

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 448**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2002 E 02734110 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 1385999**

54 Título: **Reactivos y métodos para la hibridación automatizada in situ o para microarray**

30 Prioridad:

30.04.2001 US 287324 P
30.04.2001 US 287325 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2013

73 Titular/es:

VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (100.0%)
1910 E. INNOVATION PARK DRIVE
TUCSON, ARIZONA 85755, US

72 Inventor/es:

WOLF, CATHERINE;
NITTA, HIROAKI;
GROGAN, THOMAS;
CAVADENTI, JACQUES;
PESTIC-DRAGOVICH, LIDIJA;
HARTMAN, ANTHONY;
SATTLER, ANGELA y
WONG, JENNIFER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 400 448 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

Reactivos y métodos para la hibridación automatizada in situ o para microarray.

La invención está relacionada con los campos de la medicina, la genética, la bioquímica y la biología molecular. En particular, la invención se refiere a reactivos, kits de reactivos, y métodos para la hibridación automatizada. Más particularmente, la invención se refiere a reactivos, kits de reactivos, y los métodos para la hibridación automatizada in situ y la hibridación automatizada en microarrays.

Las reacciones de hibridación de ácidos nucleicos se pueden utilizar para detectar y caracterizar secuencias de nucleótidos específicas en moléculas de DNA y de ARN. Por ejemplo, la transferencia de Southern implica la extracción de DNA a partir de células o tejidos y puede utilizarse para determinar la estructura genética de un cromosoma particular. De manera similar, la transferencia Northern implica la extracción de RNA a partir de células o tejidos y puede utilizarse para determinar si está presente y cuánta cantidad de un RNAm particular en un determinado tejido. Otros formatos de ensayo para la detección de ácidos nucleicos por hibridación incluyen los siguientes: ensayos de detección de expresión diferencial de genes ("nuclear run-on") ; ensayos de slot blot, separación con partículas magnéticas; ensayos de transferencia de Northern reversos; ensayos de dot blot; ensayos de protección de RNasa, reacción en cadena de ligasa (LCR), reacción en cadena de polimerasa (PCR); PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR); RT-PCR de visualización diferencial (DDRT-PCR); hibridación in situ, y, más recientemente, los arrays microfabricados (también referidos como "microarrays" o "chips de genes"). En cada uno de estos formatos, los métodos de detección que se pueden emplear incluyen, entre otros, marcadores radiactivos, marcadores enzimáticos, marcadores quimioluminiscentes, y marcajes fluorescentes.

La hibridación in situ es una técnica poderosa para, entre otros usos, la identificación de la localización subcelular de los ácidos nucleicos. Dado que los ácidos nucleicos, no menos que otras macromoléculas, ocupan posiciones precisas en células y tejidos, se pierde una gran cantidad de información potencial cuando los ácidos nucleicos se extraen mediante homogeneización. Por esta razón, se han desarrollado técnicas en las que se utilizan sondas de ácidos nucleicos para localizar secuencias específicas de ácidos nucleicos in situ, un procedimiento llamado hibridación in situ (ISH). La ISH puede realizarse para analizar el DNA o RNA en las células.

En el análisis de ISH de DNA, se hibridan las sondas de ácidos nucleicos marcadas a cromosomas que han sido expuestos brevemente a un pH muy alto o alta temperatura para romper sus pares de bases de DNA. Las regiones cromosómicas que se unen a la sonda durante el paso de hibridación se visualizan entonces. Originalmente, esta técnica fue desarrollada utilizando sondas de DNA altamente radiactivas, que se detectaban mediante autorradiografía. La resolución espacial de la técnica, sin embargo, puede mejorarse enormemente mediante el etiquetado químico de las sondas de DNA en lugar de radiactivamente. Para este fin, las sondas se sintetizan con nucleótidos especiales que contienen una cadena lateral modificada, y las sondas hibridadas se detectan con un anticuerpo (u otro ligando) que reconoce específicamente esta cadena lateral.

Los métodos de hibridación de RNA in situ puede revelar la distribución de moléculas específicas de RNA en las células y tejidos. En este caso, los tejidos no están expuestos a un pH o temperatura alta, de modo que el DNA cromosómico se mantiene en forma de doble cadena y no se puede unir la sonda. Si en lugar de esto, el tejido se fija, el RNA se conserva en una forma expuesta capaz de hibridar con una sonda de DNA o RNA complementario. De esta manera, los patrones de expresión génica diferencial pueden observarse en los tejidos.

La hibridación in situ de RNAm es útil para estudiar la enfermedad, identificar posibles dianas terapéuticas y evaluar los fármacos candidatos. Por ejemplo, el diagnóstico de cáncer de mama, de ovario y otros carcinomas puede ser facilitado por técnicas que determinan la presencia y expresión del protooncogén c-erb2/HER-2/neu. El protooncogén c-erb2/HER-2/neu es un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de receptoras tirosina quinasas. La amplificación y la sobreexpresión del protooncogén c-erb2/HER-2/neu se encuentra en aproximadamente el 30% de los carcinomas de mama y aproximadamente el 20% de los carcinomas de ovario. Andrecheck et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3444.

Pueden utilizarse sondas de DNA o RNA para la hibridación in situ. Normalmente, una sonda de RNA ("ribosonda") se realiza mediante transcripción in vitro de un DNAc clonado que codifica el gen de interés. Por lo tanto, se debe tener un vector que contiene el DNAc flanqueado por promotores, tales como promotores T7 y T3, con el fin de hacer una ribosonda. Por otro lado, una sonda de oligonucleótido de DNA ("oligosonda") se puede preparar, por ejemplo, usando un sintetizador automatizado de DNA. Por lo tanto, un experto en la materia sólo necesita conocer la secuencia del gen de interés para hacer una oligosonda. Una ventaja adicional de oligosondas para la hibridación in situ es que son más estables que las ribosondas. Una ventaja adicional de las oligosondas es que, debido a su corta longitud, puede facilitarse el acceso y la hibridación con una diana. Además de las oligosondas y las ribosondas, pueden utilizarse para la hibridación in situ sondas híbridas de DNA / RNA (es decir, aquellas que contienen ambos desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos) y sondas que contienen ácidos nucleicos modificados.

Se han desarrollado recientemente instrumentos para la automatización de la hibridación in situ. Por ejemplo, véase la patente de EE.UU. N ° 6.296.809, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad. Tales instrumentos son programables y capaces de realizar la hibridación in situ en muestras múltiples de manera que cada muestra está

sujeta a su propia tinción y protocolo de tratamiento, incluso cuando cada muestra requiere sus propios parámetros de temperatura. Además, las muestras que requieren desparafinado (por ejemplo, las secciones del tumor) pueden procesarse de forma automática al mismo tiempo que otras muestras que no requieren esta etapa preliminar (por ejemplo, frotis). Por lo tanto, los instrumentos automatizados reducen drásticamente la mano de obra y el tiempo implicados en la hibridación in situ, y también facilitan la estandarización de los protocolos y la consistencia entre los resultados.

Los microarrays son matrices de muchos ácidos nucleicos que tienen secuencias diferentes, impresas en posiciones específicas en un área pequeña en un sustrato tal como un portaobjetos de vidrio. La hibridación en un microarray ("hibridación de microarrays") es una técnica poderosa para, entre otros usos, determinar simultáneamente los niveles de expresión de muchos genes diferentes en una célula o muestra de tejido. Por ejemplo, Schena et al. (1996) utilizaron microarrays para monitorizar cuantitativamente la expresión diferencial los genes regulados por proteínas de choque térmico y de éster de forbol en las células T humanas. Schena et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 10614. Del mismo modo, Heller et al. (1997) demostraron el uso de chips de genes para el perfil de expresión de determinados genes humanos implicados en la inflamación, así como los genes expresados en las células de sangre periférica humanas. Heller et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:2150.

Además, las matrices de sondas de oligonucleótidos inmovilizadas sobre soportes sólidos se han utilizado para determinar las secuencias específicas de ácido nucleico en un ácido nucleico diana. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.202.231 y 5.002.867, así como la Publicación Internacional N° WO 93/17126, se refiere a la utilización de un gran número de sondas de oligonucleótidos para proporcionar la secuencia completa de ácido nucleico de una molécula de ácido nucleico diana.

Los métodos adicionales de la utilización de microarrays se describen en las siguientes patentes de EE.UU., cada una de las cuales se incorporan aquí por referencia en su totalidad. Southern (Patentes de EE.UU. Nos. 5.700.637 y 6.054.270) describe un aparato y un método para analizar una secuencia de polinucleótidos con el fin de realizar estudios de polimorfismo de genes, análisis de huellas digitales genómico, análisis de ligamiento, caracterización de RNAm, estudios de expresión génica, y determinaciones de la secuencia. La secuencia de polinucleótidos a analizar, se etiqueta y se aplica a una matriz de oligonucleótidos que son capaces de tomar parte en reacciones de hibridación con la secuencia de polinucleótidos. Chee (Patente de EE.UU. N° 5.861.242) describe un conjunto de sondas de oligonucleótidos inmovilizadas sobre un soporte sólido para el análisis de una secuencia diana de un virus de la inmunodeficiencia humana. Wang (Patente de EE.UU. N° 6.004.755) describe métodos para el análisis cuantitativo de la expresión génica en la que se pone en contacto un ácido nucleico diana marcado en el extremo con una matriz de moléculas de la sonda asociados de forma estable con la superficie de un soporte sólido en condiciones de hibridación suficientes para producir un patrón de hibridación. El patrón de hibridación resultante se usa para obtener información cuantitativa sobre el perfil genético de la muestra de ácido nucleico diana marcado en el extremo, así como la fuente fisiológica de la que se deriva. Lockhart (Patente de EE.UU. N° 6.033.860) describe colecciones de sondas inmovilizadas sobre soportes sólidos que son altamente expresados de forma diferencial entre las etapas de desarrollo y los órganos. Las sondas pueden utilizarse para priorizar dianas de fármacos potenciales, para monitorizar la progresión y la remisión de la enfermedad, y para evaluar el metabolismo del fármaco. Lockhart (Patente de EE.UU. N° 6.040.138) describe métodos de monitorización de los niveles de expresión de una multiplicidad de genes. Los métodos implican la hibridación de una muestra de ácido nucleico a una matriz de alta densidad de sondas de oligonucleótidos, en la que la matriz de alta densidad contiene sondas de oligonucleótidos complementarias a subsecuencias de ácidos nucleicos diana en la muestra de ácido nucleico. Cronin (Patente de EE.UU. N° 6.045.996) describe métodos para realizar ensayos de hibridación de ácidos nucleicos en matrices de oligonucleótidos unidos a sustrato de alta densidad, en el que la mezcla de hibridación incluye un agente isoestabilizante, un agente desnaturizante, o un acelerador de la renaturalización.

Existe una necesidad en la técnica de reactivos y métodos para la hibridación automatizada. No se han desarrollado todavía las aplicaciones de hibridación in situ para su uso con instrumentos automatizados existentes. Además, la manipulación manual de microarrays es tediosa y consume mucho tiempo, y por lo tanto existe también una necesidad de métodos para la hibridación de microarrays automatizado. La automatización de tales procesos puede tener una amplia aplicación en el campo médico, biológico, genético, bioquímico y molecular. Además, existe una necesidad de reactivos que se pueden utilizar en hibridación in situ automatizada e hibridación automatizada de microarrays. Además, existe una necesidad de kits de reactivos para su uso en la hibridación in situ automatizada y la hibridación automatizada de microarrays.

La invención se refiere a reactivos, kits de reactivos, y los métodos para la hibridación automatizada tal como se define en las reivindicaciones. Más particularmente, la invención se refiere a reactivos, kits de reactivos, y los métodos para hibridación in situ automatizada e hibridación de microarrays automatizada.

La Figura 1 muestra los resultados de la hibridación in situ automatizada de tejido de oviducto de ratón usando oligosondas para 28S RNAr (control) y ER α (prueba).

La Figura 2 muestra los resultados de un estudio comparativo que demuestra la sensibilidad superior de hibridación automatizada en el sistema DISCOVERY™ en relación con el método manual (señal-fondo).

Los métodos, reactivos y kits de la invención son para la hibridación automatizada. El término "hibridación automatizada" se refiere a los métodos de hibridación que implican el uso de instrumentos automatizados. "Hibridación automatizada" incluye, pero no se limita a, hibridación in situ automatizado y la hibridación automatizada de microarrays.

- 5 "Solución de prehibridación" se refiere a una solución que es útil para su aplicación a muestras de tejido antes del paso de hibridación en los métodos para la hibridación in situ automatizada. "La solución de prehibridación" incluye "solución de prehibridación primaria" y "solución de prehibridación secundaria".

10 "Solución de prehibridación primaria" se refiere a una solución acuosa útil para el tratamiento de muestras de tejido antes de la hibridación, incluyendo la fijación de las muestras después del desparafinado. En una realización, la solución de prehibridación primaria es una solución acuosa que comprende cloruro de sodio; fosfato sódico dibásico; fosfato de sodio monobásico; EDTA; "primer detergente de prehibridación primaria", "segundo detergente de prehibridación primaria", y formalina. En una realización preferida, la solución de prehibridación primaria comprende cloruro sódico 0,15-1,5 M; fosfato de sodio dibásico 8-80 mM; fosfato sódico monobásico 2-20 mM; EDTA 1-10 mM; primer detergente de prehibridación primaria al 0,0125-0,125%; segundo detergente de prehibridación primaria al 0,00375-0,0375 % y formalina 10-40%. En una realización más preferida, la solución de prehibridación primaria comprende cloruro de sodio 0,3 M; fosfato de sodio dibásico 16 mM; fosfato de sodio monobásico 4 mM; EDTA 2 mM; primer detergente de prehibridación primaria al 0,025%; segundo detergente de prehibridación primaria al 0,0075%, y 30% de formalina y se conoce como "RIBOPREP™".

20 El "primer detergente prehibridación primaria" es un constituyente de la solución de prehibridación primaria. En una realización preferida, el primer detergente de prehibridación primaria es un detergente no iónico que comprende condensado de óxido de etileno octilfenol. En una realización más preferida, el primer detergente de prehibridación primaria es un producto obtenido de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, en 2000, que tiene N° de producto 21123, y vendido bajo la marca comercial TRITON® X-100. TRITON® X-100 es una marca registrada de Union Carbide Corp.

25 El "segundo detergente de prehibridación primaria" es otro componente de la solución de prehibridación primaria. En una realización preferida, el segundo detergente de prehibridación primaria es un detergente no iónico que comprende lauril éter de polioxietileno (23), que tiene una fórmula molecular de $C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_nOH$, $n \sim 23$. En una realización más preferida, el segundo detergente de prehibridación primaria es un producto obtenido de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, en 2000, que tiene N° de producto 858366, y vendido bajo la marca comercial BRIJ® 35. BRIJ® 35 es una marca registrada de ICI Americas, Inc.

30 La "solución de prehibridación secundaria" se refiere a una solución de ácido clorhídrico adecuada como reactivo secundario de pretratamiento en protocolos de hibridación in situ. En una realización preferida, la solución de prehibridación secundaria comprende HCl 0,1-1 N. En una realización más preferida, la solución de prehibridación secundaria comprende HCl 0,3 N y se conoce como "RIBOCLEAR™".

35 Un "reactivo de acondicionamiento celular" se refiere a una solución acuosa útil para el acondicionamiento de muestras de células previo a la hibridación en los métodos de hibridación in situ. Por ejemplo, los reactivos de acondicionamiento celular incluyen los descritos en la solicitud de patente EE.UU. N° 09/800.689, presentada el 07 de marzo 2001, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

40 Una "solución de acondicionamiento celular" es un ejemplo de un reactivo de acondicionamiento celular. En una realización, la solución de acondicionamiento celular comprende citrato de sodio, ácido cítrico; "conservante de acondicionamiento celular", y detergente no iónico. En una realización preferida, el detergente no iónico es "detergente de acondicionamiento celular". En una realización más preferida, la solución de acondicionamiento celular comprende citrato sódico 0,4-8,2 mM; ácido cítrico 1,8-10 mM; conservante de acondicionamiento celular 0,1-1%, y detergente de acondicionamiento celular al 0,05-5%. En una realización más preferida, la solución de acondicionamiento celular comprende citrato de sodio 8,2 mM; ácido cítrico 1,8 mM; conservante de acondicionamiento celular al 0,05%, y detergente de acondicionamiento celular al 0,1% y se conoce como "RIBOCC™".

45 Un "conservante de acondicionamiento celular" es un constituyente de la solución de acondicionamiento celular. En una realización preferida, el conservante de acondicionamiento celular comprende 5-cloro-2-metil-4-isoltiazolin-3-ona, 2-metil-4-isoltiazolin-3-ona; glicol modificado y carboxilato de alquilo. En una realización más preferida, el conservante de acondicionamiento celular comprende 5-cloro-2-metil-4-isoltiazolin-3-ona al 2,30%; 2-metil-4-isoltiazolin-3-ona al 0,70%; glicol modificado al 94-95%, y carboxilato de alquilo al 2-3%. En una realización más preferida, el conservante de acondicionamiento celular es un producto obtenido de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, en 2000, que tiene n° de catálogo 48125, y vendido bajo la marca comercial PROCLIN® 300. PROCLIN® 300 es una marca registrada de Rohm and Haas Company.

55 Un "detergente de acondicionamiento celular" es otro componente de la solución de de acondicionamiento celular. En una realización preferida, el detergente de de acondicionamiento celular comprende sorbitán de polioxietileno (20). En una realización más preferida, el detergente de acondicionamiento celular es un producto obtenido de

Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, en 2000, que tiene N ° de producto 274348, y vendido bajo la marca comercial TWEEN ® 20. TWEEN ® 20 es una marca registrada de ICI Americas, Inc.

- 5 Una "solución de hibridación" se refiere a una solución acuosa útil para la hibridación de una sonda de ácido nucleico a un ácido nucleico diana. La "solución de hibridación" incluye "la solución de hibridación in situ" y la "solución de hibridación de microarrays".
- 10 Una "solución de hibridación in situ" se refiere a una solución acuosa útil para hibridar una sonda a un ácido nucleico diana en los métodos de hibridación in situ. En una realización, la solución de hibridación in situ comprende SSPE; sal de sodio de sulfato de dextrano, peso molecular promedio de 10.000; formamida, y detergente no iónico. En una realización adicional, el detergente no iónico es en "detergente de hibridación in situ". En una realización preferida, la solución de hibridación in situ comprende SSPE 1X-SX; sal de sodio de sulfato de dextrano 10-50%, peso molecular promedio de 10.000; formamida al 50-80%, y detergente de hibridación in situ al 0,01-1%. En una realización más preferida, la solución de hibridación in situ comprende SSPE 2X; sal de sodio de sulfato de dextrano al 20%, peso molecular promedio 10.000; formamida al 80%, y detergente de hibridación in situ al 0,05% y se conoce como "RIBOHYBE™". RIBOHYBE™ se describe en WO02/61139.
- 15 El "detergente de hibridación in situ" es un constituyente de la solución de hibridación in situ. En una realización preferida, el detergente de hibridación in situ es un detergente no iónico que comprende lauril éter de polioxietileno (23), que tiene una fórmula molecular de $C_{12}H_{25} (OCH_2CH_2)_n OH$, $n \sim 23$. En una realización más preferida, el detergente de hibridación in situ es un producto obtenido de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, en 2000, que tiene N° de producto 858366, y vendido bajo la marca comercial BRIJ ® 35.
- 20 SSPE, que es otro componente de la solución en hibridación in situ, es un tampón común utilizado en muchos estudios bioquímicos. SSPE comprende NaCl 3 M, fosfato de sodio monobásico 40 mM; fosfato de sodio dibásico 160 mM, y EDTA 20 mM.
- 25 Una "solución de hibridación de microarrays" se refiere a una solución acuosa útil para hibridar una sonda a un ácido nucleico diana en un microarray. En una realización, la solución de hibridación de microarrays comprende SSPE, sal de sodio de sulfato de dextrano, peso molecular promedio de 10.000, y formamida. En una realización más preferida, la solución de hibridación de microarrays comprende SSPE 6X; sal de sodio de sulfato de dextrano al 20%, peso molecular promedio de 10.000, y formamida al 10% y se conoce como "CHIPHYBE™". CHIPHYBE™ se describe en WO02/61139.
- 30 Una "solución de lavado" se refiere a una solución acuosa útil para el lavado de las muestras después del paso de hibridación en los métodos de hibridación in situ y los métodos de hibridación de microarrays. La solución de lavado es útil para el lavado de las muestras ya sea cuando se utiliza una sonda de RNA (ribosonda) o una sonda de DNA (oligosonda). En una realización, la solución de lavado comprende cloruro de sodio; tampón fosfato; EDTA, y uno o más detergentes no iónicos. En una realización preferida, la solución de lavado comprende dos detergentes no iónicos: " primer detergente de lavado" y "segundo detergente de lavado". En una realización más preferida, la solución de lavado comprende cloruro sódico 0,1-0,5 M; fosfato de sodio dibásico 5-30 mM; fosfato de sodio monobásico 1-10 mM; EDTA 0,5-5 mM; primer detergente de lavado al 0,01-0,1%, y segundo detergente de lavado al 0,0025-0,025. %. En una realización más preferida, la solución de lavado comprende cloruro de sodio 0,3 M; fosfato de sodio dibásico 16 mM; fosfato de sodio monobásico 4 mM; EDTA 2 mM; primer detergente de lavado al 0,025%, y segundo detergente de lavado al 0,0075% y se conoce como "RIBOWASH™".
- 35 El "primer detergente de lavado" es un constituyente de la solución de lavado. En una realización preferida, el primer detergente de lavado es un detergente no iónico que comprende condensado de óxido de etileno octilfenol. En una realización más preferida, el primer detergente de lavado es un producto obtenido de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, en 2000, que tiene N ° de producto 21123, y vendido bajo la marca comercial TRITON ® X-100.
- 40 El "segundo detergente de lavado" es otro componente de la solución de lavado. En una realización preferida, el segundo detergente de lavado es un detergente no iónico que comprende lauril éter de polioxietileno (23), que tiene una fórmula molecular de $C_{12}H_{25} (OCH_2CH_2)_n OH$, $n \sim 23$. En una realización más preferida, el segundo detergente de lavado es un producto obtenido de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, en 2000, que tiene N ° de producto 858366, y vendido bajo la marca comercial BRIJ ® 35.
- 45 Es conveniente empaquetar y distribuir la solución de lavado en una forma concentrada. En una realización de la forma concentrada, la solución de lavado comprende cloruro sódico 0,5-2,5 M; fosfato de sodio dibásico 25-150 mM; fosfato de sodio monobásico 5-50 mM; EDTA 2,5-25 mM; primer detergente de lavado al 0,05-0,5%, y segundo detergente de lavado al 0,0125-0,125%. En una realización más preferida de la forma concentrada, la solución de lavado comprende cloruro sódico 1,5 M; fosfato de sodio dibásico 80 mM; fosfato de sodio monobásico 20 mM; EDTA 10 mM; primer detergente de lavado al 0,125%, y segundo detergente de lavado al 0,0375%.
- 50 Una "solución de fijación post-hibridación" es útil para la fijación de las muestras después de la hibridación en métodos para la hibridación in situ. En una realización, la solución de fijación después de la hibridación es idéntica a una forma de realización de la solución de prehibridación primaria. En una realización preferida, la solución de

fijación después de la hibridación es idéntica a una forma de realización preferida de la solución de prehibridación primaria. En una realización más preferida, la solución de fijación después de la hibridación es idéntica a una forma de realización más preferida de la solución de prehibridación primaria y es referida como "RIBOFIX™", "RIBOFIX™" es idéntica a "RIBOPREP™".

5 La "solución potenciadora de la propagación" (SES) es útil para reducir la hibridación no específica y garantizar la cobertura de la superficie del portaobjetos inicial en los métodos para la hibridación automatizados de microarrays. En una realización, la SES comprende un tampón (por ejemplo, SSPE) y un detergente no iónico. En una realización preferida, la SES comprende SSPE 4X-8X y "detergente potenciador de la propagación" al 8-12%. En una
10 realización más preferida, la SES comprende el SSPE 6X al y detergente potenciador de la propagación al 10% y se conoce como "CHIPPREP™ 1."

El "detergente potenciador de la propagación" es un constituyente de la solución potenciadora de la propagación. En una realización preferida, el detergente potenciador de la propagación comprende monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20). En una realización más preferida, el detergente potenciador de la propagación es un producto
15 obtenido de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, en 2000, que tiene N° de producto 274348, y vendido bajo la marca comercial TWEEN® 20.

La "solución de bloqueo" es útil para evitar la unión no específica de una diana marcada a un ácido nucleico en un microarray. En una realización, la solución de bloqueo comprende un tampón fosfato de cualquier concentración de sal en general; material proteico (por ejemplo, gammaglobulina, caseína, o cualquier otra proteína adecuada para el
20 bloqueo de unión no específica), y un detergente no iónico. En una realización preferida, la solución de bloqueo comprende tampón fosfato con una concentración total de sal de 10 -200 mM; gammaglobulina de cabra de 0,5 a 6%, caseína hidrolizada al 5-15%, y detergente no iónico al 0,005-1%. En una realización más preferida, la solución de bloqueo comprende fosfato de potasio 75 mM, fosfato de sodio 25 mM, NaCl 55 mM, gammaglobulinas de cabra al 3%, caseína hidrolizada al 13,4%, y "detergente de bloqueo" al 0,05% y se refiere como "CHIPPREP™ 2".

El "detergente de bloqueo" es un constituyente de la solución de bloqueo. En una realización preferida, el detergente de bloqueo es un detergente no iónico que comprende lauril éter de polioxietileno (23), que tiene una fórmula molecular de C₁₂H₂₅ (OCH₂CH₂)_n OH, n ~ 23. En una realización más preferida, el detergente de bloqueo es un
25 producto obtenido de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, en 2000, que tiene N° de producto 858366, y vendido bajo la marca comercial BRIJ® 35.

La "solución de limpieza de microarray" es útil para eliminar Liquid Coverslip™ (véase, por ejemplo, Patentes de EE.UU. N° 5.225.325 y 5.418.138 a partir de microarrays tras los pasos de hibridación y de lavado de los métodos de hibridación de microarrays, reduciendo de ese modo la señal de fondo observada tras el análisis de microarray. La solución de limpieza de microarray comprende el "detergente de limpieza de microarray" diluido en agua, preferiblemente agua desionizada. En una realización preferible, la solución de limpieza de microarray comprende un detergente de limpieza de microarray al 0,1-5%. En una realización más preferida, la solución de limpieza de
30 microarray comprende un detergente de limpieza de microarrays al 1 % y se refiere como "CHIPCLEAN™".

El "detergente de limpieza de microarray" es un constituyente de la solución de limpieza de microarrays y se refiere a cualquier detergente que elimine eficazmente Liquid Coverslip™ de un microarray. En una realización preferida, el detergente de limpieza de microarray comprende tensioactivos no iónicos y aniónicos biodegradables sin fosfato. En una realización más preferida, el detergente de limpieza de microarray es un producto fabricado por Procter & Gamble, Inc., Cincinnati, OH, 45202, obtenido en 2001, que tiene el número UPC 3700091342, 3700030840, o3700035986, descrito en la patente de EE.UU. N° 5.990.065 y 6.069.122, y vendido bajo la marca comercial DAWN®. DAWN® es una marca registrada de Procter & Gamble, Inc.
40

El kit "RIBOMAP™" está diseñado para la hibridación in situ automatizada, aunque también puede utilizarse para métodos manuales de hibridación in situ. El kit RIBOMAP™ puede utilizarse en protocolos de hibridación in situ con secciones de tejido incluidas en parafina fijadas con paraformaldehído o formalina. Además, el kit RIBOMAP™ puede utilizarse en la hibridación in situ con sondas de RNA (ribosondas) o sondas de DNA (oligosondas). En una
45 realización, el kit RIBOMAP™ es un kit de reactivos que comprende dos soluciones de prehibridación, una solución de hibridación, y una solución de fijación post-hibridación. En una realización preferida, el kit RIBOMAP™ comprende: (a) una composición acuosa, que comprende cloruro sódico 0,15-1,5 M, fosfato de sodio dibásico 8-80 mM, fosfato de sodio monobásico 2-20 mM, EDTA 1,10 mM, primer detergente primario de prehibridación al 0,0125-0,125%; segundo detergente primario de prehibridación al 0,00375 - 0,0375%, y formalina al 10-40% (b) una composición acuosa, que comprende HCl de 0,1 a 1 N, y (c) una composición acuosa, que comprende SSPE 1X - SX, sal sódica de dextrano de sulfato al 10 -50%, peso molecular promedio 10.000; formamida al 50-80%, y detergente de hibridación in situ al 0,01-1%. En una realización más preferida, el kit RIBOMAP™ comprende: (a)
50 una composición acuosa, que comprende cloruro de sodio 0,3 M, fosfato de sodio dibásico 16 mM, fosfato de sodio monobásico 4 mM, EDTA 2 mM, primer detergente de prehibridación primaria al 0,025%; segundo detergente de prehibridación primaria al 0,0075%, y formalina al 30% (b) una composición acuosa, que comprende HCl 0,3 N, y (c) una composición acuosa, que comprende SSPE 2X, sal de sodio de dextrano de sulfato al 20%, peso molecular promedio de 10.000, formamida al 80%; y detergente de hibridación in situ al 0,05%.
55

El kit "ChipMap™" está diseñado para la hibridación automatizada de microarrays, aunque puede utilizarse también para métodos de hibridación manual sobre un microarray. El kit ChipMap™ es un kit de reactivos que comprende una solución potenciadora de la propagación, una solución de bloqueo, una solución de hibridación de microarray, y una solución de limpieza de microarrays. En una realización preferida, el kit ChipMap™ comprende: (a) una composición acuosa, que comprende SSPE 4X-8X y detergente potenciador de la propagación al 8-12%, (b) una composición acuosa, que comprende tampón fosfato con una concentración de sal total de 10-200 mM, gamma globulinas de cabra entre el 0,5 y el 6%; caseína hidrolizada al 5-15%, y detergente no iónico al 0,005-1%, (c) una composición acuosa, que comprende SSPE 2-6X, sal de sodio de sulfato de dextrano al 17,5- 22,5%, peso molecular promedio de 10.000, y formamida al 10-50%, y (d) una composición acuosa, que comprende detergente de limpieza de microarray al 0,1-5%. En una realización más preferible, el kit ChipMap™ comprende: (a) una composición acuosa, que comprende SSPE 6X y detergente potenciador de difusión al 10%, (b) una composición acuosa, que comprende fosfato de potasio 75 mM, fosfato de sodio 25 mM, NaCl 55 mM, gammaglobulina de cabra al 3%, caseína hidrolizada al 13,4%, y detergente de bloqueo al 0,05%, (c) una composición acuosa, que comprende SSPE 6X, sal de sodio de sulfato de dextrano al 20%, peso molecular promedio de 10.000, y formamida al 10%, y (d) una composición acuosa, que comprende un detergente de microarrays al 1%.

Los términos "complementario" y "sustancialmente complementario" se refieren a la hibridación o emparejamiento de bases entre dos nucleótidos o moléculas de ácido nucleico, como por ejemplo, entre las dos hebras de una molécula de DNA de doble cadena o entre un cebador de oligonucleótido y un sitio de unión a cebador en un ácido nucleico de cadena sencilla a secuenciar o amplificar. Los nucleótidos complementarios son, generalmente, A y T (o A y U), y C y G. Dos moléculas de RNA o de DNA de cadena sencilla se dice que son sustancialmente complementarias cuando los nucleótidos de una hebra, alineadas óptimamente y comparadas con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, se emparejan con al menos aproximadamente el 80% de los nucleótidos de la otra cadena, normalmente al menos aproximadamente del 90% al 95%, y más preferiblemente del 98 al 100%. La complementariedad sustancial existe cuando una hebra de RNA o DNA hibrida en condiciones de hibridación selectivas con su complementario. Normalmente, la hibridación selectiva se producirá cuando existe al menos un 65% de complementariedad sobre un tramo de al menos 14 a 25 nucleótidos preferiblemente al menos aproximadamente un 75%, y más preferiblemente al menos un 90% de complementariedad. Véase, por ejemplo, M. Kanehisa (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:203.

Un ácido nucleico "de doble cadena" se refiere la matriz helicoidal de ácido nucleico con enlaces de hidrógeno, que existe entre dos hebras separadas, como, por ejemplo, DNA, o dentro de una sola hebra de ácido nucleico de "cadena sencilla". Además de la forma 100% complementaria de nucleótidos de doble cadena, el término tal como de doble cadena tal como se utiliza en este documento se entiende que se refiere a aquellas formas que también incluyen características estructurales como protuberancias y bucles, que se describen más completamente en los textos de bioquímica como Stryer, *Bioquímica*, 3ª ed. Nueva York: Freeman y Co., 1988.

Las "condiciones de hibridación astringentes" incluyen normalmente concentraciones de sal de al menos 1 M, más generalmente menos de alrededor de 500 mM, y preferiblemente menos de aproximadamente 200 mM. Las temperaturas de hibridación pueden ser tan bajas como 5 °C, pero son normalmente mayores de 22 °C, más normalmente mayores e aproximadamente 30 °C, y preferiblemente por encima de aproximadamente 37 °C. Los fragmentos más largos pueden requerir temperaturas más altas de hibridación para la hibridación específica. Como otros factores pueden afectar a la astringencia de la hibridación, incluso la composición de las bases y longitud las cadenas complementarias, la presencia de disolventes orgánicos y el grado de desemparejamiento de bases, la combinación de parámetros es más importante que la medición absoluta de cualquier parámetro solo.

El término "hibridación específica" se refiere a la formación de híbridos entre una sonda de polinucleótido (por ejemplo, un polinucleótido de la invención que puede incluir sustituciones, deleciones y / o adiciones) y un polinucleótido diana específico (por ejemplo, un polinucleótido analito) en el que la sonda preferentemente hibrida con el polinucleótido diana específico y no hibrida sustancialmente con polinucleótidos que consisten en secuencias que no son sustancialmente idénticas al polinucleótido diana. Sin embargo, los expertos en la materia reconocerá que la longitud mínima de un polinucleótido requerido para una hibridación específica con un polinucleótido diana dependerá de varios factores, por ejemplo: el contenido G / C, el posicionamiento de bases no coincidentes (si las hay) , el grado de singularidad de la secuencia en comparación con la población de polinucleótidos diana, y la naturaleza química del polinucleótido (por ejemplo, la cadena principal de metilfosfonato o fosforotiolato), entre otros.

Los reactivos y kits de la invención pueden usarse con cualquiera de varios instrumentos automatizados diferentes. Además, cualquiera de los diferentes instrumentos automatizados puede utilizarse en los métodos de la invención. Tales instrumentos automatizados incluyen los modelos ES®, NEXES®, y BENCHMARK™ (todos fabricados por Ventana Medical Systems, Inc.), como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.232.664 ("Liquid Dispenser"), 6.093.574 ("Automated Biological Reaction System"), y 6.045.759 ("Sistema automatizado de reacción biológica"), WO 99/44030 ("aparato automatizado Molecular Pathology"), y la patente de EE.UU. Solicitud de EE.UU. N° 2001/010936.

El instrumento automatizado más preferido para ser utilizado en los métodos de la invención y con los reactivos y kits de la invención es un instrumento obtenido de Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, que tiene N° de

producto 750-200, y se vende bajo la marca comercial DISCOVERY™. El instrumento DISCOVERY™ se describe en la patente de EE.UU. N° 6.296.809.

5 Los métodos para la hibridación in situ automatizada se pueden realizar usando cualquier tejido seccionado congelado, o una preparación de citospina como muestra, ninguno de los cuales requiere desparafinado antes de la hibridación. Una preparación de citospina puede comprender, por ejemplo, las células de cultivo de tejidos o células procedentes de líquido cefalorraquídeo, orina, u otros fluidos biológicos. Alternativamente, los métodos para la hibridación in situ automatizada de la invención pueden llevarse a cabo utilizando secciones de tejido incluido en parafina, que deben desparafinarse antes de la hibridación.

10 Como se describe en el presente documento, ciertas muestras de tejidos utilizados con los métodos, reactivos y kits de la invención pueden incorporarse en una variedad de material inerte para su conservación (por ejemplo, parafina, celoidina, agar, plásticos, o acrílicos). Muchos de estos materiales inertes son hidrofóbicos, mientras que los reactivos utilizados para aplicaciones histológicas y citológicas son predominantemente hidrofílicos. Por lo tanto, el material inerte puede necesitar que sea eliminado de la muestra de tejido antes de su uso con los métodos, reactivos y kits de la invención. Por ejemplo, la muestra puede desparafinarse antes de su uso. Los métodos de desparafinado que son apropiados para su uso en los métodos de la invención se describen en el documento WO 02/42737 y WO 00/14507.

15 La fijación del tejido es uno de los pasos más importantes para un ensayo de ISH exitoso. Se ha encontrado que los tejidos deben fijarse adecuadamente a fin de obtener una relación óptima de señal a ruido. Se prefiere que las muestras se traten con formalina tamponada neutra (NBF) o paraformaldehído (PFA) durante un mínimo de 24 horas a temperatura ambiente. Como se describe en el presente documento, unos tiempos más largos de fijación pueden dar lugar a mejores resultados. Se han recuperado con éxito RNAm diana a partir de muestras de tejido fijadas durante un máximo de 168 horas a temperatura ambiente. Las muestras de tejido fijadas poco rato (4-24 horas) produjeron menor señal y mayor tinción de fondo en comparación con las muestras fijadas durante 48-168 horas.

20 El tejido fijado puede procesarse por inclusión en parafina y corte utilizando protocolos estándar. Una sección de parafina libre de arrugas (5 mm) se sitúa en un portaobjetos de vidrio adecuado, tal como un portaobjeto SUPERFROST™ PLUS (disponible de VWR International, N° de catálogo 48311-703), después de flotar las secciones en un baño de agua a una temperatura de aproximadamente 10 °C más baja que el punto de fusión de la parafina. Los portaobjetos se secan entonces al aire antes de realizar los ensayos de ISH. Para obtener la máxima señal, las secciones deben utilizarse tan pronto como sea posible después de la preparación. Si las muestras de tejido se han fijado poco rato, pueden aumentarse las señales y reducirse la tinción de fondo utilizando RIBOPREP™, como se describe en el presente documento.

25 En la preparación de muestras para ISH, las secciones de tejidos / células en parafina opcionalmente pueden "refijarse" con una solución a base de formalina después de la desparafinado, para evitar la pérdida de los ácidos nucleicos y reducir la tinción de fondo durante la ISH en el instrumento automatizado. El exceso de fijación del tejido reducirá o incluso eliminará la señal detectable durante la ISH. Se ha demostrado previamente que un aumento del tiempo de fijación inicial resulta en una señal más alta en ISH automatizado. Por lo tanto, para compensar la falta de fijación encontrada clásicamente en los ajustes histológicos, la presente invención proporciona el paso adicional de llevar a cabo la fijación después de la desparafinado, para producir un aumento de la intensidad de la señal obtenida por ISH.

30 En una realización, la refijación puede llevarse a cabo utilizando una solución de formalina tamponada neutral al 4% (NBF) en agua que se aplica en una capa de 200 µl de EZ PREP™ (Ventana N° de catálogo 950-100) durante 60 minutos a 37 °C. Este tratamiento se encontró que aumentaba la señal obtenida por ISH (utilizando una sonda del gen de MPS2 en tejido de estómago de ratón) a través de muestras fijadas inicialmente para 4, 8, 16, y 24 horas. En otra realización, la reacción de refijación se lleva a cabo utilizando NBF en un tampón basado en SSPE. Estos tampones han demostrado la reducción de la tinción de fondo y el precipitado de sustrato V-BLUE™, como se describe a continuación. Por lo tanto, la fijación se puede realizar en muestras de tejido desparafinadas usando una solución NBF aplicada sobre el portaobjetos de vidrio (de forma manual o mediante dispensación automatizada). Por ejemplo, se puede diluir 100 µl de solución de formalina (10% a 50%) en una capa de tampón residual de 200 µl de RIBOWASH™ y se incuba a 37 ° C durante un período de tiempo limitado, dependiendo de la calidad de la muestra de tejido.

35 El acondicionamiento de las células es un paso opcional, antes del paso de hibridación, en los métodos de hibridación in situ automatizada de la invención. El grado en el que se fija una muestra determinará la cantidad de acondicionamiento celular necesario antes de la hibridación in situ. Si la muestra se fija ligeramente, se recomienda un procedimiento de acondicionamiento celular leve. Sin embargo, si la muestra está fuertemente fijada, se recomienda un procedimiento de acondicionamiento celular fuerte. Por ejemplo, el acondicionamiento celular general no se realiza en muestras de tejido congelado o mal fijado. Ejemplos de procedimientos apropiados de acondicionamiento celular se describen en el documento WO 02/071055.

La digestión con proteasa es un paso opcional, antes del paso de hibridación, en los métodos de hibridación in situ automatizada de la invención. Por ejemplo, la digestión con proteasa se puede lograr mediante la aplicación de

Proteasa I, II, o III a la muestra (Ventana Medical Systems, Inc.; N ° de Catálogo 760-2018, 760-2019, y 760 a 2020, respectivamente). Alternativamente, se puede utilizar cualquiera de las diferentes proteasas comúnmente utilizadas en la hibridación in situ, tales como la proteinasa K.

5 En otra realización, se puede realizar opcionalmente un paso de fijación adicional después del paso de lavado de la sonda. Este paso de fijación adicional permite la incubación de las secciones de tejido con sustrato V-BLUE™ (Ventana N ° de producto 760 a 062) por un período de tiempo más largo. Por ejemplo, la incubación se ha realizado durante hasta 10 horas sin aumentar significativamente la tinción de fondo azul. Esto permite varias aplicaciones del sustrato, lo que resulta en el aumento de las señales.

10 La hibridación automatizada de microarrays puede realizarse usando microarrays disponibles comercialmente o microarrays "dispensados" por el usuario en portaobjetos comercialmente disponibles. Los métodos para la hibridación automatizada de microarrays pueden utilizarse, por ejemplo, en los procedimientos para el análisis de mutaciones conocidas en enfermedades genéticas, huella genómica, análisis de ligamiento, determinación de la secuencia y análisis de RNAm de la población.

15 Los ácidos nucleicos utilizados en la invención incluyen oligonucleótidos y moléculas de DNAC, o fragmentos de los mismos. Un oligonucleótido es una molécula de DNA o RNA de cadena simple, normalmente preparados por medios sintéticos. El DNAC, o fragmentos de los mismos, se pueden aislar o adquirir de fuentes comerciales. Los ácidos nucleicos utilizados en la invención son de 15 a 2000 nucleótidos de longitud, preferiblemente desde 70 hasta 1.500 nucleótidos, aunque pueden ser apropiados ácidos nucleicos de diferente longitud. Los oligonucleótidos adecuados se pueden preparar por el método de la fosforamidita descrito por Beaucage y Carruthers (1981) Tetrahedron Lett. 22:1859, o por el método del triéster de acuerdo con Matteucci et al. (1981) J. Am. Chem. Soc. 103:3185, o por otros métodos químicos utilizando ya sea un sintetizador automático de oligonucleótidos comercial o la tecnología de síntesis de polímeros inmovilizado a escala muy grande (VLSIPS™).

20

En un microarray, los ácidos nucleicos (por ejemplo, oligonucleótidos o DNAC) están unidos a un soporte sustancialmente sólido. En una realización preferida, el soporte sustancialmente sólido a la que los ácidos nucleicos están unidos es una película de sujeción o un sustrato de vidrio tal como un portaobjetos de microscopio. El conjunto de secuencias de sonda se puede fabricar sobre el sustrato de acuerdo con las técnicas descritas en la patente de EE.UU. N ° 5.143.854 o la Publicación Internacional No. WO 92/10092. La combinación de técnicas de fotolitografía y de fabricación pueden permitir, por ejemplo, que cada secuencia de la sonda ("diana") ocupar un área muy pequeña ("sitio") en el soporte. En algunas realizaciones, este sitio diana puede ser tan pequeño como unos pocos micrómetros o incluso una sola molécula. Por ejemplo, pueden fabricarse aproximadamente 10^5 - 10^6 dianas en un área de sólo 12,8 mm². Las empresas que actualmente fabrican y comercializan microarrays de DNA o DNAC incluyen Affymetrix, Santa Clara, CA; ClonTech, Palo Alto, CA; Corning, Inc., Corning, NY, y Motorola, Inc., División de Sistemas de BioChip, Northbrook, IL.

25

30

La química de la superficie de los portaobjetos utilizados para la impresión de DNA tiene un impacto muy significativo en el resultado final de la matriz. Las metodologías de revestimiento que producen portaobjetos con fluorescencia de fondo bajo y la unión uniforme de DNA a lo largo de la superficie del portaobjetos son muy importantes. El sistema DISCOVERY™ y CHIPMAP™ de Ventana, como se describe en el presente documento, son compatibles con portaobjetos recubiertos con amino-silano, aldehído, y polilisina. Se han analizado en el sistema los portaobjetos de las siguientes fuentes y se ha encontrado que funcionan satisfactoriamente:

35

- 40
1. Clontech Tipo I y II (Catálogo N ° 7880-1 y 7881);
 2. Corning (N ° de catálogo 2549);
 3. Sigma (n ° de catálogo P0425);
 4. Telechem (N ° de catálogo CSS 100);
 5. NEN (N ° de catálogo MPS620).

45 Debido al aumento de la cinética que resulta de la mezcla y lavado en el instrumento DISCOVERY™, la unión de DNA al sustrato de vidrio es crítico si deben obtenerse resultados consistentes. Es esencial que el DNA esté fuertemente unido a la superficie después de la impresión. Si se omite la unión después de la impresión, el riesgo de pérdidas tras el lavado de cantidades significativas de sonda es alta.

50 Se recomienda encarecidamente seguir los procedimientos de calentamiento / secado e hibridación sugeridos por el fabricante de portaobjetos antes de accionar el sistema DISCOVERY™ sobre las matrices. También se recomienda que todas las matrices se escaneen antes de accionar el sistema DISCOVERY™. Esto permite la identificación de matrices que tienen problemas de impresión, ruido de fondo o estén dañadas antes de accionar el sistema. Además, mediante la comparación de los puntos que contienen la sonda marcada antes y después de la hibridación, es posible identificar las matrices que producen señal débil debido a una baja hibridación y posterior pérdida de la sonda de DNA.

55

Se requieren múltiples pasos para practicar el método de hibridación automatizado de microarrays de la invención. Los microarrays se colocan en el instrumento, tales como el instrumento DISCOVERY™, y se exponen a las condiciones descritas en el presente documento. Las soluciones descritas en este documento se aplican a los microarrays dentro del instrumento. Por ejemplo, las soluciones para el uso en la prehibridación, hibridación y lavado están contenidas en y dispensadas desde los dispensadores de líquido (por ejemplo, dispensadores "rellenables por el usuario"), tales como los descritos en las patentes de EE.UU. N° 6.045.759 y 6.192.945. El tipo de dispensador usado para las soluciones de la invención (ya sea para hibridación in situ o la hibridación de microarrays) no es crítica. Los microarrays se tratan en las condiciones descritas en el presente documento. A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos se obtuvieron de Ventana Medical Systems, Inc., y todas las reacciones procesadas en portaobjetos se realizaron bajo una película de LIQUID COVERSLIP™ para evitar la pérdida de agua por evaporación durante el procesamiento.

Se han utilizado detergentes en soluciones de hibridación por los investigadores para reducir la unión no específica de la sonda marcada con el ácido nucleico del portaobjetos de vidrio durante la hibridación manual. Se cree generalmente que tales detergentes aumentan la astringencia de la reacción, lo que resulta en la reducción de la unión no específica. Junto con los esfuerzos anteriores para hibridar arrays de ácidos nucleicos en el DISCOVERY™, se incorporó un detergente al tampón de hibridación. Mientras que esto tenía un efecto positivo en la reacción de hibridación, también disminuyó la cobertura durante largos periodos de incubación (por ejemplo, 4-6 horas).

Los intentos de eliminar estos efectos perjudiciales mediante la alteración de las concentraciones de sal (SSPE / SSC 2X-12X) o de detergente (1-20%), así como la sustitución de diferentes detergentes (por ejemplo, TWEEN® 80 (detergente no iónico que comprende monooleato de sorbitán de polioxietileno; disponible de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, N° de producto P8074), NP-40 (detergente no iónico que comprende tensoactivos de éter de poliglicol, disponible de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, N° de producto NP-40), o BRIJ® 35 detergente no iónico que comprende lauril éter de polioxietileno (23), que tiene una fórmula molecular de C₁₂H₂₅(OCH₂CH₂)_nOH, n ~ 23, disponible de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, N° de producto 858366)), en la solución de hibridación de microarrays, no tuvieron éxito. Sin embargo, si el efecto positivo que ejerce el detergente no se debía a la prevención simple de la unión no específica a través de un efecto de astringencia tradicional, sino más bien a mejorar la hidratación de los ácidos nucleicos dispersados o un mecanismo similar, tratando entonces el portaobjetos con el detergente antes de la hibridación podría proporcionar el mismo beneficio. Así, el uso de una solución que contiene detergente fue considerado para su uso en un paso de prehibridación.

La "solución potenciadora de la propagación" (SES), que se describe en este documento, es una solución que se ha encontrado que reduce la hibridación no específica y asegura una cobertura inicial de la superficie del portaobjetos. En una realización, el portaobjetos se trata con SES antes de la hibridación. El pretratamiento con la solución disminuye la unión de fondo de la sonda al DNA y por lo tanto aumenta la relación señal-ruido. En un método preferido de utilización de SES, se dispensan dos gotas de la solución (200 µl, que resulta en una concentración real sobre el portaobjetos de aproximadamente SSPE 3,6 X, y detergente potenciador de la propagación al 4%) sobre el portaobjetos y se incuban durante diez minutos a 70 °C. Este tratamiento antes de la hibridación aumenta la humectabilidad de la superficie del portaobjetos, mejorando la cobertura mediante soluciones acuosas durante los posteriores pasos y aumenta la accesibilidad del DNA/ RNA diana marcado con sondas de ácidos nucleicos unidos a la superficie del portaobjetos. Además, el tratamiento del portaobjetos con SES antes de la hibridación reduce la unión del DNA / RNA diana marcado con los ácidos nucleicos negativos (no homólogos) esparcidos en la superficie del portaobjetos, lo que mejora la relación señal-ruido obtenidos durante la hibridación.

Tradicionalmente, las altas concentraciones de proteína (por ejemplo, BSA, caseína, o leche en polvo) se han utilizado para bloquear la unión inespecífica de los reactivos utilizados en inmunohistoquímica (IHC), ISH, y transferencia a membrana. La presente invención proporciona un método mejorado para la prehibridación de portaobjetos que permite una mayor cobertura del portaobjetos durante incubaciones prolongadas. Para su utilización en los ensayos descritos, dos gotas (200 µl) de solución de bloqueo se aplica al portaobjetos, seguido de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Las proteínas contenidas en la solución de bloqueo recubren la superficie del portaobjetos a través de una carga no específica e interacciones hidrofóbicas para reducir la unión no específica tardía de DNA / RNA diana marcado a la superficie del portaobjetos durante la hibridación. Debido a la naturaleza no específica de estas interacciones, el aumento de la energía cinética a temperaturas elevadas reduce la eficacia del bloqueo. Por lo tanto, el tratamiento con solución de bloqueo para reducir la unión no específica de DNA / RNA diana marcado al portaobjetos se lleva a cabo a temperatura ambiente mediante la desactivación de los calentadores de portaobjetos individuales en el instrumento automático durante este pretratamiento. Tras una incubación de 30 minutos, el portaobjetos se enjuaga para eliminar cualquier proteína no unida antes de la hibridación.

Aunque la intención original de este pretratamiento fue simplemente reducir la unión no específica al portaobjetos de DNA / RNA diana marcado, se observó durante el desarrollo de esta solución que los portaobjetos tratados con solución de bloqueo retuvieron significativamente mejor la cobertura de la superficie del portaobjetos por el tampón de hibridación en incubaciones de hibridación prolongadas (por ejemplo, hasta 16 horas). Además, cuando se compara con el estándar de solución de BSA al 5% utilizado comúnmente para bloquear la unión no específica, la cobertura de portaobjetos fue mejor en los portaobjetos tratados con solución de bloqueo. La cobertura uniforme es

esencial para una hibridación consistente del microarray, por lo tanto, el tratamiento del portaobjetos con solución de bloqueo antes de la hibridación se ha incorporado en el método estándar para la hibridación automatizada de microarrays de la invención.

5 En los ensayos de hibridación convencionales, las sondas de ácidos nucleicos se hibridan con una secuencia diana en una solución tal que la unión no específica se inhibe y la unión específica se mantiene. La elección del tampón de hibridación puede ser un factor crítico en la sensibilidad global del ensayo. Varios métodos de hibridación diferentes definidos para la hibridación manual se conocen en la técnica. Por ejemplo, pueden ser útiles las soluciones disponibles comercialmente tales como EXPRESS-HYB™ (Clontech; Palo Alto, CA). En ciertas realizaciones, son
10 útiles los reactivos de hibridación y de lavado ULTRARRAY™ (Ambion, Austin, TX) (por ejemplo, con el sistema de SLIDEHYB™; Ambion, Austin, TX). Normalmente se realiza un paso inicial de desnaturalización para permitir una interacción óptima entre la sonda (o ácido nucleico diana) y los ácidos nucleicos que forman el microarray.

Normalmente, antes de la hibridación de las sondas de ácido nucleico del microarray con el ácido nucleico diana, el tampón se elimina y se reemplaza con una solución que contiene el ácido nucleico diana (por ejemplo, RNA hidrolizado) en tampón de hibridación y se mezcla bien. El ácido nucleico diana y las sondas de oligonucleótidos
15 fijados al portaobjetos se incuban preferiblemente entonces durante 30 minutos a 12 horas a 42-60 ° C. El tampón de hibridación se retira a continuación.

De acuerdo con el método de hibridación automatizado de microarrays de la invención, una cantidad suficiente de solución de hibridación que contiene la solución diana marcada se añade a la superficie del microarray. Las reacciones de hibridación se realizan normalmente en una solución de hibridación que contiene entre 200 ng a 20 µg
20 de ácido nucleico marcado diana. El sulfato de dextrano utilizado en la solución de hibridación de la invención es sulfato de dextrano de peso molecular bajo, aprox. Un promedio de peso mol. De 10.000, como se describe en el documento WO 02/61139.

Después de la hibridación, el microarray se lava normalmente en condiciones de astringencia alta o baja, dependiendo de las propiedades de unión calculadas del híbrido diana:sonda. Por ejemplo, en la serie de lavados de astringencia, el portaobjetos se lava normalmente de una a tres veces con cambios de solución de lavado 1X a
25 0,05X (por ejemplo, RIBOWASH™), normalmente a temperaturas entre 37-42 °C durante entre 2 y 6 minutos cada uno. En una realización, el primer lavado puede estar en una solución de lavado 1X, la segunda solución de lavado en 0,5 X, y la tercera solución de lavado en 0,05X. Alternativamente, puede producirse un lavado en solución de lavado 0,25X. Sin embargo, debe hacerse hincapié en que las condiciones de lavado (por ejemplo, concentraciones de sal, temperaturas y tiempos de incubación) variarán dependiendo de la sonda y la diana utilizada en el método.

Después de la hibridación de una sonda a un microarray y antes del análisis de los patrones de hibridación, uno puede opcionalmente eliminar el LIQUID COVERSLIP™ del portaobjetos. El LIQUID COVERSLIP™ interfiere con el análisis ya que provoca autofluorescencia. Se sabía de los estudios de inmunohistoquímica (IHC) que el detergente para lavavajillas DAWN® era un buen agente limpiador. Inicialmente, las portaobjetos se limpiaron
35 utilizando DAWN® al 5% en SSPE 2X seguido de SSPE 1X y enjuagues de EtOH. Este procedimiento a menudo resultó en una película jabonosa que queda en la matriz, lo que provoca la autofluorescencia. Otras soluciones de limpieza han sido probadas (por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (SDS) solo o en combinación con DAWN®) en un esfuerzo para mejorar y simplificar el proceso con poco éxito.

Se realizaron estudios, sin embargo, que indicaron que niveles de detergente de 0,01% a 0,5% eran suficientes y redujeron la incidencia de la autofluorescencia con relación a la observada en el nivel de 5%. También se demostró que calentando la solución de limpieza de microarrays a aproximadamente 40 °C aumentó significativamente su eficacia (es decir, reduciendo del número de lavados necesarios). Sin embargo, se mantuvo una variabilidad significativa en la consistencia del resultado final. El procedimiento se automatizó posteriormente en un intento de
40 eliminar esta variabilidad. Los estudios iniciales demostraron que una solución detergente de limpieza de microarrays de 0,1% en agua desionizada seguido por un lavado en agua desionizada permitió la automatización del proceso y mejoró la consistencia de los lavados.

En la adaptación de este procedimiento para el sistema DISCOVERY™, se colocó una solución de limpieza de microarray en un dispensador, que a continuación dispensa solución de limpieza de microarrays en el tampón de reacción (Ventana N° de catálogo 760-105) en una relación aproximada de 1:10 (solución de limpieza de
50 microarray: tampón de reacción), seguido por la aplicación al portaobjetos durante dos minutos a 37 °C. Esta secuencia de eventos se repite tres veces, seguida por dos lavados finales en tampón de reacción para eliminar el detergente de limpieza de microarrays restante. Este procedimiento permite la eliminación de LIQUID COVERSLIP™, reduce la autofluorescencia, y proporciona la consistencia de la señal sobre los procedimientos manuales previamente utilizados.

55 Al retirar los portaobjetos del instrumento, la parte posterior del portaobjetos se limpia normalmente para eliminar el LIQUID COVERSLIP™, y los portaobjetos se colocan boca abajo en tampón de reacción de modo que el cubreobjetos con el código de barras no se deslice hacia el portaobjetos. El portaobjetos se enjuaga dos veces en tampón de reacción y luego dos veces en agua desionizada, después de lo cual el portaobjetos se seca. Preferiblemente, el portaobjetos se seca con una pistola de nitrógeno. Alternativamente, sin embargo, el

portaobjetos puede secarse mediante centrifugación, en cuyo caso primero se enjuagará dos veces en EtOH de calidad molecular; el alcohol isopropílico cubre los portaobjetos con una película azul brillante que potencia el ruido de fondo y oculta la señal.

Ejemplo 1: Hibridación automatizado in situ con una ribosonda.

- 5 Se fija una muestra de tejido, ya sea en formalina tamponada neutra (NBF) o paraformaldehído (PFA), incluida en parafina y se corta en secciones de 5 mm. Se coloca una sección de parafina en un portaobjetos de microscopio y se tiñe para uno o más dianas utilizando técnicas de ISH. Los protocolos tradicionales de ISH es muy lento y técnicamente muy complicado. Sin embargo, una vez preparado el portaobjetos, el protocolo de ISH restante está automatizado en el sistema DISCOVERY™.
- 10 Los protocolos del sistema DISCOVERY™ ISH incluyen el desparafinado, varios pasos de pretratamiento, hibridación, lavados de astringencia post hibridación, y detección de la señal cromogénica. El kit RIBOMAP™ suministra los reactivos para los pasos pretratamiento óptimos. La detección se realiza usando moléculas DIG de reconocimiento de anticuerpos marcados con biotina, seguido por unión de estreptavidina-fosfatasa alcalina (SA-AP) al anticuerpo. La detección colorimétrica usando el sustrato V-BLUE™ (Ventana N° de producto 760-062) es catalizada por la enzima fosfatasa alcalina. Los portaobjetos se contratñeron y se cubrieron para la evaluación microscópica.

Un método preferido para ISH de RNAm se resume como sigue:

A. Preparación del tejido: recogida, fijación con NBF / PFA, se procesa usando un procesador de tejidos, y se secciona utilizando un micrótomos;

- 20 B. Protocolo de DISCOVERY™ ISH: horneado, desparafinado; pretratamiento. utilizando RIBOPREP™, RIBOCLEAR™, RIBOCC™, y digestión con proteasa utilizando la proteasa I, II, o III (Ventana Medical Systems, Inc.; N° Catálogo 760-2018, 760-2019, y 760-2020, respectivamente); hibridación utilizando ribosonda marcada con DIG y RIBOHYBE™; lavados de astringencia utilizando diluciones seriadas de RIBOWASH™; post-tratamiento con RIBOFIX™, detección de la señal mediante la incubación de la muestra con un anticuerpo primario, incubación con un anticuerpo anti-DIG marcado con biotina y diluyente de anticuerpo, y el uso del Kit potenciador V-BLUE™ (Ventana Medical Systems, Inc.) (incubación del conjugado SA-AP e incubación del sustrato V-BLUE™), y la contratinción. Después se analizaron las muestras al microscopio.

- 30 La ribosonda se prepara mediante el marcaje de la ribosonda con digoxigenina (DIG)-UTP utilizando el kit de marcaje de Roche, DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (N° de catálogo 1175025), y la polimerasa de RNA T3 (Roche N° de catálogo 1031163, 1000 U; o N° de catálogo 1011171, 5000 U). El análisis cuantitativo de ribosondas marcada con DIG se realiza usando el kit de detección de ácidos nucleicos de Roche, DIG Nucleic Acid Detection Kit (N° de catálogo 1175041) y las soluciones preparadas de tampón de lavado, Roche DIG Wash y tampón de bloqueo, Block Buffer (N° de catálogo 1585762). Las sondas sentido y antisentido se preparan de acuerdo con el protocolo del fabricante (disponible en www.roche.com).

- 35 La sonda se diluye a una concentración final de 100 ng / ml en RIBOHYBE™, y se utilizan 100 µl en cada portaobjetos. La concentración óptima de la sonda debe determinarse para cada sonda. La sonda se aplica al portaobjetos utilizando el paso del "Manual Application Wet" del protocolo de DISCOVERY™. La sonda se aplica manualmente y se mezcla suavemente con el tampón de hibridación sin que se formen burbujas.

- 40 El anticuerpo anti-DIG (clon DI-22, Sigma N° de catálogo B7405) se diluyó 1:500 en diluyente de anticuerpo Ventana (n° de catálogo 251-018) y se filtró en un dispensador "Antibody" de Ventana rellenable por el usuario (n° de catálogo 770-001 a 770-050). También pueden utilizarse anticuerpos anti-DIG marcados con biotina procedentes de otras fuentes, tales como Jackson ImmunoResearch, diluido 1:4000, (www.jacksonimmuno.com).

- 45 También se utilizan controles, como sigue: (1) control de sonda - sonda sentido, (2) control de tejido - un tejido de control conocido por expresar el gen diana. El uso de controles garantiza la calidad de los resultados obtenidos. Es preferible que la conservación de RNA en los tejidos se confirme mediante la visualización de los genes altamente expresados, tales como RNAr 28S (Cleveland et al. (1980) Cell 20:95) o beta-actina (Toshii et al. J. Histochem Cytochem 43:321). Tras el establecimiento de protocolos de ISH para la visualización de las dianas control, el protocolo puede ser utilizado para dianas experimentales. A continuación se presenta el protocolo recomendado para el uso del sistema DISCOVERY™ ISH.

- 50 1. Calentamiento: pre-programado para las secciones de parafina.
2. Desparafinado: preprogramado.
3. Pretratamiento:
- a. RIBOPREP™: 30 min, 37 °C;

- b. RIBOCLEAR™: 10 min, 37 °C;
- c. acondicionamiento celular utilizando RIBOCC™: ajuste "CC1 suave";
- d. digestión enzimática con proteasa II: 2 min, 37 °C.

4 °. Hibridación:

- 5 a. aplicación de la sonda: "Manual Application Wet";
- b. desnaturalización: 10 min, 70 °C;
- c. hibridación utilizando RIBOHYBE™: 2 horas a 60 °C para el RNAm altamente expresado; 6 horas a 60 °C para RNAm medianamente expresado;
- d. lavados de astringencia: dos lavados con RIBOWASH™: 6 min. a 65 °C;
- 10 e. después del tratamiento: RIBOFIX™ durante 20 min a 37 °C;
- f. detección de señales:
 - i. anticuerpo anti-DIG: 20 min, 37 °C;
 - 15 ii. Kit potenciador de la detección V-BLUE™ (Ventana Medical Systems, Inc.; un programa aplicará automáticamente Enhanced SA-AP, Enhanced Enhancer, Enhanced NBT y Enhanced BCIP del kit): para el RNAm altamente expresado, la incubación del sustrato es de 2 horas; para RNAm medianamente expresado, la incubación del sustrato es de 5 horas.

El tiempo de reacción de V-BLUE™ debe ajustarse de acuerdo a las preferencias del usuario para el equilibrio de señal - ruido. La señal puede desarrollarse durante varias horas, pero el fondo puede seguir aumentando. Un tiempo óptimo de incubación de la ISH es normalmente 2 horas para los genes altamente expresados.

20 Ejemplo 2: Hibridación in situ automatizado con una oligosonda.

Secciones de oviducto de ratón fijadas con formalina, incluidos en parafina se procesan en pasos de pretratamiento con los siguientes reactivos de RIBOMAP™: RIBOPREP™, RIBOCLEAR, y RIBOCC™. Además, pueden utilizarse en el protocolo proteasa, I, II, o III (Ventana Medical Systems, Inc.; Nº de Catálogo 760 a 2018, 760 a 2019, y 760 a 2020, respectivamente)

- 25 A continuación, las secciones de tejido se hibridan con oligosonda sentido o antisentido del receptor de estrógenos α ($ER\alpha$) marcada con DIG utilizando el tampón de hibridación del sistema CHIPMAP™, CHIPHYBE™ (Ventana Medical Systems). Como control positivo para la conservación de RNA en las secciones de tejido, se hibridan secciones paralelas del tejido con oligosonda antisentido de RNAr 28S marcada con DIG (Yoshii et al (1995) J. Histochem Cytochem. 43: 321). Las oligosondas se sintetizan por métodos convencionales, y se marcan con un kit de marcaje fabricado por Roche Diagnostics (Indianapolis, IN).

- 30 Después de la hibridación durante cinco horas, los portaobjetos se lavan con uno a tres lavados de astringencia de RIBOWASH™ 1X-0,05X cada uno. Normalmente, habrá tres lavados de astringencia, cada uno con una solución progresivamente más diluida de RIBOWASH™. Por ejemplo, el primer lavado en condiciones de astringencia es en RIBOWASH™ 1X, el segundo en RIBOWASH™ 0,5 X, y el tercero en RIBOWASH™ 0,05X. Cada lavado se realiza a temperaturas de aproximadamente diez grados superior a la temperatura a la que la hibridación se lleva a cabo (por ejemplo, entre 47-60 °C) durante entre aproximadamente 2 y aproximadamente 30 minutos cada uno.

- 35 A continuación, las muestras se tratan con reactivo RIBOFIX™, y las señales se detectan usando anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina anti-DIG (Sigma, 1:500), se incuban durante 20 minutos, y un sistema de detección de señal de fosfatasa alcalina (kit de detección V-BLUE™). Todo tratamiento preliminar, la hibridación y los pasos de lavado se realizan en el instrumento DISCOVERY™ (Ventana Medical Systems). Finalmente, las muestras se analizaron al microscopio.

- 40 Como se muestra en la Figura 1, las secciones que no se expusieron a la sonda no muestran ninguna señal significativa. Sin embargo, las secciones que se expusieron a la oligosonda antisentido de RNAr 28S muestran un señal abundante, lo que demuestra la conservación de RNA en las secciones de oviducto de ratón. Además, la oligosonda antisentido de $ER\alpha$ muestra una localización precisa de RNAm de $ER\alpha$ en las secciones de tejido de oviducto de ratón. Mientras tanto, la oligosonda sentido $ER\alpha$ no muestra ninguna señal significativa, como se esperaba. La localización de RNAm de $ER\alpha$ en el oviducto se verificó mediante comparación con los datos publicados de los receptores de estrógenos inmunohistoquímicos (Cooke et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 94:6535).

- 50 Ejemplo 3: Protocolo para la hibridación in situ utilizando el DISCOVERY™.

ES 2 400 448 T3

Los protocolos de ISH de DISCOVERY™ pueden crearse con el programa ISH de DISCOVERY™ en el ordenador del sistema DISCOVERY™, de la siguiente manera:

1. Abrir el programa NEXES®.

5 2. Para crear un protocolo, pulsar el botón "Protocolos" en la pantalla principal. Aparecerá una ventana en la pantalla con "Crear / Editar Protocolo" y "Eliminar Protocolo". El usuario pulsa en "Crear / Editar Protocolo" para abrir la ventana "Editor de protocolos NEXES® - módulo de tinción DISCOVERY™".

3. Seleccione el procedimiento "Investigación ISH Blue Plus" del archivo "Procedimiento".

Para definir los pasos de pretratamiento:

1. Pulse en la casilla de verificación junto a "desparafinar".

10 2. Pulse en la casilla de verificación al lado de "fijador". Aparecen nuevos campos en la pantalla. En el campo "baja temperatura", seleccione "37 °C". En el campo "fijador", seleccione "RIBOPREP™". En la sección "Tiempo de incubación Plus", seleccione "20 minutos".

15 3. Pulse en la casilla de verificación junto a "Pretratamiento # 1". Dos nuevas casillas de verificación aparecen en la pantalla. Pulse en la casilla junto a "Usar tampón EZ para PT1". Dos nuevas casillas de verificación aparecen en la pantalla. Pulse en la casilla junto a "calentadores de portaobjetos para PT1-EZ". Tres nuevos campos aparecen en la pantalla. Bajo el campo "baja temperatura", seleccione "37 °C". En la sección "Pretratamiento", seleccione "RIBOCLEAR™". En "Tiempo de incubación", seleccione "10 minutos".

20 4. Pulse en la casilla de verificación al lado de "Acondicionamiento celular". Dos nuevas casillas de verificación aparecen en la pantalla. Pulse en la casilla de verificación junto a "Acondicionador # 1". Una nueva casilla de verificación aparece en la pantalla y el usuario pulsa sobre "CC1 suave". Una nueva casilla de verificación aparece en la pantalla "CC1 estándar" (el usuario no pulsa en esta casilla).

25 5. Pulse en la casilla junto a "Pretratamiento # 2". Dos nuevas casillas aparecen en la pantalla. Pulse en la casilla junto a "Usar tampón de reacción para PT2". Dos nuevas casillas aparecen en la pantalla. Pulse en la casilla junto a "calentadores de portaobjetos para PT2-RB". Tres nuevos campos aparecen en la pantalla. Bajo la casilla "baja temperatura", seleccione "37 °C". Debajo de "Enzima" seleccione "proteasa 2". En "Tiempo de incubación", seleccione "2 minutos".

Para seleccionar las condiciones de hibridación y lavado de astringencia:

30 1. Pulse en la casilla de verificación junto a "Sonda". Dos nuevas casillas de verificación aparecen en la pantalla por encima de "Sonda" y aparecen cuatro campos nuevos. Pulse en la casilla de verificación al lado de "Titulación". El "Autodispensación de sonda" desaparecerá de la pantalla y dos nuevas casillas de verificación aparecen debajo de "Titulación". Pulse en la casilla junto a "Manual Application Wet".

35 2. El panel "sonda" de la pantalla se utiliza para configurar las condiciones de desnaturalización e hibridación. Bajo el campo "temperatura alta", presentada por "desnaturalización", seleccione "65 °C" y en el campo "Tiempo de incubación para desnaturalización", seleccione "6 minutos". Bajo el campo de "baja temperatura", presentada por "hibridación", seleccione "60 °C" y en el campo de "Tiempo de incubación para hibridación", seleccione "2 horas" (expresión alta del RNAm) o "6 horas" (expresión media del RNAm).

40 3. Pulse en la casilla de verificación al lado de "lavado de astringencia # 1". Aparece un nuevo campo en la pantalla de "lavado de astringencia" y una nueva casilla de verificación al lado de "temperatura de astringencia # 1". Bajo el campo de "lavado de astringencia", seleccione "SSC 0,1 X". No haga caso de la casilla de verificación junto a "alta temperatura", y bajo la ventana de "baja temperatura", seleccione "60 °C" y en el "tiempo de incubación", seleccione "6 minutos".

4. Repita el paso 3 de "lavado de astringencia # 2".

5. Pulse en la casilla junto a "Post fijador", y aparecen dos campos nuevos en la pantalla. Bajo el campo fijador, seleccione "RIBOFIX™" y bajo "Tiempo de incubación", seleccione "20 minutos".

45 Para establecer la incubación de anticuerpos y las condiciones del kit potenciador V-BLUE™:

50 1. Pulse en la casilla junto a "anticuerpo". Dos nuevas casillas de verificación aparecen en la pantalla. Pulse en la casilla junto a "Autodispensación de anticuerpos". Dos nuevas casillas de verificación aparecen en la pantalla. Pulse en la casilla junto a "incubación estándar de anticuerpos". Dos nuevos campos aparecen en la pantalla. En el campo de "anticuerpo", seleccione el "Nº de anticuerpo (que corresponde al número en el dispensador que contiene el anticuerpo anti-DIG)". En la sección "Tiempo de incubación Plus", seleccione "20 minutos".

2. En el campo "sustrato" sin la casilla de verificación, dentro de "tiempo de incubación largo", seleccione "2 horas"

(expresión alta del RNAm) o "5 horas" (expresión media del RNAm).

Para guardar el protocolo:

- 5 1. Pulse en el botón "Guardar como". Aparecen campos con un nombre y número de protocolo. Escriba un nombre para el protocolo y seleccione un número en las casillas correspondientes. Pulse de nuevo en el botón "Cerrar" y el protocolo se guardará.

Preparación de etiquetas de código de barras y carga de portaobjetos:

- 10 1. Desde la barra de herramientas en la parte inferior de la pantalla principal, pulse en el símbolo de código de barras. Pulse en el botón "Protocolos". Resalte el número de protocolo y el nombre que desee en el campo de protocolos "seleccione DISCOVERY™". Pulse en el botón "Añadir >>" una vez para cada etiqueta de código de barras de protocolo que desee imprimir. Pulse en el botón "Cerrar / imprimir". Introduzca cualquier información adicional que desee que aparezca en la etiqueta en los campos "Preguntar al usuario". Pulse en el botón "Imprimir". Cuando el último código de barras se haya impreso, pulse en el botón "Salir".

- 15 2. Coloque el(los) código(s) de barras en el(los) portaobjetos, colóquelos con cuidado sobre el instrumento, cierre la puerta y pulse el botón "Ejecutar". Pulse en la casilla "Carga de bandeja de reactivos" y en la casilla "Abrir tapón de reactivos". Introduce el número de portaobjetos cargados y pulse en "Inicio del proceso".

La Tabla 1 enumera los posibles problemas que pueden surgir al utilizar el instrumento DISCOVERY™ para ISH y posibles soluciones.

TABLA 1: Guía de "Resolución de Problemas"

Problema	Posible causa	Siguiente paso
Sin señal	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sondas pobremente preparadas o degradadas 2. Digestión insuficiente con proteasa 3. Baja expresión génica 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Utilizar correctamente sondas frescas. 2. Utilizar una proteasa fuerte o aumentar el tiempo de digestión (puede causar mayor ruido de fondo). 3. Pruebe las sondas y protocolos sobre tejidos conocidos con alta expresión.
Señal débil y ruido de fondo bajo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Baja concentración de la sonda 2. Corto período de incubación de Sustrato 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Incrementar la concentración de la sonda. 2. Extender la incubación del sustrato.
Señal débil y ruido de fondo alto	Pobre fijación de la sonda	Extend RIBOPREP™ tiempo de incubación o muestras de recordar y fijar durante más tiempo.
Señal muy fuerte y ruido de fondo bajo	Alta concentración de sonda	Utilizar menos sonda o acortar el tiempo de incubación del sustrato V-BLUE™
Señal muy fuerte y ruido de fondo alto	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sobredigestión con proteasa 2. Alta concentración de sonda 3. Alta concentración de anticuerpo 4. Incubación larga con RIBOFIX™ 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Utilizar proteasa más débil o acortar el periodo de tiempo de digestión de la proteasa. 2. Utilizar una concentración más baja de la sonda. 3. Utilizar una concentración más baja de anticuerpos. 4. Acortar el tiempo de incubación de RIBOFIX™.
Pobre morfología de tejidos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tejidos mal fijados 2. Sobredigestión con proteasa 3. Secciones mal cortadas 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Extender el período de incubación de RIBOPREP™ o fijar nuevas muestras para un período más largo y procesar correctamente. 2. Utilizar proteasa más débil o acortar el tiempo de digestión con proteasa (si se ha digerido por más de 2 minutos). 3. Cortar secciones cuidadosamente con cuchillas nuevas.

Ejemplo 4: Preparación de CHIPPREP™ 1.

Se utiliza el siguiente equipo y reactivos:

1. Recipiente limpio, de tamaño adecuado para mezclar,
2. Sistema de filtro 0,2 µm o filtro de 0,2 µm y equipo de bombeo apropiado;
- 5 3. Equipo de mezcla apropiado para el tamaño de la preparación;
4. Cilindros graduados de tamaño apropiado de Clase A,
5. Balanza electrónica y pesos,
6. Recipiente de almacenamiento limpio, de tamaño adecuado;
7. Agua desionizada,
- 10 8. SSPE 20X (Sigma P / N S8140);
9. TWEEN® 20 (Sigma P / N P7949).

Se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Un recipiente limpio, de tamaño adecuado para mezclar etiquetado "CHIPPREP™ 1 volumen de trabajo", fechado e iniciado,
- 15 2. Se registra el tipo y el tamaño de recipiente;
3. el volumen de agua desionizada que debe añadirse se calcula a 80% del volumen final del lote de CHIPPREP™ 1, como sigue: volumen del lote x 0,8 = volumen total de agua desionizada para añadir al recipiente;
4. Mezclar de forma vigorosa usando una barra de agitación magnética;
- 20 5. Se añade el volumen necesario de SSPE 20X de tal manera que la concentración final es 6X, como sigue: volumen de lote final dividido por 20 x 6 = volumen de SSPE 20X a añadir;
6. añadir TWEEN® 20 (Sigma P / N P7949) a una concentración final de 10%, como sigue: volumen final del lote x 0,1 = volumen de Tween® 20 para añadir;
7. Mezclar durante al menos 20 minutos;
8. Añadir agua desionizada para llevar la solución hasta el volumen final del lote;
- 25 9. Mezclar durante al menos durante 30 minutos;
10. Etiquetar el contenedor de almacenamiento de una unidad de filtro de 0,2 µm con una etiqueta como "CHIPPREP™ 1 volumen final", L / N, fecha e iniciales; registrar el tipo y tamaño del recipiente de almacenamiento;
11. Filtrar la solución a través de una unidad de filtro de 0,45 µm;
12. Filtrar la solución a través del filtro de 0,2 µm unido al recipiente de almacenamiento etiquetado;
- 30 13. Almacenar la solución de CHIPPREP™ 1 a temperatura ambiente.

Ejemplo 5: Preparación y utilización de CHIPPREP™ 2.

- En una realización, CHIPPREP™ 2 comprende tampón de fosfato de cualquier concentración total de sal; material proteico (por ejemplo, gammaglobulinas, caseína, o cualquier otra proteína adecuada para el bloqueo de la unión no específica), y detergente no iónico. En una realización preferida, CHIPPREP™ 2 comprende tampón de fosfato con una concentración total de sal de 10-200 mM; gamma-globulinas de cabra al 0,5-6%; caseína hidrolizada al 5-15%, y detergente no iónico al 0,005-1%. En una realización más preferida, CHIPPREP™ 2 comprende fosfato de potasio 75 mM; fosfato de sodio 25 mM; NaCl 55 mM; gamma-globulinas de cabra al 3%; caseína hidrolizada al 13,4%, y BRIJ® 35 AL 0,05%.

- Para el uso en los ensayos descritos, dos gotas (200 µl) se aplican al portaobjetos seguido de una incubación de 30-40 minutos a temperatura ambiente. Las proteínas contenidas en CHIPPREP™ 2 cubren la superficie del portaobjetos a través de una carga no específica e interacciones hidrófobas para reducir la unión no específica a la superficie del portaobjetos de DNA / RNA diana marcado durante la hibridación. Debido a la naturaleza no específica de estas interacciones, el aumento de la energía cinética a temperaturas elevadas reduce la eficacia del bloqueo. Por lo tanto,

el tratamiento con CHIPPREP™ 2 para reducir la unión no específica de DNA / RNA diana marcado al portaobjetos se lleva a cabo a temperatura ambiente mediante la desactivación de los calentadores de portaobjetos individuales en el instrumento automático durante este pretratamiento. Tras una incubación de 30 minutos, el portaobjetos se enjuaga para eliminar cualquier proteína no unida antes de la hibridación.

- 5 Aunque la intención original de este pretratamiento fue simplemente para reducir la unión no específica de DNA / RNA diana marcado al portaobjetos, se observó durante el desarrollo de esta solución que los portaobjetos tratados con CHIPPREP™ 2 retuvieron significativamente mejor la cobertura en la superficie del portaobjetos por el tampón de hibridación en tiempos de incubación de hibridación prolongados (por ejemplo, hasta 16 horas). Además, cuando se compara con el estándar de solución de BSA al 5% utilizada comúnmente para bloquear la unión no específica, la cobertura del portaobjetos fue mejor en los portaobjetos tratados con CHIPPREP™ 2. La cobertura uniforme es esencial para la hibridación de microarrays consistente. Por lo tanto, el tratamiento del portaobjetos con CHIPPREP™ 2 antes de la hibridación se ha incorporado en el protocolo estándar en el microarray DISCOVERY™.

Ejemplo 6: Preparación de CHIPHYBE™.

- 15 La solución CHIPHYBE™ consiste preferiblemente en SSPE 6X; sal de sodio de sulfato de dextrano al 20%, peso molecular promedio de 10.000, y formamida al 10%. La formamida desionizada se puede obtener de Sigma Corp. (Producto n° F9037), así como SSPE 20X (Sigma N° de producto S8140) y la sal de sodio de sulfato de dextrano, peso molecular promedio de 10.000 (Sigma N° de producto D6924). El equipo requerido para la preparación de CHIPHYBE™ es el siguiente:

1. Recipiente limpio, de tamaño adecuado para mezclar,
- 20 2. Sistema de filtro 0,2 µm o filtro de 0,2 µm y equipo de bombeo apropiado;
3. Equipo de mezcla apropiado para el tamaño de la preparación;
4. Cilindros graduados de tamaño apropiado de Clase A,
5. Balanza electrónica y pesos,
6. Recipiente de almacenamiento limpio, de tamaño adecuado;
- 25 Se añade formamida, SSPE 20X y sulfato de dextrano al agua desionizada en los volúmenes apropiados para alcanzar las concentraciones finales correctas. Por ejemplo, si el volumen del lote es de 1 L, a continuación, a 400 ml de agua desionizada se añade formamida al 10% del volumen final (es decir, 100 ml de N° de producto F9037 de Sigma), SSPE 20X a una concentración final de 6X (es decir, 300 ml de Sigma N° de producto S8140), y 200 g de sulfato de dextrano (es decir, Sigma N° de producto D-6924). El volumen final se llevó luego a 1 L por adición de agua desionizada con mezcla. Se realiza una mezcla vigorosa durante la adición de estos constituyentes. La solución se envasa en recipientes de líquidos compatibles con el sistema de hibridación automatizada DISCOVERY™.
- 30

Ejemplo 7: Kit CHIPMAP™.

- 35 El kit CHIPMAP™ de DISCOVERY™ proporciona reactivos para la hibridación de una diana marcada para un microarray de DNA utilizando el instrumento DISCOVERY™ de Ventana.

- Como se describió anteriormente, la capacidad de propagar el tampón de manera uniforme sobre toda la superficie de una matriz es crítico para la automatización de la reacción de hibridación sobre un portaobjetos de vidrio. Los reactivos de pretratamiento proporcionados en el kit CHIPMAP™ preparan la superficie de la matriz y, en combinación con el tampón de hibridación especialmente formulado, aseguran una cobertura uniforme de la superficie del microarray diana marcado. Además, estos reactivos se han formulado de manera que su uso combinado proporciona una reducción de la unión no específica, lo que resulta en una señal mejorada. La automatización del proceso de hibridación en el sistema DISCOVERY™ reduce la variación entre portaobjetos, disminuye el tiempo de hibridación, y aumenta la relación señal - ruido.

En una realización, al menos uno de cada uno de los siguientes componentes se incluye en el kit:

- 45 1. CHIPPREP™ 1 (potenciador de la propagación, almacenado a temperatura ambiente),
2. CHIPPREP™ 2 (potenciador de la propagación y solución de bloqueo, almacenado a temperatura ambiente hasta que se abre, a continuación, 2-8 °C);
3. CHIPHYBE™ (tampón de hibridación, almacenado a temperatura ambiente);
4. CHIPCLEAN™ (solución de limpieza de microarrays),
- 50 5. (El kit puede contener opcionalmente) dispensadores rellenables por el usuario

6. Prospecto que contienen instrucciones de uso.

Reactivos adicionales necesarios pero no necesariamente incluidos en el kit:

1. LCS™ (Ventana N° de catálogo 650-010);
2. EZ PREP™ (Ventana N° de catálogo 950-100);
- 5 3. RIBOWASH™ (Ventana N° de catálogo 760-105);
4. Tampón de Reacción (Ventana N° de catálogo 760-105).

Otros Materiales necesarios pero no suministrados por Ventana Medical Systems, Inc.:

1. microarrays;
2. diana marcada,
- 10 3. centrifugadora o pistola de nitrógeno.

CHIPPREP™ 1, CHIPPREP™ 2, y CHIPCLEAN™ se transfieren a dispensadores Ventana rellenables por los usuarios. Antes de transferir el contenido, el usuario debe leer las instrucciones que aparecen en el prospecto que acompaña al dispensador. Otras instrucciones se proporcionan a continuación.

Ejemplo 8 Síntesis y marcaje de dianas para la hibridación automatizada de microarrays.

- 15 La preparación adecuada y el marcaje de la diana de ácido nucleico es esencial para obtener resultados consistentes de hibridación. Un método común de marcaje de dianas es la transcripción inversa utilizando una mezcla de nucleótidos trifosfato (dNTP), que incluye el nucleótido marcado fluorescentemente. Se puede utilizar RNA total o RNA poliA (RNAm) como material de partida para la transcripción inversa.

- 20 El sistema DISCOVERY™ de Ventana ha sido evaluado para su uso tanto con dianas directamente marcadas (por ejemplo, con incorporación de nucleótidos de cianina, tales como Cy3-dUTP o Cy5-dUTP) y dianas indirectamente marcadas (por ejemplo, marcaje por incorporación de aminoalil-dUTP, seguido por el acoplamiento de los tintes monofuncionales fluorescentes Cy3 o Cy5, activados con N-hidroxisuccinimida). Independientemente del procedimiento de marcaje elegido, se recomienda que 0,5-2,0 mg de diana marcada se aplique a cada array como un punto de partida en el sistema de hibridación DISCOVERY™.

- 25 Se recomiendan dos protocolos de marcaje de dianas. El protocolo de amplificación se utiliza cuando la cantidad de RNA es limitada y requiere amplificación. El protocolo de amplificación no se utiliza cuando la cantidad de RNA disponible no es un factor limitante. En el protocolo de amplificación, el RNA total se convierte en DNAc de doble hebra (dscDNA). El dscDNA se somete entonces a la transcripción in vitro (es decir, la amplificación). El material transcrito in vitro se convierte entonces en una sonda de DNA marcada de cadena sencilla (ssDNA). Se analiza a
- 30 continuación la calidad de la diana. Por otro lado, en el protocolo de no-amplificación, el RNA total se convierte directamente en sonda de DNA marcada, sin un paso intermedio de amplificación, y se determina la calidad de la población diana.

- 35 En el paso donde el material transcrito in vitro o RNA total se convierte en ssDNA marcado (paso 3 en el siguiente protocolo de amplificación), se utiliza el mismo el protocolo de marcaje. Se puede utilizar como material de partida 4 µg de cRNA o 20 µg de RNA total, manteniendo el resto de cantidades igual (incluyendo la cantidad de cebadores hexámeros aleatorios).

Se describe a continuación un ejemplo de síntesis de dianas adecuadas y un protocolo de marcaje.

Paso 1: Preparación de cDNA de doble cadena.

a. Síntesis de la primera cadena de cDNA utilizando cebadores poli dT

- 40 i. Mezclar 10 µl de RNA total (5-10 µg) con 1 µl de cebador T7-(T) 24 (100 pmol / µl); secuencia de cebador (cebadores específicos):

GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-T (24)

ii. Calentar a 70 ° C durante 10 minutos; poner en hielo.

iii. Añadir, en hielo, la mezcla de RNA / cebador:

- 45 1) 4 µl de tampón 5X de la primera cadena;

ES 2 400 448 T3

- 2) 2 μ l de DTT 0,1 mM;
- 3) 1 μ l de dNTP 10 mM.
- iv. Incubar a 37 °C durante dos minutos.
- v. Añadir 2 μ l de SuperScript II (SSII).
- 5 vi. Incubar a 37 °C durante una hora, y colocar en hielo.
(Nota: tampón de primera cadena, DTT 0,1 mM y SSII están disponibles como un kit (Gibco N ° de catálogo 18064-014))
- b. Síntesis de la segunda cadena de cDNA
 - i. Ajustar la máquina de PCR o baño de agua a 16 °C.
 - 10 ii. Añadir lo siguiente al tubo de la primera cadena:
 - 1) 91 μ l de agua Gibco (Gibco n ° de catálogo 10977)
 - 2) 30 μ l de tampón 5X de segunda cadena (Gibco N° de catálogo 10812014)
 - 3) 3 μ l de mezcla de dNTP 10 mM (Gibco N° de catálogo 18427-013)
 - 4) 1 μ l de E. coli ligasa (Gibco N° de catálogo 18052-019)
 - 15 5) 4 μ l de E. coli DNA polimerasa I (Gibco N° de catálogo 18010-017)
 - 6) 1 μ l de E. coli RNasa. H (Gibco N° de catálogo 18021-014)
 - iii. Incubar a 16 °C durante dos horas.
 - iv. Terminar la reacción mediante la adición de 10 μ l de EDTA 0,5 M y colocar los tubos en hielo.
- c. Limpieza de dscDNA
 - 20 i. Añadir a la reacción dscDNA (150 μ l) un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) (Gibco N ° de catálogo 15593-031) y agitar al vórtex durante 30 segundos.
 - ii. Centrifugar los tubos con gel de bloqueo de fase (Eppendorf 5 prime N° Catálogo 32007953) durante un minuto a velocidad máxima.
 - 25 iii. Añadir el cDNA más la mezcla de fenol a los tubos con gel de bloqueo de fase centrifugados y centrifugar dos minutos a 14.000 rpm.
 - iv. Transferir la fase superior a un tubo nuevo (~ 150 μ l).
 - v. Añadir 113 μ l de MH_4Oac 5 M (Ambion número de catálogo 90706) y mezclar con una punta de pipeta.
 - vi. Añadir 660 μ l de EtOH al 100% (almacenada a -20 °C) (Sigma N ° de catálogo E702-3).
 - vii. Mezclar invirtiendo varias veces y centrifugar durante 30 minutos a 14.000 rpm a 16 °C
 - 30 viii. Cuidadosamente verter EtOH (el pellet debe ser visible) y lavar el pellet con 500 μ l de EtOH al 80% (almacenado a -20 °C).
 - ix. Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos a 16 °C.
 - x. Eliminar el EtOH y secar al aire el pellet durante unos cinco minutos (el pellet se pueden almacenar a -20 °C).
 - xi. Resuspender el pellet en 8 μ l de agua Gibco.
- 35 Paso 2: Transcripción in vitro.
 - a. Utilizar el kit Ambion Megascript T7 (Ambion N° de Catálogo 1334))
 - i. Descongelar todos los reactivos excepto la mezcla de enzimas.
 - ii. Mezclar la mezcla de dNTP (por tubo):

ES 2 400 448 T3

- 1) 2 µl de ATP 75 mM
 - 2) 2 µl de CTP 75 mM
 - 3) 2 µl de GTP 75 mM
 - 4) 2 µl de UTP 75 mM
 - 5) 2 µl de tampón T7 10X
 - 6) 2 µl de enzima T7 10X
- iii. Añadir 12 µl de la mezcla de 8 µl de cDNA y mezclar bien.
- iv. Incubar a 37 °C durante 6 horas en la máquina de PCR y después mantener a 4 °C si la incubación se realiza durante la noche.
- 10 b. Limpieza IVT
- i. Utilizar el kit de purificación de RNA RNEasy (Qiagen número de catálogo 74104) y seguir el protocolo que se suministra con el producto.
- c. Determinar la concentración de cRNA mediante la lectura de la DO a 260/280 utilizando la siguiente fórmula de conversión: $A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 40 = \text{___ } \mu\text{g / ml}$. El paso de amplificación debe proporcionar un aumento de 3-5 veces la cantidad de RNA disponible para el marcaje (con material de partida de 5-10 µg).
- 15 Paso 3: Protocolo para el marcaje de cRNA o RNA celular total.
- a. Mezclar 4 µg de cRNA (desde el protocolo anterior) con 4 µg de hexámeros aleatorios (Operon Technologies N ° de catálogo SP200-10D) y llevar el volumen hasta 14 µl con agua Gibco.
 - b. Incubar a 70 °C durante 10 minutos y poner en hielo. Añadir, en hielo, a la mezcla de cRNA / cebador:
 - 20 i. 6 µl de tampón de primera cadena 5X (Gibco)
 - ii. 3 µl de DTT 0,1 M
 - iii. 0,6 µl de mezcla de dNTP 50X (mezcla de dNTP 50X: concentración final dCTP 25 mM, dGTP 25 mM y dTTP 10 mM; Roche n ° de catálogo 1969064; todas las soluciones madre de nucleótidos son 100 mM)
 - iv. 1,4 µl de agua Gibco
 - 25 v. 1 µl de SSII (Gibco)
 - c. Añadir 3 ml de Cy3-dUTP 1 mM (100 mM final (NEN N ° de catálogo NEL578) o Cy5-dUTP 1 mM (NEN N ° de catálogo 577)).
 - d. Incubar a 42 °C durante 30 minutos y añadir 1 µl de SSII.
 - e. Incubar durante una hora adicional a 42 °C.
 - 30 f. Poner las muestras en hielo.
 - g. Degradación de RNA
 - i. Añadir 1,5 µl de NaOH 1M, solución EDTA 2 mM (debe prepararse fresca cada mes) por tubo y se incuba a 65 °C durante diez minutos. Poner las muestras en hielo.
 - h. Limpieza de ssDNA
 - 35 i. Añadir 500 µl de Tris 10 mM pH 7,4 a la sonda marcada y aplicarlo a la columna Microcon 30 (Millipore N ° de catálogo 42410).
 - ii. Centrifugar a 12.000 x g durante seis minutos (descartar el eluido).
 - iii. Invertir la columna microcon en el tubo limpio y centrifugar durante un minuto a 1.000 xg para recoger la muestra.
 - 40 iv. Utilizar un kit de purificación QiaQuick (Qiagen n ° de catálogo 28104) y seguir el protocolo que se suministra

con el producto.

Paso 4: Análisis de la calidad de la diana.

5 Se diluye 20 veces la diana marcada y se mide la DO para Cy3 y Cy5 como sigue. Para la sonda Cy3, se mide A_{260} y A_{550} . A_{260} se utiliza para calcular la concentración de diana como se describe en el Paso 2. A_{550} es una medida de la eficiencia de marcaje. La A_{550} típica está entre 0,4 o más (con la dilución de 20 veces). Para la sonda de Cy5, se mide A_{260} y A_{650} . La A_{650} típica está entre 0,03 o más (con la dilución de 20 veces).

10 Después de asegurarse que la diana sea de suficiente calidad, se continua con el protocolo de hibridación. Cuando se empieza con 20 μg de RNA total, es normal obtener aproximadamente 5 μg de diana marcada (equivalente a $A_{260} = 0,16$). Cuando se empieza con 4 μg de cRNA, es normal obtener aproximadamente 2 μg de diana marcada (equivalente a $A_{260} = 0,07$). Después de marcar la diana se termina normalmente con aproximadamente el 25% del material de partida.

La diana marcada preparada como se ha descrito anteriormente puede diluirse en CHIPHYBE™ y aplicarse a los arrays tal como se describe a continuación.

Paso 5: Fragmentación de la diana.

15 Si la diana marcada se prepara directamente a partir de RNAm usando cebadores poli-dT (en lugar de hexámeros aleatorios), la longitud de los cDNA es significativamente mayor que cuando se utilizan los cebadores aleatorios. Las dianas de longitud grande tienen una mayor tendencia a unirse no específicamente al portaobjetos de vidrio, dando lugar a una señal de fondo "granular" que puede interferir con el análisis. Este problema se puede superar mediante la fragmentación del cDNA diana antes de su aplicación. Por lo tanto, si se utilizan cDNA diana grandes, es preferible la fragmentación de las dianas. Los pasos para la fragmentación de dianas son los siguientes.

a. Mezclar en un tubo: 79 μl de agua libre de RNasa / DNasa (Gibco N° de catálogo 10977); 20 μl de tampón 5X de la primera cadena (Gibco N° de catálogo 18064-014), y, 1 μl de DNasa I (Ambion N° de catálogo 2222)

b. Añadir 1 μl de la mezcla anterior a 30 μl de sonda e incubar a 37 °C durante 15 minutos.

c. Desnaturalizar a 95 °C durante cinco minutos para desnaturalizar la enzima y poner en hielo.

25 Ejemplo 9: Protocolo para la hibridación de microarrays utilizando DISCOVERY™.

Se recomienda que el array inicial se ejecuta en el sistema siguiendo el protocolo descrito a continuación. Basándose en los resultados obtenidos en estas condiciones, el protocolo puede modificarse para afinar cualquier parámetro necesarios para optimizar las condiciones para las aplicaciones en arrays particulares. Para ejecutar la aplicación en la plataforma DISCOVERY™, se siguen los siguientes pasos:

30 1. Abrir el programa NEXES®.

2. Crear un protocolo pulsando en el botón "Protocolos" en la pantalla principal. Aparece un cuadro de diálogo en la pantalla que pone "Crear / editar protocolo" y "Eliminar protocolo". Pulse en "Crear / editar protocolo" para abrir la ventana del "Editor de protocolos Nexes®".

3. Seleccione el procedimiento "microarrays" de acuerdo con la ventana "Procedimiento".

35 4. Los pasos de pretratamiento que utiliza CHIPPREP™ 1 y 2 de forma sucesiva se realizan automáticamente en el sistema DISCOVERY™, y no son seleccionables.

40 5. Establecer las condiciones de hibridación: pulsar en la casilla junto a "Sonda". Aparecen dos nuevas casillas en la pantalla por encima de "Sonda" y aparecen cuatro nuevas ventanas. Pulse sobre la casilla al lado de "Titulación" (por encima de la casilla "Sonda" que acaba de seleccionar). El "Autodispensador de sondas" desaparecerá de la pantalla y dos nuevas casillas aparecerán debajo de "Titulación". Pulse en la casilla junto a "Manual Application Wet".

45 6. La ventana "sonda" sirve para configurar las condiciones de desnaturalización y de hibridación. Bajo la ventana de "alta temperatura" de la "desnaturalización", seleccione "70 °C" y en la ventana "tiempo de incubación de la desnaturalización", seleccione "6 minutos". No se recomienda exceder la temperatura de desnaturalización de 70 °C en más de 6 minutos. Bajo la ventana de "baja temperatura" para la "hibridación", seleccione "42 °C" (se debe mantener entre 42 °C - 50 °C para las dianas de DNA) y bajo la ventana de "tiempo de incubación de la hibridación", seleccione "6 horas".

50 7. Pulse en la casilla junto a "lavado de astringencia # 1". Una nueva ventana de "lavado de astringencia" y una casilla junto a "astringencia de alta temperatura # 1" aparece en la pantalla. Baja la ventana de "lavado de astringencia", seleccione "1X SSC". Ignore la casilla junto a "alta temperatura", bajo la ventana de "baja

temperatura" seleccione "42 grados" y bajo la ventana de "tiempo de incubación", seleccione "10 min".

8. Repita los pasos anteriores para "lavado de astringencia # 2" y "lavado de astringencia # 3".

9. Pulse en la casilla junto a "CHIPCLEAN™".

5 10. Guarde el protocolo pulsando en el botón "Guardar como". Aparece una ventana para poner un nombre de protocolo y número de protocolo. Escriba un nombre para el protocolo y seleccione un número en las casillas correspondientes. Pulse en el botón "Cerrar" de nuevo y el protocolo se guardará.

10 11. Prepare las etiquetas y cargue los portaobjetos de la siguiente manera: En la barra de herramientas en la parte inferior de la pantalla principal, pulse en el símbolo de código de barras. Pulse en el botón "Protocolos". Resalte el número de protocolo y el nombre deseado en la ventana de protocolos "Seleccionar DISCOVERY™". Pulse en el botón "Añadir >>" una vez para cada etiqueta de código de barras de protocolo que desee imprimir. Pulse en el botón de "Cerrar / imprimir". Cualquier información adicional que debe aparecer en la etiqueta se introduce en los cuadros de preguntas al usuario. Pulse en el botón "Imprimir". Cuando el último código de barras se ha impreso, pulse en el botón "Salir". A continuación, asegúrese de que todos los contenedores de solución están debidamente rellenos. Para un programa de 20 portaobjetos del procedimiento de microarrays, el contenedor SSC 2X debe estar completamente lleno con RIBOWASH™.

15

12. Coloque el código de barras en la portaobjetos (s), colóquelos con cuidado en el instrumento, cierre la puerta y pulse el botón "Ejecutar". Pulse en la casilla "Bandeja de reactivos / reactivo cargada" y "Tapones de reactivos eliminados". Introduzca el número de portaobjetos cargados y pulse en "Ejecutar".

20 13. Tras el pretratamiento automatizado de los portaobjetos con el primer potenciador de propagación (CHIPPREP™ 1) y después con la solución de bloqueo (CHIPPREP™ 2), la diana marcada se aplica manualmente a los portaobjetos. Normalmente, debe diluirse 0,5-2 µg de diana marcada en 200 µl de CHIPHYBE™ y se aplica a los portaobjetos. Toda la solución se debe aplicar a los portaobjetos presentación tocando el portaobjetos de vidrio con la punta de la pipeta justo debajo del borde de la etiqueta de código de barras en el portaobjetos. La mezcla de hibridación se pipetea entonces sobre el portaobjetos, teniendo cuidado de evitar burbujas. El protocolo de hibridación automatizada se completa entonces.

25

30 14. Cuando se completa el proceso, los portaobjetos se retiran cuidadosamente del instrumento y la parte trasera de los portaobjetos se limpian utilizando KIMWIPES™ (Kimberly-Clark, Inc.). Los portaobjetos se colocan con el código de barras hacia abajo en el soporte de portaobjetos en tampón de reacción. Los portaobjetos se lavan por inmersión en dos cambios de tampón de reacción 30 veces, seguido de 30 inmersiones en agua (dos recipientes separados), después se seca de inmediato, ya sea insuflando el agua de la superficie del array con una pistola de nitrógeno o mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos. Tras el secado, los portaobjetos deben almacenarse en un recipiente a prueba de luz hasta su escaneado.

Ejemplo 10: Comparación de hibridación automatizada con un método manual.

35 Los resultados de un experimento ejemplar se muestran en la Figura 2. La figura muestra los resultados de un estudio comparativo que demuestra la sensibilidad superior de hibridación automatizada en el instrumento DISCOVERY™ en comparación con las técnicas manuales. Los datos se generaron a partir de 19 genes diferentes en ocho microarrays: cuatro ejecutados de forma manual y cuatro mediante el método automatizado. Como se muestra en la Figura 2, la hibridación automatizada de acuerdo con la invención produce una señal significativamente superior a la proporción de señal respecto al ruido de fondo que con el protocolo manual para la gran mayoría de los 19 genes analizados.

40

El coeficiente de variación en los cuatro microarrays, comparando la hibridación automatizada en el instrumento DISCOVERY™ frente a dos hibridaciones manuales, se muestra a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1: Coeficiente de Variación (CV): Hibridación Manual vs Automatizada

	% CV
DISCOVERY™	15,1
Manual1	16,7
Manual 2	19,4

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa, que comprende SSPE 4X-8X y sorbitán de polioxietileno al 8-12% (20).
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende SSPE 6X y sorbitán de polioxietileno al 10% (20).
- 5 3. Una composición acuosa que comprende tampón fosfato con una concentración total de sal de 10-200 mM, gammaglobulinas de cabra al 0,5-6%, caseína hidrolizada al 5-15% y detergente no iónico al 0,005-1%.
4. La composición de la reivindicación 3, que comprende fosfato de potasio 75 mM, fosfato de sodio 25 mM, NaCl 55 mM, gamma-globulinas de cabra al 3%, caseína hidrolizada al 13,4%, y 0,05% de lauril éter de polioxietileno (23).
5. Un kit de reactivos para utilizar en la hibridación automatizada de microarrays, que comprende:
 - (a) una composición acuosa, que comprende SSPE 4X-8X y sorbitán de polioxietileno al 8-12% (20);
 - 10 (b) una composición acuosa, que comprende tampón fosfato con una concentración total de sal de 10-200 mM, gammaglobulinas de cabra al 0,5-6%, caseína hidrolizada al 5-15%, y detergente no iónico al 0,005-1%,
 - (c) una composición acuosa, que comprende SSPE 2-6X, sal de sodio de sulfato de dextrano 17,5-22,5% peso molecular promedio de 10000, y formamida al 10-50%, y
 - 15 (d) una composición acuosa, que comprende detergente de limpieza de microarrays al 0,1-5%, que comprende tensioactivos aniónicos y no iónicos biodegradables, sin fosfato.
6. El kit de reactivos de la reivindicación 5, que comprende:
 - (a) una composición acuosa, que comprende SSPE 6X y sorbitán de polioxietileno al 10% (20);
 - (b) una composición acuosa, que comprende fosfato de potasio 75 mM, fosfato de sodio 25 mM, NaCl 55 mM, gamma globulinas de cabra al 3%, caseína hidrolizada al 13,4% y detergente de bloqueo al 0,05%;
 - 20 (c) una composición acuosa, que comprende SSPE 6X, sal sódico de sulfato de dextrano al 20%, peso molecular promedio de 10000, y formamida al 10%, y
 - (d) una composición acuosa, que comprende detergente de limpieza de microarrays al 1%.
7. Un método automatizado para la hibridación in situ, que comprende:
 - 25 (a) exponer una muestra de tejidos o de células o una solución de prehibridación que incluye una solución de prehibridación primaria acuosa que comprende cloruro sódico al 0,15-1,5 M, fosfato de sodio dibásico 8-80 mM, fosfato de sodio monobásico 2-20 mM, EDTA 1-10 mM, condensado de óxido de etileno octilfenol al 0,0125-0,125%, lauril éter de polioxietileno al 0,00375-0,0375% (23), y formalina al 10-40%, y una solución de prehibridación secundaria que comprende HCl 0,3 N;
 - 30 (b) exponer la muestra a un reactivo de acondicionamiento celular que comprende citrato sódico al 0,4-8,2 mM, ácido cítrico 1,8-10 mM, conservante de acondicionamiento celular al 0,1-1%, que comprende además 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona, 2-metil-4-isotiazolin-3-ona, glicol modificado, y carboxilato de alquilo, y detergente de acondicionamiento celular al 0,05-5%, que comprende además sorbitán de polioxietileno (20);
 - 35 (c) exponer la muestra a una sonda de ácido nucleico en una solución de hibridación, la solución de hibridación incluye una solución de hibridación in situ que comprende SSPE 2X, sal sódica de sulfato de dextrano al 20%, peso molecular promedio 10000, formamida al 80%, y detergente no iónico al 0,05% que comprende lauril éter de polioxietileno (23), o una solución de hibridación de microarrays que comprende SSPE 6X, sal sódica de sulfato de dextrano al 20%, peso molecular promedio 10000, formamida al 10%;
 - 40 (d) exponer la muestra a una solución de lavado que comprende cloruro sódico al 0,1-0,5 M, fosfato dibásico 5-30 mM, fosfato de sodio monobásico 1-10 mM, EDTA 0,5-5 mM y un primer detergente no iónico al 0,01-0,1% y un segundo detergente no iónico al 0,0025-0,025% ;
 - 45 (e) exponer la muestra a una solución de fijación post-hibridación que comprende cloruro sódico al 0,15-1,5 M, fosfato de sodio dibásico 8-80 mM, fosfato de sodio monobásico 2-20 mM, EDTA 1-10 mM, condensado de óxido de etileno octilfenol al 0,0125-0,125%, lauril éter de polioxietileno al 0,00375-0,0375% (23) y formalina al 10-40%, y.
 - (f) analizar la muestra para la hibridación entre la sonda y un ácido nucleico diana; en el que los pasos (a) - (e) se realizan utilizando un instrumento automatizado.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la primera solución de prehibridación comprende cloruro de sodio 0,3 M, fosfato de sodio dibásico 16 mM, fosfato de sodio monobásico 4 mM, EDTA 2 mM; condensado de óxido de

etileno octofenol al 0,025%, lauril éter de polioxietileno (23) al 0,0075% y formalina al 30%.

- 5 9. El método de la reivindicación 7, en el que el reactivo de acondicionamiento celular comprende citrato sódico al 8,2 mM, ácido cítrico al 1,8 mM, conservante de acondicionamiento celular al 0,05%, que comprende además 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona, 2-metil-4-isotiazolin-3-ona, glicol modificado, y carboxilato de alquilo, y detergente de acondicionamiento celular al 0,1%, que comprende además sorbitán de polioxietileno (20).
10. El método de la reivindicación 7, en el que la solución de lavado comprende cloruro de sodio 0,3 M, fosfato de sodio dibásico 16 mM, fosfato de sodio monobásico 4 mM, EDTA 2 mM, primer detergente no iónico 0,025%, y segundo detergente no iónico 0,0075%.
- 10 11. El método de la reivindicación 7, en el que la solución de fijación post-hibridación comprende cloruro de sodio 0,3 M, fosfato de sodio dibásico 16 mM, fosfato de sodio monobásico 4 mM, EDTA 2 mM, condensado de óxido de etileno octofenol al 0,025%, lauril éter de polioxietileno al 0,0075% (23), y formalina al 30%.
12. El método de la reivindicación 7, que comprende:
- (a) exponer una muestra de tejido o celular a la composición que comprende cloruro de sodio 0,3 M, fosfato de sodio dibásico 16 mM, fosfato de sodio monobásico 4 mM, EDTA 2 mM, condensado de óxido de etileno de octilfenol 15 0,025%, y lauril éter de polioxietileno al 0,0075% (23), y formalina al 30%;
- (b) exponer la muestra a una composición que comprende HCl 0,3 N;
- (c) exponer la muestra a una composición que comprende citrato sódico 8,2 mM, ácido cítrico 1,8 mM, conservante de acondicionamiento celular al 0,05%, que comprende además de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona, 2-metil-4-isotiazolin-3-ona, glicol modificado, y carboxilato de alquilo, y detergente de acondicionamiento celular al 0,1%, que 20 comprende adicionalmente. sorbitán de polioxietileno (20),
- (d) exponer la muestra a una sonda de ácido nucleico en una composición que comprende SSPE 2X, sal sódico de sulfato de dextrano al 20%, peso molecular promedio 10000, formamida al 80%, y detergente no iónico al 0,05% que comprende lauril éter de polioxietileno (23);
- (e) exponer la muestra a una composición que comprende cloruro de sodio 0,3 M, fosfato de sodio dibásico 16 mM, fosfato de sodio monobásico 4 mM, EDTA 2 mM, condensado de óxido de etileno octofenol al 0,025%, lauril éter de polioxietileno al 0,0075% (23), y formalina al 30%, y un segundo detergente de lavado no iónico al 0,0075%; 25
- (f) exponer la muestra a una composición que comprende cloruro de sodio 0,3 M, fosfato de sodio dibásico 16 mM, fosfato de sodio monobásico 4 mM, EDTA 2 mM; condensado de óxido de etileno octofenol al 0,025%, lauril éter de polioxietileno al 0,0075% (23) y formalina al 30%, y
- (g) analizar la muestra para la hibridación entre la sonda y un ácido nucleico diana; en el que los pasos (a) - (f) se realizan usando un instrumento automatizado. 30
13. Un método para la hibridación automatizada de microarrays, que comprende:
- (a) exponer un microarray a una solución de potenciador de la propagación que comprende SSPE 4X-8X y sorbitán de polioxietileno al 8-12% (20);
- 35 (b) exponer el microarray a una solución de bloqueo que comprende tampón de fosfato con concentración de sal total de 10-200 mM, gammaglobulinas de cabra al 0,5-6%, caseína hidrolizada al 5-15%, y detergente no iónico al 0,005-1%,
- (c) exponer el microarray a un ácido nucleico diana en una solución de hibridación que incluye una solución de hibridación in situ que comprende SSPE 2X, sal sódica de sulfato de dextrano al 20%, peso molecular promedio de 10.000, formamida al 80%, y detergente no iónico al 0,05%, o una solución de hibridación de microarrays que comprende SSPE 6X, sal sódica de sulfato de dextrano al 20%, peso molecular promedio de 10.000, y formamida al 10 %, 40
- (d) exponer el microarrays a una solución de lavado que comprende cloruro sódico 0,1-0,5 M, fosfato de sodio dibásico 5-30 mM, fosfato de sodio monobásico 1-10 mM, EDTA 0,5-5 mM, un primer detergente no iónico al 0,01-0,1% y un segundo detergente no iónico al 0,0025-0,025%; 45
- (e) exponer el microarray a una solución de limpieza de microarray que comprende agua y tensioactivos aniónicos y no iónicos biodegradables, sin fosfato al 0,1-5%, y
- (f) analizar el microarray para hibridación entre una sonda de ácido nucleico y el ácido nucleico diana; en el que los pasos (a), (b), (d) y (e) se realizan utilizando un instrumento automatizado.
- 50 14. El método de la reivindicación 13, en el que la solución potenciadora de la propagación es la composición de la

reivindicación 2.

15. El método de la reivindicación 13, en el que la solución de lavado comprende cloruro de sodio 0,3 M, fosfato de sodio dibásico 16 mM, fosfato de sodio monobásico 4 mM, EDTA 2 mM, primer detergente no iónico al 0,025%, y segundo detergente no iónico al 0,0075%.

5 16. El método de la reivindicación 13, en el que la solución de limpieza de microarrays comprende tensioactivos aniónicos y no iónicos biodegradables, sin fosfato al 1%.

17. El método de la reivindicación 13, que comprende:

(a) exponer un microarray para la composición de la reivindicación;

10 (b) exponer la microarray a una composición que comprende fosfato de potasio 75 mM, fosfato de sodio 25 mM, NaCl 55 mM, gamma-globulinas de cabra al 3%, caseína hidrolizada al 13,4%, y lauril éter de polioxietileno al 0,05% (23);

15 (c) exponer el microarray a un ácido nucleico diana en una solución de hibridación que incluye una solución de hibridación in situ que comprende SSPE 2X, sal sódica de sulfato de dextrano al 20%, peso molecular promedio de 10.000, formamida al 80%, y detergente no iónico al 0,05%, o una solución de hibridación de microarrays que comprende SSPE 6X; sal sódica de sulfato de dextrano al 20%, peso molecular promedio de 10.000, y formamida al 10%,

(d) exponer el microarray a una composición que comprende cloruro de sodio 0,3 M, fosfato de sodio dibásico 16 mM, fosfato de sodio monobásico 4 mM, EDTA 2 mM, primer detergente no iónico al 0,025%, y segundo detergente no iónico al 0,0075%;

20 (e) exponer el microarray a una composición que comprende tensioactivos aniónicos y no iónicos biodegradables, sin fosfato al 1%, y

(f) analizar el microarray para la hibridación entre una sonda de ácido nucleico y el ácido nucleico diana; en el que los pasos (a), (b), (d) y (e) se realizan utilizando un instrumento automatizado.

Hibridación in situ utilizando oligosondas

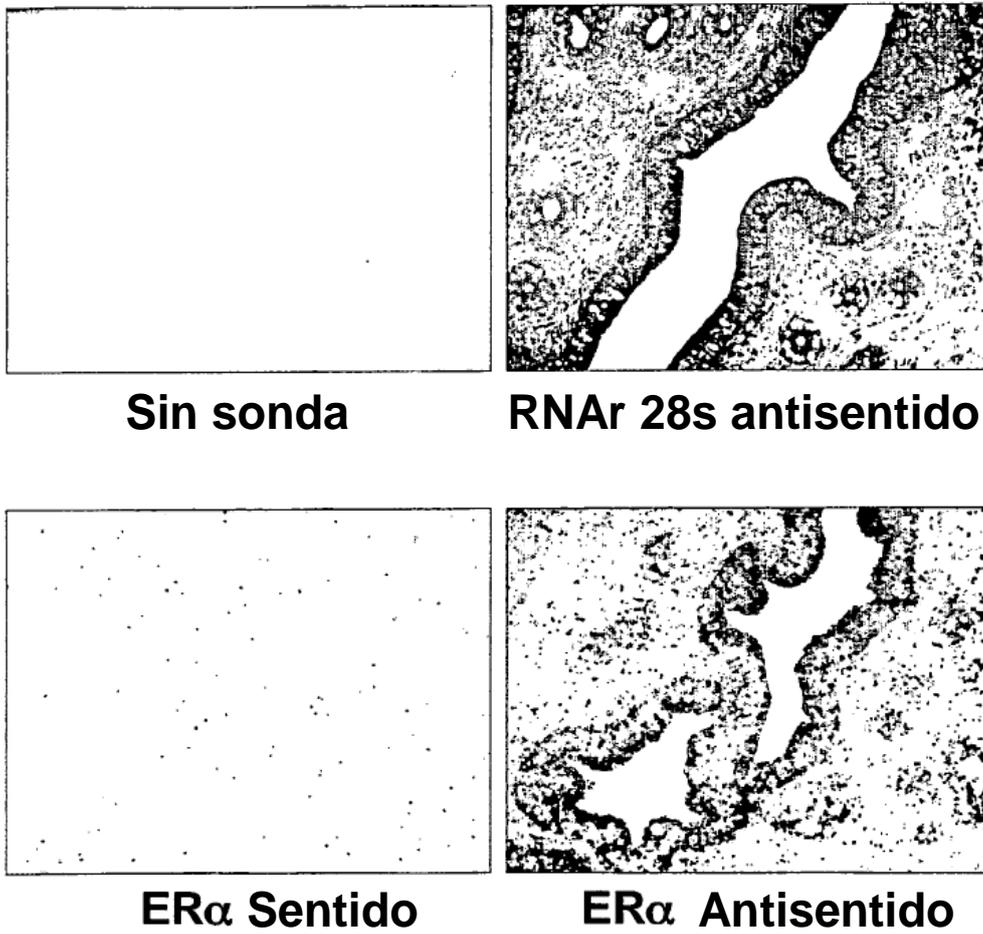


Fig. 1

FIGURA 2

Comparación de las técnicas de hibridación manual y con DISCOVERY™ (señal vs ruido de fondo)

