

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 984**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2008 E 08006778 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 1978109**

54 Título: **RT-PCR rápida en una etapa**

30 Prioridad:

05.04.2007 EP 07007173

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.03.2013

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**ANKENBAUER, WALTRAUD;
GREPL, URSULA y
HAERTEIS, RITA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 398 984 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

RT-PCR rápida en una etapa

5 Antecedentes de la invención

10 La presente invención se refiere al campo del análisis de la expresión de ARNm mediante la realización de una reacción de transcriptasa inversa y posteriormente una reacción en cadena de la polimerasa, con el fin de cuantificar la cantidad de ADNc generada. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método mejorado para llevar a cabo una RT-PCR en una etapa, caracterizado porque el tiempo para la reacción de la transcriptasa inversa se ha minimizado.

Técnica anterior

15 El descubrimiento de las transcriptasas inversas en los años setenta refutó el "dogma central" de la biología molecular de la transferencia de información desde el ADN pasando por el ARN hasta las proteínas como un proceso unidireccional (Temin H. y Mizutani S., Nature 226:1211-1213, 1970; Baltimore D., Nature 226:1209-1211, 1970). La caracterización enzimática de estas ADN polimerasas dependientes de ARN es la base para la comprensión actual del ciclo de amplificación de los virus ARN y, de esta manera, también para el desarrollo y propagación de enfermedades causadas por este tipo de virus (cáncer, SIDA, etc.).

20 Sin embargo, las transcriptasas inversas también son una herramienta a disposición del biólogo molecular para la síntesis, amplificación y clonación del ADNc (RT-PCR). Esta tecnología permite un examen simplificado y acelerado de la expresión génica en las células eucarióticas. Tras aislar el ARNm total de extractos celulares o tejidos, el ARNm es traducido nuevamente en ADNc por la transcriptasa inversa y amplificado en una etapa posterior de PCR, permitiendo la clonación y la caracterización. En consecuencia no resulta necesario, por una parte, elucidar las estructuras de intrón y exón de los genes, aunque, por otra parte, además resulta posible examinar la expresión génica en la célula durante diversos ciclos vitales o durante el desarrollo de enfermedades (tales como el cáncer).

30 Hasta el momento se han examinado detenidamente las transcriptasas inversas (RT) de tres retrovirus diferentes: la RT del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV). Este enzima consiste de una única subunidad con un peso molecular de 78 kDa (Prasad V.R., 1993, revisado en Reverse Transcriptase, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 135). Además es conocida una RT del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Esta RT es un heterodímero compuesto de dos subunidades, p66 y p51; la subunidad p51 se forma por corte proteolítico de p66 (Le Grice S.F.J., 1993, revisado en Reverse Transcriptase, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 163). Además, se conocen las RT del virus del sarcoma-leucosis aviar (VSLA). La RT obtenible del virus de la mieloblastosis aviar (VMA) también pertenece a la familia del VSLA. Esta RT también es un heterodímero compuesto de una cadena α de un peso molecular de aproximadamente 63 kDa y una cadena β de un peso molecular de aproximadamente 95 kDa. En este caso, la cadena α también se forma mediante procesamiento proteolítico de la cadena β (Golomb M. y Grandgenett D.J., Biol. Chem. 254:1606-1613, 1979; Weiss R. *et al.*, Molecular Biology of tumor viruses, 2a edición: RNA tumor viruses 1/texto. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (editores, 1984)).

45 También existen ADN polimerasas termoestables que, además de su actividad de ADN polimerasa dependiente de ADN, se ha dado a conocer que comprenden una actividad de transcriptasa inversa dependiente de ARN. Estos enzimas resultan particularmente útiles para métodos de realización de una PCR en una etapa, caracterizados porque, después de una etapa de transcripción inversa, el ADNc generado se amplifica mediante PCR sin apertura intermedia del recipiente de reacción.

50 Una de las ADN polimerasas conocidas que presenta una actividad elevada de transcriptasa inversa es la obtenible de *Thermus thermophilus* (polimerasa Tth) (patente WO n° 91/09944 y patente US n° 5.561.058). La polimerasa Tth, así como la polimerasa Taq, no presentan actividad correctora exonucleolítica 3' a 5'. Esta actividad de exonucleasa 3' a 5' se considera generalmente que resulta deseable porque permite la eliminación de las bases mal incorporadas o desapareadas en las secuencias de ácidos nucleicos recién sintetizadas. Otra ADN polimerasa termofílica de tipo pol I aislada a partir de *Thermotoga maritima* (pol Tma) presenta actividad de exonucleasa 3' a 5'. La patente US n° 5.624.833 proporciona medios para aislar y producir polimerasa Tma. Sin embargo, ambas ADN polimerasas, la polimerasa Tth y la Tma, muestran actividad de transcriptasa inversa únicamente en la presencia de iones manganeso.

60 La ADN polimerasa de *Carboxydotherrnus hidrogenoformans* muestra actividad de transcripción inversa en presencia de iones magnesio y en ausencia sustancial de iones manganeso, y puede utilizarse para transcribir inversamente el ARN, con el fin de detectar y amplificar (en combinación con una ADN polimerasa termoestable como Taq), secuencias específicas de ARN. Mediante la utilización de la ADN polimerasa de *Carboxydotherrnus hidrogenoformans*, se observa una elevada especificidad de transcripción con tiempos de incubación cortos. Se

observa una especificidad elevada aplicando, por ejemplo, 5 minutos de incubación y 33 unidades de proteína ADN polimerasa. Con tiempos de incubación más largos, así como con cantidades más bajas de polimerasa de *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*, pueden obtenerse productos específicos. Sin embargo, se produce un abanico inespecífico de productos. Estos productos inespecíficos pueden estar causados por la actividad de

5 exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa, lo que permite que el enzima corte el molde en estructuras secundarias (actividad "ARNasaH") y genere cebadores adicionales que pueden ser alargados por la actividad de ADN polimerasa.

También se ha establecido en la técnica cómo proporcionar mezclas de enzimas transcriptasa inversa y ADN polimerasa termoestables con el fin de proporcionar una mezcla de reactivos que pueda utilizarse para llevar a cabo una amplificación por RT-PCR en 1 etapa (patente WO nº 94/08032). Estas mezclas ahora se encuentran disponibles comercialmente de una diversidad de proveedores y, de esta manera, son los utilizados más frecuentemente en la técnica (Qiagen nº de cat. 210210, 210212), (USB nº de cat. 78350), (Clontech nº de cat. K1403-1), (Invitrogen nº de cat. 11736-051 y 11736-059).

Sin embargo, todos los protocolos publicados y recomendados hasta el momento requieren un intervalo de tiempo sustancial para llevar a cabo la etapa de reacción de la transcriptasa inversa previamente al protocolo de termociclado por PCR. El intervalo de tiempo recomendado habitualmente es de entre 30 minutos y 1 hora (Qiagen, Clontech, USB). Se dan a conocer etapas de reacción de transcriptasa inversa de 5 minutos para la RT-PCR en 1

20 etapa utilizando la ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Myers T.W. y Gelfand D.H., Biochemistry 30:7661-7666, 1991). Se recomienda una etapa de reacción de la transcriptasa inversa de 3 minutos para la mezcla de enzimas Superscript/Platinum de Invitrogen (nº de cat. 11736-051 y 11736-059). Además, la patente US nº 5.561.058 da a conocer un intervalo de tiempo mínimo de 1 minuto como el tiempo mínimo requerido para llevar a cabo la reacción de la transcriptasa inversa previamente al termociclado por PCR.

De esta manera, todos los métodos dados a conocer anteriormente requieren una etapa de preincubación de larga duración a temperaturas más bajas, de manera que la etapa de reacción de transcriptasa inversa pueda tener lugar. Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un método mejorado de RT-PCR en una etapa.

30 Breve descripción de la invención

En vista de la técnica anterior citada anteriormente, resultó muy inesperado que la etapa de la transcriptasa inversa pudiese acortarse a intervalos de tiempo muy cortos o incluso omitirse por completo la preincubación. De esta manera, la presente invención se refiere a un método para llevar a cabo una RT-PCR en una etapa destinada a la amplificación de un ARN diana, comprendiendo las etapas siguientes:

a) obtener una muestra que supuestamente contiene dicho ARN diana,

40 b) añadir una mezcla de reacción que comprende todos los reactivos necesarios para transcribir inversamente dicho ARN diana en ADNc y amplificar por lo menos una parte de dicho ADNc,

c) incubar dicha muestra durante un intervalo de tiempo de entre 0 y 40 segundos a una temperatura de entre 20°C y 65°C,

45 d) someter dicha muestra a múltiples ciclos de un protocolo de termociclado, en el que la temperatura de dicha muestra se varía entre por lo menos una primera temperatura de entre 90°C y 100°C y una segunda temperatura de entre 50°C y 75°C.

Preferentemente, la etapa c) puede ser de tan sólo 20 segundos. Más preferentemente, la etapa c) puede ser de menos de 5 segundos. Todavía más preferentemente, la etapa c) puede ser de 0 segundos, es decir, la etapa c) puede omitirse por completo.

También preferentemente, la temperatura en la etapa c) es de entre 37°C y 65°C. Más preferentemente, dicha temperatura es de entre 37°C y 55°C.

55 En una realización, dicha reacción de RT-PCR en una etapa es catalizada por una polimerasa termoestable que comprende actividad de polimerasa dependiente de ADN y actividad de transcriptasa inversa. Por ejemplo, dicha polimerasa puede obtenerse del género de eubacterias *Thermus*. En una realización particular, dicha polimerasa puede obtenerse de *Thermus thermophilus*.

60 Alternativamente, dicha reacción de RT-PCR en una etapa es catalizada por una mezcla de por lo menos una polimerasa termoestable que comprende actividad de polimerasa dependiente de ADN y por lo menos una transcriptasa inversa.

La presente invención resulta particularmente adecuada para la amplificación de fragmentos de ADNc que presentan un tamaño de aproximadamente 0,2 kb o menos.

5 Un aspecto importante adicional de la presente invención es un método de realización de RT-PCR dado a conocer anteriormente que se caracteriza porque se realiza un seguimiento en tiempo real del progreso de dicha reacción de RT-PCR en una etapa.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención proporciona un método mejorado para llevar a cabo una reacción de RT-PCR en una etapa. La mejora se basa en el hecho inesperado de que la reacción de transcriptasa inversa de la RT-PCR en 1 etapa se completa tras un intervalo de tiempo muy corto de incubación libre a una temperatura apropiada, conjuntamente con el incremento de temperatura para la desnaturalización durante el primer ciclo del protocolo de termociclado por PCR. Más concretamente, la presente invención se refiere a un método para llevar a cabo una RT-PCR destinada a la amplificación de un ARN diana, comprendiendo las etapas siguientes:

a) obtener una muestra que supuestamente contiene dicho ARN diana,

20 b) añadir una mezcla de reacción que comprende todos los reactivos necesarios para transcribir inversamente dicho ARN diana en ADNc de cadena sencilla y amplificar por lo menos una parte de dicho ADNc de cadena sencilla,

25 c) incubar dicha muestra durante un intervalo de tiempo de entre 0 y 40 segundos a una temperatura de entre 20°C y 65°C,

d) someter dicha muestra a múltiples ciclos de un protocolo de termociclado, caracterizado porque la temperatura de dicha muestra se varía entre por lo menos una primera temperatura de entre 90°C y 100°C y una segunda temperatura de entre 50°C y 75°C.

30 Todos los reactivos que resultan necesarios para llevar a cabo una reacción de RT-PCR, tales como tampones, cebadores y desoxinucleótidos, son bien conocidos de la técnica. Además, pueden optimizarse las concentraciones utilizadas en el contexto de la presente invención mediante experimentos rutinarios.

35 La reacción de la transcriptasa inversa tiene lugar durante la etapa c) y durante el primer incremento de temperatura para la desnaturalización de la muestra en la etapa d). Los inventores han demostrado que el intervalo de tiempo de la etapa c) y su puesta en práctica puede ser incluso mucho más corta que 40 segundos. Preferentemente es de tan sólo 20 segundos, y más preferentemente es incluso de tan sólo 5 segundos o menos. En una realización específica, el intervalo de tiempo para la etapa c) es de 0 segundos, lo que significa que la etapa c) se omite por completo.

40 En otras palabras, la etapa c) de la presente invención también puede definirse como incubar "opcionalmente" dicha muestra durante un intervalo de tiempo de menos de 40 segundos, preferentemente de menos de 20 segundos y más preferentemente de menos de 5 segundos a una temperatura de entre 20°C y 65°C.

45 En el caso de que se lleve a cabo una etapa de incubación corta a una temperatura de entre 20°C y 65°C según la etapa c), dicha preincubación puede tener lugar en un dispositivo termostatzado o, alternativamente, ya en un instrumento termociclador que posteriormente se utiliza para llevar a cabo el protocolo de termociclado por PCR.

50 Debido al hecho de que la etapa c) puede omitirse por completo, debe concluirse que la reacción de la transcriptasa inversa o por lo menos una parte sustancial de dicha reacción, tiene lugar durante la etapa d). Tras introducir las muestras en el termociclador, las muestras se calientan hasta una primera temperatura de entre 90°C y 100°C. De esta manera, este periodo de transición de la temperatura resulta suficiente para finalizar la etapa de reacción de transcriptasa inversa. Este primer calentamiento, así como todos los calentamientos posteriores durante el protocolo de termociclado, pueden tener lugar a una tasa de 10°C por segundo. Preferentemente, la tasa de calentamiento para la primera etapa de calentamiento es de 5°C por segundo o menos.

De esta manera, la etapa d) de la presente invención también puede definirse como comprendiendo las etapas de:

60 - incrementar la temperatura de la muestra hasta una temperatura de entre 90°C y 100°C a una tasa de transición térmica de 10°C por segundo o menos (preferentemente de 5°C por segundo o menos),

- reducir la temperatura de dicha muestra hasta una segunda temperatura de entre 50°C y 75°C.

Será bien entendido por el experto en la materia que pueden ponerse en práctica diversos protocolos de

5 termociclado. En particular, un experto en la materia podrá optimizar los intervalos de tiempo para mantener la temperatura de desnaturalización entre 90°C y 100°C y la segunda temperatura entre 50°C y 75°C. Además, en muchos casos puede seleccionarse un ciclo de mantenimiento con tres temperaturas: con una temperatura de desnaturalización, una primera temperatura de hibridación de entre 50°C y 60°C y una temperatura de extensión de entre 70°C y 75°C. El método según la presente invención es aplicable a la totalidad de dichos diferentes protocolos de termociclado, con la condición de que el protocolo de termociclado se inicie con una desnaturalización caracterizada porque la temperatura en primer lugar se incrementa hasta una temperatura de entre 90°C y 100°C a una tasa de transición de 10°C por segundo o menos.

10 En general, existen dos posibilidades diferentes para seleccionar el sistema enzimático apropiado para llevar a cabo el método según la presente invención. En una primera alternativa, el enzima es una ADN polimerasa termoestable que comprende tanto una actividad de ADN polimerasa dependiente de molde de ADN para llevar a cabo la parte de PCR de la reacción, y una actividad de ADN polimerasa dependiente de molde de ARN para llevar a cabo una parte de transcriptasa inversa de la reacción de RT-PCR en una etapa. Se conoce una diversidad de enzimas en la
 15 técnica. Por ejemplo, la ADN polimerasa de *Carboxydothermus hydrogenoformans* es capaz de llevar a cabo una PCR en una etapa (Roche Applied Science, nº de catálogo 12016338001). Preferentemente, las polimerasas utilizadas son polimerasas obtenibles de organismos pertenecientes al género de eubacterias *Thermus*. En una realización preferente, se utiliza la ADN polimerasa de la especie *Thermus* Z05 (patente US nº 5.674.738). En otra realización altamente preferente, para un método de RT-PCR en una etapa según la presente invención se utiliza la
 20 ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Roche Applied Science nº de catálogo 11480014001).

Alternativamente, el método de RT-PCR en una etapa según la presente invención se lleva a cabo utilizando una mezcla de enzimas que comprende por lo menos dos polimerasas dependientes de ADN. Una polimerasa es una
 25 ADN polimerasa termoestable dependiente de molde de ADN capaz de llevar a cabo una reacción de PCR. El segundo enzima es una ADN polimerasa dependiente de molde de ARN capaz de llevar a cabo la etapa de transcriptasa inversa de la reacción de RT-PCR en una etapa. Dicha transcriptasa inversa según la presente invención no es necesario que sea termoestable. Por ejemplo, dicha mezcla puede estar compuesta de polimerasa de *Thermus aquaticus* y transcriptasa inversa del VMA (Roche Applied Science nº de catálogo 11888382001).

30 En aquellos casos en los que se lleve a cabo una etapa de preincubación c) para el inicio de la reacción de transcriptasa inversa, la temperatura para dicha preincubación es de entre 20°C y 65°C. Preferentemente, la temperatura es de entre 37°C y 65°C, preferentemente de entre 37°C y 55°C. La selección de la temperatura predominantemente depende de dos parámetros: la elección de enzima o enzimas y la tendencia del ARN diana a formar estructuras secundarias. En el caso de que dicha tendencia sea muy elevada, resultan preferentes
 35 temperaturas más altas. En el caso de que se utilicen polimerasas termoestables dependientes de molde de ADN que comprendan una actividad de transcriptasa inversa, pueden seleccionarse temperaturas más altas, de entre 50°C y 65°C. Sin embargo, en el caso de que se utilicen mezclas de enzimas que comprendan una transcriptasa inversa no termoestable, se utilizan temperaturas más bajas, de entre 37°C y 55°C.

40 En una realización particular específica de la invención, una RT-PCR para amplificar un ARN diana comprende las etapas siguientes:

- a) obtener una muestra que supuestamente contiene el ARN diana,
- 45 b) añadir una mezcla de reacción que comprende todos los reactivos necesarios para transcribir inversamente dicho ARN diana en ADNc y amplificar por lo menos una parte de dicho ADNc, comprendiendo dicha mezcla de reacción ADN polimerasa de *Thermus thermophilus*,
- 50 c) incubar dicha muestra durante un intervalo de tiempo de 5 segundos o menos a una temperatura de entre 37°C y 65°C,
- d) someter dicha muestra múltiples ciclos de un protocolo de termociclado, en el que la temperatura de dicho ciclo se varía entre por lo menos una primera temperatura de entre 90°C y 100°C y una segunda temperatura de entre 50°C y 75°C.

55 El método según la presente invención puede utilizarse para una diversidad de diferentes aplicaciones cualitativas y cuantitativas. En principio, cualquier tipo de ARN puede ser transcrito y amplificado. Resulta más importante que el método según la presente invención es aplicable a la amplificación y detección de los ARNm de un modo cualitativo y cuantitativo. De esta manera, la presente invención también es aplicable al seguimiento de la expresión génica.

60 Para la síntesis del ADNc de primera cadena, se utilizan cebadores con una secuencia antisentido. Estos cebadores son cebadores específicos, cebadores oligo-dT que se unen a la cola poliA de un ARNm o cebadores aleatorios, tales como cebadores hexámeros aleatorios. Para la PCR posterior, se utiliza un cebador específico de secuencia en orientación de sentido, a modo de cebador directo. El cebador inverso es un cebador específico que puede ser

idéntico al cebador específico utilizado en la reacción de síntesis del ADNc de primera cadena. Alternativamente, se utiliza el cebador inverso, el cual se hibrida con una secuencia situada cadena arriba del sitio de unión del cebador que se ha utilizado para la reacción de la transcriptasa inversa.

5 La presente invención es aplicable a la realización de RT-PCR en una etapa de secuencias de prácticamente cualquier tamaño de amplicón hasta 5 kb. Para las reacciones de RT-PCR en una etapa con un tamaño de producto pequeño, de aproximadamente 0,2 kb o inferior, no resulta necesaria ninguna etapa de incubación c). Para las reacciones de RT-PCR en una etapa utilizadas para amplificar secuencias de más de 0,3 kb pero menos de 1 kb, se ha demostrado que resulta suficiente una etapa de incubación c) de aproximadamente 20 segundos. Para dianas amplificadas de más de 1 kb, resulta ventajoso un tiempo de incubación de entre más de 35 segundos y 42 segundos.

15 Un aspecto importante adicional de la presente invención es un método de realización de RT-PCR tal como se ha dado a conocer anteriormente que se caracteriza porque se realiza un seguimiento en tiempo real del progreso de dicha reacción de RT-PCR en una etapa. Se conocen de la técnica diferentes formatos de detección. Los formatos de detección indicados posteriormente se ha demostrado que resultan útiles para una RT-PCR en 1 etapa y, de esta manera, proporcionan una posibilidad fácil y sencilla para el análisis de la expresión génica:

20 a) Formato de sonda de hidrólisis TaqMan:

Se marca con dos componentes una sonda de hibridación de cadena sencilla. Cuando el primer componente resulta excitado por luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere al segundo componente, el denominado inhibidor, según el principio de transferencia resonante de energía fluorescente. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación se une al ADN diana y resulta degradada por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa Taq durante la etapa de elongación posterior. Como resultado, el componente fluorescente excitado y el inhibidor se encuentran separados espacialmente y, de esta manera, puede medirse una emisión fluorescente del primer componente. Los ensayos de sondas TaqMan se dan a conocer en detalle en las patentes US nº 5.210.015, nº 5.538.848 y nº 5.487.972. Las sondas de hibridación TaqMan y mezclas de reactivos se dan a conocer en la patente US nº 5.804.375.

30 caso de un apareamiento no perfecto entre el cebador y la diana de amplificación.

b) Balizas moleculares:

35 Estas sondas de hibridación también se marcan con un primer componente y con un inhibidor, estando los marcajes preferentemente situados en ambos extremos de la sonda. Como resultado de la estructura secundaria de la sonda, ambos componentes son contiguos en solución. Tras la hibridación con los ácidos nucleicos diana, ambos componentes se separan de manera que tras la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, puede medirse la emisión fluorescente del primer componente (patente US nº 5.118.801).

40 c) Sondas de hibridación FRET:

El formato de ensayo de sonda de hibridación FRET resulta especialmente útil para todo tipo de ensayos de hibridación homogénea (Matthews J.A. y Kricka L.J., *Analytical Biochemistry* 169:1-25, 1988). Se caracteriza por dos sondas de hibridación de cadena sencilla que se utilizan simultáneamente y que son complementarias a sitios contiguos de la misma cadena del ácido nucleico diana amplificado. Ambas sondas se marcan con diferentes componentes fluorescentes. Al excitarse con luz de una longitud de onda adecuada, un primer componente transfiere la energía absorbida al segundo componente según el principio de transferencia resonante de energía fluorescente, de manera que puede medirse una emisión fluorescente del segundo componente al unirse ambas sondas de hibridación a posiciones contiguas de la molécula diana que debe detectarse. Alternativamente al seguimiento del incremento de fluorescencia del componente aceptor de FRET, también resulta posible realizar un seguimiento de la reducción de la fluorescencia del componente donante de FRET a modo de medición cuantitativa del suceso de hibridación.

55 En particular, el formato de sonda de hibridación FRET puede utilizarse en la PCR en tiempo real con el fin de detectar el ADN diana amplificado. Entre todos los formatos de detección conocidos de la técnica de PCR en tiempo real, el formato de sonda de hibridación-FRET ha demostrado ser altamente sensible, preciso y fiable (patentes WO nº 97/46707, nº 97/46712 y nº 97/46714). A modo de alternativa al uso de dos sondas de hibridación de FRET, también resulta posible utilizar un cebador marcado fluorescentemente y únicamente una sonda oligonucleotídica marcada (Bernard P.S. *et al.*, *Analytical Biochemistry* 255:101-107, 1998). A este respecto, puede seleccionarse arbitrariamente si el cebador se marca con el donador de FRET o con el compuesto aceptor de FRET.

60

d) Formato SybrGreen:

También se encuentra comprendido dentro del alcance de la invención que la PCR en tiempo real se lleve a cabo en presencia de un aditivo según la invención en el caso de que el producto de amplificación se detecte utilizando una fracción de unión a ácido nucleico de doble cadena. Por ejemplo, el producto de amplificación respectivo también puede detectarse según la invención con un pigmento de unión a ADN fluorescente que emita una señal fluorescente correspondiente, al interactuar con el ácido nucleico de doble cadena tras la excitación con luz de una longitud de onda adecuada. Los pigmentos SybrGreenI y SybrGold (Molecular Probes) han demostrado ser particularmente adecuados para esta aplicación. Alternativamente pueden utilizarse pigmentos intercalantes. Sin embargo, para el presente formato, con el fin de discriminar los diferentes productos de amplificación, resulta necesario llevar a cabo un análisis apropiado de las curvas de fusión (patente US nº 6.174.670).

Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse por ello del espíritu de la invención.

Breve descripción de las figuras

Figs. 1-8:

RT-PCR en tiempo real para amplificar ARN ABCC2 utilizando diversos tiempos y temperaturas para la preincubación previamente al protocolo de termociclado. Las dos curvas a la izquierda en cada figura en todos los casos corresponden a una muestra de 100 pg de ARNm. Las dos curvas a la derecha en cada figura en todos los casos corresponden a una muestra de 10 pg de ARNm.

- Figura 1 Preincubación de transcripción inversa durante 20 minutos a 25°C
- Figura 2 Preincubación de transcripción inversa durante 10 minutos a 25°C
- Figura 3 Preincubación de transcripción inversa durante 5 minutos a 25°C
- Figura 4 Transcripción inversa sin preincubación
- Figura 5 Amplificación de ARN sin preincubación
- Figura 6 Preincubación de transcripción inversa durante 3 segundos a 63°C
- Figura 7 Preincubación de transcripción inversa durante 10 segundos a 63°C
- Figura 8 Transcripción inversa durante 3 minutos a 63°C

Ejemplo 1

Para una reacción de RT-PCR en una etapa en tiempo real, se seleccionó ARN ABCC2 (número de acceso de GenBank U63970) como diana de amplificación. La secuencia del cebador directo se encuentra situada entre las posiciones 2728 y 2748; la secuencia del cebador inverso se encuentra situada entre las posiciones 2.788 y 2.807. La detección se llevó a cabo según el principio de la sonda de hidrólisis TaqMan (patente US nº 5.804.375). La sonda se marcó con FAM en el extremo 5' y TAMRA en el extremo 3' se derivó de las posiciones 2750-2780 del ARN ABCC2 (Langmann T. *et al.*, Clinical Chemistry 49:230-238, 2003).

Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo utilizando las sondas de hidrólisis LightCycler 480 RNA Master de Roche Applied Science (nº de catálogo 04991885001) en volúmenes de reacción de 20 µl. Esta mezcla Mastermix contiene ADN polimerasa de *Thermus thermophilus*.

La PCR se constituyó de la manera siguiente:

- 100 pg ó 10 pg de ARN total procedente de células hepáticas humanas,
- 7,4 µl de RNA Master,
- 3,25 mM de acetato de manganeso,
- 0,5 mM de cada cebador,
- 0,25 mM de sonda de hidrólisis.

Se llevó a cabo la transcripción inversa a 25°C durante 0 minutos, 5 minutos, 10 minutos y 20 minutos en un Lightcycler 480 (Roche Applied Science, nº de catálogo 04 640268001). La PCR se llevó a cabo con una desnaturalización inicial durante 30 segundos a 95°C y 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos. Todas las tasas de calentamiento fueron de 4,8°C/s, mientras que todas las tasas de enfriamiento fueron de 2,5°C/s. Se realizó un seguimiento de la amplificación en tiempo real. Se muestran los resultados en las figs. 1-4, así como en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1: Puntos de cruce de los productos de RT-PCR generados con los tiempos de preincubación y las temperaturas de preincubación que se indican en las columnas.

Concentración de ARN	25°C / 20 min	25°C / 10 min	25°C / 5 min	25°C / 0 min
100 pg	32,5	31,7	32,3	32,0
100 pg	32,3	31,9	32,2	31,6
10 pg	35,0	34,5	34,9	34,7
10 pg	34,9	35,1	35,5	34,9

5 Los puntos de cruce indican el número de ciclo en el que la señalización fluorescente excede un determinado nivel umbral. De esta manera, los puntos de cruce en el presente experimento son una medida de la sensibilidad de la reacción de RT-PCR bajo las diferentes condiciones dadas a conocer. Puede observarse a partir de la tabla que se obtuvieron puntos de cruce similares o prácticamente idénticos para la RT-PCR de cantidades idénticas de ARN diana, con independencia del intervalo de tiempo de preincubación a 25°C. De esta manera, no resulta necesaria una etapa de preincubación para llevar a cabo la reacción de la transcriptasa inversa.

Ejemplo 2

15 El experimento completo se llevó a cabo según el Ejemplo 1, con la excepción de que se llevó a cabo una etapa de preincubación a 63°C durante 0 segundos, 3 segundos, 10 segundos ó 3 minutos. Se muestran los resultados en las figs. 5-8, así como en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2: Puntos de cruce de los productos de RT-PCR generados con los tiempos de preincubación y las temperaturas de preincubación que se indican en las columnas.

Concentración de ARN	Directamente en la PCR	63°C / 3 s	63°C / 10 s	63°C / 3 min
100 pg	32,5	32,5	32,2	31,2
100 pg	32,6	32,7	32,3	31,3
10 pg	35,7	35,6	35,7	34,7
10 pg	35,9	35,7	35,0	34,7

20 Puede observarse a partir de la tabla que se obtuvieron puntos de cruce similares o prácticamente idénticos para la RT-PCR de cantidades idénticas de ARN diana, con independencia del intervalo de tiempo de preincubación a 63°C. De esta manera, una etapa de preincubación no resulta en un mejor rendimiento del protocolo de RT-PCR.

Ejemplo 3

30 El experimento completo se llevó a cabo según el Ejemplo 1, con las excepciones de que: (i) se utilizó una mezcla de 0,6 U de transcriptasa inversa de VMA y 0,4 U de ADN polimerasa Taq en cada reacción en lugar de polimerasa Tth, e (ii) la etapa de preincubación se llevó a cabo a 55°C durante 30 segundos, 50 segundos ó 10 minutos. Se muestran los resultados en la Tabla 3, a continuación.

Tabla 3: Puntos de cruce de los productos de RT-PCR generados con los tiempos de preincubación y las temperaturas de preincubación que se indican en las columnas.

Concentración de ARN	55°C / 30 s	55°C / 50 s	55°C / 10 min
1 ng	32,3	31,6	32,0
1 ng	32,3	31,7	31,9
100 pg	35,1	34,8	33,8
100 pg	34,8	34,2	34,2
10 pg	36,7	36,1	35,8
10 pg	36,2	36,1	-

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para llevar a cabo una RT-PCR en una etapa para la amplificación de un ARN diana, que comprende las etapas de:
- a) obtener una muestra que supuestamente contiene dicho ARN diana,
 - b) añadir una mezcla de reacción que comprende todos los reactivos necesarios para transcribir inversamente dicho ARN diana en ADNc y amplificar por lo menos una parte de dicho ADNc,
 - 10 c) incubar dicha muestra durante un intervalo de tiempo de entre 0 y 40 segundos a una temperatura de entre 20°C y 65°C,
 - d) someter dicha muestra a múltiples ciclos de un protocolo de termociclado, en el que la temperatura de dicha muestra se varía entre por lo menos una primera temperatura de entre 90°C y 100°C y una segunda temperatura de entre 50°C y 75°C.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho intervalo de tiempo de la etapa c) es de menos de 20 segundos.
3. Método según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho intervalo de tiempo es de 0 segundos.
- 20 4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la temperatura en la etapa c) es de entre 37°C y 55°C.
5. Método según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dicha reacción de RT-PCR en una etapa es catalizada por una polimerasa termoestable que comprende actividad de polimerasa dependiente de ADN y actividad de transcriptasa inversa.
- 25 6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque dicha polimerasa puede obtenerse de *Thermus thermophilus*.
- 30 7. Método según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dicha reacción de RT-PCR en una etapa es catalizada por una mezcla de por lo menos una polimerasa termoestable que comprende actividad de polimerasa dependiente de ADN y por lo menos una transcriptasa inversa.
- 35 8. Método según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque dicha porción de dicho ADNc es menor de 0,2 kb.
9. Método según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque se realiza un seguimiento en tiempo real del progreso de dicha reacción de RT-PCR en una etapa.
- 40

Fig. 1

Transcripción inversa durante 20 minutos a 25°C

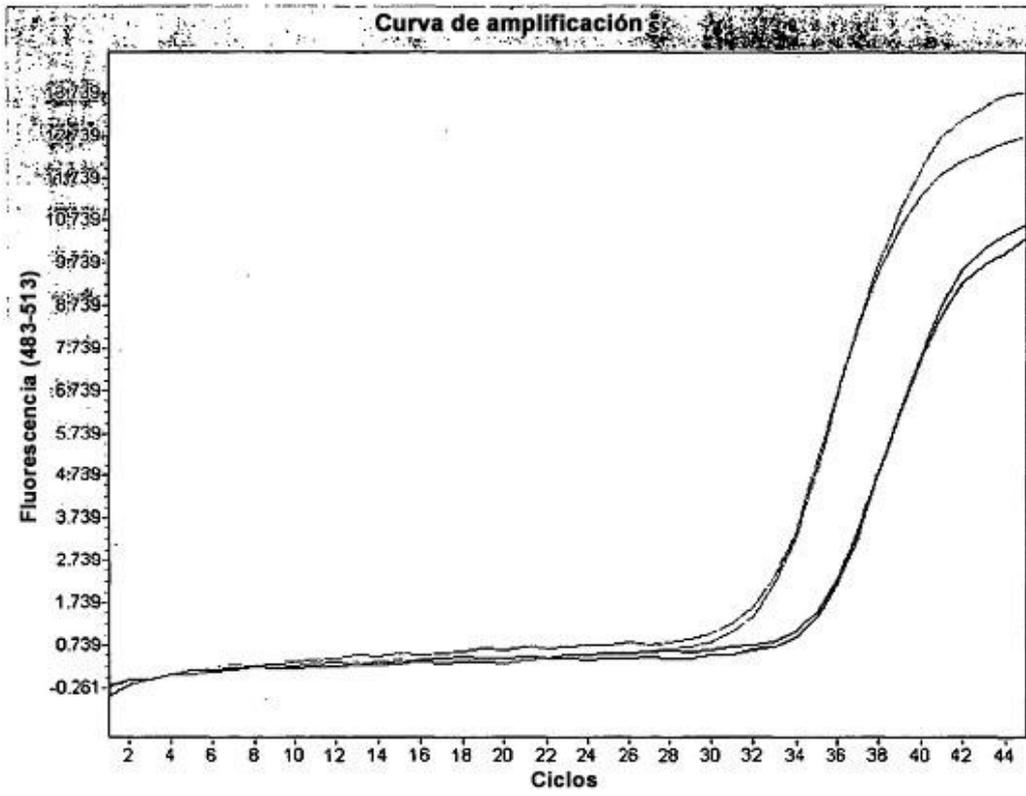


Fig. 2

Transcripción inversa durante 10 minutos a 25°C

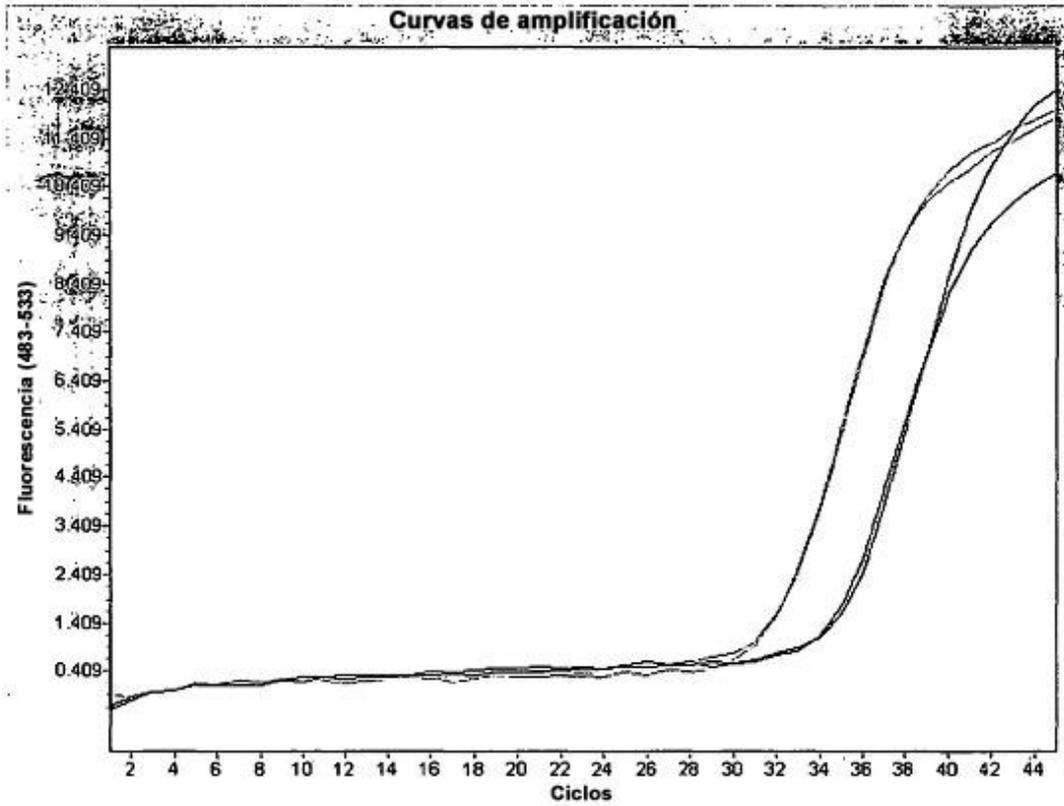


Fig. 3

Transcripción inversa durante 5 minutos a 25°C

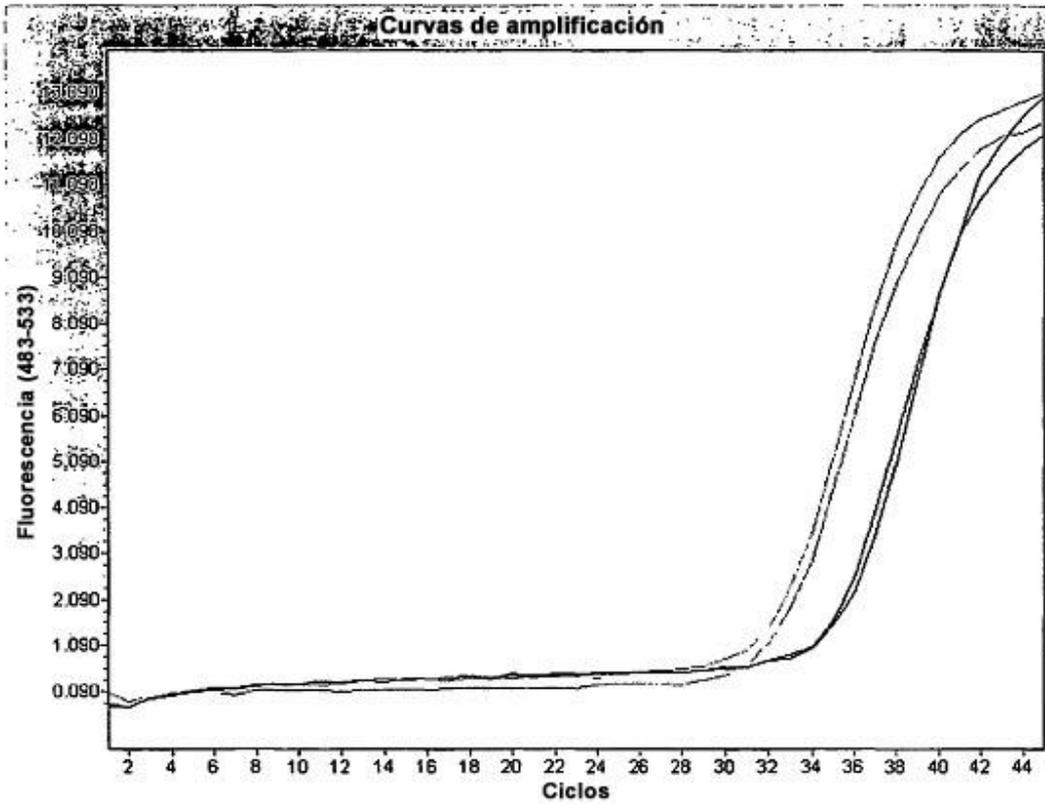


Fig. 4

Transcripción inversa durante 0 minutos a 25°C

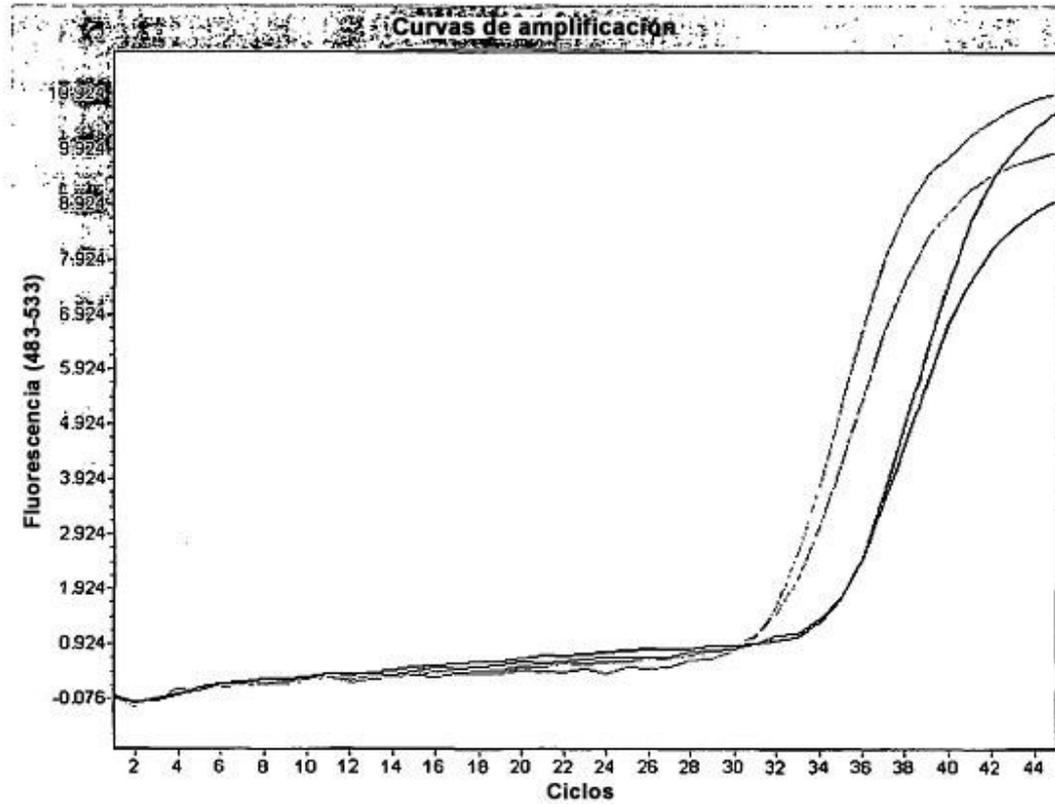


Fig. 5

Amplificación de ARN sin incubación para permitir la transcripción inversa

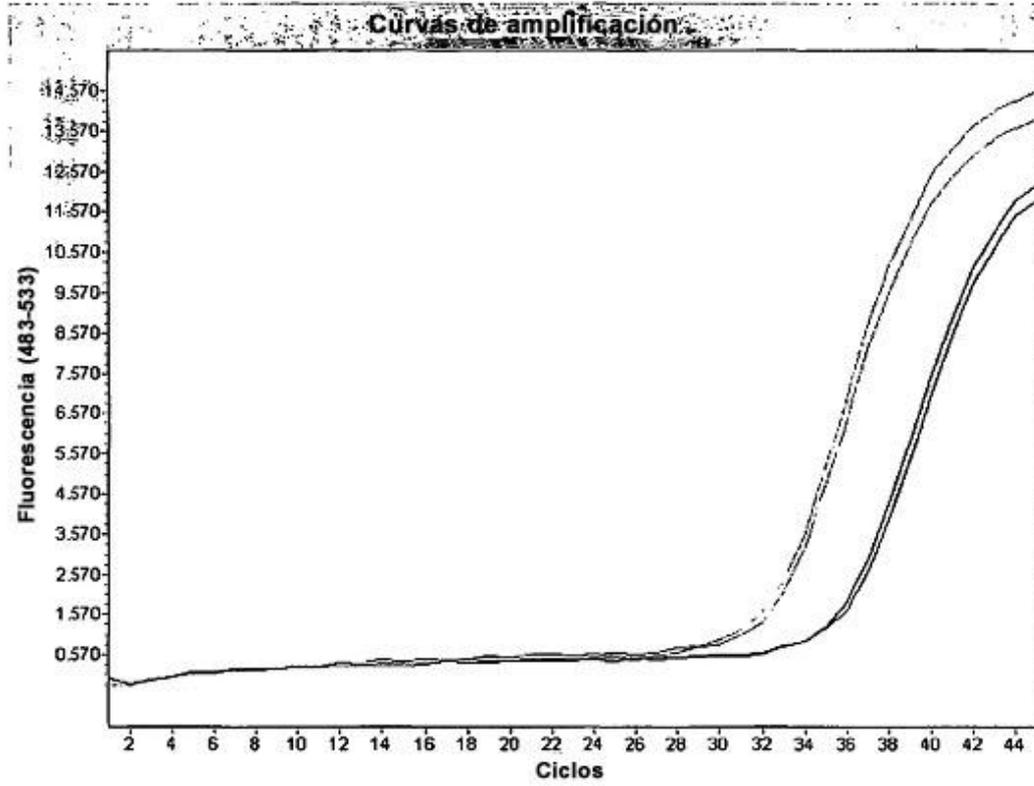


Fig. 6

Transcripción inversa a 63°C durante 3 segundos.

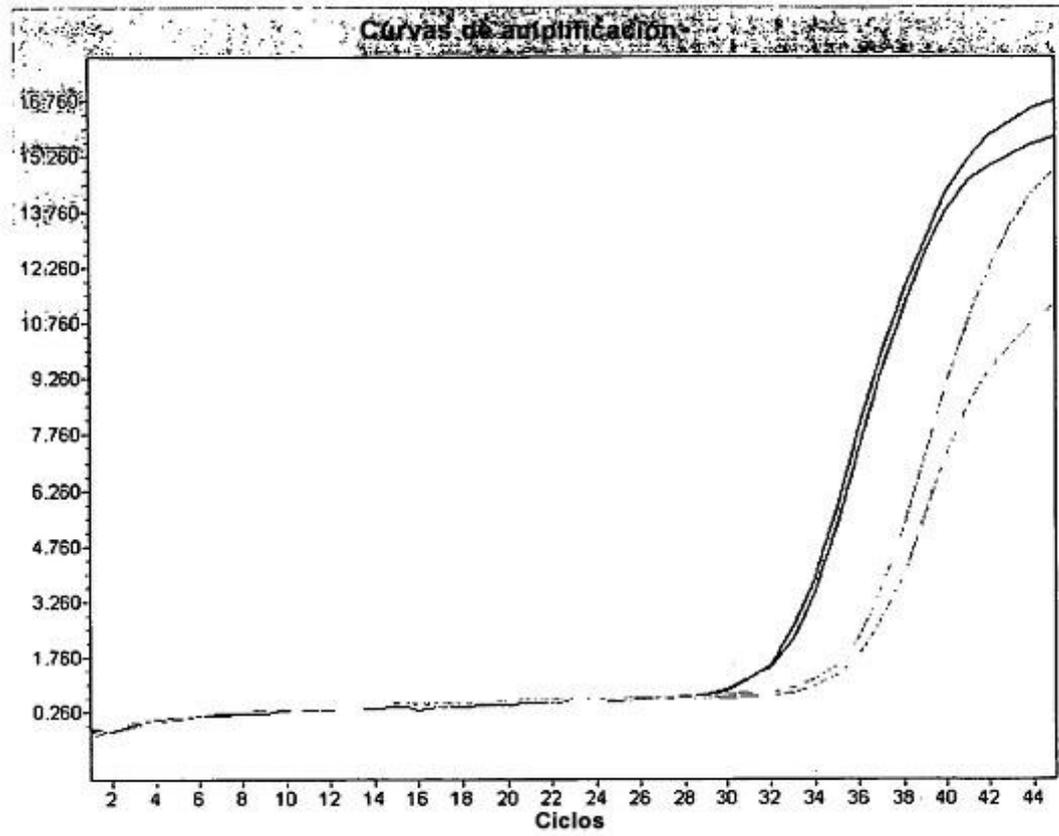


Fig. 7

Transcripción inversa durante 10 segundos a 63°C

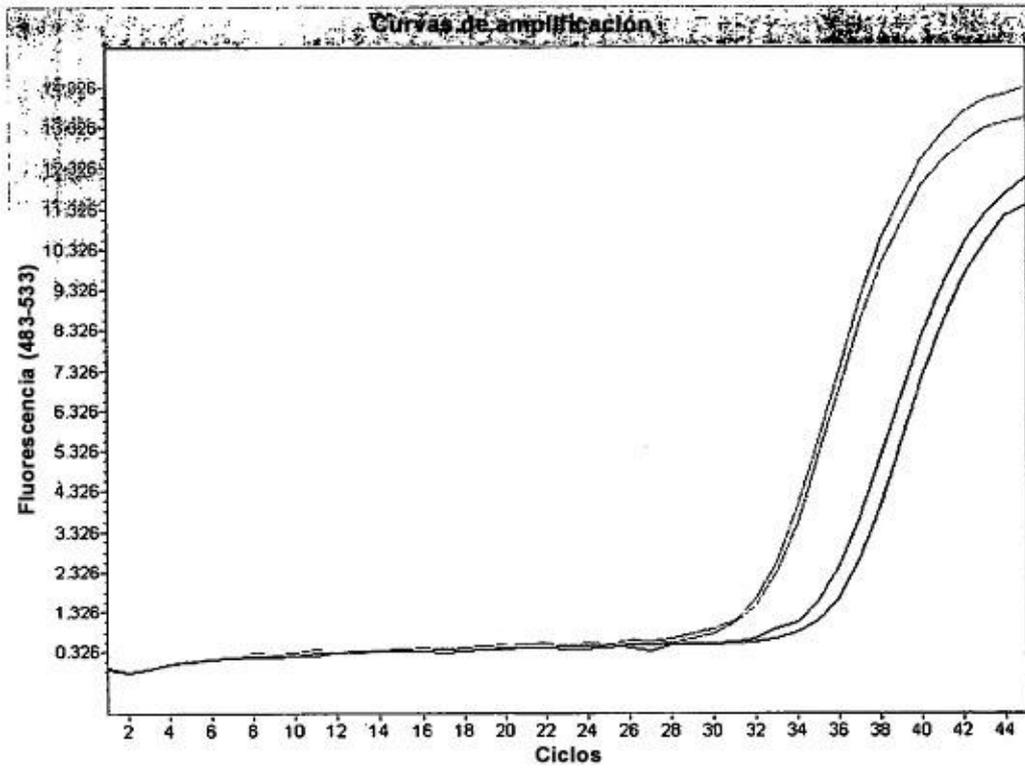


Fig. 8

Transcripción inversa a 63°C durante 3 minutos

