

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 765**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2008 E 08749214 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2147120**

54 Título: **Lisis y transcripción inversa mejoradas para la cuantificación de ARNm**

30 Prioridad:

03.05.2007 EP 07008961

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

03.07.2014

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH y

TATAA BIOCENTER AB (50.0%)

72 Inventor/es:

BENGTSSON, MARTIN;

KUBISTA, MICHAEL;

STAHLBERG, ANDERS y

STROEMBOM, LINDA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 472 765 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

Lisis y transcripción inversa mejoradas para la cuantificación de ARNm

5 Ámbito técnico

La presente invención proporciona un procedimiento para mediciones de ARNm. Mediante el uso de una PCR cuantitativa, junto con procedimientos optimizados de recolección celular, análisis y transcripción inversa, el método permite el estudio del número de transcritos, las distribuciones y las correlaciones, y la inducción génica incluso a nivel de una única célula.

Antecedentes de la técnica anterior

Las células de una población son en muchos aspectos únicas por sus características, incluso en un cultivo o un tejido aparentemente homogéneo. Los niveles de expresión génica muestran importantes variaciones entre una célula y otra, debido a fuentes de factores externos (extrínsecos) e internos (intrínsecos) [1]. Asimismo, cuando se exponen a estímulos idénticos, las células a menudo se comportan estocásticamente [1 - 7]. Esto significa que no puede asumirse que los datos obtenidos a partir de una población de células reflejen el comportamiento de la célula individual. Se ha sugerido que las células pueden responder a los estímulos mediante explosiones en la actividad transcripcional y operan como un interruptor binario [4 - 9]; es decir, en una forma de todo o nada.

Para determinar si los transcritos son expresados en paralelo (elevada expresión al mismo tiempo) o antiparalelo (uno está alto cuando el otro está bajo), se requiere un análisis de la transcripción a nivel de la célula individual. Cuando se analizan grupos de células al mismo tiempo se pierde información importante. Por ejemplo, no es posible discriminar entre un pequeño cambio en la transcripción génica que se produce en cada célula por oposición a cambios importantes únicamente en unas pocas células. Adicionalmente, la heterogeneidad celular de los tejidos hace difícil el análisis específico del tipo celular. Estas cuestiones se resuelven mediante mediciones en las células individuales.

Una célula eucariota típica contiene aproximadamente 25 pg de ARN, del cual menos del 2 % es ARNm [10]. Esto se corresponde con unos pocos cientos de miles de transcritos de los ~10.000 genes que son expresados en cada célula en cualquier punto temporal en particular. Las técnicas de imagen tales como la fluorescencia múltiple en la hibridación *in situ* (FISH) pueden monitorizar la actividad transcripcional génica espacialmente en una célula individual mediante el marcaje de ARNm específicos [3 - 4] y puede aplicarse a células vivas para proporcionar imágenes resueltas temporalmente de la complejidad de la maquinaria de transcripción. Los niveles de proteínas en las células individuales se han medido cuantitativamente en bacterias [1,7] y en levaduras [6] mediante el uso de proteínas indicadoras fluorescentes. Para un análisis completo del transcriptoma de una célula individual se usan micromatrices, precedidas por una amplificación no específica del ADNc [10 - 11]. El método más extendido para el análisis del ARNm de una célula individual es la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), y la relacionada RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Esta técnica ofrece una sensibilidad, precisión e intervalo dinámico superiores en comparación con los métodos alternativos de medición del ARNm [12 - 13]. El número de transcritos que puede ser fácilmente analizado en la célula individual es pequeño, pero la preamplificación del ADNc aumenta en gran medida este número [13 - 14].

Sin embargo, los protocolos para el análisis de células individuales que existen en la técnica hasta ahora sólo son útiles con respecto a la detección de objetivos expresados abundantemente. Estos métodos no proporciona la sensibilidad requerida para detectar ARNm objetivo que son expresados a un nivel comparativamente bajo.

50 Descripción breve

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la realización de una RT-PCR para la amplificación de un ARN objetivo que comprende las etapas de

a) en un recipiente de muestra, la lisis de una muestra biológica que consiste únicamente en unas pocas células que se supone que contienen dicho ARN objetivo con un tampón de lisis que comprende entre 0,05 M y 1 M de un agente que caotrópico

b) en el mismo recipiente de muestra, diluir dicha muestra hasta el punto en que el agente caotrópico esté presente durante la etapa c) en una concentración de aproximadamente entre 10 y 60 mM

c) en el mismo recipiente de muestra, sin ninguna etapa de purificación intermedia, retrotranscribir dicho ARN objetivo en presencia de una mezcla de cebadores de la síntesis de la primera hebra de ADNc en una primera hebra de ADNc, consistiendo dicha mezcla en cebadores que hibridan con una secuencia de poli-A y/o cebadores aleatorios

65

d) amplificar dicha primera hebra de ADNc sometiendo dicha muestra a múltiples ciclos de un protocolo de termociclado.

5 Preferiblemente, la amplificación de dicha primera hebra de ADNc durante dicho protocolo de termociclado es monitorizada en tiempo real.

Este método es aplicable típicamente si la muestra comprende únicamente un número limitado de células, es decir, no más de 1.000 células, y preferiblemente menos de 100 células. En particular, el método es aplicable incluso si la muestra comprende únicamente menos de 10 células o una única célula.

10 Preferiblemente, dicho agente caotrópico es tiocianato de guanidina. Alternativamente dicho agente caotrópico puede elegirse de entre un grupo que consiste en clorhidrato de guanina, cianato de potasio y sulfato de amonio.

15 Preferiblemente, el tampón de lisis comprende entre aproximadamente 0,2 y 0,5 M de agente caotrópico.

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

20 También preferiblemente, la etapa a) comprende la adición de un carbohidrato, que es preferiblemente un azúcar o un dextrano, con objeto de evitar la evaporación de bajos volúmenes de muestra.

25 Opcionalmente, la reacción de la transcriptasa inversa puede realizarse en presencia de entre un 0,5 y un 2 % de un detergente no iónico, que es preferiblemente NP 40. En una forma de realización, dicho detergente no iónico puede ya estar añadido a la muestra durante la etapa a).

En una forma de realización, la etapa a) se realiza durante al menos 5 minutos a temperatura ambiente o incluso menos.

30 En otra forma de realización, la incubación de la etapa a) puede realizarse a entre 55 - 85 °C en presencia de proteinasa K. Entonces, entre la etapa a) y la etapa b), o la etapa b) y la etapa c), la muestra puede incubarse durante al menos 5 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 80 °C y 90 °C con objeto de destruir cualquier actividad residual de la proteinasa K.

35 También de acuerdo con la presente invención, la etapa a) puede realizarse en presencia de una ADNasa específica de hebra doble, preferiblemente ADNasa I o nucleasa de gamba. En el caso de usar la ADNasa I, es ventajoso si, entre la etapa a) y la etapa b), o la etapa b) y la etapa c), la muestra se incuba durante al menos 5 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 80 °C y 90 °C.

40 Opcionalmente, la muestra se congela a unas temperaturas de entre aproximadamente -20 °C y -80 °C inmediatamente antes de la etapa b). Eso significa que después de congelar, ya no se añade ningún aditivo según se ha desvelado anteriormente antes de la etapa b).

45 De acuerdo con la presente invención es muy preferible que dicha mezcla de cebadores de síntesis de ADNc comprenda tanto cebadores que hibridan con una secuencia de poli-A secuencia como cebadores aleatorios.

50 El cebador aleatorio es habitualmente un cebador aleatorio hexámero. Los cebadores que hibridan con una secuencia de poli-A son habitualmente cebadores de oligo-dT o cebadores de Oligo-dU. En una forma de realización preferida, dichos cebadores que hibridan con una secuencia de poli-A y los cebadores aleatorios están presentes en cantidades iguales. En otra forma de realización preferida, que es compatible con la mencionada anteriormente, dichos cebadores que hibridan con una secuencia de poli-A y los cebadores aleatorios están presentes a unas concentraciones de entre 1 μM y 5 μM cada uno. Son muy preferidas las concentraciones de aproximadamente 2,5 μM de cada uno.

55 En una forma de realización muy específica adecuada para el análisis de muestras biológicas multicelulares, el método de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de

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

- 60
- incubación durante al menos 5 minutos a una temperatura a la temperatura ambiente entre 16 °C y 24 °C en ausencia de proteinasa K, o a entre 55 - 85 °C en presencia de proteinasa K
 - incubación durante aproximadamente entre 2 y 10 minutos a 95 °C
 - 65 - congelar dicha muestra a -25 °C

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

c) retrotranscribir, en presencia de una mezcla de cebadores de síntesis de la primera hebra del ADNc, dicha mezcla que consiste en cebadores de secuencia aleatorios y cebadores que hibridan con una secuencia de poli-A.

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

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

a) lisis de una única célula que se supone que contiene dicho ARN objetivo con un tampón de lisis que comprende entre 0,2 M y 1 M de tiocianato de guanidina mediante

- incubación durante al menos 10 minutos a una temperatura entre la temperatura ambiente entre 16 °C y 24 °C en ausencia de proteinasa K, o a entre 55 - 85 °C en presencia de proteinasa K
- congelar dicha muestra a entre -75 °C y -80 °C

b) diluir dicha muestra hasta el punto en que el tiocianato de guanidina esté presente en una concentración de entre aproximadamente 30 y 50 mM.

c) retrotranscribir, en presencia de una mezcla de cebadores de síntesis de la primera hebra del ADNc, dicha mezcla que consiste en cebadores que hibridan con una secuencia de poli-A y cebadores aleatorios

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

Breve descripción de las figuras

Figura 1: visión general de un perfil de la expresión génica de una célula individual mediante el uso de una qRT-PCR. Las alternativas y los aspectos importantes de cada etapa del procedimiento que fueron abordados en este estudio se muestran en cuadros. Las etapas opcionales se muestran con flechas punteadas.

Figura 2: evaluación de los tampones de lisis. (A) Determinación de la eficacia de lisis. Cada barra indica el rendimiento relativo de Ins2 mediante el uso de un único islote pancreático (~ 2.000 células) como material de partida. Cada islote se trató con las concentraciones indicadas de NP-40, con y sin proteinasa K (Prot K), o con tiocianato de guanidina (GTC). Únicamente la lisis con 0,5 M de GTC tuvo un efecto significativo en comparación con las condiciones de control ($p < 0,001$, $n = 3$). (B) Efecto de los tampones de lisis sobre el rendimiento de la reacción de RT. Se usaron cantidades idénticas de ARN total purificado de los islotes como material de partida. Se analizaron los rendimientos relativos de cinco genes: Ins1 Gcg, Sst, Gapdh y Rps29. Se añadieron concentraciones crecientes de tiocianato de guanidina a la reacción de RT. Hay una diferencia significativa para todos los genes entre el control y 40 mM o 120 mM ($p < 0,05$) pero no a 80 mM. Los valores son la media \pm EEM para 3 experimentos por separado.

Figura 3: optimización de la reacción de RT. Se midieron cuatro genes: Ins1 Ins2, Rps29 y Hprt. (A) Determinación de la concentración óptima de cebador de la RT mediante el uso de oligo(dT) o de hexámeros aleatorios. (B) Comparación de las estrategias de cebado de la RT y los perfiles de temperatura. Se usaron cantidades idénticas de ARN total purificado de células MIN6 como material de partida. Se muestran los rendimientos relativos de la reacción de RT para varias combinaciones de cebadores. Se usaron 2,0 μ M de oligo(dT) o de hexámeros aleatorios o de ambos. Los perfiles de temperatura usados eran isotérmico (barras negras), en gradiente (barras blancas) y por ciclos (barras grises). Los valores son la media \pm EEM para 3 experimentos por separado.

Figura 4: reproductibilidad técnica de la RT y la qPCR. (A) Se analizaron diluciones de ARN total purificado de islote, equivalente a la cantidad encontrada en una única célula, en reacciones de RT por triplicado y de qPCR por triplicado. Se muestran las desviaciones típicas (DT) de las mediciones de los tres genes (Ins1 Ins2 y Gcg), con la contribución de la qPCR (cuadrados negros) y de la RT (círculos rojos). La DT de las reacciones por triplicado de la qPCR basadas en cantidades predeterminadas del producto purificado de la PCR de Ins1 Ins2, Gcg, Rps29 y Hprt se muestran como referencia (línea negra continua). La variabilidad entre estos cinco ensayos se muestra como (DT) barras de error. (B) Se midieron células β individuales con reacciones de RT por triplicado y reacciones de qPCR por duplicado para visualizar la variabilidad en las mediciones del ARNm en una célula individual. El número de copias de Ins2 se refiere al número de moléculas en la reacción de RT. Se ha analizado aproximadamente el 3 % de la célula original en cada reacción.

Figura 5: se cuantificaron transcritos de *Ins2* en 126 células β de los islotes de Langerhans. (A) El nivel de expresión de *Ins2* para cada célula β , incubada en 3, 6, 10 ó 20 mM de glucosa, como se indica. (B) El histograma muestra que los niveles de expresión de *Ins2* están distribuidos lognormalmente. Los niveles de transcrito están centrados en la media para las cuatro concentraciones de glucosa.

Figura 6: expresiones de los genes en células individuales recogidas mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), extraídos mediante el uso de la invención desvelada y medidos con transcripción inversa y qPCR. ADNc de actina Beta medido en células individuales a partir del cual se extrajo el ARNm en 0,2 M de GTC (arriba), en 0,1 M de GTC (centro) y en agua pura (abajo).

Figura 7: ADNc de *RRN18S* medido en células individuales a partir del cual se extrajo el ARNm en 0,2 M de GTC (arriba), en 0,1 M de GTC (centro) y en agua pura (abajo). El eje X muestra la cantidad relativa de ADNc presente por célula en una escala logarítmica.

Figura 8: media y desviación típica de la cantidad relativa de ADN de 18S, *ACTB* y *GAPDH* determinada mediante una QPCR tras el tratamiento con la invención desvelada. A las muestras estudiadas de ARN se les añadió ADN genómico y se trataron con *ADNasa I* (arriba) o nucleasa de gamba (abajo). Se presentan los controles sin tratamiento con nucleasa, así como la muestra no tratada con transcriptasa inversa (no hay controles de RT), que sólo contienen ADN genómico.

Figura 9: se analizaron ocho muestras de células individuales en reacciones de RT por triplicado para analizar la expresión de la insulina II. Cuatro de las muestras de células individuales se extrajeron con tampón de lisis que contenía un 0,5 % de NP-40, y cuatro con 0,5 M de GTC de acuerdo con la invención desvelada. Se muestra la variación intraensayo.

Figura 10: *Arriba:* alícuota extraída con el RNeasy Micro kit de Qiagen. La media del Ct para HPV16E7 fue de 37,7. No fue posible detectar el HPV 16E6. *Abajo:* alícuota extraída mediante el uso de la invención desvelada. La media del Ct para el HPV16E6 fue de 30,6 y la media del CT para el HPV16E7 fue de 29,2.

Figura 11: extracción y análisis de células Caski. Análisis mediante QPCR de ADNc del HPV16E6 (arriba) y 18S (abajo) +/- tratamiento con *ADNasa* +/- RT.

Figura 12: expresiones de los genes en monocitos THP1 sedimentados preparados mediante el uso de la invención desvelada a diferentes temperaturas de lisis, y medidos mediante transcripción inversa y qPCR. El eje Y muestra el rendimiento relativo de ADNc por muestra.

Descripción detallada

De acuerdo con la presente invención, es posible realizar una lisis de células eucariotas o incluso de células procariontas en un cierto recipiente de reacción, y en el mismo recipiente de reacción realizar una reacción de transcripción inversa con objeto de generar ADNc monocatenario. Por lo tanto, la presente invención se refiere de forma más precisa a un método para la realización de una RT-PCR para la amplificación de un ARN objetivo que comprende las etapas de

- a) lisis de una muestra biológica que se supone que contiene dicho ARN objetivo en un recipiente de muestra con un tampón de lisis que comprende entre 0,05 M y 1 M de un agente caotrópico
- b) diluir dicha muestra hasta el punto en que dicho agente caotrópico esté presente durante la etapa c) a una concentración de entre aproximadamente 10 y 60 mM en dicho recipiente de muestra
- c) sin ninguna etapa de purificación intermedia, retrotranscribir dicho ARN objetivo en presencia de una mezcla de cebadores de síntesis de la primera hebra de ADNc, consistiendo dicha mezcla en cebadores que hibridan con una secuencia de poli-A secuencia y/o cebadores aleatorios y/o cebadores específicos del objetivo en dicho recipiente de muestra
- d) someter dicha muestra a múltiples ciclos de un protocolo de termociclado y preferiblemente monitorizar la amplificación de dicha primera hebra de ADNc en tiempo real.

Con objeto de controlar el proceso de recogida, la lisis celular y la transcripción inversa, a las muestras puede añadirse un ARN de control. El ARN de control es preferiblemente un ARN artificial que durante la etapa de transcripción inversa es transcrito en un ADNc que puede ser discriminado del ARN de la muestra. En el caso de usar cebadores específicos para la etapa de retrotranscripción, el ARN artificial puede derivar de una transcripción *in vitro* de un molde de ADN diseñado genéticamente que comprende una inserción o que sólo representa parcialmente la secuencia objetivo que debe ser analizada.

La muestra biológica puede contener células eucariotas o células procariotas que están en suspensión. En el caso de que haya sólo unas pocas células eucariotas, tal como una única célula, preferiblemente menos de 10 células, más preferiblemente menos de 100 células o al menos, menos de 1.000 células, el volumen de la suspensión también puede ser muy bajo. Preferiblemente, el volumen de la suspensión es de menos de 20 μl y lo más preferiblemente de menos de 5 μl .

Las muestras biológicas que contienen únicamente unas pocas células pueden ser generadas, por ejemplo, mediante la dilución de un cultivo de células en suspensión. Para estos casos, el reactivo de lisis de acuerdo con la invención puede añadirse directamente a la suspensión de células siempre que el reactivo de lisis se proporcione en un exceso de al menos 5:1 V/V, o preferiblemente en un exceso de 10:1 V/V.

Las muestras biológicas que consisten en un pequeño número de células, tales como no más de 100 células, preferiblemente no más de 10 células, y lo más preferiblemente únicamente células individuales, también pueden ser generadas mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). En este caso, las células clasificadas pueden ser dirigidas a un pocillo, tal como un pocillo de una placa de microtitulación, que ya contiene el tampón de lisis de acuerdo con la invención.

Sin embargo, el método de acuerdo con la presente invención también es aplicable para un número mayor de células que han sido cultivadas en suspensión. Preferiblemente, los grandes números de células se recogen en primer lugar mediante un medio apropiado de centrifugación. Opcionalmente dicha recolección comprende una etapa de lavado con un sistema de tampón apropiado, tal como un tampón de PBS. Subsiguientemente se añade el tampón de lisis. Para la lisis de la muestra completa, la muestra puede ser agitada vigorosamente, por ejemplo, mediante una agitación vorticial.

En una forma de realización, la etapa a) de la presente invención se realiza en presencia de un detergente no iónico tal como NP40. Alternativamente, la etapa a) comprende la adición de un carbohidrato, que es preferiblemente un azúcar o un dextrano. Ambos componentes dan como resultado una evitación eficaz de los efectos de la evaporación si deben procesarse muestras únicamente con volúmenes pequeños. Si se añade NP40 u otro detergente no iónico, entonces la cantidad de detergente debe elegirse de tal forma que durante la etapa c) dicho detergente esté presente en una cantidad en V/V del 0,5 al 2 %.

En una forma de realización preferida, el tampón de lisis de acuerdo con la presente invención contiene adicionalmente ácido poliinosínico. Ventajosamente, hay contenidos 0,2 - 5 ng y lo más ventajosamente, 0,5 - 2 ng de ácido poliinosínico en 1 μl de tampón de lisis.

La recogida y la lisis de las células de acuerdo con la presente invención pueden realizarse a varias temperaturas diferentes. En una forma de realización, la etapa a) del método inventivo se realiza en ausencia de proteinasa K durante al menos 5 minutos, es decir, a entre 16 °C y 24 °C. El tiempo máximo que se requiere para la lisis en estas circunstancias es de aproximadamente 30 minutos. De forma análoga, la etapa a) del método inventivo en ausencia de proteinasa K puede realizarse durante al menos 10 minutos incluso por debajo de la temperatura ambiente, pero por encima de 5 °C. El tiempo máximo que se requiere para la lisis en estas circunstancias es de aproximadamente 60 minutos. Estas condiciones son muy favorables para la evitación de cualquier efecto de evaporación, si se están procesando muestras con volúmenes pequeños. También elimina la necesidad de calentamiento.

En una forma de realización alternativa de la presente invención, la etapa a) se realiza durante al menos 5 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 55 °C y 85 °C, preferiblemente en presencia de proteinasa K a unas concentraciones de entre aproximadamente 0,05 y 5 mg/ml y preferiblemente de 0,1 - 1 mg/ml. Opcionalmente, dicha proteinasa K puede ser inactivada irreversiblemente mediante una subsiguiente incubación, bien entre la etapa a) y la etapa b), o bien entre la etapa b) y la etapa c) durante al menos 5 minutos, pero habitualmente no más de 30 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 80 °C y 90 °C.

De acuerdo con la presente invención, la lisis y la transcripción inversa de las células se realizan en el mismo recipiente de reacción, se ha demostrado que es muy ventajoso si el ADN genómico que está contenido en las células lisadas puede eliminarse selectivamente, mientras que el ARN células se mantiene intacto. La posibilidad más eficaz para conseguir este efecto es una eliminación enzimática mediante la inclusión de una etapa de digestión con ADNasa. Por lo tanto, en una forma de realización principal de la presente invención, la etapa a) se realiza en presencia de una ADNasa específica de doble hebra. Preferiblemente, dicha ADNasa es exclusivamente específica para ADN bicatenarios, tal como la ADNasa I o la ADNasa de gama (USB, nº de catálogo: 78314).

Sin embargo, si durante la etapa d) el ADNc monocatenario se somete adicionalmente a una reacción de amplificación catalizada por la polimerasa de ADN, tal como una reacción de PCR, es más ventajoso inactivar dicha ADNasa antes de la reacción de amplificación. Por lo tanto, para la inactivación de la actividad de la ADNasa, en una forma de realización específica, la muestra se incuba durante al menos 5 minutos pero no más de 60 minutos entre la etapa a) y la etapa b), o la etapa b) y la etapa c), a una temperatura de entre aproximadamente 80 °C y 90°. Alternativamente, si la ADNasa es ADNasa de gamba, habitualmente es suficiente la desnaturalización durante el primer ciclo de la reacción de PCR de la etapa d).

Todas las diferentes formas de realización descritas anteriormente tienen en común que la lisis celular, la dilución, cualquier adición de aditivos y la reacción de la transcriptasa inversa se llevan a cabo en el mismo recipiente de reacción. Por lo tanto, el método inventivo es particularmente útil para el análisis de alto rendimiento de múltiples muestras en un proceso automatizado. En este contexto, los múltiples recipientes de reacción pueden disponerse conjuntamente en forma de una placa de microtitulación como se sabe bien en la técnica. Por ejemplo, dicha placa de microtitulación puede consistir en 24, 96, 384 ó 1.536 recipientes de reacción individuales dispuestos según los estándares que están establecidos en la técnica. Entonces, pueden añadirse a las muestras el reactivo de lisis, los diversos aditivos y los reactivos necesarios para la realización de una reacción de la transcriptasa inversa mediante instrumentos robotizados de manipulación de líquidos.

Optimización de las condiciones para la realización de un análisis mediante RT-PCR en pequeños números de células

El método de acuerdo con la presente invención también permite perfilar la expresión génica únicamente en unas pocas células e incluso en una única célula. Las especies de ARNm en células individuales o en unas pocas células se cuantifican mediante qRT-PCR. A una escala de una población de células, los niveles de expresión génica son habitualmente normalizados a los genes de referencia [15]. La naturaleza estocástica de las células individuales invalida esta metodología, dejando la cuantificación absoluta como la mejor opción para la comparación de los niveles de transcrito dentro y entre las células. Con objeto de mejorar los protocolos experimentales para optimizar la lisis celular y la accesibilidad al ARNm, se analizaron por lo tanto sistemáticamente el rendimiento del ARNm en la reacción de transcripción inversa y la evaluación de la calidad. El método fue demostrado en células individuales procedentes de los islotes pancreáticos de Langerhans de ratón, revelando el número de copias del transcrito, la coregulación de la expresión génica y la distribución de los niveles de expresión del transcrito.

Se recogieron células dispersas con un capilar de vidrio, se vaciaron en tampón de lisis y se analizaron con una qRT-PCR. La Figura 1 esquematiza el procedimiento experimental. Para la evaluación de la calidad se generó una molécula de ARN artificial basada en el gen de la ciclofilina E (Ppie) mediante una transcripción *in vitro*. Se añadió una cantidad igual de ARN de Ppie junto con tampón de lisis a todos los tubos de reacción antes de que se depositara la célula individual en el tubo. El ARN podría reducir la adsorción de la propia célula o de los ARNm de las células individuales a las superficies. Las muestras con unos valores anormales del ciclo umbral (Ct) para el ARN añadido pueden ser el resultado de una degradación por parte de las RNasas. Estas muestras se analizaron de nuevo y, si permanecía el problema, se excluyeron de los análisis adicionales. La presencia de inhibidores puede reducir el rendimiento del ADNc.

Optimización de la lisis y del tampón

El propósito del tampón de lisis es hacer que el ARNm sea accesible para la enzima de RT. Se eligieron dos detergentes para esta tarea, uno débil no caotrópico (Igepal CA-630, a.k.a. NP-40) y uno fuerte caotrópico (tiocianato de guanidina, GTC). Se evaluaron la eficacia de la lisis y la influencia potencial sobre la reacción de RT secuencia abajo. Se evaluaron cinco condiciones de lisis diferentes en términos de su capacidad para lisar un islote pancreático (Figura 2A). El NP-40 no tenía ningún efecto en comparación con el control (agua) cuando se usaba a unas concentraciones del 0,5 % o del 4 %. La proteinasa K no tenía ningún efecto cuando se añadía en presencia de un 0,5 % de NP-40. El tampón de lisis basado en GTC proporcionó una lisis eficaz del islote mediante el uso de una concentración de 0,5 M y aumentó 600 veces el rendimiento del ARN; un efecto que disminuyó fuertemente a 4 M.

Después se compararon los tampones de lisis con respecto a su efecto sobre la reacción de RT. Unas bajas concentraciones (0,1 %) de NP-40, independientemente de la adición de proteinasa K, no tuvieron ningún efecto en comparación con las condiciones de control. Sin embargo, cuando se usaba a una concentración del 1 %, el NP-40 dio como resultado una pequeña pero significativa mejora en la eficacia de la RT. En la Figura 2B se ensayaron tres concentraciones del GTC (40 mM, 80 mM y 120 mM) en cinco genes. La eficacia de la reacción mejoró significativamente (entre 2 y 6 veces) en todos los genes ensayados mediante el uso del GTC 40 mM. Por el contrario, el GTC 80 mM no tuvo ningún efecto, mientras que el GTC 120 mM era de hecho inhibidor. La adición de un 0,5 - 1-5 % de 2-mercapto etanol no mejoró el rendimiento de la reacción de RT ni solo ni junto con el GTC (datos no mostrados). La formación de los productos correctos de la PCR se confirmó mediante una electroforesis en gel de agarosa. De entre los detergentes ensayados, se eligió el GTC debido a una superior capacidad de lisis y al efecto positivo sobre la reacción de RT a la concentración de 40 mM.

Optimización del cebado de la RT

Una cuantificación apropiada de transcritos raros requiere una eficiente generación del ADNc mediante una transcripción inversa (RT). En la Figura 3, se investigó el cebado de la reacción de RT por parte de hexámeros aleatorios y de oligo(dT) nucleótidos para cuatro genes: insulina 1 (Ins1), insulina 2 (Ins2), proteína ribosómica S29 (Rps29) e hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (Hprt). Se analizó el efecto de la concentración del cebador de la RT (Figura 3A). La eficacia de la RT aumentaba generalmente al aumentar la concentración de cebador, aunque había algunas diferencias entre los genes medidos. 2,0 µM del cebador con oligo(dT) o con hexámero

aleatorio dio como resultado un alto rendimiento de ADNc. En la Figura 3B, se probaron los efectos de combinar cebadores de la RT y perfiles de temperatura. Se evaluaron tres perfiles de temperatura diferentes (los perfiles isotérmico, en gradiente y por ciclos) junto con estrategias de cebado con hexámero aleatorio y oligo(dT). La combinación de ambos métodos de cebado fue superior o igual en todos los casos al mejor método de cebado o individual usado. Podría hipotetizarse que el inicio de la reacción de RT, en la etapa en la que el cebador de la RT se aparea con su molécula de ARNm objetivo, es crítico. Un aumento gradual de la temperatura (gradiente) permitiría que los cebadores de la RT con un punto de fusión bajo se aparearan con su objetivo, mientras que las estructuras secundarias fuertes se desnaturalizan en las etapas tardías de la incubación. También se probó un perfil de temperatura por ciclos, del que recientemente se ha informado que aumenta el rendimiento del ADNc para la cuantificación del miARN [14]. Sin embargo, no hubo una diferencia significativa en el rendimiento ni en la productividad entre los perfiles de temperatura probados. Había una diferencia de 2 - 5 veces entre la peor y la mejor combinación de cebador / temperatura. Se puede concluir que una combinación de 2,0 μ M de oligo(dT) y 2,0 μ M hexámeros aleatorios maximiza el rendimiento de la reacción de RT.

Además del cebado con oligo(dT) y hexámero aleatorio, se probó el cebado de la RT con cebadores específicos de genes (GSP). Para algunos genes se observó una formación dependiente de la concentración de productos no específicos en la PCR secuencia abajo. Este efecto era pronunciado cuando se usaba una mezcla de diferentes GSP. Para determinar si este era un efecto sobre la RT o la PCR, se añadieron directamente GSP a la PCR. Una concentración total de > 0,4 μ M de GSP en la PCR dio como resultado la formación de productos erróneos en la PCR. Sin embargo, la dilución del ADNc retrotranscrito con GSP sólo eliminó parcialmente la formación de productos inespecíficos. Por lo tanto, unas elevadas concentraciones de GSP afectan negativamente tanto a la reacción de RT como a la de PCR.

Reproducibilidad técnica

La reproducibilidad técnica de la RT y de la qPCR se presenta en la Figura 4A. Se muestran la reproducibilidad de la reacción de RT y de qPCR, representadas aquí por la desviación típica en valores del Ct (DTRT y DTqPCR, respectivamente), para un intervalo de diferentes números de copias iniciales. Además, se calculó la DT de la qPCR a partir de una dilución del producto purificado de la PCR. No hay ninguna diferencia entre la DT de la qPCR entre el ADNc o el producto de la PCR, lo que indica que la reproducibilidad técnica es intrínseca de la propia reacción de qPCR y no es debida a factores interferentes procedentes de reacciones secuencia arriba. Todas las reacciones son muy reproducibles hasta ~ 1.000 copias (aprox. Ct 28 - 30), y aceptables hasta ~ 100 copias. A < 100 copias la variabilidad en las reacciones de RT y de PCR es un obstáculo considerable para una cuantificación precisa del ARNm. La Figura 4B muestra la variación técnica en el contexto de una variación biológica de una célula a otra. Se recogieron células individuales de los islotes de Langerhans de ratones y se analizaron en reacciones de RT por triplicado y en reacciones de qPCR por duplicado. La variación técnica está a la par con la observada en la Figura 4A. Aunque la variación de una célula a otra para las células β recogidas era relativamente pequeña, la variación técnica es menor, y permite una cuantificación absoluta con una precisión suficiente en el intervalo de 100 - 200 moléculas. Para el análisis del perfil de expresión génica en células individuales del páncreas endocrino en el ratón, se midieron *Ins1*, *Ins2*, glucagón (Gcg), *Rps29* y cromogranina B (Chgb) en 158 células recogidas a partir de cuatro incubaciones con diferentes concentraciones de glucosa (3, 6, 10 y 20 mM). Los islotes de Langerhans en el páncreas son heterogéneos y contienen 1.000 - 3.000 células que comprenden al menos cuatro tipos de células endocrinas, en las que las células β secretadoras de insulina y las células α productoras de glucagón son las más abundantes [18]. Teniendo en cuenta la presencia de transcritos de insulina o de glucagón, estas células se distinguieron como células β (126 células, 83 %), células α (25 células, 16 %) o desconocidas (1 célula, 0,7 %). Seis muestras fueron negativas para todos los genes medidos y fueron clasificadas como fallos técnicos (tasa de éxito del 96 %). Para todos los genes se confirmó una distribución lognormal y se calcularon las medias geométricas según se muestra en la siguiente tabla:

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

Gen	N ¹	Media geométrica	log ₁₀ de la media geométrica (DT)	valor de P de Shapiro Wilk ²
Ins2	124	8.900	3,9 (0,5)	0,53
Ins1	100	3.100	3,5 (0,5)	0,57
Gcg	25	19.000	4,3 (0,3)	0,25
Rps29	102	230	2,4 (0,3)	0,98
Chgb	59	82	1,9 (0,5)	0,67

¹ N es el número de células que expresan el gen probado, N_{lot} = 158.

² Un elevado valor de Shapiro-Wilk refleja un buen ajuste, en este caso a la distribución lognormal.

Los datos permitieron establecer una correlación de los niveles de expresión en las células individuales, según se muestra en la siguiente tabla. El factor de correlación de Pearson para Ins1 y para Ins2 era de 0,59, lo que indica una correlación entre las células individuales.

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

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

10 Todas las poblaciones de células mostraron una gran heterogeneidad en los niveles de transcrito. Por ejemplo, de las 35 células β incubadas en glucosa 20 mM, las cuatro células con la mayor expresión suponen el 50 % del ARNm total de Ins2 (Figura 5A). Como se ha indicado en los estudios con células agrupadas, una concentración creciente de glucosa tenía un efecto estimulante sobre Ins1, Ins2 y Chgb y un ligero efecto negativo sobre Gcg. Se observó un efecto más fuerte de la glucosa sobre la insulina y el glucagón en las células con elevados niveles de expresión. De las 14 células con los mayores niveles de Ins2 (el primer 20 %), 11 se incubaron en glucosa 20 mM y tres en glucosa 3 mM. Las proporciones correspondientes entre las incubaciones con glucosa 20 y 3 mM eran de 12 a 1 para Ins1 y de 0 a 2 para Gcg. Los niveles de expresión estaban distribuidos normalmente para todos los genes a cualquier concentración de glucosa.

15 Como en cualquier investigación de mecanismos pequeños sensibles, el perfilado de la transcripción de células individuales requiere unas preparaciones cuidadosas y unas condiciones de reacción muy optimizadas para un resultado exitoso. Los resultados del estudio desvelado permiten la definición de las condiciones óptimas que permitirán experimentar evitando dificultades mediante el uso de los reactivos adecuados a las concentraciones ideales.

20 Mientras que el efecto sobre la lisis es incuestionable y esperado, es decir, el GTC era superior en el lisado de los islotes, su efecto sobre las reacciones de RT es más complejo. Mientras que con unas concentraciones elevadas (> 100 mM) se alteraba notablemente la reacción, las concentraciones bajas (~ 40 mM) tenían un efecto favorable sobre el rendimiento de la RT. El GTC es un fuerte detergente caotrópico. El efecto positivo del GTC puede actuar mediante la reducción de las estructuras secundarias, permitiendo así un mejor acceso de los cebadores y de la transcriptasa inversa al ARNm.

25 De acuerdo con la presente invención, se prefiere usar una combinación de hexámero aleatorio y oligo(dT) en la reacción de RT independientemente del perfil de temperatura usado. En concordancia con los hallazgos previos [16], los resultados son altamente dependientes del gen y se necesitan unas optimizaciones cuidadosas para la mayor eficacia posible de la RT. El cebado de la RT con cebadores específicos de gen (GSP) se usa ocasionalmente en la cuantificación del ARNm. Existen dos explicaciones para la formación de productos inespecíficos de la PCR del ADNc cebado con GSP: en primer lugar, la concentración total de cebador en el ADNc usado en la PCR puede alcanzar unos niveles que se aproximen a los de los cebadores de la PCR. Esto podría interferir en la amplificación y generar productos inespecíficos. En segundo lugar, los GSP se unen muy inespecíficamente al ARNm [16]. Por lo tanto, el ADNc resultante será similar al de un cebado con hexámero aleatorio, pero con el cebador GSP en el extremo 3'.

30 En cinco mediciones de una célula con 100 copias de un transcrito en particular, los resultados abarcan aproximadamente 10 - 40 copias por reacción (correspondientes a 50 - 200 copias por célula). Esta diseminación se debe fundamentalmente a la variación en la qPCR, y está en línea con la variación biológica entre células. Las reacciones de qPCR por duplicado o por triplicado proporcionarán un aumento en la precisión, y permitirán la cuantificación de niveles menores.

35 Además, se comparó la reproducibilidad de los resultados obtenidos con preparaciones de células individuales en NP40 en agua miliQ con las preparaciones en GTC 0,3 M mediante el cálculo de las desviaciones típicas de cada una de 6 reacciones de RT-PCR. Para este experimento cada célula se dividió en tres replicados para RT, y cada uno de estos se dividió posteriormente en duplicados para PCR. Por lo tanto, la desviación típica (DT) se basó en seis muestras. Los resultados demostraron que la desviación típica era sustancialmente menor (y por lo tanto la reproducibilidad mayor) para las células preparadas en GTC 0,3 M.

40 En resumen, de acuerdo con el método de la presente invención, las células se depositan en el fuerte detergente tiocianato de guanidina, opcionalmente junto con una adición de ARN para una evaluación de la calidad. Una

concentración de 30 a 50 mM de tiocianato de guanidina es un potente potenciador de una reacción de transcripción inversa. Una combinación de cebado de hexámero aleatorio y de oligo(dT) asegura un elevado rendimiento de ADNc.

5 Ejemplos

Ejemplo 1: preparación y cultivo de células

Se prepararon islotes pancreáticos a partir de ratones hembras sanos del National Maritime Research Institute (RMNI) de 3 - 4 meses de edad (Bomholtgaard, Ry, Dinamarca) y se alimentaron a voluntad con una dieta normal. Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical, y los islotes pancreáticos se aislaron mediante una digestión con colagenasa P (Roche, Basilea, Suiza) seguido de la recolección manual de los islotes. Todos los procedimientos experimentales que implican animales fueron aprobados por el comité ético de la Universidad de Lund. Para preparar las células individuales dispersadas, los islotes recogidos se agitaron suavemente con una baja concentración extracelular de Ca^{2+} para disolver la estructura del islote [21]. Las células dispersadas se colocaron en placas de Petri de plástico de 35 mm (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en medio RPMI 1640 (SVA, Uppsala, Suecia) complementado con un 10 % de FCS, $100 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ de penicilina y $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de estreptomycin (todos de Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) en presencia de varias concentraciones de glucosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Las células se mantuvieron en cultivo durante 18 - 24 horas para el experimento de estimulación con glucosa, y durante 2 - 6 horas para otros experimentos.

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

Ejemplo 2: recolección de células individuales

Las células dispersadas fijadas se lavaron dos veces con un tampón que contenía NaCl 138 mM, KCl 5,6 mM, MgCl_2 1,2 mM, CaCl_2 2,6 mM, HEPES 5 mM (pH 7,4 con NaOH) y glucosa 3 - 20 mM (la misma concentración de glucosa que en el cultivo) para eliminar las muertas y los desechos celulares para la recolección celular con pipetas de fijación de membranas. El disco, que contiene las células adheridas y aproximadamente 1 ml de tampón, se montó en un microscopio óptico invertido estándar (Zeiss Axiovert 135, Oberkochen, Alemania). Se sacaron de las pipetas los tiradores capilares de borosilicato de vidrio (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Alemania) con un diámetro exterior de 1,6 mm y un espesor de la pared de 0,16 mm mediante el uso de un tirador de pipetas de fijación de membranas (Heka PIP5 Lambrecht, Alemania). El diámetro de la punta era de aproximadamente $10 \mu\text{m}$ de media, sustancialmente más ancho que las pipetas de fijación de membranas estándar, y lo suficientemente grande como para permitir el paso de una célula intacta. La pipeta de vidrio se montó en un micromanipulador hidráulico (Narishige, Tokio, Japón) en el microscopio. Mediante el control de la presión dentro de la pipeta era posible recoger células intactas o prácticamente intactas con un volumen mínimo de disolución extracelular.

Ejemplo 3: lisis y purificación

Lisis de los islotes: se colocaron islotes pancreáticos individuales prácticamente del mismo tamaño y aproximadamente 1.000 células en 10 ml de varios tampones de lisis. Se usaron los detergentes Nonidet P-40 (NP-40, a.k.a. Igepal CA-630, Sigma-Aldrich) y tiocianato de guanidina (GTC, Sigma-Aldrich). Las muestras se incubaron a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ u $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos ($60 \text{ }^\circ\text{C}$ para las muestras que contenían 0,4 mg/ml de proteinasa K (Invitrogen)) seguido de 5 min de incubación a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ y se congelaron a $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ para su subsiguiente análisis. Las muestras se diluyeron a 1:20 antes de la transcripción inversa para minimizar posibles efectos inhibidores.

Lisis de las células individuales: en los experimentos con células individuales, las pipetas de vidrio se vaciaron en tubos de plástico de 0,2 ml que contenían $2 \mu\text{l}$ de disolución de lisis. El vaciado requirió un dispositivo personalizado, que consistía en un soporte de tubo alineado con un micromanipulador tosco en el que se montó la pipeta. La pipeta de vidrio se purgó cuidadosamente con tampón de lisis unas pocas veces para asegurar que la célula entraba en el tubo. En la mayoría de los casos, la punta de la pipeta se rompió suavemente en el tubo facilitando así la descarga de la pipeta. Los tubos se colocaron después inmediatamente en un bloque de calentamiento con una tapa calentada a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 minutos. Se evaluaron varias composiciones del tampón de lisis, que contenía NP-40 o GTC. Salvo que se indique de otro modo, los detergentes se diluyeron en agua mQ purificada, pero ocasionalmente se usó un tampón que contenía Tris-Cl 50 mM a pH 8,0, NaCl 140 mM, MgCl_2 1,5 mM (todos de Sigma). Después del tratamiento térmico, las muestras se congelaron inmediatamente en hielo seco ($-78 \text{ }^\circ\text{C}$) y se almacenaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para la subsiguiente transcripción inversa.

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

Ejemplo 4: transcripción *in vitro*

Para generar un control artificial de ARN usamos el sistema de transcripción *in vitro* de la polimerasa T7 de ARN (Takara, Shiga, Japón). Se usó un ensayo de PCR para la ciclofilina E (Ppie) como molde para la transcripción *in vitro*. En primer lugar se generó el producto de la PCR de Ppie mediante el uso de la misma configuración que para los ensayos de PCR en tiempo real, excepto porque se excluyeron todos los fluoróforos. El producto de la PCR se purificó mediante el uso del kit de purificación de PCR (Qiagen, Hilden, Alemania) y después se amplificaron de nuevo en una nueva reacción de PCR con un cebador extendido de PCR donde se añadió la secuencia promotora para la polimerasa T7 de ARN. El producto final de la PCR se purificó como anteriormente y se usó en la reacción de transcripción *in vitro*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción de 20 μ l contenía: Tris-HCl 40 mM (pH 8,0), MgCl₂ 8 mM, espermidina 2 mM, ditiotreititol 5 mM (todos de Takara), NTP 2 mM (Invitrogen), 20 U de RNaseOut (Invitrogen) y ~ 40 ng de ADN de molde. La reacción se incubó a 42 °C durante 1 h.

Ejemplo 5: transcripción inversa

Se usó la transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) a lo largo del estudio [17]. Se incubaron 6,5 μ l que contenían el ARN total o las células individuales lisadas, dNTP 0,5 mM (Sigma-Aldrich), oligo(dT) 2,5 μ M (Invitrogen), hexámeros aleatorios 2,5 μ M (Invitrogen) y si se indicaba, 0,5 μ M de cada cebador específico del gen (idéntico al cebador inverso de la PCR, Invitrogen o MWG-Biotech, Ebersberg, Alemania) a 65 °C durante 5 min. Se usaron varias combinaciones de cebadores de la RT en este trabajo y en los resultados se describen estrategias alternativas. Después añadimos Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditiotreititol 5 mM, 20 U de RNaseOut y 100 U de SuperScript III (todos de Invitrogen) hasta un volumen final de 10 μ l. Se muestran las concentraciones finales de reacción. Los perfiles de temperatura usados fueron: isotérmico, a 25 °C durante 5 min, a 50 °C durante 45 min; en gradiente, a 25 - 40 °C durante 1 min/°C, a 41 - 65 °C durante 5 min/°C; por ciclos, 50 ciclos a 25 °C durante 30 s, a 50 °C durante 30 s y a 55 °C durante 5 s. Todas las reacciones terminaron a 70 °C durante 15 min. Para los cálculos de la desviación típica de la reacción de RT-qPCR, se usaron reacciones de RT por triplicado y de qPCR por triplicado en ARN de islote de ratón total purificado diluido [16].

Ejemplo 6: PCR cuantitativa en tiempo real

Las mediciones de la PCR en tiempo real se realizaron con el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) en reacciones de 10 och 20 μ l. La mezcla de la PCR contenía: Tris 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM MgCl₂ 3 mM, dNTP 0,3 mM, 1 U de polimerasa Taq JumpStart (todos de Sigma-Aldrich), 0,5 x de SYBR Green I (Invitrogen), 1 x de colorante de referencia (Sigma-Aldrich) y 400 nM de cada cebador (MWG-Biotech). La formación de los productos esperados de la PCR se confirmó mediante una electroforesis en gel de agarosa (2 %) para todos los ensayos, y el análisis de la curva de fusión para todas las muestras. El análisis de los datos de la PCR en tiempo real se realizó según se ha descrito, y se calcularon las eficacias de la PCR a partir diluciones sucesivas de productos purificados de la PCR (kit de purificación de PCR QIAquick, Qiagen) [12,19]. Se calculó el número absoluto de copias de los productos purificados de la PCR mediante el uso de los siguientes valores de absortividad molar (en Moles-1cm-1): dAMP, 15.200; dTMP, 8.400; dGMP, 12.010; dCMP, 7.050. La A260 se midió con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

Ejemplo 7: análisis de las células individuales clasificadas mediante una clasificación de células activadas por fluorescencia

Se clasificaron monocitos individuales THP1 en placas de 96 pocillos mediante el uso de una clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Cada pocillo contenía 100 ng de ácido poliinosínico, 500.000 copias de un ARN artificial añadido y 2 μ l de GTC 0,2 M, 4 μ l de GTC 0,1 M o 10 μ l de H₂O. La reacción de transcripción inversa (RT) se realizó directamente sobre los lisados en un volumen de reacción de 20 μ l (concentración final de GTC de 20 mM por reacción de RT) mediante el uso del kit de síntesis de ADNc Transcriptor First Strand (Roche) con una mezcla de oligo(dT) y hexámeros aleatorios. Se cuantificaron dos ARNm, RRN18S y ACTB, por célula con qPCR y SYBR Green I Chemistry en un LightCycler480 (Roche).

Ejemplo 8: eliminación del ácido desoxirribonucleico como una etapa integrada en la invención desvelada.

Se generaron muestras de ARN contaminadas con ADN añadiendo 5 ng de ARN humano total (Roche) con 250 ng de ADN genómico humano. Se añadieron 2 μ l de tampón de lisis (GTC 0,2 M, 10 ng/ μ l de poli(I)) a ocho muestras junto con H₂O (4 muestras) o con 1 U de nucleasa (bien ADNasa I o bien nucleasa de gamba) con tampón de reacción (4 muestras) hasta un volumen total de 6 μ l. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se inactivó la nucleasa mediante calentamiento a 85 °C durante 5 minutos en presencia de EDTA. Los componentes de la transcripción inversa se añadieron a las muestras mediante el uso del kit de síntesis de ADNc Transcriptor First Strand (Roche) con una mezcla de oligo(dT) y hexámeros aleatorios en un volumen total de 20 μ l (concentración final de GTC de 20 mM por reacción de RT). Para probar adicionalmente el efecto del tratamiento con nucleasa, las muestras se extrajeron y se amplificaron mediante una QPCR, pero sin transcripción inversa (sin controles de RT). Por lo tanto, ningún ARN se convierte en ADNc y la QPCR mide la presencia del ADN

genómico contaminante. Todas las muestras fueron ensayadas mediante una QPCR para 18S rARN, ACTB y GAPDH mediante el uso de SYBR Green I chemistry en un LightCycler480 (Roche).

Ejemplo 9: mejora de la reproducibilidad con la invención desvelada

5 Se recogieron ocho células pancreáticas β individuales en un 0,5 % de NP-40 o en GTC 0,5 M de acuerdo con la invención desvelada. Después de la lisis, el ARN se dividió en tres reacciones de transcripción inversa (SuperScript III, Invitrogen), el ADNc se cuantificó mediante una QPCR en un instrumento 7900 Taqman de Applied Biosystems. La variación intraensayo, representada aquí por la desviación típica (DT) de los tres valores del CT obtenidos para cada una de las ocho células, se muestra en la Figura 9. La DT basada en la invención desvelada era coherentemente menor, demostrando la mejora en la reproducibilidad del proceso desvelado.

Ejemplo 10: comparación entre la tecnología del estado actual de la técnica y la invención desvelada.

15 Se dividieron muestras cervicouterinas humanas que contenían el virus del papiloma humano (HPV) en dos alícuotas de 300 μ l cada una. La primera alícuota se extrajo mediante el uso del Micro kit RNeasy (QIAGEN) del estado de la técnica de acuerdo con el protocolo del fabricante. La segunda alícuota se extrajo mediante el uso de la invención desvelada como sigue. El material alícuotado se centrifugó durante 5 minutos a 2.300 g, se lavó con 500 μ l de PBS, se centrifugó de nuevo durante 3 minutos a 2.300 g y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 2 μ l de GTC que contenía tampón de lisis (0,2 M) de acuerdo con la invención desvelada. Las alícuotas se agitaron vorticialmente durante un minuto, se transfirieron a tubos de 0,2 ml que se incubaron a 80 °C durante 5 minutos. A continuación se colocaron en hielo.

25 Los reactivos de la transcripción inversa se añadieron en forma del kit de síntesis de ADNc Transcriptor First Strand (Roche) con una mezcla de oligo(dT) y hexámeros aleatorios en un volumen total de 20 μ l (la concentración final de GTC era de 0,2 M). Se cuantificó la presencia del HPV 16 con una qPCR y sondas TaqMan marcadas con FAM mediante el uso del sistema Eppendorf Realplex. Para el HPV16E7, la diferencia en los valores del CT con los dos métodos fue de 37,2 - 29,2 = 8, correspondiente a una detección aproximadamente $2^8 = 256$ veces mayor de material con la invención desvelada. El HPV16E6 sólo fue detectado cuando la muestra se extrajo con la invención desvelada.

Ejemplo 11: eliminación del ácido desoxirribonucleico en muestras de raspados cervicouterinos como una etapa integrada en la invención desvelada.

35 Se extrajeron células Caski con un volumen total de 500 μ l mediante el uso de la invención desvelada y se retrotranscribieron mediante el uso del kit de síntesis de ADNc Transcriptor First Strand (Roche) con una mezcla de oligo(dT) y hexámeros aleatorios. La muestra se incubó a 80 °C durante 5 minutos. Se añadió una ADNasa específica para ADN bicatenario a la mezcla de transcripción inversa (a una concentración final de 6 U de ADNasa de gamba). Tanto la enzima de la transcripción inversa como la ADNasa de gamba fueron inactivadas mediante un calentamiento a 85 °C durante 5 minutos. La muestra se analizó mediante una QPCR mediante el uso de un Eppendorf Realplex. Los controles se llevaron a cabo con transcripción inversa y/o sin tratamiento con ADNasa. El tratamiento con ADNasa modificó sustancialmente los valores del CT a unos valores mayores que evidenciaban que la etapa de la ADNasa para eliminar el ADN genómico contaminante se había integrado con éxito en la invención desvelada.

Ejemplo 12: análisis de monocitos sedimentados con la invención desvelada mediante el uso de diferentes temperaturas de lisis.

50 Se sedimentaron alícuotas de monocitos THP1 de aproximadamente 35.000 células mediante centrifugación a 300 g durante 5 min y se lavaron con 200 ml de PBS frío. Después de eliminar el PBS, se añadieron a cada pocillo 2 μ l de tampón de lisis que contenía GTC 0,2 M y 20 ng de ácido poliinosínico de acuerdo con la presente invención. Las muestras se incubaron a 80 °C durante 5 minutos o a temperatura ambiente durante 10 ó 20 minutos. La transcripción inversa (RT) se realizó directamente sobre los lisados en un volumen de reacción de 20 μ l (la concentración final de GTC era de 20 mM) mediante el uso de del kit de síntesis de ADNc Transcriptor First Strand (Roche) con una mezcla de oligo(dT) y hexámeros aleatorios. Se cuantificaron dos ARNm, RRN18S y ACTB, en cada alícuota con qPCR y una detección con SYBR Green I en un LightCycler480 (Roche).

Lista de abreviaturas usadas

60 Ct, ciclo umbral
GSP, cebador específico de gen de la RT
qRT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa
RT, transcripción inversa
DT, desviación típica

65

Lista de referencias

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

REIVINDICACIONES

1. Método para la realización de una RT-PCR para la amplificación de un ARN objetivo que comprende las etapas de:
 - a) lisis de una muestra biológica que se supone que contiene dicho ARN objetivo en un recipiente de muestra con un tampón de lisis que comprende entre 0,05 M y 1 M de un tiocianato de guanidina,
 - b) diluir dicha muestra hasta el punto en que dicho tiocianato de guanidina esté presente durante la etapa c) en una concentración de entre aproximadamente 10 y 60 mM en dicho recipiente de muestra,
 - c) sin ninguna etapa de purificación intermedia, retrotranscribir dicho ARN objetivo en presencia de una mezcla de cebadores de síntesis de primera hebra de ADNc en una primera hebra de ADNc, consistiendo dicha mezcla en cebadores que hibridan con una secuencia de poli-A y/o cebadores aleatorios y/o cebadores específicos del objetivo, en dicho recipiente de muestra,
 - d) amplificar dicha primera hebra de ADNc sometiendo dicha muestra a múltiples ciclos de un protocolo de termociclado.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica consiste en no más de 1.000 células, preferiblemente en no más de 100 células, y lo más preferiblemente es una única célula.
3. Método de acuerdo con la reivindicaciones 1 - 2, en el que dicho tampón de lisis comprende entre aproximadamente 0,2 y 0,5 M de agente caotrópico.
4. Método de acuerdo con la reivindicaciones 1 - 3, en el que durante la etapa c) dicho agente caotrópico está presente en una concentración de entre aproximadamente 30 y 50 mM, y preferiblemente de aproximadamente 40 mM.
5. Método de acuerdo con la reivindicaciones 1 - 4 en el que la etapa a) se realiza en presencia de un detergente no iónico que es preferiblemente NP40, y en el que dicho detergente no iónico tiene durante la etapa c) una V/V del 0,5 al 2 %.
6. Método de acuerdo con la reivindicaciones 1 - 5, en el que la etapa a) comprende la adición de un carbohidrato, que es preferiblemente un azúcar o un dextrano.
7. Método de acuerdo con la reivindicaciones 1 - 6, en el que la etapa a) se realiza durante al menos 5 minutos a la temperatura ambiente o por debajo de la temperatura ambiente.
8. Método de acuerdo con la reivindicaciones 1 - 7, en el que la etapa a) se realiza durante al menos 5 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 55 °C y 85 °C, preferiblemente en presencia de proteinasa K.
9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que entre la etapa a) y la etapa b), o entre la etapa b) y la etapa c), la muestra se incuba durante al menos 5 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 80 °C y 90 °C.
10. Método de acuerdo con la reivindicaciones 7 - 9, en el que la etapa a) se realiza en presencia de una ADNasa específica de hebra doble, preferiblemente ADNasa I o nucleasa de gamba.
11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que entre la etapa a) y la etapa b), o entre la etapa b) y la etapa c), la muestra se incuba durante al menos 5 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 80 °C y 90 °C.
12. Método de acuerdo con la reivindicación 7 - 11, en el que antes de la etapa b) la muestra se congela a unas temperaturas de entre aproximadamente -20 °C y -80 °C.
13. Método de acuerdo con la reivindicaciones 1 - 12, en el que dicha mezcla de síntesis de ADNc comprende cebadores que hibridan con una secuencia de poli-A y cebadores aleatorios.
14. Método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que los cebadores que hibridan con una secuencia de poli-A y los cebadores aleatorios están presentes en unas cantidades molares esencialmente iguales.
15. Método de acuerdo con la reivindicaciones 13 - 14, en el que dichos cebadores que hibridan con una secuencia de poli-A y los cebadores aleatorios están presentes en unas concentraciones de entre 1 μM y 5 μM cada uno.
16. Método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dichos cebadores que hibridan con una secuencia de poli-A y los cebadores aleatorios están presentes en unas concentraciones de aproximadamente 2,5 μM cada uno.

Fig. 1

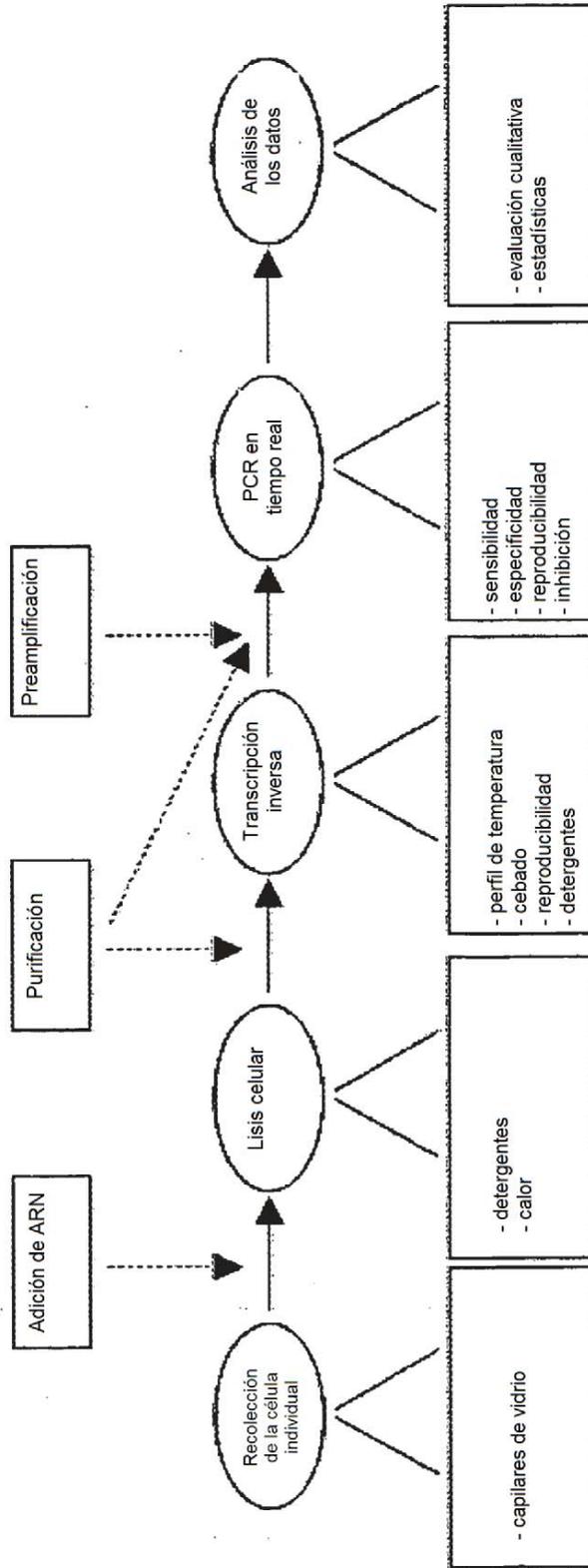


Fig. 2

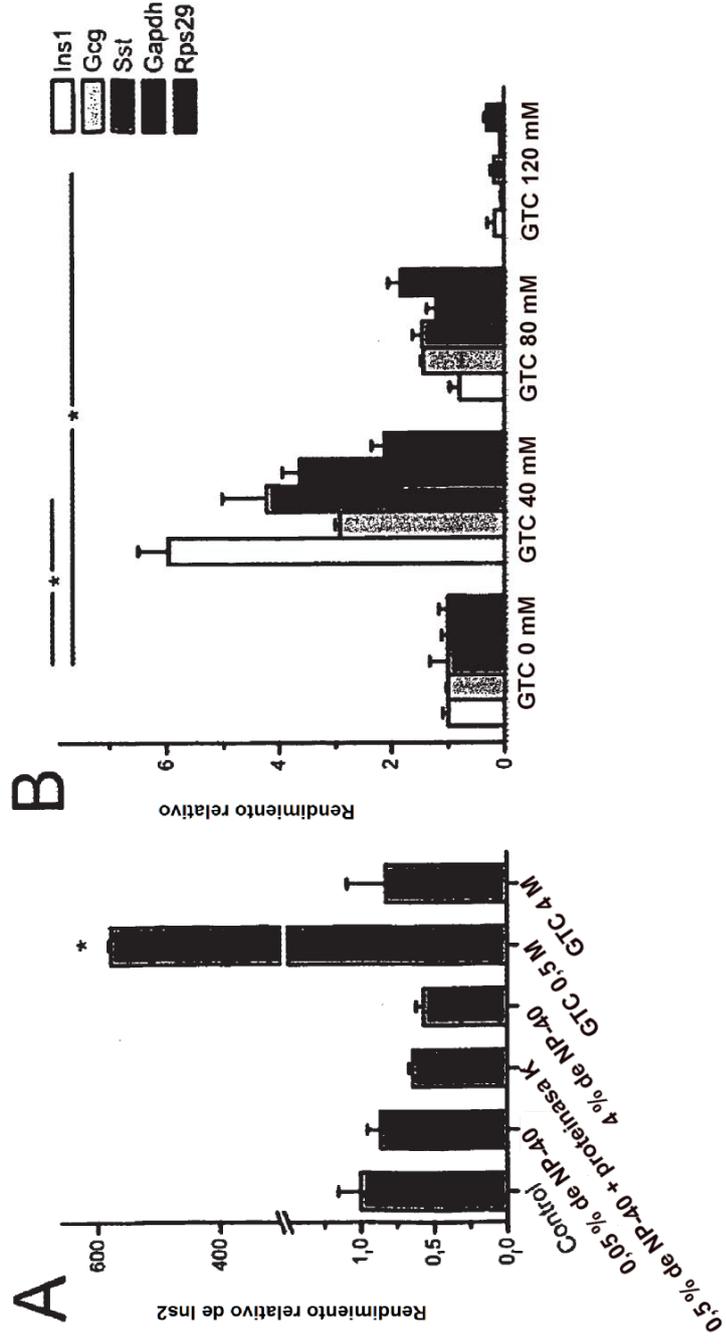


Fig. 3

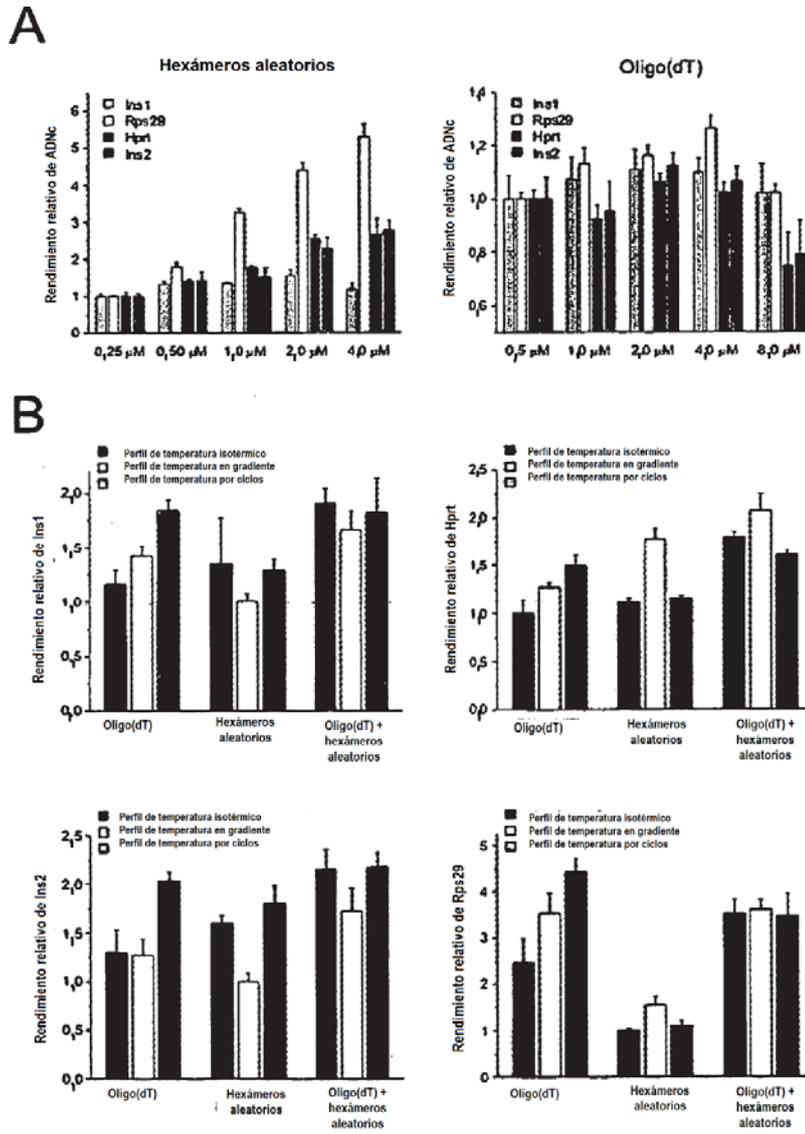


Fig. 4

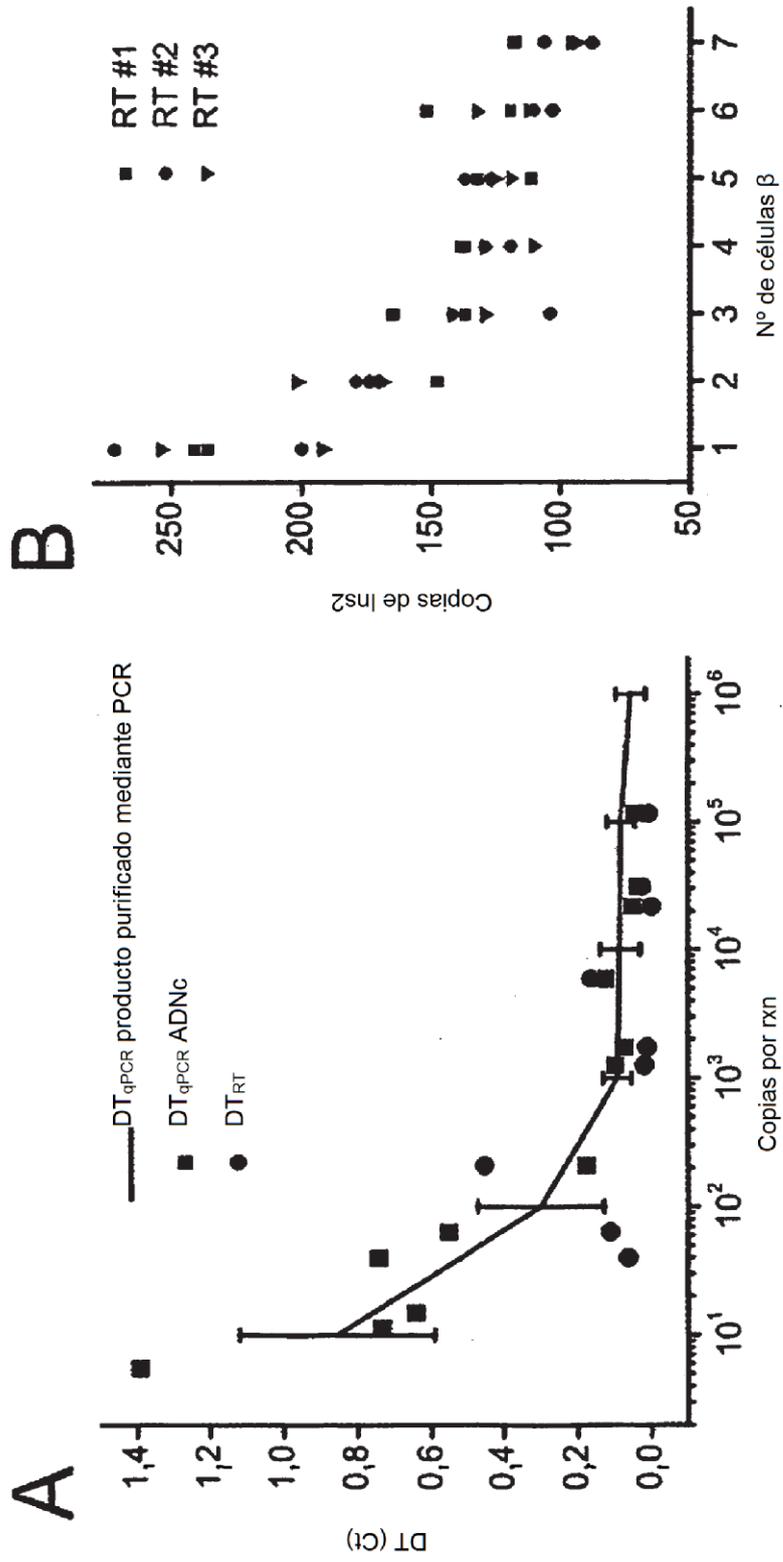


Fig. 5

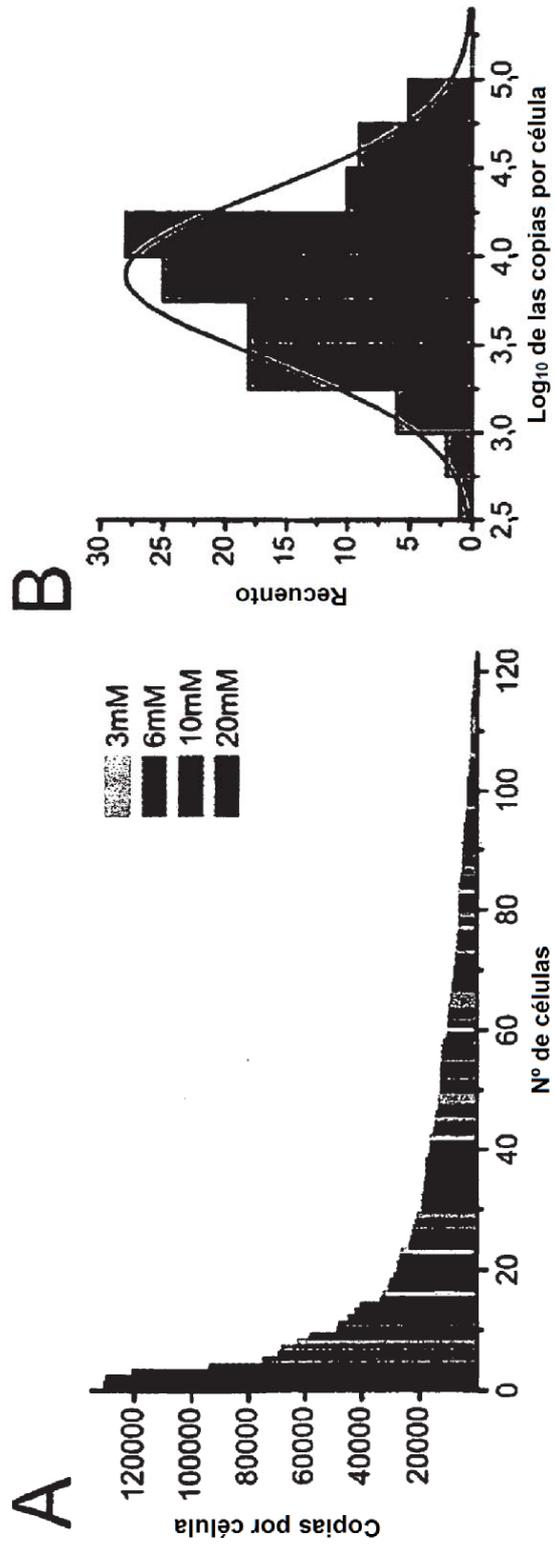


Fig. 6

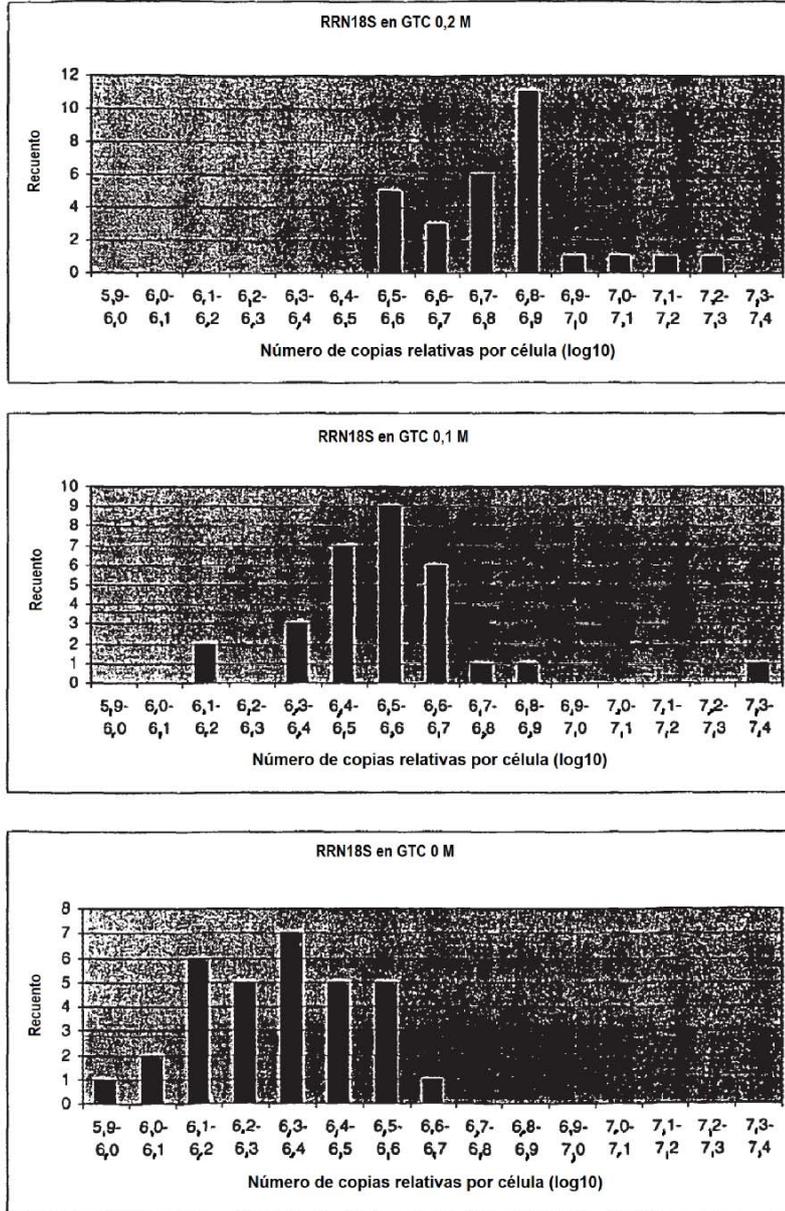


Fig. 7

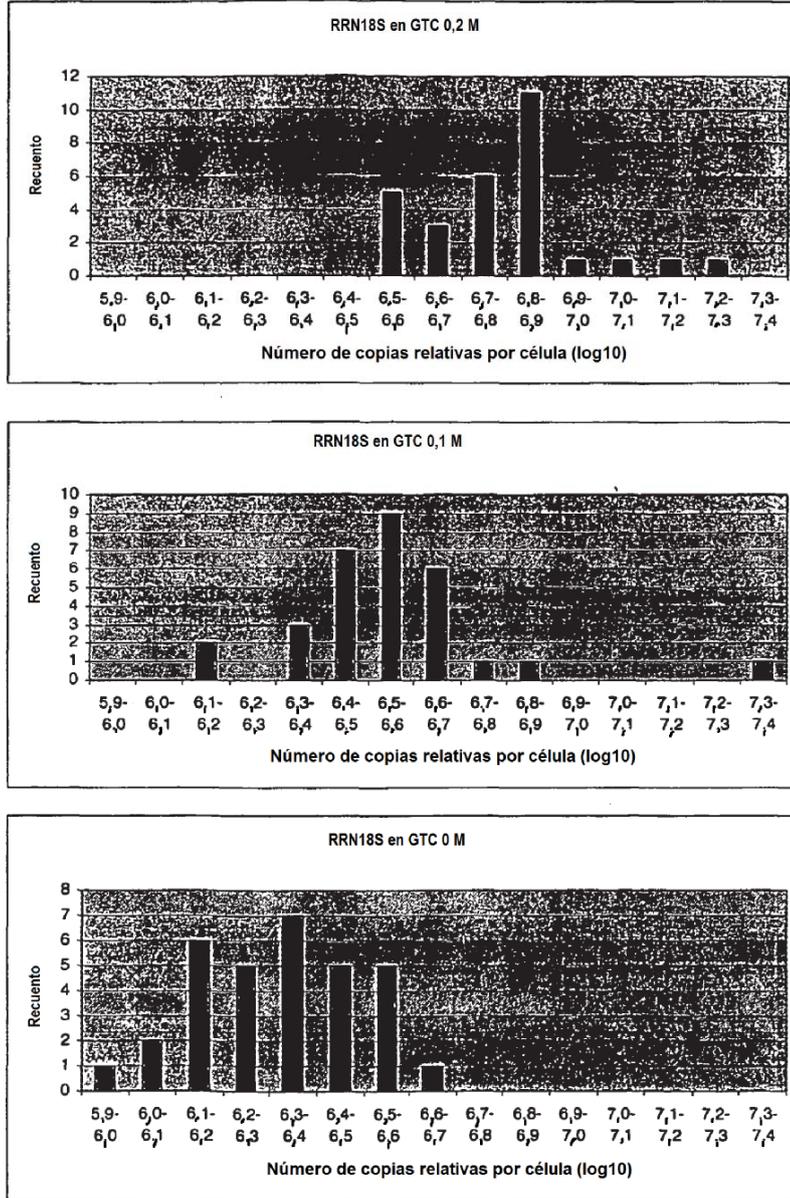


Fig. 8

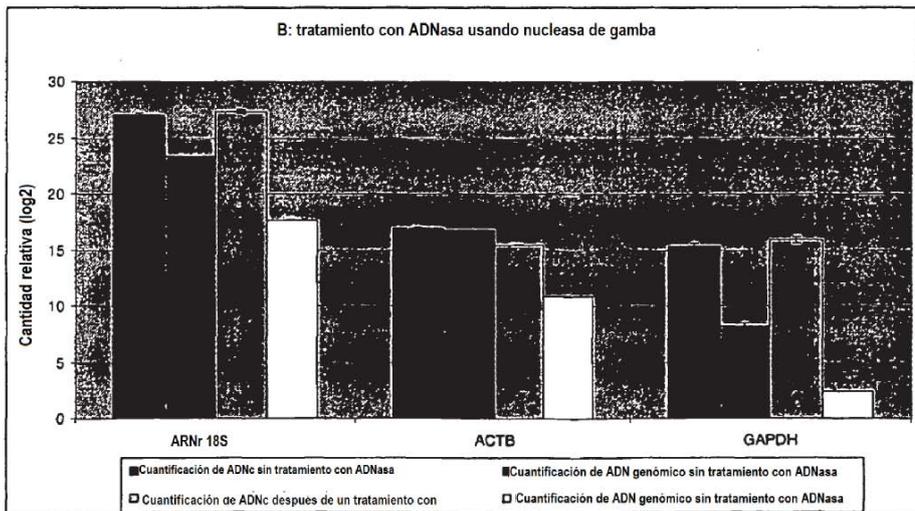
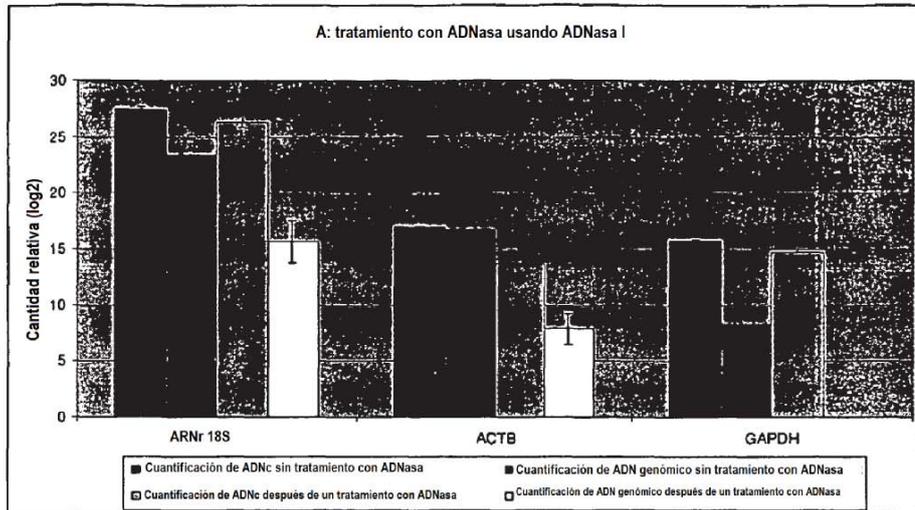


Fig. 9

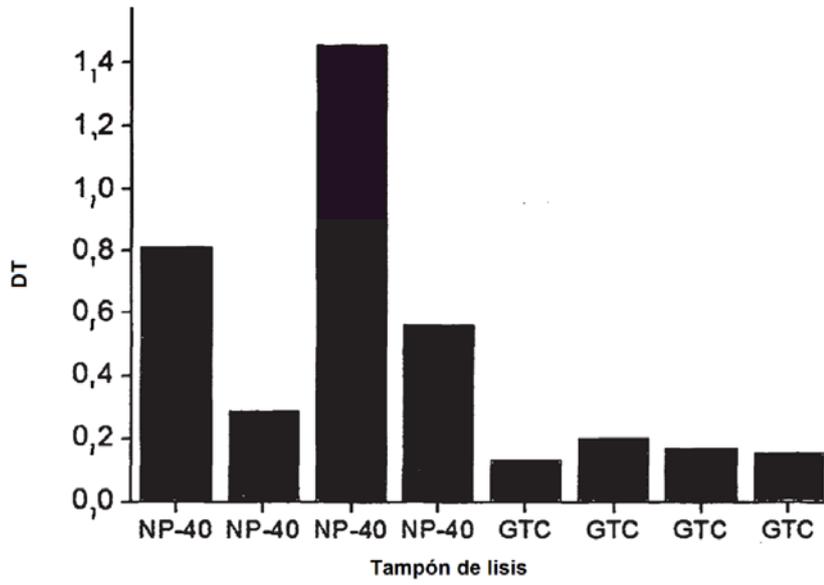
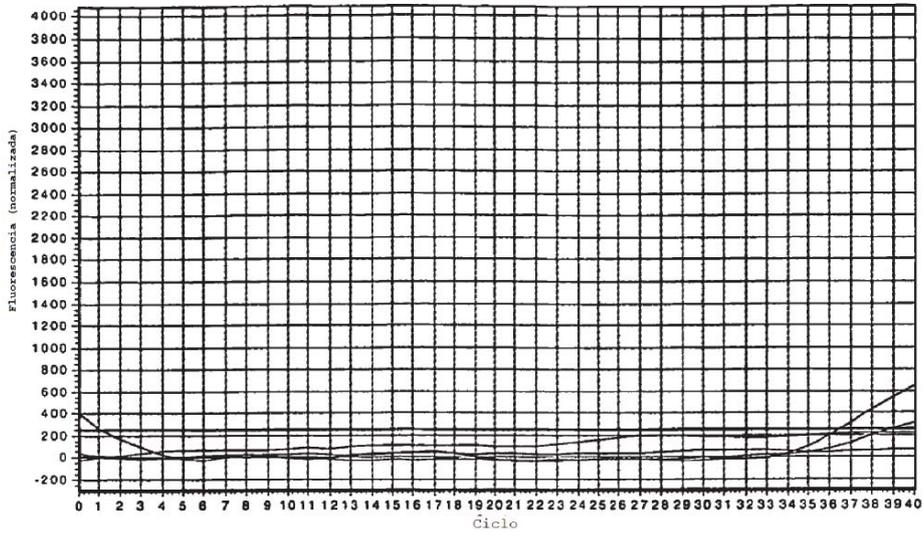
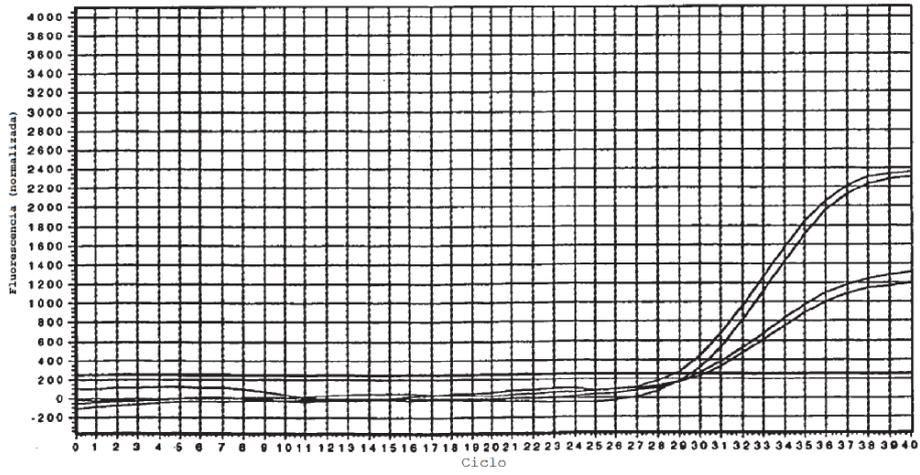


Fig. 10



Umbral: 249 (ajustado manualmente)
Parámetros de la línea de base: automático, corrección de la deriva desactivada



Umbral: 249 (ajustado manualmente)
Parámetros de la línea de base: automático, corrección de la deriva desactivada

Fig. 11

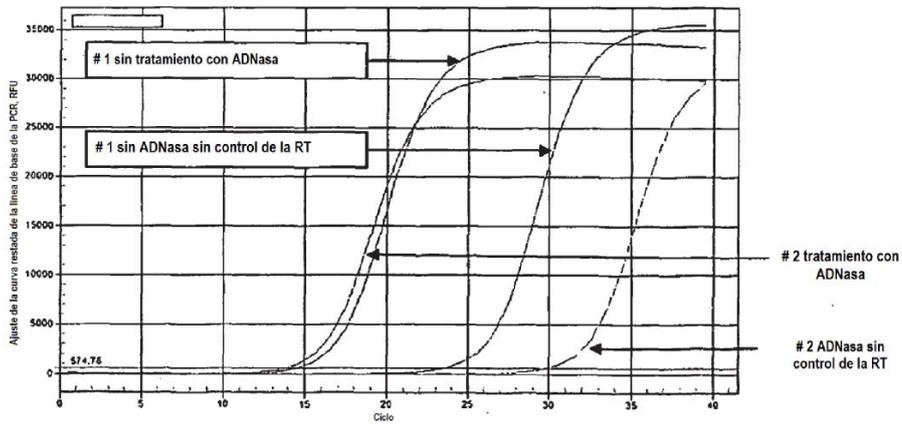
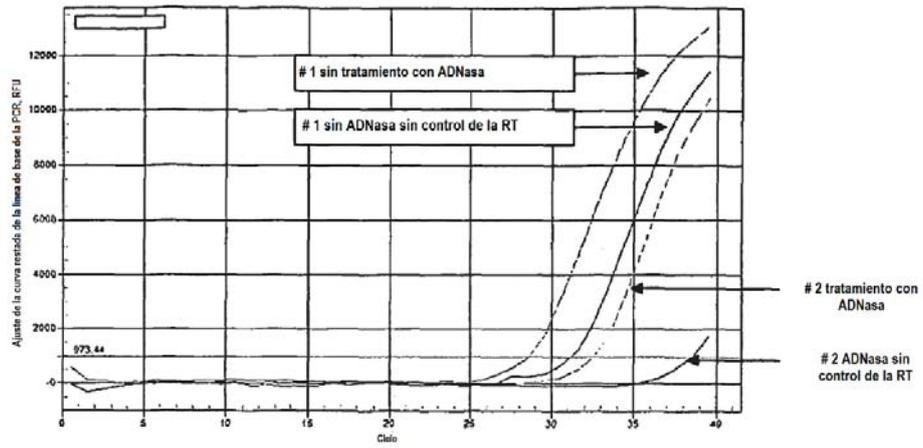


Fig. 12

