterazina nativa, coelenterazina *cp*, coelenterazina *f*, coelenterazina *fcp*, coelenterazina *h*, coelenterazina *hcp*, coelenterazina *i*, coelenterazina *ip* y coelenterazina *n*.
- 20 4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la coelenterazina o un análogo de la misma está presente en la mezcla de reacción en una concentración de 2-5 μM, preferentemente en una solución tampón de EDTA 1-10 mM que tiene un pH entre 7,2-8,0.
- 25 5. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha mezcla de reacción comprende yoduro de 1 mM a 100 mM.
6. Kit de ensayo para detector luciferasa en una muestra que comprende un primer recipiente que comprende un reactivo de detección de luciferasa que comprende coelenterazina o un análogo de la misma en combinación con, como mínimo, una fuente de yoduro en una cantidad suficiente para generar de 0,02 a 100 mM de yoduro, en el que dicho reactivo no comprende una luciferasa, y un segundo recipiente que comprende otro componente útil para el ensayo, tal como un reactivo tampón o un patrón de luciferasa, y/o instrucciones para utilizar el kit.
- 30 7. Kit, según la reivindicación 6, en el que la coelenterazina se selecciona del grupo que comprende coelenterazina nativa, coelenterazina *cp*, coelenterazina *f*, coelenterazina *fcp*, coelenterazina *h*, coelenterazina *hcp*, coelenterazina *i*, coelenterazina *ip* y coelenterazina *n*.
- 35 8. Kit, según la reivindicación 6 ó 7, en el que dicha, como mínimo, una fuente de yoduro es una sal de yoduro, preferentemente seleccionada del grupo que comprende NaI, KI, LiI, y NH₄I.
- 40 9. Kit, según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que dicho reactivo de detección de luciferasa comprende, como mínimo, una fuente de yoduro en una cantidad de 1 a 100 mM.
- 45 10. Utilización de una fuente de yoduro para reducir la autoluminiscencia de la coelenterazina o un análogo de la misma para mejorar la sensibilidad de detección en un sistema de ensayo de bioluminiscencia que utiliza coelenterazina o un análogo de la misma como sustrato.
11. Utilización, según la reivindicación 10, en la que la fuente de yoduro es una sal de yoduro, preferentemente seleccionada del grupo que comprende NaI, KI, LiI, y NH₄I o cualquier combinación de las mismas.
- 50 12. Utilización, según la reivindicación 10 u 11, en la que la coelenterazina se selecciona del grupo que comprende coelenterazina nativa, coelenterazina *cp*, coelenterazina *f*, coelenterazina *fcp*, coelenterazina *h*, coelenterazina *hcp*, coelenterazina *i*, coelenterazina *ip* y coelenterazina *n*.
- 55 13. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que dicha fuente de yoduro se utiliza en una cantidad suficiente para generar yoduro de 0,02 a 500 mM.
14. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, para mejorar la sensibilidad de detección en un sistema de ensayo de luciferasa.
- 60 15. Utilización, según la reivindicación 14, en la que dicha luciferasa es luciferasa *Renilla*, *Gaussia*, *Metridia* u *Obelia*.

Figura 1

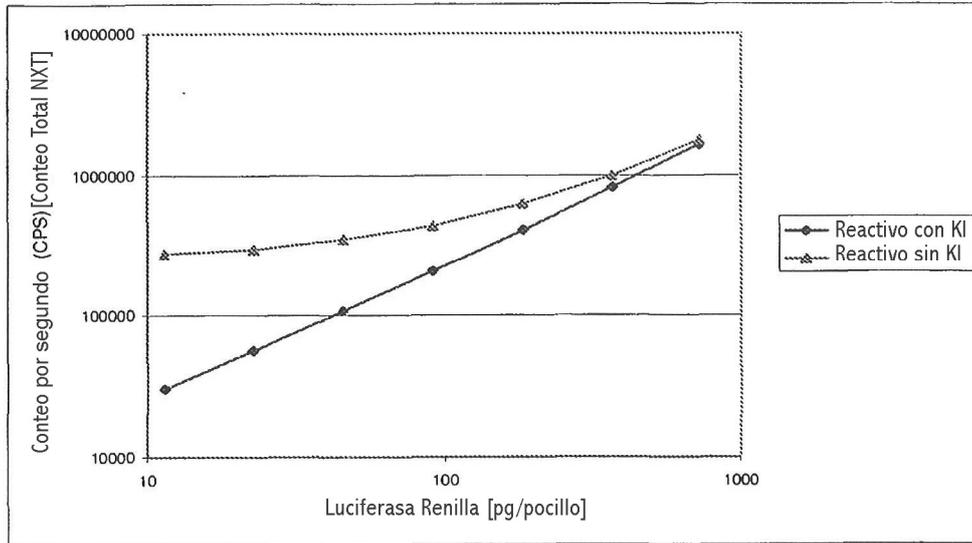


Figura 2

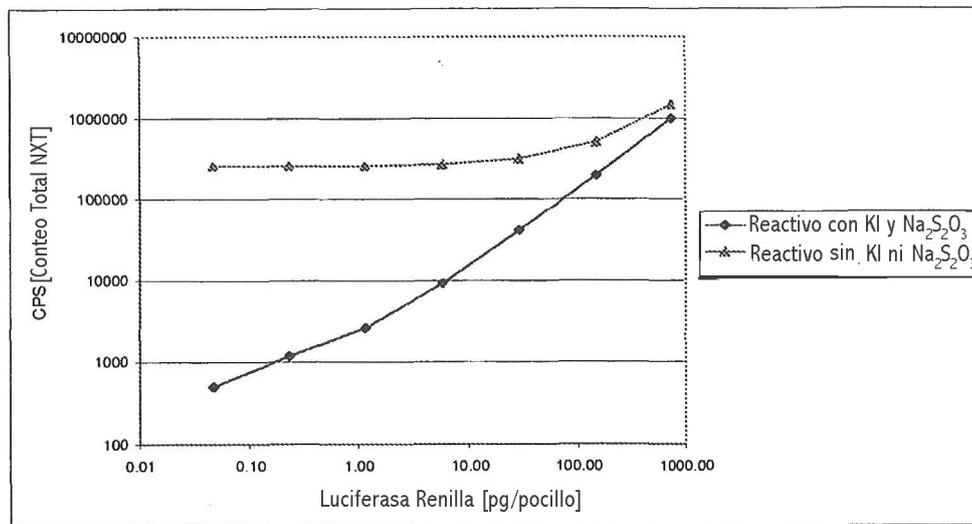


Figura 3

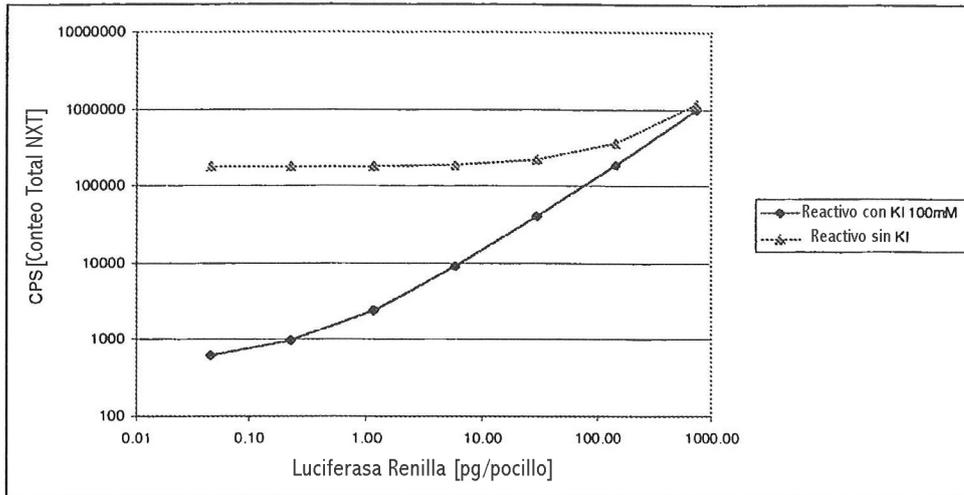


Figura 4A

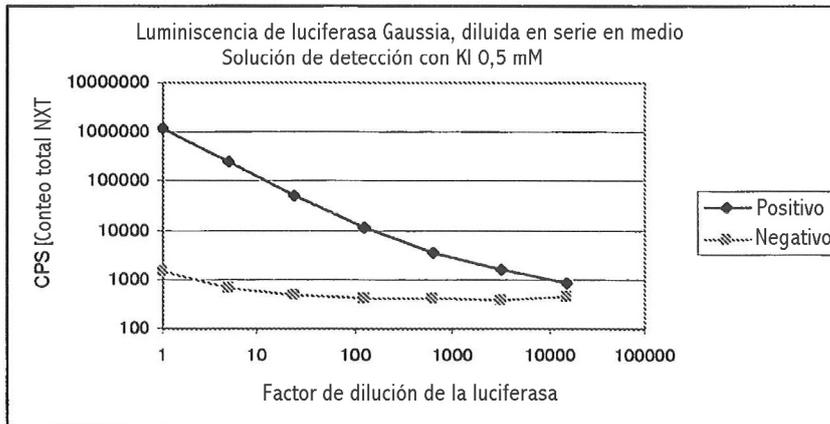


Figura 4B

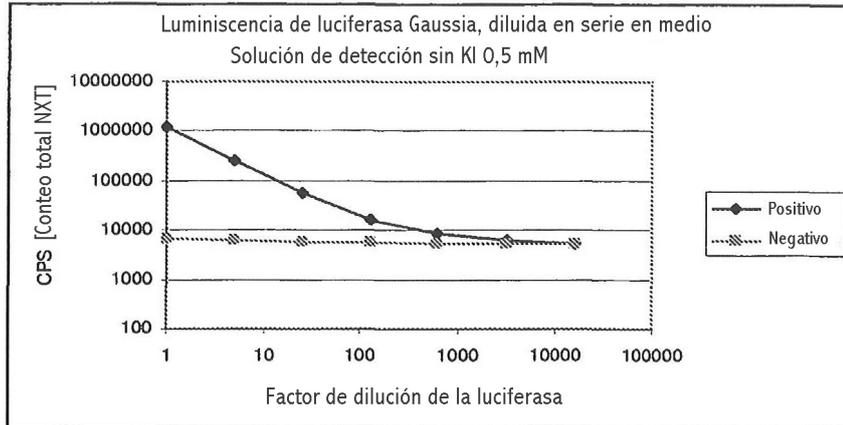


Figura 5

