

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 922**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2006 E 06774894 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 1937834**

54 Título: **Métodos para la amplificación, cuantificación e identificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

01.09.2005 AU 2005205791

01.09.2005 US 713636 P

05.04.2006 CA 2545613

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

16.09.2014

73 Titular/es:

AUSDIAGNOSTICS PTY LTD. (100.0%)

Unit 3, 36 O'Riordan Street

Alexandria, NSW 2015, AU

72 Inventor/es:

STANLEY, KEITH

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 494 922 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para la amplificación, cuantificación e identificación de ácidos nucleicos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a métodos de amplificación, identificación y cuantificación de ácidos nucleicos y en particular a métodos mejorados para amplificar y cuantificar o identificar una pluralidad de genes o productos de expresión génica para uso en diagnóstico, uso forense y uso en investigación. La invención también se refiere a la
10 amplificación, identificación y cuantificación más precisa de múltiples secuencias de ácido nucleico a partir de muestras pequeñas y degradadas de ácidos nucleicos.

En particular, la invención se refiere a la amplificación y cuantificación simultánea de una pluralidad de moléculas de ácido nucleico y se describirán a partir de ahora en este documento con referencia a esta aplicación. Sin embargo,
15 se apreciará que la invención no se limita a este campo de uso particular.

Antecedentes

Cualquier análisis de la técnica previa durante toda la memoria descriptiva no debe considerarse de ningún modo como una admisión de que dicha técnica previa es ampliamente conocida o forma parte del conocimiento general común en el campo.

Los métodos conocidos para analizar la expresión génica incluyen el uso de PCR o PCR anidada para amplificar una secuencia de ADNc seleccionada, que representa el producto de expresión de un único gen de una combinación de moléculas de ADNc que representan muchos genes diferentes. En una reacción de PCR de un
25 único gen los productos de expresión génica de un único gen normalmente se amplifican usando un par de cebadores en una única ronda de PCR. En una reacción de amplificación por PCR anidada típica se amplifica una única secuencia muy rara mediante dos reacciones de PCR secuenciales, consistiendo cada una en 30-40 ciclos usando una única combinación de cebador anidado. La PCR anidada se usa normalmente para obtener un clon de una secuencia rara y no se considera normalmente para la cuantificación de expresión génica o identificación de un
30 gen. Para identificar el nivel de expresión génica usando PCR, normalmente se estima la cantidad de cada producto de PCR de interés usando PCR a tiempo real cuantitativa convencional (qPCR) para medir la acumulación de productos de PCR a tiempo real después de cada ciclo de amplificación. Esto utiliza normalmente un indicador detectable tal como un colorante intercalante, un colorante de unión al surco menor o sonda fluorogénica mediante la cual la aplicación de luz excita el indicador para que emita fluorescencia y la fluorescencia resultante se detecta
35 normalmente usando una cámara CCD o sistema de detección fotomultiplicador, tal como el descrito en el documento US 6.713.297. Aunque ahora son rutinarios los métodos de análisis de un único gen, surgen dificultades cuando deben amplificarse múltiples productos de expresión génica dentro de la misma reacción de PCR en una PCR combinada. En una reacción de amplificación combinada, cada producto de expresión génica individual debe competir por los componentes de reacción durante la PCR, de modo que los productos de genes altamente expresado, que están presentes en una elevada cantidad de copias en el inicio de la reacción de PCR, efectivamente evitan la amplificación de los productos génicos de bajo número de copias secuestrando los
40 componentes de reacción vitales. Esto produce una combinación de productos génicos amplificados que puede representar solamente una pequeña cantidad de genes altamente expresados. El análisis de estos productos se complica adicionalmente por la enorme variación que sucede entre experimentos replicados haciendo que la cuantificación precisa de la expresión génica sea muy difícil. Aunque la optimización de cebadores y componentes de reacción puede aliviar este problema en algún grado, normalmente implica experimentación extensiva y llega a ser mucho más difícil ya que la cantidad de genes a analizar en una reacción combinada se aumenta, de modo que cuatro genes normalmente sería el número máximo que podría analizarse de forma fiable en un sistema optimizado extensivamente. El análisis de expresión génica normalmente requiere que se estime la cantidad de cada expresión
45 génica, que se complica adicionalmente en una PCR combinada.

Aproximaciones modernas a PCR combinada

Las aproximaciones modernas a este problema incluyen el uso de sistemas de detección fluorogénicos tales como sondas Taqman® para detectar cada producto de expresión génica individualmente por unión a estas y liberando una fluorescencia detectable específica (Exner M. M., y Lewinski. M.A. (2002)). La sensibilidad de las reacciones de PCR a tiempo real combinadas, usando el LightCycler y el Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM 7700, depende de la concentración de la ADN polimerasa (Molecular and Cellular Probes. Oct. 2002; 16(5):351-7). Estas
60 sondas y sus usos se describen en las patentes de Estados Unidos N°: 5.210.015; 5.487.972; 5.804.375; 5.994.056; 5.538.848 y 6.030.787. Esto requiere una máquina de ciclado térmico a tiempo real que tenga múltiples canales para detectar fluorescencia a diferentes longitudes de onda. Además, las sondas Taqman® son caras de adquirir y también pueden limitar la región particular de secuencia que puede analizarse debido a las necesidades específicas de secuencia para la unión de la sonda.

Otras aproximaciones fluorogénicas incluyen el uso de sistemas de detección genéricos tales como el colorante SYBR-green, que emite fluorescencia cuando se intercala con el ADN amplificado de cualquier producto de

expresión génica como se describe en las patentes de Estados Unidos N^o: 5.436.134 y 5.658.751. Journal of Medical Microbiology (2003) 52, 681-683 describe un método de amplificación doble que incluye una PCR anidada que permite la detección cualitativa de dos dianas. Aunque el SYBR-green es barato de usar y tiene excelentes propiedades fluorogénicas normalmente no es apropiado para estimar el nivel de expresión génica en una PCR combinada ya que la fuente de fluorescencia, con respecto a cada producto génico, no puede determinarse fiablemente.

Independientemente del uso de sondas fluorogénicas o colorante SYBR-green como sistema de detección, la PCR combinada aún sufre el mismo problema en que los productos de expresión génica compiten por los componentes de reacción, impidiendo de este modo la cuantificación precisa de expresión génica de múltiples genes.

Aproximación de alto rendimiento

Una aproximación alternativa a las mediciones de expresión génica combinadas incluye el uso de microseries. Las microseries pueden usarse para cuantificar la expresión de miles de genes simultáneamente. Sin embargo, las microseries normalmente requieren una formación extensiva del operario, grandes cantidades de ARN de muestra, y un equipo caro. Además, aunque la cantidad de genes que puede analizarse es grande, la cuantificación resultante de expresión génica es mucho menos precisa, conduciendo a menudo a falsos positivos.

Por tanto, existe la necesidad de un método simple y barato que sea adecuado para usar en cualquier entorno en que se requiera la cuantificación precisa de la expresión de múltiples genes o donde se requiera la detección de ácidos nucleicos específicos o donde se requiera la producción de múltiples productos de ácido nucleico. La invención es particularmente adecuada para la amplificación y detección de ácidos nucleicos de muestras muy pequeñas tales como manchas de sangre, muestras de microscopia de disección laser, células individuales y muestras que contengan ácidos nucleicos parcialmente fragmentados tales como aquellas tomadas de muestras envejecidas y secciones incorporadas en parafina fijadas en formalina (FFPE). Sin embargo, los métodos de la invención son igualmente aplicables a muestras más grandes y también a aquellas de alta calidad. Ejemplos de entornos en que podría ser útil la invención incluyen, aunque sin limitación: diagnóstico; pronóstico; técnicas forenses; ensayo y control ambiental y de productos; detección de armas biológicas; investigación y similares.

Por lo tanto un objetivo de la presente invención es superar o mejorar al menos una de las desventajas de la técnica previa, o proporcionar una alternativa útil.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos de amplificación y cuantificación de ácidos nucleicos y en particular a métodos mejorados para amplificar y cuantificar o identificar una pluralidad de productos de expresión génica para uso de diagnóstico, uso forense y uso en investigación. Los métodos son particularmente aplicables a la cuantificación o identificación de expresión génica de muchos genes usando una pequeña cantidad de material de partida y también pueden usarse sobre muestras degradadas tales como aquellas obtenidas de material archivado o forense. Los especialistas destinatarios entenderán que los métodos de la invención son igualmente aplicables a la amplificación de ácidos nucleicos de otras fuentes tales como ADN genómico o ADN viral. La presente invención implica el uso de un protocolo de amplificación en tándem de dos rondas que incluye una reacción de amplificación combinada de primera ronda, que amplifica una pluralidad de secuencias de ácido nucleico seleccionadas seguida por una pluralidad de reacciones de amplificación de segunda ronda amplificando adicionalmente cada una normalmente una de las secuencias nucleicas seleccionadas.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un método definido en la reivindicación 1.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona un método definido en la reivindicación 2.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención se proporciona un método definido en la reivindicación 3.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención se proporciona un método definido en la reivindicación 4.

En una realización de la invención, la forma completamente anidada del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tándem Combinada (MT-PCR) se usa de acuerdo con el primer y tercer aspectos, mediante los cual cada molécula de ácido nucleico seleccionada se amplifica usando un par de cebadores externos en la primera ronda de amplificación y dos cebadores internos en la segunda ronda de amplificación.

En otra realización de la invención, se usa el método MT-PCR semi-anidado de acuerdo con el segundo y cuarto aspectos, mediante lo cual cada molécula de ácido nucleico seleccionada se amplifica usando un par de cebadores externos en la primera ronda de amplificación y la secuencia de ácido nucleico seleccionada se amplifica adicionalmente en la segunda ronda de amplificación usando un par de cebadores que comprenden uno de los cebadores externos usado en la primera ronda de amplificación apareado con un cebador interno.

Preferiblemente, el indicador fluorogénico es SYBR-green o colorante SYTO-9.

Los especialistas en la técnica destinatarios entenderán que también se contemplan otros colorantes fluorogénicos.

5 En algunas realizaciones, el indicador fluorogénico es una sonda fluorogénica.

En algunas realizaciones, la reacción de amplificación de segunda ronda incluye una pluralidad de pares de cebadores y una pluralidad de sondas fluorescentes de modo que se amplifica una pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas de cada secuencia seleccionada y se cuantifica mediante las sondas fluorescentes siendo

10 cada una específica para una secuencia de ácido nucleico seleccionada.

Los especialistas en la técnica destinatarios reconocerán que las reacciones de amplificación de segunda ronda pueden realizarse simultánea o secuencialmente.

15 Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico incluyen moléculas de ADN.

Preferiblemente, los cebadores incluidos en la reacción de amplificación de segunda ronda tienen una T_m superior que al menos uno de los cebadores externos incluidos en la reacción de amplificación de primera ronda, de modo que el oligonucleótido que ceba la reacción de amplificación de segunda ronda se desvíe sustancialmente en favor

20 de los cebadores que tienen la T_m superior.

En algunas realizaciones, al menos uno de los cebadores externos incluyen nucleótidos UTP por lo cual el cebador es susceptible a digestión por una enzima UNG y los cebadores externos se retiran del final de la primera ronda de amplificación por digestión con una enzima UNG evitando de este modo sustancialmente la contaminación de la

25 reacción de amplificación de segunda ronda por los cebadores de la primera ronda.

Preferiblemente, la combinación de ciclos de amplificación combinada usados se selecciona teniendo en cuenta la cantidad de ácido nucleico usada al inicio de la reacción para minimizar los efectos de cualquier competición entre amplicones por los componentes de reacción durante la amplificación amplificando estos en un punto antes de que

30 haya sucedido competición significativa entre los amplicones por los componentes de reacción proporcionando al mismo tiempo amplificación específica de cada secuencia de ácido nucleico seleccionada. Por ejemplo, cuando se usan de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 500 ng de ácido nucleico, se prefieren aproximadamente 10 ciclos de amplificación combinada. Cuando se usan de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 ng de ácido nucleico, se prefieren aproximadamente 15 ciclos de amplificación combinada. Cuando se usan de

35 aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 ng de ácido nucleico, se prefieren aproximadamente 20 ciclos de amplificación combinada. Estará claro para los especialistas en la técnica destinatarios a partir del contenido proporcionado en la presente memoria descriptiva que puede usarse una cantidad más grande de ciclos de amplificación combinada cuando se introducen cantidades inferiores de ácido nucleico.

40 Preferiblemente, la reacción de amplificación combinada de primera ronda se permite proceder durante entre aproximadamente 1 y aproximadamente 30 ciclos. Más preferiblemente, la reacción de amplificación combinada de primera ronda se permite proceder durante entre aproximadamente 5 y aproximadamente 25 ciclos, aún más preferiblemente, la reacción de amplificación combinada de primera ronda se permite proceder durante

45 aproximadamente 5 y aproximadamente 20 ciclos y mucho más preferiblemente la reacción de amplificación combinada de primera ronda se permite proceder durante entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 ciclos.

Aunque una reacción de PCR combinada convencional puede usarse normalmente para amplificar, cuantificar e identificar solamente una cantidad limitada de secuencias diferentes (tal como 4 secuencias), se ha descubierto sorprendentemente que los métodos de la invención pueden usarse para amplificar, cuantificar y/o identificar un

50 exceso de 150 secuencias seleccionadas. Preferiblemente, la reacción de amplificación combinada de la invención amplifica más de aproximadamente 4 moléculas de ácido nucleico seleccionadas. Más preferiblemente, la reacción de amplificación combinada amplifica entre aproximadamente 4 y 150 moléculas de ácido nucleico seleccionadas. Aún más preferiblemente, la reacción de amplificación combinada amplifica entre aproximadamente 10 y 150 moléculas de ácido nucleico seleccionadas y mucho más preferiblemente la reacción de amplificación combinada

55 amplifica entre aproximadamente 20 y 100 moléculas de ácido nucleico seleccionadas.

Los especialistas en la técnica destinatarios entenderán que la cantidad máxima de moléculas de ácido nucleico seleccionadas que puede amplificarse eficazmente en la reacción de amplificación combinada de primera ronda para una muestra dada y grupo de cebadores debe de determinarse en cada caso teniendo en cuenta el nivel de

60 amplificación requerido y la precisión de la cuantificación resultante en la segunda ronda de amplificación.

Preferiblemente, los métodos se usan en un método para detectar polimorfismos, mutaciones, inserciones y delecciones.

65 En una realización, se usan sondas fluorogénicas en la segunda ronda de amplificación para detectar variantes de ácido nucleico tales como polimorfismos, mutaciones, SNP, metilaciones (después de tratamiento con bisulfito),

inserciones y deleciones.

En algunas realizaciones, los métodos se usan en el diagnóstico de enfermedades y trastornos.

5 En algunas realizaciones, los métodos se usan para el diagnóstico de una neoplasia.

En algunas realizaciones, la neoplasia es cáncer de mama.

En algunas realizaciones, la neoplasia es cáncer colorrectal.

10 Los especialistas en la técnica destinatarios reconocerán que los métodos de la invención serán útiles en un ensayo de diagnóstico para cualquier enfermedad o trastorno que pueda detectarse mediante la amplificación y/o cuantificación de cualquier secuencia de ácido nucleico dada.

15 En algunas realizaciones, los métodos se usan para la detección e identificación de organismos seleccionados.

En algunas realizaciones, los organismos se detectan e identifican por análisis de fusión de alta resolución.

Preferiblemente, los organismos se seleccionan entre el grupo de bacterias, virus, hongos, micoplasma y parásitos.

20 Preferiblemente, el método incluye el análisis de la curva de fusión de alta resolución y la curva de fusión se genera preferiblemente teniendo una resolución en el intervalo de aproximadamente 0,05 °C a aproximadamente 0,02 °C y aún más preferiblemente a una resolución de menos de 0,02 °C.

25 Los especialistas en la técnica destinatarios entenderán que los métodos de la invención pueden aplicarse a cualquier material genético que pueda amplificarse donde este material puede obtenerse de cualquier organismo.

Preferiblemente, las reacciones de amplificación se procesan automáticamente en un aparato de ciclado térmico.

30 Preferiblemente, el aparato de ciclado térmico es un aparato de ciclado térmico a tiempo real multi-pocillo.

En algunas realizaciones, el aparato de ciclado térmico es un dispositivo de PCR de flujo continuo.

En algunas realizaciones, el aparato de ciclado térmico es un aparato de ciclado térmico rotatorio.

35 De acuerdo con un quinto aspecto de la invención se proporciona un método para identificar y/o cuantificar al menos una secuencia de ácido nucleico seleccionada que incluye las etapas de:

- 40 (i) mezclar una o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas con uno o más indicadores detectables;
 (ii) generar una curva de fusión midiendo la señal generada por dicho uno o más indicadores detectables;
 (iii) identificar y/o cuantificar dicha una o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas a partir de dicha curva de fusión.

45 Preferiblemente, la curva de fusión se genera teniendo una resolución en el intervalo de aproximadamente 0,05 °C a aproximadamente 0,02 °C y aún más preferiblemente a una resolución de menos de 0,02 °C.

Breve descripción de las figuras

50 Figura 1. Diagrama esquemático que muestra la disposición de cebadores en MT-PCR que ilustra las realizaciones tanto en tándem como en hemi-tándem (A y B respectivamente), cada una mostrada en el proceso de amplificar y cuantificar los productos de expresión génica de 4 genes distintos (1-4).

Figura 2A. 24 de las mediciones de expresión génica por triplicado que se realizaron a partir de una única muestra de ARN por MT-PCR en hemi-tándem medidas por triplicado en un Corbett Research RG3000 usando los cebadores de las Tablas 1 y 2, y el método descrito.

55 Figura 2B. Curvas de fusión referentes a las 24 mediciones génicas mostradas en la Figura 2A.

Figura 2C. Los productos formados por MT-PCR para los 24 genes mostrados en la Figura 2A analizados usando un Bioanalizador.

60 Figura 3A. 24 curvas de amplificación de productos de expresión génica (cada una por triplicado) usando ADNc derivado de una única sección de material FFPE, que se ha amplificado primero usando 15 ciclos de PCR combinada como una combinación de 72 productos de expresión génica seleccionados donde 24 de estos se cuantificaron posteriormente en una segunda ronda de PCR.

Figura 3B. Curvas de fusión para las 24 mediciones de genes mostradas en la Figura 3A.

65 Figura 4A. 24 curvas de amplificación de productos de expresión génica (cada una por triplicado) a partir de 10 pg de ARN introducido mostrado en la segunda de PCR después de 20 ciclos iniciales de amplificación combinada.

Figura 4B. Curvas de fusión para las 24 mediciones de genes mostradas en la Figura 4A.

- Figura 5. Determinación de una cantidad adecuada de ciclos de amplificación combinada para evitar competición entre amplicones por componentes de reacción durante la amplificación.
La PCR del gen más abundante se usó en la serie génica actual (BTF3) en las condiciones de la etapa de PCR combinada. Se ilustran curvas de amplificación cuando cada amplificación se inició usando ADNc derivado de 5 ng, 50 ng y 500 ng ARN introducido.
- Figura 6A. La cuantificación de expresión génica relativa a un gen comparador se mantiene en diferentes cantidades de ARN introducido.
- Figura 6B. Variación de la cantidad de ciclos de amplificación combinada y el efecto resultante sobre la cuantificación de la expresión génica.
- Figura 7A. Curvas de fusión obtenidas después de la segunda ronda de amplificación para ensayar los efectos del uso de 0,5 unidades de Taq por reacción en la reacción de amplificación de segunda ronda de MT-PCR en tándem.
- Figura 7B. Un experimento idéntico al mostrado en la Figura 7A, donde se usaron 1,0 unidades de Taq.
- Figura 7C. Curvas de fusión obtenidas después de segunda ronda de amplificación para ensayar los efectos de usar 20 unidades de transcriptasa inversa para transcripción inversa antes de la etapa de amplificación combinada MT-PCR en tándem.
- Figura 7D. Un experimento idéntico al mostrado en la Figura 7C, donde se usaron 200 unidades de transcriptasa inversa.
- Figura 8. Potencial de diagnóstico adicional de MT-PCR: La expresión del gen EGFR en 15 líneas celulares de las cuales BT20 y SKBR3 se sabe que sobreexpresan EGFR.
- Figura 9A. Cuantificación de genes inflamatorios por MT-PCR que muestra la expresión de 17 genes inflamatorios por triplicado a partir de una biopsia de piel humana.
- Figura 9B. Curvas de fusión correspondientes para los productos de amplificación de la Figura 9A.
- Figura 9C. Análisis de Bioanalyzer de los productos de amplificación de la Figura 9A.
- Figura 10A. Análisis de la región hipervariable de TP53 por fusión de alta resolución en líneas celulares de cáncer de mama humano.
- Figura 10B. Análisis de una región de TP53 sin mutaciones usando una fusión de alta resolución en líneas celulares de cáncer de mama humano.
- Figura 11A. Análisis del amplicón de ARN 16S en diversas cepas bacterianas por fusión de alta resolución.
- Figura 11B. Gráfico de diferencia de la curva de fusión normalizada mostrada en la Fig. 11A.

Descripción de la realización preferida

- Se diseñó un protocolo de PCR en tándem de dos rondas llamado Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tándem Combinada (MT-PCR) para medir de forma precisa la expresión de un gran grupo de genes a partir de una muestra relativamente pequeña de ácido nucleico en un tiempo reducido a coste reducido. El problema inherente con PCR combinada, mediante la cual muchos productos de expresión génica compiten por los componentes de reacción, se supera por la presente invención mediante la cual la amplificación combinada se limita a una cantidad preseleccionada de ciclos de modo que se minimiza la competición entre los amplicones. La sensibilidad se mejora usando una amplificación de dos rondas, permitiendo que todas las secuencias de ácido nucleico seleccionadas, que normalmente son los productos de expresión de un grupo de genes, se midan usando una cantidad de muestra que previamente había sido suficiente solamente para cuantificar productos a partir de una única secuencia seleccionada tal como los productos de expresión de un único gen. El tiempo de procesamiento global se reduce ya que la segunda ronda de amplificación de ácido nucleico puede usar parámetros de ciclado rápido.
- En una realización preferida, los costes se reducen mediante el uso de medición de ADN SYBR-green en lugar de usar sondas oligonucleotídicas marcadas costosas que se requerían previamente para detectar múltiples secuencias a partir de reacciones combinadas.
- En otra realización, también pueden usarse sondas fluorogénicas tales como sondas Taqman® para detectar y cuantificar los productos amplificados de un único ácido nucleico seleccionado o una pluralidad de ácidos nucleicos seleccionados en la reacción de amplificación de segunda ronda.
- Para analizar los niveles de expresión génica de muestras clínicas, primero se extrae el ARN de un tejido apropiado, normalmente de una muestra de biopsia conservada en formaldehído, muestra sanguínea u otro tejido. Después se prepara el ADNc a partir de la muestra de ARN por transcripción inversa, que puede hacerse usando hexámeros aleatorios (para un cebado aleatorio) para preparar ADNc a partir del grueso de secuencias expresadas o más preferiblemente por métodos específicos de gen.
- En una realización preferida, la reacción transcripción inversa (reacción RT) se realiza usando un método de cebado específico de múltiples genes usando cada par de cebadores externos específicos para los ácidos nucleicos seleccionados de interés. Estos mismos cebadores externos se usan posteriormente para amplificar los productos de expresión génica específicos de interés en la amplificación combinada de primera ronda, cuyos métodos se describen posteriormente en este documento. Usando los mismos cebadores de transcripción inversa y la primera ronda de amplificación se reduce la cantidad de oligonucleótidos usada en la mezcla de reacción. El cebado específico de gen también reduce problemas asociados con la degradación del ARN permitiendo el uso de MT-PCR

5 con ARN extraído de muestras incorporadas en parafina fijadas en formaldehído (FFPE) que se han almacenado durante muchos años. La reacción RT se realiza durante aproximadamente un minuto, que es suficiente para generar el ADNc requerido para posterior amplificación. Los amplicones de amplificación combinada normalmente son de menos de aproximadamente 150 pb de longitud, lo que facilita tanto una transcripción inversa eficaz como la posterior amplificación. También se obtienen resultados mejorados usando pequeñas cantidades de enzima RT en la reacción y en una realización preferida se usa aproximadamente 1 unidad/ μ l de MMLV o enzima superscript III en la reacción RT.

10 La transcriptasa inversa es un inhibidor de las reacciones de PCR y es útil para retirar o desnaturalizar la enzima antes de la amplificación combinada. En una realización preferida, la transcriptasa inversa se desnaturaliza antes de etapa de amplificación combinada por una etapa de calentamiento a aproximadamente 95 °C. Esto también sirve para desnaturalizar el ADNc para hacer que esté disponible para la primera ronda de amplificación combinada.

15 Preferiblemente, se añade una proteína vehículo para estabilizar las enzimas en la reacción de primera ronda. La gelatina es satisfactoria para esto debido a su bajo coste y su estabilidad a aproximadamente 95 °C, aunque BSA, proteínas cristalinas y otras proteínas o estabilizadores son alternativas adecuadas que también pueden usarse.

20 La amplificación combinada de primera ronda normalmente contiene los cebadores externos y componentes requeridos para permitir la co-amplificación de muchos genes expresados o productos de secuencia en una amplificación combinada.

25 Será evidente para los especialistas en la técnica destinatarios, que el formato de las reacciones puede seleccionarse teniendo en cuenta el equipo que se esté usando. Por ejemplo, cuando se usa una "Placa-Génica" (Corbett Research, Sídney, Australia) que puede usarse para ejecutar 72 reacciones de amplificación, pueden cuantificarse los productos de expresión de aproximadamente 24 genes por triplicado usando una de estas placas o 72 genes individuales, o como alternativa pueden cuantificarse aproximadamente 32 productos de expresión génica por triplicado usando un formato de placa de 96 pocillos o la cantidad también puede seleccionarse teniendo en cuenta la validez estadística requerida.

30 El siguiente formato descrito se refiere al uso de una "Placa-Génica" de Corbett Research aunque los especialistas en la técnica destinatarios entenderán por conveniencia, puede usarse cualquier otro formato adecuado tal como una placa de 384 pocillos, placa de 96 pocillos, o dispositivo de flujo continuo.

35 Preferiblemente, en cada amplificación combinada de primera ronda, se usan aproximadamente 72 pares de cebadores externos para amplificar aproximadamente 72 secuencias simultáneamente, representando cada una el producto de expresión de un gen u otra secuencia expresada.

40 Preferiblemente, los cebadores externos se diseñan para amplificar fragmentos de ADN que constan de amplicones de aproximadamente 250 pb de ADN o menos de cada producto de expresión génica para una MT-PCR completamente anidada o aproximadamente 150 pb o menos para MT-PCR hemi-anidada.

45 Un especialista en la técnica reconocerá que la invención también puede aplicarse a secuencias de ácido nucleico seleccionadas de longitudes mayores usando la práctica convencional de laboratorio, donde la alteración de las condiciones tales como la cantidad de tiempo usado en la reacción RT y los tiempos de extensión usados durante las amplificaciones también pueden aumentarse para conseguir síntesis adecuada de ADNc y amplificación.

50 Para superar el problema de la competición entre los amplicones por los componentes de reacción durante la amplificación combinada, la reacción de amplificación se ejecuta durante una cantidad relativamente baja de ciclos, dependiendo del nivel introducido de ARN usado. En un instrumento automatizado, el nivel de síntesis de ADN total en la reacción de amplificación combinada puede medirse con un colorante fluorogénico intercalante, tal como un colorante SYBR-green, para asegurar que no se excede este punto. La cantidad de ciclos usada en la amplificación combinada de primera ronda puede optimizarse teniendo en cuenta la abundancia relativa de los ácidos nucleicos seleccionados y el tamaño de muestra disponible de modo que la amplificación de estos amplicones de la primera ronda de amplificación combinada no produzca más de aproximadamente un 5 % de la cantidad total de polinucleótidos que se produciría en la reacción cuando la reacción se deja proceder durante una cantidad de ciclos más allá de un punto tal que ya no se conseguiría amplificación adicional. Mediante esta variante del método, se evita que la combinación de secuencias de ácido nucleico seleccionadas (tales como productos de expresión génica) se amplifiquen hasta un nivel donde sucede competición significativa por los componentes de reacción entre sus amplicones respectivos durante amplificación combinada. Como la cantidad total de ácido nucleico sintetizado aún es relativamente pequeña, siempre existe un gran exceso de reactivos y por lo tanto se minimiza sustancialmente la competición entre los amplicones en la reacción de amplificación combinada.

65 La cantidad de ciclos de amplificación combinada se selecciona de acuerdo con la sensibilidad deseada de la reacción de detección. Preferiblemente, se usan aproximadamente 10 ciclos de amplificación combinada para la detección de expresión génica a partir de una muestra de aproximadamente 50-500 ng de ARN. Preferiblemente, se usan aproximadamente 15 ciclos para la detección de expresión génica a partir de aproximadamente 0,5 a 50 ng de

ARN y preferiblemente, se usan aproximadamente 20 ciclos para la detección a partir de aproximadamente 0,01 a 0,5 ng de ARN. Los especialistas en la técnica destinatarios reconocerán que puede usarse una gran cantidad de ciclos de amplificación combinada cuando se introducen cantidades inferiores de ARN.

- 5 En la práctica, cuando se usa el mismo tipo y cantidad de muestra, se hacen comparaciones de expresión génica entre los ensayos de MT-PCR usando la misma cantidad de ciclos de amplificación combinada.

10 En una realización preferida, esta primera ronda de amplificación se ejecuta durante 15 ciclos con 10 ng de ARN o ADN introducido y se incluye un elevado nivel de nucleótidos trifosfato (aproximadamente 0,3 mM) en la mezcla de reacción para reducir adicionalmente la probabilidad de competición entre los amplicones. La concentración de cebadores externos en la amplificación combinada de primera ronda también se reduce hasta aproximadamente 0,1 μ M para reducir adicionalmente las concentraciones de estos cebadores cuando los productos de reacción se transfieren a la reacción de amplificación de segunda ronda reduciendo de este modo los efectos de estos cebadores sobre la reacción de amplificación de segunda ronda.

15 Aunque esto reduce el problema significativo de competición entre amplicones en amplificación combinada, la amplificación obtenida usando dicha cantidad baja de ciclos de amplificación no proporciona suficiente amplificación para permitir una detección o cuantificación precisa de las secuencias de ácido nucleico expresadas y la mezcla de reacción de amplificación combinada completada contiene una combinación de productos amplificados derivados de muchas secuencias de ácido nucleico expresadas. La amplificación adicional de secuencias seleccionadas específicas a partir de esta combinación en reacciones diferentes de amplificación de segunda ronda permite que los productos de amplificación de cada gen o secuencia expresada se amplifiquen suficientemente para su análisis en una base sustancialmente individual detectando de este modo y cuantificando de forma precisa cada secuencia de ácido nucleico seleccionada a partir de una combinación original de secuencias de ácido nucleico.

20 La cantidad reducida de cebadores y enzima polimerasa Taq usada en la segunda ronda de PCR reduce adicionalmente la probabilidad de formación de producto no específico tal como la formación de cebadores dimerizados. En algunas realizaciones, se usan aproximadamente 0,5 unidades de Taq por cada 20 μ l de reacción de amplificación de segunda ronda y la concentración de cebador se reduce hasta aproximadamente 0,2 μ M. Preferiblemente, se añade DMSO aproximadamente al 2 % para facilitar la amplificación de amplicones ricos en GC en estas condiciones.

25 En una realización preferida, normalmente son suficientes aproximadamente 35 ciclos de amplificación de segunda fase para permitir la cuantificación precisa de productos de expresión génica a partir de genes expresados de forma escasa. Un especialista en la técnica reconocerá que la cantidad de ciclos en la primera y segunda rondas de amplificación también puede variarse para permitir la cuantificación de ácidos nucleicos donde estos se han amplificado a partir de cantidades diferentes de material de partida antes de las reacciones de amplificación combinada de primera ronda, mediante lo cual, cuanto menor es la cantidad de material de partida usado, mayor es la cantidad de ciclos de amplificación de primera y segunda ronda que normalmente se requiere.

30 En una realización, se recoge una alícuota de la reacción de amplificación combinada de primera ronda completada y se añade a varios tubos independientes, que contienen cada uno una mezcla de reacción de amplificación de segunda ronda individual. Esta alícuota puede diluirse antes de su adición en las mezclas de reacción de segunda ronda o puede transferirse una pequeña cantidad de productos de primera ronda de modo que exista un nivel adecuado de dilución de la alícuota en la adición a la mezcla de reacción de amplificación de segunda ronda.

35 Preferiblemente, se hace una dilución 25x de los productos de amplificación combinada de primera ronda antes de su adición a cada tubo de reacción de segunda ronda, donde se obtiene dilución adicional hasta un nivel de aproximadamente 100x cuando la alícuota se diluye dentro de la reacción de amplificación de segunda ronda. Un especialista en la técnica reconocerá que el nivel de dilución puede variarse, pero que este debe ser normalmente suficientemente elevado para evitar que los cebadores externos de primera ronda residuales afecten a la precisión de la cuantificación de cada secuencia de ácido nucleico seleccionada en la segunda ronda de amplificación.

40 Esta etapa de dilución asegura que la cantidad de cebadores externos de primera ronda que pasan desde la reacción de amplificación combinada de primera ronda a la segunda ronda de amplificación sea insignificante, de modo que el cebado adicional en la segunda ronda de amplificación esté dirigido sustancialmente por los cebadores de segunda ronda, amplificando de este modo sustancialmente solamente aquellas moléculas seleccionadas que se ceban por los cebadores de segunda ronda elegidos.

45 Preferiblemente, cada reacción de amplificación de segunda ronda individual incluye un par de cebadores internos, que se han seleccionado por ser complementarios a una subregión dentro de uno de los amplicones de uno de los genes seleccionados o secuencias expresadas amplificadas en la primera ronda de amplificación combinada. Cada par de cebadores internos amplifica un amplicón más corto y en una realización preferida estos amplicones más cortos son de aproximadamente 70-90 pb o menos.

65

En una realización alternativa, se añade una cantidad adicional de uno de los cebadores externos de primera ronda a la reacción de amplificación de segunda ronda en combinación con uno de los cebadores internos correspondientes para amplificar adicionalmente la secuencia de ácido nucleico seleccionada en una MT-PCR hemianidada, donde este amplicón es preferiblemente de aproximadamente 150 pb o menos.

5 Por tanto, separando la reacción de amplificación para cada gen o secuencia expresada de interés en la segunda ronda de amplificación, en que sucede el grueso de amplificaciones, cada amplicón se amplifica libre de competición con otras secuencias en un estado independiente que facilita su análisis adicional.

10 En una realización preferida, el tiempo de procesamiento se reduce mediante la inclusión de los cebadores de segunda ronda en una forma liofilizada dentro de los recipientes de reacción de PCR de segunda ronda. Ejemplos de recipientes de reacción adecuados incluyen una "Placa-Génica" (Corbett Research), una placa de PCR de 96 pocillos o una placa de PCR de 384 pocillos (Applied Biosystems, EE.UU.). La mezcla de producto de amplificación de primera ronda/componente de reacción después se añade a los recipientes de reacción antes de la segunda
15 ronda de amplificación.

Preferiblemente, las reacciones de amplificación de segunda ronda también se ejecutan usando condiciones de ciclado rápido para reducir la aparición de un falso cebado y reducir el tiempo de procesamiento.

20 Convenientemente, en una realización de la invención, la primera fase de amplificación combinada contiene cebadores externos para aproximadamente 36 genes basados en el formato de "Placa-Génica" de 72 pocillos que permite que cada amplificación se ejecute por duplicado usando ADNc transcrito de forma inversa procedente de aproximadamente 10 ng de ARN total. Las reacciones de amplificación de primera ronda contienen cebadores
25 externos, cada uno a una concentración de aproximadamente 0,1 μ M en presencia de DMSO a aproximadamente al 2 %. Al final de la primera ronda de aproximadamente 10 ciclos de amplificación, los productos e reacción se diluyen aproximadamente 25x, y se introducen aproximadamente 5 μ l de estos productos diluidos en la segunda ronda de amplificación. Para la segunda ronda de amplificación, se usa ciclado rápido ya que los genes de interés ya se han enriquecido en el molde. Además, los cebadores internos se diseñan para que se unan dentro de los amplicones
30 seleccionados producidos a partir de la amplificación combinada. Estos cebadores internos posibilitan la amplificación de amplicones cortos de aproximadamente 70-90 pb de modo que se usan tiempos cortos de extensión en la segunda ronda de amplificación. Normalmente, las condiciones de ciclado de amplificación de segunda ronda son 1 segundo a 95 °C, 10 segundos a 60 °C y 10 segundos a 72 °C.

35 Un especialista en la técnica reconocerá que la cantidad de secuencias que puede co-amplificarse en la reacción combinada de primera ronda puede variarse siempre que la inclusión de pares adicionales de cebadores externos de primera ronda no conduzca a productos adicionales indeseados en la segunda ronda de amplificación, o afecten a la precisión de cuantificación de los amplicones seleccionados durante la segunda ronda.

40 Como los productos de reacción introducidos en la segunda ronda de amplificación están enriquecidos en la secuencias de ácido nucleico seleccionadas de interés, la segunda fase puede usar condiciones de ciclado rápido y contener concentraciones limitantes de cebadores y enzima que conduce a la formación de productos únicos y correctos de amplicón en la segunda ronda de amplificación. Esto provoca que los productos de amplificación de segunda ronda estén sustancialmente no contaminados por moléculas de ADN no específicas o cebadores
45 dimerizados que de otro modo complicaría o evitaría el análisis.

Las mezclas de reacción usadas en la segunda ronda de amplificación preferiblemente incluyen un componente indicador detectable tal como un colorante fluorescente o sondas que contienen fluoróforos tales como sondas Taqman® y un especialista en la técnica reconocerá que se requieren temperaturas de hibridación específicas para
50 el uso de dichas sondas.

En una realización preferida, el componente indicador es un colorante SYBR-green que emite fluorescencia en respuesta a la presencia de ADN amplificado de un modo no específico, por lo cual el nivel de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN amplificado presente en la reacción de amplificación de segunda ronda. Las reacciones de amplificación de segunda ronda se controlan preferiblemente en una máquina de PCR a tiempo real
55 durante la amplificación de modo que se controle el desarrollo de esta fluorescencia y se cuantifique la cantidad de secuencias o productos génicos expresados presentes en cada reacción.

60 En una realización alternativa, la reacción de amplificación de segunda ronda puede incluir cebadores para una pluralidad de secuencias de ácido nucleico seleccionadas mediante lo cual se hace la detección y cuantificación de secuencias de ácido nucleico seleccionadas usando sondas fluorogénicas tales como sondas Taqman® u otras sondas oligonucleotídicas marcadas adecuadamente.

65 En una realización adicional, los métodos de la invención se aplican al análisis de ADN para detectar secuencias específicas asociadas con diversos rasgos (tal como búsqueda de rasgos y predisposiciones a enfermedades en mamíferos), SNP, metilaciones (después de reacción con bisulfito), trastornos genéticos y similares.

Los especialistas en la técnica destinatarios reconocerán que la invención permite el análisis de pequeñas muestras de modo que este método es útil para, aunque sin limitación, análisis forense y la detección de parásitos, virus, hongos, bacterias y micoplasma, contaminación de alimentos, tejido, agua, tierra, aire y similares incluyendo detección de armas biológicas.

5 En una realización adicional más, el procesamiento de los ácidos nucleicos antes de PCR y la preparación de las reacciones de PCR se automatizan usando un aparato adecuado tal como el robot CAS1200 (Corbett Research), la Estación de Trabajo de Ácido Nucleico MultiPROBE[®] II (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) y la Estación de Trabajo epMotion[™] 5075 (Eppendorf[®]) u otros de estos aparatos que son bien conocidos en la técnica.

10 Preferiblemente, el sistema de amplificación de ácido nucleico es un sistema de PCR, como se describe en los documentos US 4.683.202. US 4.683.195 y US 4.965.188.

15 Preferiblemente, la amplificación, detección y cuantificación de los ácidos nucleicos se consigue mediante el la ejecución y control de las reacciones en un aparato termociclador de PCR cuantitativa automatizado, tal como el Rotor Gene RG6000 (Corbett Research), Applied Biosystems 7900HT u otro instrumento adecuado, cuyos ejemplos se describen en los documentos EP1157744 y US 6.713.297.

20 Preferiblemente, las mediciones de expresión génica se expresan relativas a genes comparadores ejecutados en el mismo lote de MT-PCR y se comparan solamente con mediciones de expresión génica hechas en condiciones sustancialmente similares.

25 En otras realizaciones, las reacciones de amplificación pueden ser reacciones en cadena de la ligasa, replicación de secuencia autosostenida, amplificación por círculo rodante, amplificación por desplazamiento de hebra, amplificación de ADN isotérmico y similares.

30 Los especialistas en la técnica destinatarios también reconocerán que los métodos de la invención pueden aplicarse a cualquier célula u organismo vivo incluyendo, aunque sin limitación: mamíferos (incluyendo seres humanos); aves; peces; plantas, reptiles; artrópodos; gasterópodos; bacterias; virus; hongos y micoplasma.

35 Los especialistas en la técnica destinatarios también reconocerán que los métodos de la invención pueden usarse para detectar los niveles de ácidos nucleicos seleccionados a partir de muestras tales como células individuales de mamífero a partir de las cuales está disponible aproximadamente 0,01 ng de ARN y a partir de una única sección tisular FFPE, de la cual se obtiene aproximadamente 10 ng de ARN.

Preferiblemente, las reacciones de amplificación se procesan automáticamente por un robot de fluidos en un termociclador a tiempo real de múltiples pocillos o dispositivo de PCR de flujo continuo.

40 En otra realización, la segunda ronda de amplificación incluye cebadores internos que hibridan a una temperatura superior (T_m superior) con respecto a los cebadores externos, de modo que las etapas de hibridación en la segunda ronda de amplificación se ejecutan a una temperatura superior para cebar específicamente la segunda ronda de amplificación usando los cebadores internos evitando de este modo sustancialmente el cebado por los cebadores externos durante la reacción de amplificación de segunda ronda.

45 En una realización adicional, se incorporan uno o más nucleótidos UTP en uno o más de los cebadores externos de modo que estos cebadores sean susceptibles a digestión por una enzima UNG por lo cual los cebadores externos pueden retirarse al final de la primera ronda de amplificación evitando de este modo sustancialmente la contaminación de las reacciones de amplificación de segunda ronda por cebadores de primera ronda.

50 En otra realización, los métodos se usan en un método de diagnóstico tal como en el diagnóstico de neoplasias seleccionadas entre diversos tumores sólidos, tanto benignos como malignos, así como formas de leucemia y similares.

55 Las moléculas de ácido nucleico descritas incluyen moléculas de ARN, ADN y ADNc, sin embargo, se entenderá que también se contemplan variantes relacionadas siempre que puedan amplificarse.

Ejemplos de restos fluorescentes que pueden incorporarse dentro de las sondas oligonucleotídicas incluyen, aunque sin limitación, los siguientes ejemplos: carboxi-X-rodamina, fluoresceína, 6-tetrametilrodamina-5(6)-carboxamida, BODIPY 493/503[™], BODIPY-F1-X[™], (4,6-Diclorotriazinil)aminofluoresceína, 6-carboxifluoresceína, hexanoato de 6-((5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonil)amino), Oregon Green 500[™], Oregon Green 488[™], Rhodol Green[™], Oregon Green 514[™], Rhodamine Green-X[™], NBD-X, Tetraclorofluoresceína, 2',4',5',7'-Tetrabromosulfonafluoresceína, BODIPY-F1 BR2[™], BODIPY-R6G[™], 6-Carboxi-4'-5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína, BODIPY-530/550[™], Hexaclorofluoresceína, Carboxyrhodamine 6G[™], BODIPY 558/568[™], BODIPY-TMR-X[™], bromuro de 1-(3-carboxibenzil)-4-(5-(4-metoxifenil)oxazol-2-il)piridinio, BODIPY-564/570[™], Cy3[™], 6-(Tetrametilrodamina-5(6)-carboxamida) hexanoato, Rhodamine Red-X[™], BODIPY-576/589[™], BODIPY-581/591[™], Texas-Red-X[™], Cy3.5[™], BODIPY-TR-X[™], Cy5[™], carboxinaftofluoresceína, Cy5.5[™].

DEFINICIONES

5 En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "indicador detectable" se refiere a un componente que proporciona un medio detectable para medir la cantidad de ácido nucleico, esto incluye componentes radio-
marcados, e indicadores fluorescentes tales como colorantes y sondas (tal como sondas Taqman®) que incorporan
restos fluorescentes y similares.

10 En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "indicador fluorescente" se refiere a un indicador detectable que es (1) una secuencia oligonucleotídica que incorpora una base nucleotídica, capaz de emitir fluorescencia, que se une a una secuencia de ADN diana específica y emite una fluorescencia detectable específica de un modo que permite la cuantificación de la cantidad de ese ácido nucleico (también conocida como sonda o sondas fluorogénica) o (2) un colorante (tal como colorante SYRB-green), que se une a ADN para emitir fluorescencia de un modo que permite la detección, y/o cuantificación y/o identificación de la secuencia.

15 En el contexto de la presente memoria descriptiva, las expresiones "sonda" o "sonda fluorogénica" se refieren a una secuencia oligonucleotídica que incorpora una base nucleotídica, capaz de emitir fluorescencia, que se une a una secuencia de ADN diana específica y emite una fluorescencia detectable específica de un modo que permite la cuantificación de la cantidad de ese ácido nucleico. Esto también entre dentro de las definiciones de "indicador detectable" y "indicador fluorescente".

20 En el contexto de la presente memoria descriptiva, las expresiones "reacción en cadena de la polimerasa" y su acrónimo "PCR" se usan de acuerdo con su significado habitual entendido por los especialistas en la técnica. Pueden encontrarse ejemplos de métodos PCR en libros de texto de biología molecular comunes y manuales de referencia usados en la técnica. Por ejemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (1989) Ed H A Erlich. Stockton Press, Nueva York. Un ejemplo de PCR se usa normalmente para amplificar una
25 secuencia de ácido nucleico seleccionada usando una polimerasa termoestable y varios reactivos y dos cebadores cortos mediante los cuales se "selecciona" la secuencia a amplificar mediante la inclusión de cebadores que se unen a la secuencia. Un cebador se une por apareamiento de bases complementarias a la hebra (+) en un extremo de la secuencia a amplificar y el otro cebador se une a la hebra (-) en el otro extremo. Como las hebras de ADN recién sintetizadas (amplicones) pueden servir posteriormente como moldes adicionales para las mismas secuencias
30 cebadoras, rondas sucesivas de hibridación de cebadores, elongación de hebra, y disociación producen una amplificación rápida y altamente específica de la secuencia seleccionada.

35 En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "amplicón" se refiere a las hebras de ADN recién sintetizadas producidas por un proceso de amplificación de ácido nucleico tal como PCR.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, los términos "cebador" y "oligonucleótido" se refieren a una corta longitud de ADN de cadena polinucleotídica usada para iniciar el proceso de amplificación (copiado) en una reacción de amplificación de ácido nucleico (normalmente en una reacción PCR) o una reacción de transcripción inversa.

40 En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "cebador externo" se refiere a un cebador que se une a una secuencia de ácido nucleico seleccionada o amplicón en una localización que es externa a la región unida a uno o más cebadores internos correspondientes como se ilustra en la Figura 1. En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "cebador interno" se refiere a un cebador que se une a un amplicón seleccionado en una localización que es interna a la localización de unión de los cebadores externos como se ilustra en la Figura
45 1.

50 En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "PCR anidada", "PCR completamente anidada" o "PCR en tándem" se refiere a una amplificación de ácido nucleico de dos o más rondas (etapas), que está compuesta normalmente por dos rondas de PCR, donde la primera ronda de PCR usa un par de cebadores externos para amplificar la molécula de ácido nucleico seleccionada y la segunda ronda de amplificación amplifica adicionalmente los amplicones derivados de la molécula de ácido nucleico amplificada seleccionada usando un par de cebadores internos que se unen al amplicón en una localización que es interna a la localización de unión de los cebadores externos.

55 En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "PCR hemi-anidada" o "PCR en hemi-tándem" se refiere a una forma de reacción de PCR donde uno de los cebadores externos de primera ronda también se incluye en la reacción de amplificación de segunda ronda y ceba la amplificación del amplicón seleccionado en concierto con un cebador interno correspondiente que se une al mismo amplicón en una localización interna a la localización de unión del otro cebador externo de primera ronda.

60 En el contexto de la presente memoria descriptiva, las expresiones "PCR combinada" o "amplificación de ácido nucleico combinada" o "amplificación combinada" se refieren a una reacción de amplificación de ácido nucleico (normalmente PCR) que incluye más de un par de cebadores de modo que se amplifican dos o más secuencias de ácido nucleico seleccionadas diferentes por la reacción, en un único recipiente de reacción como se ilustra en la
65 Figura 1.

5 En el contexto de la presente memoria descriptiva, las expresiones "molécula de ácido nucleico seleccionada" y "secuencia de ácido nucleico seleccionada" se refieren a moléculas de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico específica. Por ejemplo, en el contexto de análisis de expresión génica, una secuencia de ácido nucleico seleccionada haría referencia a los productos de expresión génica de un gen específico que es de una secuencia de ácido nucleico específica mientras que una pluralidad de secuencias de ácido nucleico seleccionadas haría referencia a los productos de expresión génica de una pluralidad de genes específicos.

10 En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "ácido nucleico" se refiere a una molécula compleja de ácido orgánico compuesta por subunidades nucleotídicas. Los dos ácidos nucleicos principales son ADN y ARN. Esto incluye todos los subtipos de ácido nucleico tal como ADN genómico, ADN mitocondrial, ADN de cloroplasto, ADNc y similares. Esto también se refiere a las diversas formas de ARN tales como ARNm, ARNt, ARNr, ARN viral y similares.

15 En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "ADNc" se refiere a una secuencia de ADN que se produjo a partir de ARN por transcripción inversa. Un ADNc se llama así porque su secuencia es el complemento de la secuencia de ARNm original.

20 En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "mamífero" incluye seres humanos, animales de compañía tales como gatos y perros, y animales de ganadería tales como caballos, vacas, cerdos, ovejas y similares.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "liofilizado" se refiere a una sustancia en una forma seca, después de cristalizarse o pulverizarse.

25 En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "organismo" se refiere a cualquier especie de planta, animal, bacteria, hongo, virus, micoplasma u organismo modificado por ingeniería genética y se extiende a secuencias de ADN parasitarias y similares.

30 En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "Tm", cuando se aplica a un cebador oligonucleotídico, se refiere a la temperatura a la cual normalmente existe una probabilidad del 50 % de que el oligonucleótido se una en un dúplex con su secuencia de ácido nucleico complementaria.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "UTP" se refiere a uridintrifosfato.

35 En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "Uracil N-glucosilasa (UNG)" se refiere a una enzima que es capaz de hidrolizar el enlace N-glucosílico entre el azúcar desoxirribosa y uracilo en ADN que contiene desoxiuridina.

40 En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "un punto previo a que suceda competición significativa entre amplicones por componentes de reacción" se refiere al ciclo o fase dentro de una reacción de amplificación pasado el cual una amplificación adicional de las secuencias de ácido nucleico seleccionadas sería perjudicial para la precisión de las cuantificaciones obtenidas en la segunda ronda de amplificación. Sin el deseo de limitarse por ningún mecanismo particular o teoría, el perjuicio a la precisión de las cuantificaciones mencionado, se considera debido a competición entre las secuencias en amplificación (amplicones) por los componentes de reacción tales como dNTP y cebadores. Según se aumenta la cantidad de ciclos, estos componentes llegan a ser progresivamente más escasos, y de este modo de una concentración inferior en la reacción. Según los componentes de reacciones disponibles llegan a estar más limitados, esto favorece la amplificación de la especie de ácido nucleico más abundante, que interfiere con la precisión de la cuantificación en la reacción de amplificación de segunda ronda. La cantidad óptima de ciclos de amplificación combinada por lo tanto se selecciona teniendo en cuenta la cantidad de ácido nucleico introducida para minimizar los efectos de cualquier competición entre amplicones por los componentes de reacción durante la amplificación proporcionando al mismo tiempo amplificación específica de cada secuencia de ácido nucleico seleccionada. En la práctica, cuando se usa por ejemplo 50-500 ng de ácido nucleico, son suficientes aproximadamente 10 ciclos de amplificación combinada para amplificar las moléculas de ácido nucleico seleccionadas hasta un punto previo a que suceda competición significativa entre amplicones por componentes de reacción. Así mismo, cuando se usa 0,5-50 ng de ácido nucleico, se prefieren aproximadamente 15 ciclos de amplificación combinada. Cuando se usa 0,01-0,5 ng de ácido nucleico, se prefieren aproximadamente 20 ciclos de amplificación combinada. Puede usarse una cantidad mayor de ciclos de amplificación combinada cuando se introducen cantidades inferiores de ácido nucleico. La cantidad de ciclos de reacción de amplificación combinada usada en los métodos de la invención normalmente no provoca la producción de dichas cantidades grandes de productos de secuencia de ácido nucleico seleccionados que afectan de forma adversa a la precisión de su cuantificación estimada en la segunda ronda de amplificación.

La invención se describirá ahora más particularmente con referencia a ejemplos no limitantes.

65

Ejemplos

Ejemplo 1. Puede usarse MT-PCR para medir la expresión de muchos genes diferentes usando amplificación combinada a partir de una única muestra e incorporando un sistema de detección de SYBR-green en la segunda ronda de amplificación.

La amplificación combinada y la medición de múltiples productos de expresión génica usando un indicador genérico tal como el colorante indicador SYBR-green actualmente no es posible. Sin embargo, el método MT-PCR es capaz de amplificar los productos de expresión de muchos genes simultáneamente. El método MT-PCR se resume en la Figura 1 como un diagrama esquemático que muestra la disposición de cebadores en MT-PCR, ilustrando las realizaciones tanto en tándem como en hemi-tándem. El cebador externo inverso, indicado como "RT", normalmente se usa para cebar la síntesis de ADNc, específico para cada gen durante la reacción de transcripción inversa antes de las reacciones de amplificación ilustradas. Ambos métodos se muestran en el proceso de amplificación y cuantificación de los productos de expresión génica de 4 genes distintos (1-4), aunque en la práctica es típico amplificar los productos de expresión de 72 genes distintos. En MT-PCR en tándem, los cebadores externos se usan como cebadores combinados mientras que los cebadores internos se usan en las reacciones de amplificación de segunda ronda cuando se hace la cuantificación de especies de ácido nucleico. En MT-PCR en hemi-tándem uno de los cebadores internos es común entre tanto la reacción de amplificación combinada de primera ronda y la reacción de amplificación de segunda ronda.

Para demostrar que el método MT-PCR es particularmente eficaz en la cuantificación de los productos de expresión de múltiples genes, se extrajeron 50 ng de ARN de células epiteliales humanas MCF7 y se usaron en un ensayo de MT-PCR en hemi-tándem en un formato de "placa génica" de 72 pocillos para cuantificar los productos de expresión de 72 genes distintos simultáneamente usando detección de SYBR-green. En la primera fase del proceso, se usaron 72 pares de cebadores oligonucleotídicos, 24 de los cuales se muestran en las Tablas 1 y 2. Cada par de cebadores era específico para un producto de expresión génica dado, y éstos se añadieron a 50 ng de ARN junto con transcriptasa inversa y polimerasa Taq. Después de un 1 min de reacción de transcripción inversa a 55 °C en que los cebadores inversos de PCR específicos de gen actúan como cebadores para la transcripción inversa, la transcriptasa inversa se desnaturalizó a 95 °C durante 5 min y los 72 genes se co-amplificaron durante 10 ciclos. Cada ciclo mantuvo la temperatura a 95 °C durante 5 s, 60 °C durante 20 s y 72 °C durante 20 s. El producto resultante, ahora enriquecido en amplicones correspondientes a los 72 genes, se dividió entonces en alícuotas y cada alícuota se amplificó adicionalmente y cuantificó por triplicado usando uno de los cebadores externos usados en la amplificación combinada y un cebador interno correspondiente específico para ese amplicón deseado usando el método MT-PCR en hemi-tándem ilustrado en la Figura 1. Para esta fase, se emplearon ciclos de 95 °C durante 1 s, 60 °C durante 10 s y 72 °C durante 10 s. Ambas fases del ensayo se realizaron en un termociclador a tiempo real RG3000 Rotor-Gene (Corbett Research), que puede combinar cualquier cantidad de temperaturas de mantenimiento y condiciones de ciclado. El resultado de las 72 reacciones de amplificación, que representan 24 mediciones de expresión génica por triplicado, se ilustra en la Figura 2A. Este resultado muestra que cada producto de expresión génica dado se amplificó de un modo reproducible, ya que cada serie de tres líneas correspondientes a una medición de gen individual por triplicado tiene curvas casi idénticas. De forma importante, estos productos también se amplificaron con alta especificidad, ya que los productos secundarios de amplificación no eran detectables en estas reacciones como se demuestra por las correspondientes curvas de fusión mostradas en la Figura 2B, y la imagen de 'gel' de Bioanalyzer mostrada en la Figura 2C, que ilustra que cada reacción produjo un único producto de amplificación en cada caso.

Tabla 1. Cebadores de la primera ronda de MT-PCR en hemi-tándem

Gen	Directo	Inverso
ESR1	GATGAATCTGCAGGGAGG	TCGGTGGATATGGTCCTTCT
TOP2A	TGCTACACATTTCCCAGATGA	GATTCTTGGTTTTGGCAGGA
CCND1	GCGGAGGAGAAACAACAGAT	TGAGGCGGTAGTAGGACAGG
PTEN	TGGCACTGTTGTTTCAACAAG	AGGTAACGGCTGAGGGAAGT
MDM2	GAGCAGGCAAATGTGCAATA	TTTTTGTGCACCAACAGACTTT
TP53	GGAGCACTAAGCGAGCACTG	CCTCATTGAGCTCGGAAC
VEGF	CAAGATCCGCAGACGTGTAA	GGAGGCTCCTTCCTCCTG
MYC	TGCTCCATGAGGAGACACC	CTCTGACCTTTTGCCAGGAG
PgR	GTCAGTGGGCAGATGCTGTA	AGCCCTTCCAAAGGAATTGT
BSG	TGGGCCTGGTACAAGATCAC	GCCTCCATGTTGAGTTTCTC
GSTM3	GGGAAATTCTCATGTTTGC	CGATTTTCTCCAAAGCCTCA
MKI67	CCCCACCTCAGAGAGTTTTG	GGGCGTTTTTGCTACGTTT
MELK	GGAGCAAAGGAAGGGTTCT	TGCATTGCTACTTTCCCAA
MAD2L1	TCCTGGAAAGATGGCAGTTT	TGGCAGAAATGTCACCGTAG
BUB1	CTCAGCAACAACCATGGAA	TCCACATATCCAAATGAGGAAG
TPD52	GCAAGACGTGACAGCAACAT	TTCCAGCTTTTTGGTGATGA
HPRT	GCAGACTTTGCTTTCCTTGG	TTTCAAATCCAACAAGTCTGG

NAT1	ATTCAAGCCAGGAAGAAGCA	TCGGATCTGGTGTGAAGAA
E2F1	ATCAAAGCCCCTCCTGAGAC	TGGTGGTGGTGACACTATGG
TGFB2	GCATGCCCGTATTTATGGAG	TTGGGTGTTTTGCCAATGTA
TGFB3	GGGCTTTGGACACCAATTAC	GCAGATGCTTCAGGGTTCAG
SMAD4	AGGACAGCAGCAGAATGGAT	GGAATGCAAGCTCATTGTGA
RELA	CTCCTGTGCGTGTCTCCAT	GGTCCGCTGAAAGGACTCTT
BTF3	CAGGAAAACTCGCCAAACT	TGGATCACTGTTCTTGGTTT

Tabla 2. Cebadores de la segunda ronda de MT-PCR en hemi-tándem

Gen	Directo	Inverso
ESR1	GATGAATCTGCAGGGAGG	TCCAGAGACTTCAGGGTGTCT
TOP2A	TGCTACACATTTCCAGATGA	CGGTAGTGGAGGTGGAAGAC
CCND1	GCGGAGGAGAACAACAGAT	GGCGGATTGGAATGAACT
PTEN	TGGCACTGTTGTTTACAAG	TCACCTTTAGCTGGCAGACC
MDM2	GAGCAGGCAAATGTGCAATA	AAGCAATGGCTTTGGTCTAA
TP53	GGAGCACTAAGCGAGCACTG	CACGGATCTGAAGGGTGAAA
VEGF	CAAGATCCGCAGACGTGTAA	TCACATCTGCAAGTACGTTCCG
MYC	TGCTCCATGAGGAGACACC	CCTGCCTCTTTTCCACAGAA
PgR	GTCAGTGGGCAGATGCTGTA	TGCCACATGGTAAGGCATAA
BSG	TGGGCCTGGTACAAGATCAC	GCGAGGAACTCACGAAGAAC
GSTM3	GGGAAATTCTCATGGTTTGC	CAGGCACTTGGGGTCAAATA
MKI67	CCCCACCTCAGAGAGTTTGT	GGGCTTGCAGAGCATTATC
MELK	GGAGCAAAAGGAAGGGTCTT	CAACAGTTGATCTGGATTCACTAA
MAD2L1	TCCTGGAAAGATGGCAGTTT	CGGATTTTCATCCTGGATAGC
BUB1	CTCAGCAACAACCATGGAA	GTGCCAAAGAGCATGCAATA
TPD52	GCAAGACGTGACAGCAACAT	GAGCCAACAGACGAAAAAGC
HPRT	GCAGACTTTGCTTTCCTTGG	ACACTTCGTGGGGTCTTTTT
NAT1	ATTCAAGCCAGGAAGAAGCA	CAATGTCCATGATCCCCTTT
E2F1	ATCAAAGCCCCTCCTGAGAC	CTCAGGGCACAGGAAAACAT
TGFB2	GCATGCCCGTATTTATGGAG	GCAGCAAGGAGAAGCAGATG
TGFB3	GGGCTTTGGACACCAATTAC	GCAGATGCTTCAGGGTTCAG
SMAD4	AGGACAGCAGCAGAATGGAT	GTTTTGGTGGTGAGGCAAAAT
RELA	CTCCTGTGCGTGTCTCCAT	GTTTCTCCTCAATCCGGTGA
BTF3	CAGGAAAACTCGCCAAACT	TCATCTGCTGTGGCTGTTCT

Ejemplo 2. Puede usarse MT-PCR para cuantificar ácidos nucleicos, tales como productos de expresión génica, a partir de muestras pequeñas de ácidos nucleicos fragmentados tales como aquellos encontrados en muestras tisulares FFPE archivadas.

La cuantificación de la expresión génica a partir de muestras incorporadas en parafina fijadas en formalina (FFPE) archivadas es altamente deseable, pero está limitada por la baja recuperación de ARN a partir de estas muestras (aproximadamente 10 ng por sección de 10 μm) y por la naturaleza altamente fragmentada de las moléculas recuperadas. No es posible realizar amplificación de ARN lineal o transcripción inversa usando cebadores oligo-dT ya que es improbable que algún fragmento de ARN contenga tanto el extremo 3' del ARN como el amplicón que se va a medir. Los protocolos actuales permiten solamente la cuantificación de la expresión de una cantidad muy pequeña de genes a partir de cada muestra usando transcripción inversa específica de gen o cebada de forma aleatoria.

Para demostrar que el método MT-PCR es particularmente eficaz en la amplificación de muchos genes simultáneamente a partir de ácido nucleico altamente fragmentado y degradado, primero se extrajo el ARN de un único corte de una muestra de xenoinjerto FFPE que se había almacenado durante 10 años antes de la extracción del ARN. El ARN se extrajo de una sección que era de aproximadamente 4 mm de diámetro y 10 μm de grosor, usando digestión con proteinasa K y purificación en columna de sílice (Ambion). Un tercio del ARN total extraído del corte FFPE, que contenía de forma estimada aproximadamente 3 ng, se usó posteriormente en el método MT-PCR en hemi-tándem descrito en el ejemplo 1 usando los cebadores externos e internos mostrados en Tablas 1 y 2 y en el que se usaron 15 ciclos de amplificación combinada. Los perfiles de expresión génica de los 24 genes amplificados por triplicado se ilustran en la Figura 3A. Esto demuestra que el método puede usarse para amplificar y cuantificar de forma eficaz y reproducible productos de expresión génica a partir de cantidades muy pequeñas de ARN fragmentado como se demuestra por la elevada reproducibilidad de las curvas de amplificación. De forma importante, estos productos también se amplificaron con alta especificidad ya que los productos secundarios de amplificación no eran detectables en estas reacciones como se demuestra por las correspondientes curvas de fusión mostradas en la Figura 3B, que ilustra que cada reacción producía un único producto de amplificación representado por un único pico en cada caso. Este resultado demuestra que el método puede usarse de forma eficaz para

amplificar muchas secuencias diferentes de ácido nucleico a partir de una cantidad muy pequeña de molde de ácido nucleico, como la obtenida de células individuales, biopsias tisulares diseccionadas con láser, muestras forenses y similares.

5 **Ejemplo 3. El uso de MT-PCR para la amplificación y cuantificación de ácidos nucleicos a partir de micromuestras obtenidas de células individuales y disecciones láser.**

Se usó el método MT-PCR, que incluyó 20 ciclos de amplificación combinada para amplificar y cuantificar los productos de expresión de 24 genes usando una muestra de solamente 10 pg de ARN que es equivalente a la cantidad aproximada de molde de ARN total que se obtiene normalmente de una única célula de mamífero. La Figura 4A muestra la cuantificación de 24 genes a partir de 10 pg de ARN de MCF7 y la Figura 4B muestra las correspondientes curvas de fusión para cada producto de amplificación. Se detectaron 20 de los 24 productos de expresión génica y se cuantificaron, sin productos secundarios de amplificación indeseados. Este resultado ilustra que el método puede usarse de forma eficaz para amplificar muchas secuencias diferentes de ácido nucleico a partir de una cantidad muy pequeña de molde de ácido nucleico, tal como la obtenida de células individuales, biopsias tisulares diseccionadas con láser, muestras forenses y similares. Como se indica, es necesario usara una cantidad relativamente grande de ciclos en la etapa de amplificación combinada para amplificar los ácidos nucleicos suficientemente a partir de dicha pequeña cantidad de muestra y 20 ciclos fue suficiente en este caso. El método es particularmente útil para aplicaciones forenses y similares donde las muestras son frecuentemente muy limitadas en tamaño y donde los ácidos nucleicos son de una estructura altamente degradada/fragmentada.

Ejemplo 4. Establecimiento de las condiciones de reacción y parámetros adecuados para MT-PCR.

Para establecer una cantidad apropiada de ciclos de amplificación combinada para un sistema de reacción combinada dado, la cantidad apropiada de ciclos debe determinarse empíricamente para un sistema dado de muestra/cebador. De forma ideal, la etapa de amplificación combinada debe ejecutarse durante una cantidad suficiente de ciclos para proporcionar un nivel suficiente de amplificación para facilitar la cuantificación precisa de cada secuencia de ácido nucleico seleccionada en la segunda ronda de amplificación. Sin embargo, la cantidad de ciclos de amplificación combinada también debe restringirse de modo que no se permita proceder durante una cantidad de ciclos pasada la cual sería perjudicial la amplificación adicional de las secuencias de ácido nucleico seleccionadas para la precisión de las cuantificaciones obtenidas en la segunda ronda de amplificación. El perjuicio a la precisión de las cuantificaciones mencionado, se considera debido a la competición entre las secuencias en amplificación (amplicones) por los componentes de reacción tales como dNTP y cebadores. Según se aumenta la cantidad de ciclos, estos componentes llegan a estar progresivamente más escasos, y de este modo a una concentración inferior en la reacción.

Como guía para establecer la cantidad apropiada de ciclos a usar en una reacción de amplificación combinada de primera ronda dada, la amplificación exponencial de la especie más abundante de ARNm, o secuencia de ácido nucleico, no debe haber aumentado significativamente durante la primera ronda de amplificación. El aumento significativo puede comprobarse usando reacciones RT individuales incluyendo, cada una, una cantidad diferente de ARN introducido y después examinando la cantidad de ácido nucleico producida durante la primera ronda de amplificación mediante la inclusión de colorante SYBR-green para controlar la reacción. En este caso, la reacción de amplificación incluye solamente los cebadores específicos para una secuencia seleccionada de ácido nucleico, que es la especie más abundante de ARN elegida, y esta reacción de este modo no es una reacción de amplificación combinada, sino que en su lugar es una reacción única. Como se muestra en la Figura 5, la introducción de 50 - 500 ng de ARN produce solamente una pequeña cantidad de ácido nucleico a partir de una especie abundante de ARN en los primeros 10 ciclos de la reacción, lo que demuestra que ésta es una cantidad apropiada de ciclos a usar con este intervalo de ARN introducido. Como norma general para establecer la cantidad apropiada de ciclos de amplificación combinada a usar, debe evitarse que la amplificación combinada proceda más allá de un punto en que más del 5 % de los polinucleótidos se ha sintetizado como un porcentaje de la cantidad total que se produce normalmente si la reacción se deja proceder durante una cantidad suficiente de ciclos en cuyo punto el ciclado adicional ya no produce amplificación adicional.

Por tanto, se recomiendan 10 ciclos de PCR combinada para aplicaciones rutinarias de investigación. Esto puede compararse con la qPCR convencional en que normalmente se usarían aproximadamente 50 ng de ARN para analizar los productos de expresión génica de un único gen.

Para introducciones de 5-50 ng de ARN, los primeros 15 ciclos de la reacción producen solamente pequeñas cantidades de ácido nucleico para los ARN más abundantes como se muestra en la Figura 5, por tanto se recomiendan 15 ciclos de PCR combinada para muestras de esta escala, incluyendo el análisis de muestras de ARN procedentes de secciones FFPE.

Para introducciones de 0,01-5 ng de ARN, serían posibles 20 ciclos de amplificación combinada antes de que sucediera amplificación significativa de la especie abundante de ARN como se muestra en la Figura 5. Por tanto, se recomiendan 20 ciclos de PCR combinada para muestras forenses, microbianas y de disección láser de microscopía. En la práctica, si se usan 25 o más ciclos de amplificación para analizar cantidades muy pequeñas de

muestra en la etapa de amplificación combinada, esta cantidad mayor de ciclos favorece la formación de dímeros de cebador y productos secundarios, aunque los especialistas en la técnica destinatarios reconocerán que el uso de más de 25 ciclos de PCR combinada puede ser práctico en algunos casos. Se aplicarían intervalos similares de sensibilidad para el análisis de ADN como de ARN.

Para comparar directamente la precisión de la cuantificación cuando se varía la cantidad de molde de ARN introducido o la cantidad de ciclos de amplificación combinada, se amplificaron los productos de expresión génica de 24 genes y se cuantificaron con estos parámetros variados. Las cuantificaciones resultantes, hechas durante 35 ciclos de amplificación de segunda ronda, se compararon cuando se usaron 0,1 ng o 1,0 ng de ARN (Figura 6A) y donde se usaron 10 ó 15 ciclos de amplificación combinada (Figura 6B). En cada caso, se cuantificó la expresión de 23 de los genes y se comparó como una proporción con un gen comparador en el mismo ensayo de MT-PCR en tándem para normalizar los datos. La Figura 6A ilustra que se obtuvieron mediciones similares cuando se usaron 0,1 o 1 ng de ARN, dando lugar a un coeficiente de correlación de 0,96, demostrando que cambios de factor en la cantidad de ARN usada provocaban valores similares de cuantificación relativa. Cuando se midió la misma cantidad de ARN usando diferentes cantidades de ciclos de amplificación combinada, la correlación fue aún mayor de 0,96, pero aparece un error sistemático en las diferencias absolutas de factor como se esperaba (Figura 6B). Esto demuestra que cuando se cuantifica la cantidad de ácido nucleico tal como la cuantificación de expresión génica, cada experimento replicado debería compararse solamente cuando éstos emplean la misma cantidad de ciclos de amplificación combinada.

Ejemplo 5. Establecimiento de la polimerasa Taq, concentraciones de cebador y transcriptasa inversa adecuadas para su uso en PCR en tándem para minimizar la formación de dímeros de cebador.

Para cuantificar los productos de expresión génica de genes que se expresan de forma escasa, normalmente debe usarse una cantidad mayor de ciclos de amplificación para amplificar los productos suficientemente para su análisis. En estos casos, es habitual que se formen dímeros de cebador, que pueden complicar o impedir la cuantificación eficaz por métodos convencionales. Para minimizar este problema usando los métodos de la presente invención, se optimizaron los niveles de polimerasa Taq que debían incluirse en la reacción de amplificación de segunda ronda en un experimento para amplificar y cuantificar los productos de expresión génica de un grupo de genes raros (ERBB2, ESR1, TP53, MYC y GEM). El rendimiento óptimo se obtuvo cuando se incorporaron aproximadamente 0,5 unidades de Taq en una reacción de 20 μ l con cebadores aproximadamente 0,2 μ M y DMSO al 2 % que produjeron en curvas de fusión limpias como se muestra en la Figura 7A. Se ilustra una comparación entre el uso de 0,5 U o 1,0 U de Taq en las reacciones de amplificación de segunda ronda mediante las curvas de fusión resultantes mostradas en las Figuras 7A y 7B respectivamente, que demuestran que pueden formarse dímeros de cebador cuando se usan niveles mayores de Taq (tales como 1,0 U).

Entonces se ejecutó un experimento similar donde se varió la cantidad de transcriptasa inversa (MMLV) durante la síntesis de ADNc a partir del molde de ARN antes de la posterior amplificación. El método se usó posteriormente para amplificar una selección de genes altamente expresados (TOP2A, BTF3, MDM2, RPL35), y expresados de forma escasa (ESR1) y los efectos de las cantidades alteradas de MMLV en la reacción de transcripción inversa (RT) sobre la calidad de las posteriores reacciones de amplificación de segunda ronda se ilustran mediante las curvas de fusión resultantes mostradas en las Figuras 7C y 7D. La curva de fusión en la Figura 7C muestra que no se obtuvieron productos secundarios de amplificación significativos cuando se habían usado aproximadamente 20 U de MMLV en la reacción previa de RT. Sin embargo, cuando se usaron niveles mayores de aproximadamente 200 U de MMLV, esto provocó una amplificación posterior de productos no específicos como se ilustra por los múltiples picos observados en la curva de fusión resultante mostrada en la Figura 7D. También se obtuvieron resultados similares usando transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen). Por tanto, se recomienda que se usen aproximadamente 20 U de transcriptasa inversa en una reacción típica de RT de 20 μ l.

Ejemplo 6. Comparación de la reproducibilidad de las estimaciones de cuantificación sobre múltiples experimentos.

Se realizaron diez reacciones MT-PCR diferentes, en 4 días diferentes a partir de 50 ng del mismo lote de ARN. Se realizó MT-PCR en tándem como se ha descrito en el ejemplo 1 usando 10 ciclos de PCR combinada en la primera ronda. En una única ejecución, se dividió la mezcla de RT de 20 μ l en 3 alícuotas x 6 ml y se usaron para 3 series de mediciones de 24 genes que después se promediaron para generar los datos mostrados en la Tabla 3. La media de estas mediciones se comparó entre las 10 ejecuciones. Un gen (Nat1) estaba ausente del ARN y dio una curva plana de ciclado. El coeficiente de variación en el valor Ct varió de 0,01 a 0,05 con un valor medio de 0,03 para los 23 genes detectados que demuestra un nivel particularmente elevado de precisión entre experimentos MT-PCR.

Tabla 3. Comparación entre las estimaciones de cuantificación de expresión génica sobre múltiples experimentos.

GENES	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	Media	SD	CV
ESR1	28,1	28,1	28,2	28,0	28,0	27,8	27,7	27,5	27,7	27,6	27,9	0,24	0,01
TOP2A	19,8	20,7	21,5	20,9	21,5	20,1	20,4	20,1	19,7	19,7	20,4	0,69	0,03
CCND1	18,5	19,6	19,8	18,9	18,5	17,7	16,9	17,7	18,2	18,1	18,4	0,88	0,05
PTEN	18,3	19,1	19,4	18,8	18,5	17,8	18,0	18,4	18,1	18,8	18,5	0,51	0,03
MDM2	20,7	21,7	22,4	21,5	21,0	20,3	20,2	21,0	20,7	20,4	21,0	0,70	0,03
TP53	19,8	20,0	20,4	20,0	19,1	18,1	18,1	19,3	19,1	19,0	19,3	0,78	0,04
VEGF	26,2	26,6	26,7	26,7	25,7	25,0	24,2	24,8	25,4	26,4	25,8	0,89	0,03
MYC	24,0	25,3	24,9	24,5	23,4	22,5	22,6	23,1	22,9	22,9	23,6	1,00	0,04
PgR	21,5	22,2	22,4	21,9	22,5	21,2	20,9	20,9	20,8	21,0	21,5	0,67	0,03
BSG	18,2	18,6	19,2	18,4	17,9	17,1	16,8	17,7	17,8	17,8	18,0	0,70	0,04
GSTM3	20,3	21,1	22,0	21,6	20,7	19,7	20,5	19,8	19,6	19,9	20,5	0,83	0,04
MKI67	17,3	18,3	18,4	17,8	17,9	17,4	16,6	17,3	17,4	17,5	17,6	0,53	0,03
MELK	21,1	22,3	23,1	22,5	22,1	21,3	21,6	21,3	21,2	21,4	21,8	0,67	0,03
MAD2L1	24,2	24,5	24,7	24,2	23,9	23,0	23,2	23,2	23,1	22,6	23,7	0,72	0,03
BUB1	25,4	26,2	26,4	26,7	26,0	25,2	24,7	24,7	25,0	24,9	25,5	0,74	0,03
TPD52	23,4	24,6	24,4	24,3	23,5	23,0	22,8	22,7	22,7	23,0	23,4	0,74	0,03
HPRT	26,5	26,0	26,0	25,6	24,9	23,9	24,9	25,6	24,8	24,2	25,2	0,84	0,03
NAT1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	
E2F1	20,1	21,2	20,6	20,5	19,7	19,0	18,2	19,4	19,3	19,4	19,7	0,88	0,04
TGFB2	23,0	24,5	24,6	23,9	23,8	23,1	22,6	23,0	22,8	23,3	23,5	0,70	0,03
TGFB3	25,3	26,7	26,1	26,3	24,9	23,6	22,4	24,3	24,5	24,2	24,8	1,32	0,05
SMAD4	23,6	24,7	24,4	24,1	23,6	23,0	22,5	23,3	23,4	23,3	23,6	0,66	0,03
NFkB	25,0	26,8	25,9	26,1	24,1	23,2	23,1	23,7	24,3	23,8	24,6	1,29	0,05
BTF3	14,2	14,9	14,9	14,6	14,6	14,1	13,6	14,0	14,2	14,1	14,3	0,42	0,03
Media													0,03

Ejemplo 7. El uso de MT-PCR en la cuantificación de expresión génica relacionada con cáncer en diagnóstico usando un modelo de línea celular.

5

7.1 Medición de la expresión génica en línea celular derivada de tumor.

Se cree que las líneas celulares de cáncer de mama humano derivadas de tumor conservan mucho de la composición genética y propiedades fisiológicas de las células tumorales de las cuales derivan. En este estudio se han medido el nivel de expresión de 24 genes por triplicado por MT-PCR hemi-anidada en 15 líneas celulares de cáncer de mama humano.

10

7.2 Materiales

Se preparó una mezcla de cebadores externos mezclando 2 μ l de cada uno de los 24 pares de cebadores enumerados en la Tabla 4 a concentración 100 μ M junto con 4 μ l de agua.

15

Preparación de placa génica de Corbett Research con cebadores liofilizados

Se prepararon mezclas de cebadores específicos de gen, que contenían cada una un par de cebadores mostrados en la Tabla 5, que contenían 10 μ l de solución madre de cebador directo a 100 μ M, 10 μ l de la correspondiente solución madre de cebador inverso a 100 μ M y 605 μ l de agua en un tubo de 0,2 ml. Después se usó el CAS1200 Robot (Corbett Research) para formar alícuotas de 5 μ l de cada mezcla de cebadores por triplicado en una placa génica de Corbett Research. Estas alícuotas después se liofilizaron en la placa génica durante 15 min con calentamiento usando un liofilizador SpeedVac seguido de sellamiento de la placa a 160 °C usando el sellador por calor de placa génica. Cada placa después se almacenó a 4 °C antes de su uso.

25

*Soluciones madre de RT-PCR y PCR**30 Gelatina - sin ARNasa (5 ml)*

Se añadieron 50 mg de gelatina (Sigma G-2625) a 5,0 ml de agua y 5 μ l de DEPC seguido de incubación a 60 °C durante 1 h con mezcla ocasional y almacenamiento a -20 °C antes de su uso.

Tampón RT 10 x (10 ml)
TrisHCl 500 mM (pH 8,5) que contiene MgCl₂ 30 mM, KCl 300 mM, DTT 1 mM y 0,1 mg/ml de gelatina. Esto se almacenó a 20 °C en alícuotas de 0,5 ml antes de su uso.

35

Tampón PCR 10 x (10 ml)

TrisHCl 200 mM (pH 8,5) que contiene KCl 500 mM, MgSO₄ 30 mM, y 1 μ g/ml de gelatina. Esto se almacenó a 20

°C en alícuotas de 0,5 ml antes de su uso.

7.3 Método

5 En resumen, se extrajo el ARN de cultivos de cada línea celular usando el método RNeasy (Qiagen) y se diluyó de modo que se usaran 50 ng en cada reacción MT-PCR. La mezclas de reacción RT-PCR se prepararon en un tubo de PCR de pared delgada de 0,2 ml que incluía: 50 ng de ARN total, mezcla de cebadores externos a una concentración final de 0,1 µM de cada cebador, 0,3 mM de dNTP (Roche), tampón RT-PCR, DMSO al 2 %, 0,5 µl de RNAsin, 20 unidades de MMLV (Invitrogen), 1 unidad de ADN polimerasa Taq (Invitrogen).

10

Amplificación combinada de primera ronda

Cada tubo se colocó en un RG3000 (Corbett Research) y se trató por calor del siguiente modo: 1 min a 55 °C (transcripción inversa), 5 min a 95 °C (desnaturalización de RT) seguido de 10 ciclos de 10 s a 95 °C, 20 s a 60 °C, 20 s a 72 °C. Esto completó la etapa de PCR combinada y el producto se diluyó 1:50 en agua.

15

Mezcla de reacción de la amplificación de segunda ronda.

Se añadieron 500 µl de los productos de amplificación combinada a cada 1,5 ml de mezcla de reacción de PCR para dar una concentración final de: 0,2 mM de dNTP, DMSO al 2 %, 25 U/ml de Taq, tampón PCR, SYBR-green dilución 1:20.000. Después se añadieron 20 µl de mezcla de reacción de PCR a cada posición en la placa génica (que contenía los cebadores internos liofilizados) y se realizó PCR durante 35 ciclos de: 1 s a 95 °C, 10 s a 60 °C y 10 s a 72 °C. Se midió la fluorescencia al final de la etapa de extensión de 72 °C. Debe apreciarse que este protocolo también se ha aplicado satisfactoriamente usando MT-PCR tanto en tándem como en hemi-tándem.

25

7.4 Resultado

La expresión del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en cada línea celular se cuantificó usando MT-PCR en tándem. Los datos obtenidos de cada línea celular se normalizaron mediante el uso de un gen comparador interno para proporcionar una cuantificación relativa de expresión de EGFR en cada una de las 15 líneas celulares y éstas después se compararon por pares como se muestra en la Figura 8. Puede observarse que EGFR es expresa de forma elevada en solamente 2 de las 15 líneas celulares, siendo éstas BT20 y SKBR3. Se sabe que tanto BT20 como SKBR3 sobre-expresan este gen y este resultado se refleja de forma precisa por los resultados de cuantificación por MT-PCR en la comparación por pares de la Figura 8. La información de este tipo es valiosa en el tratamiento de pacientes con cáncer y en algunos casos proporcionaría la información necesaria para la determinación de tratamientos adecuados con fármaco.

30

35

Tabla 4. Cebadores externos de la primera ronda de MT-PCR en tándem

Gen	Directo	Inverso
ERBB2	ACATGACCCCAGCCCTCTAC	AGAGAGTCTTGCCCTTTCC
ESR1	TGGAGATCTTCGACATGCTG	GCCATCAGGTGGATCAAAGT
EGFR	CTTGCAGCGATACAGCTCAG	GGTCTGGTAGTGTGGGTCT
TOP2A	GCTGATGATGTTAAGGGCAGT	GATTCTTGGTTTTGGCAGGA
CCND1	TCCTCTCCAAAATGCCAGAG	TGAGGCGGTAGTAGGACAGG
PTEN	CAGTCAGAGGCGCTATGTGT	AGGTAACGGCTGAGGGAAC
CDH1	AGCGTGTGTGACTGTGAAGG	CTCTTCTCCGCCCTCTCTT
CDKN1A	CCATGTGGACCTGTCACTGT	AAGATGTAGAGCGGGCCTTT
MDM2	GAAGGAACTGGGGAGTCTTG	TTTTTGTGCACCAACAGACTTT
BTF3	CCTTATTCGCTCCGACAAGA	TGGATCACTGTTCTTGGTTT
RPL35	AAGGAGGAGCTGCTGAAACA	GCATGGCACGTGTCTTCTTA
VEGF	GAGCGGAGAAAGCATTGTT	GGAGGCTCCTTCCTCTG
TP53	CTTCGAGATGTTCCGAGAGC	TCTGAGTCAGGCCCTTCTGT
MYC	CCTACCCTCTCAACGACAGC	CTCTGACCTTTTGCCAGGAG
PgR	TGGTGTGTTGGTCTAGGATGGA	AGCCCTTCCAAAGGAATTGT
BSG	TGCTGGTCTGCAAGTCAGAG	GCCTCCATGTTCAAGTTCTC
MKI67	AGCAACCGCAGTTGACAAG	GGGCGTTTTTGCTACGTTT
GSTM3	TTGGAAGAGCTACCTGGACAA	CGATTTTCTCCAAAGCCTCA
GEM	CTTCGAGAAGGCATCTGAGC	CCCTCAAACAGCTCCTTCAC
MELK	AAAGGGGGTTGGATAAGGTT	TGCATTGTCACTTTCCCAA
MAD2L1	TGTGGTGGAAACAACACTGAAAG	TGGCAGAAATGTCACCGTAG
BUB1	CAGCAAAGTGTGAAACATCTGG	TCCACATATCCAAATGAGGAAG
TPD52	GAGATCAAGCGGAAACTTGG	TTCCAGCTTTTTGGTGATGA
HPRT	GACCAGTCAACAGGGGACAT	TTTCAAATCCAACAAAGTCTGG

Tabla 5. Cebadores internos de la segunda ronda de MT-PCR en tándem

	Cebador directo	Cebador inverso
ERBB2	GTACCCCTGCCCTCTGAGAC	CGAACATCTGGCTGGTTCAC
ESR1	GATGAATCTGCAGGGAGAGG	TCCAGAGACTTCAGGGTGCT
EGFR	TCCTCCCAGTGCCTGAATAC	GGTTCAGAGGCTGATTGTG
TOP2A	TGCTACACATTTCCAGATGA	CGGTAGTGGAGGTGGAAGAC
CCND1	GCGGAGGAGAACAAACAGAT	GGCGGATTGGAAATGAACT
PTEN	TGGCACTGTTGTTTCACAAG	TCACCTTTAGCTGGCAGACC
CDH1	ATTGCAAATTCCTGCCATTC	CAGCAAGAGCAGCAGAATCA
CDKN1A	GACTCTCAGGGTCGAAAACG	GGATTAGGGCTTCCTCTTGG
MDM2	GAGCAGGCAAATGTGCAATA	AAGCAATGGCTTTGGTCTAA
BTF3	CAGGAAAACTCGCCAAACT	TCATCTGCTGTGGCTGTTCT
RPL35	GACCTGAAGGTGGAGCTGTC	ACTGTGAGAACACGGGCAAT
VEGF	CAAGATCCGCAGACGTGTAA	TCACATCTGCAAGTACGTTCCG
TP53	GGAGCACTAAGCGAGCACTG	CACGGATCTGAAGGGTGAAA
MYC	TGCTCCATGAGGAGACACC	CCTGCCTCTTTCCACAGAA
PgR	GTCAGTGGGCAGATGCTGTA	TGCCACATGGTAAGGCATAA
BSG	TGGGCCTGGTACAAGATCAC	GCGAGGAACTCACGAAGAAC
MKI67	CCCCACCTCAGAGAGTTTTG	GGGCTTGCAGAGCATTATC
GSTM3	GGGAAATTCTCATGGTTTGC	CAGGCACTTGGGGTCAAATA
GEM	TGGTTGGCAACAAAAGTGAC	ACAGCTGCAGAGGTCTCGAT
MELK	GGAGCAAAGGAAGGGTTCT	CAACAGTTGATCTGGATTCACTAA
MAD2L1	TCCTGGAAAGATGGCAGTTT	CGGATTTATCCTGGATAGC
BUB1	CTCAGCAACAAACCATGGAA	GTGCCAAAGAGCATGCAATA
TPD52	GCAAGACGTGACAGCAACAT	GAGCCAACAGACGAAAAAGC
HPRT	GCAGACTTTGCTTTCCTTGG	ACACTTCGTGGGGTCTTTT

Ejemplo 8. MT-PCR tiene amplia aplicabilidad a cualquier gen que pueda medirse por PCR: Cuantificación de productos de expresión de genes inflamatorios en células endoteliales

- 5 Para demostrar la aplicación adicional de MT-PCR en otras áreas clínicamente relevantes, se cuantificó la expresión de 17 genes inflamatorios a partir de 100 ng de ARN aislado de una biopsia de piel humana y se analizaron usando 10 ciclos de amplificación combinada en la primera ronda seguido de 35 ciclos de amplificación de segunda ronda. Los 17 genes se amplificaron por triplicado de forma eficaz y precisa como se muestra en la Figura 9A. Se apreciará que las mediciones triplicadas demuestran que cada producto de expresión génica dado se ha medido con elevada reproducibilidad. Las correspondientes curvas de fusión mostradas en la Figura 9B también muestran que cada reacción de amplificación de segunda ronda producía un único producto que carecía de contaminación con productos no específicos, dímeros de cebador y similares, incluso después de 35 ciclos de amplificación en la segunda ronda. La especificidad de la amplificación se confirmó adicionalmente por análisis usando un Bioanalyzer (Agilent Technologies) como se muestra en la Figura 9C, que muestra claramente que estaban presentes productos de PCR individuales en cada reacción. Los genes usados en este ensayo MT-PCR se validaron demostrando que producían un único producto cuando se ensayaban por su cuenta en una reacción de PCR convencional. Entonces se usaron juntos en una reacción MT-PCR altamente combinada previamente optimizada para una serie de genes relacionados con cáncer sin optimización adicional. Este ejemplo demuestra que cualquier reacción de PCR que funciones bien cuando se ensaya por su cuenta probablemente funcionará de un modo sustancialmente similar cuando se incorpore en una reacción de MT-PCR altamente combinada sin optimización adicional.

Ejemplo 9. MT-PCR combinada con análisis de fusión de alta resolución para la identificación de secuencias diana.

- 25 El método MT-PCR también puede combinarse con análisis de curvas de fusión de alta resolución para una amplia diversidad de aplicaciones tales como la identificación de secuencias de ADN diana, la detección de diferentes cepas virales o bacterianas en muestras heterogéneas, la detección y cuantificación de SNP, la mutación de ADN (después de tratamiento con bisulfito) y el genotipado. Ejemplos de análisis de curvas de fusión que utilizan preferiblemente colorantes intercalantes que saturan el ADN amplicón bicatenario tal como SYTO9, EvaGreen o LCGreen incluyen la detección de múltiples cepas virales (Varga, A y James, D (2006) J. of Virol. Methods 132:146-153), diferentes especies bacterianas (Bell CA y Patel R. (2005) Diagn Microbiol Infect Dis. 53(4):301-6), análisis de mutación de ADN (Worm et al., (2001) Clinical Chemistry 47:1183-1189) y análisis de mutación y genotipado para el diagnóstico de cáncer (Bernard, P.S. y Wittwer, C.T (2002) Clinical Chemistry 48(8): 1178-1185; Powell B.L. et al., (2002) Carcinogenesis 23(2):311-315). El análisis de fusión de alta resolución claramente tiene amplia aplicabilidad a cualquier gen que pueda medirse por PCR.

Para obtener un perfil de curva de fusión a partir de una reacción de amplificación, que podría contener uno o múltiples productos de MT-PCR, el producto o productos se calientan gradualmente desde aproximadamente 60 °C

hasta aproximadamente 95 °C, donde el indicador fluorescente, tal como colorante SYTO-9, se disocia rápidamente de los productos amplificados a la temperatura a la que el ADN cambia de una forma bicatenaria a una forma monocatenaria causando una bajada en la fluorescencia emitida a una temperatura característica. Este cambio en la fluorescencia se controla de forma continua o regular a través del gradiente de temperatura y el cambio en la fluorescencia después se representa a lo largo de un eje de gradiente de temperatura para obtener el perfil de curva de fusión. Como cada producto de PCR tiene una temperatura de fusión específica (T_m), éstos pueden identificarse por sus diferentes temperaturas de fusión como se demuestra en las Figuras 10A y 10B. El control preciso de la temperatura del Rotor-gene 6000 (Corbett Research) permite determinar las temperaturas de fusión con una precisión de menos de 0,02 °C. Esto es suficiente para distinguir pequeñas mutaciones en dianas amplificadas por MT-PCR o confirmar que la diana correcta se ha amplificado en la reacción. En la Figura 10A, se amplificó por MT-PCR una región del gen TP53, que es susceptible a mutación, a partir de 8 muestras seleccionadas entre dos líneas celulares de cáncer de mama humano y se analizaron por fusión de alta resolución en el Rotor-gene 6000. Puede observarse que los productos de amplificación de la línea celular SKBR3 presentan una región génica TP53 mutante (con una temperatura de fusión de 86,46 °C) y que ésta puede distinguirse fácilmente de los productos de amplificación de la línea celular MCF7 que tiene una región génica TP53 de tipo silvestre (con una temperatura de fusión de 87,16 °C). Como se sabe que algunos motivos hipervariables en el gen TP53 tienen consecuencias terapéuticas, este análisis y otros similares puede ser de utilidad en medicina predictiva como también se analiza en Powell *et al.*, (supra). La Figura 10B muestra un estudio comparativo sobre una región del gen TP53 que no presenta dichas mutaciones. Esta región también se amplificó usando MT-PCR sobre muestras recogidas de las dos líneas celulares. En este caso, las curvas indican que los productos de amplificación por MT-PCR tanto de SKBR3 como de MCF7 son iguales, teniendo la misma temperatura de fusión de 84,90 °C. Debe apreciarse adicionalmente que es ventajoso optimizar los componentes de la reacción de amplificación de segunda ronda para mejorar la precisión y fiabilidad de los perfiles de curva de fusión y, a este respecto, es frecuentemente beneficioso que no se incluya DMSO en la mezcla de amplificación de segunda ronda.

Ejemplo 10. MT-PCR combinada con análisis de fusión de alta resolución para identificación bacteriana.

Se usó de nuevo método de análisis de curva de fusión de alta resolución, descrito en el Ejemplo 9, pero se proporcionó una muestra de ADN comparadora, de modo que pudiera compararse el ADN de ensayo con el ADN comparador después de la normalización de las curvas de fusión para dar una medición altamente sensible de identidad o disparidad con el comparador. En las Figuras 11A y 11B, se muestran las curvas de fusión de varios extractos de ADN bacteriano después de su amplificación con cebadores específicos para el gen de ARNr 16S de *Enterococcus*. La similitud con la secuencia 16S de otras bacterias significa que éstas también generarán un producto de PCR, incluso después de amplificación anidada por MT-PCR. Después de normalización de las curvas de fusión entre las regiones mostradas en la Fig. 11A, se identificó una curva de fusión como la curva de fusión genuina de *Enterococcus* y todas las demás curvas de fusión se compararon con ella (Fig. 11B). En esta figura las líneas horizontales son del *Enterococcus* comparador y otra muestra de *Enterococcus* que se identifica con un 98 % de confianza. Las otras curvas de fusión se consideran bacterias diferentes ya que tienen un nivel muy bajo de confianza del que podría ser *Enterococcus* (Tabla 5). La MT-PCR es particularmente adecuada para análisis de fusión de alta resolución ya que la pureza de los productos mejora la fiabilidad de los resultados. Además, para análisis forense, la sensibilidad de MT-PCR es muy adecuada para el análisis de restos de tejido humano, y para el tipado tisular, las grandes cantidades de dianas que pueden determinarse simultáneamente hace que el método sea muy preciso.

Tabla 5

Muestra	Genotipo	% de confianza
<i>Enterococcus</i> (comparador)	<i>Enterococcus</i>	100
<i>Staphylococcus</i>	Variación	0,62
Enterobacteriaceae	Variación	0,26
<i>Streptococcus</i>	Variación	0,23
<i>Staphylococcus</i>	Variación	0,38
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	98,28

Un especialista en la técnica apreciará que el método MT-PCR y el método MT-PCR que incluye o combinado con análisis de curvas de fusión de alta resolución, puede realizarse usando una gama de plataformas de termociclado y sistemas de detección incluyendo una gama de indicadores fluorescentes. Por ejemplo, aunque las reacciones de amplificación y análisis de curvas de fusión pueden realizarse usando el Rotor-gene 6000, esto también puede conseguirse usando otros sistemas tales como el Light cycler® (Roche), el ABI PRISM® 7000, 7700 y 7900 (Applied Biosystems), el SmartCycler® (Cepheid), iCycler™ (BioRad) y otras plataformas tal como sabrán los especialistas en la técnica. Por consiguiente, la MT-PCR y MT-PCR que incluye o combinada con análisis de curvas de fusión, puede realizarse usando una gama de indicadores fluorescentes tales como SYBR-green I, SYTO9, LC Green, EvaGreen, sondas Lightcycler®, cebadores fluorogénicos LUX™ y similares como será evidente para un especialista en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Un método para amplificar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas a partir de una combinación de moléculas de ácido nucleico, que comprende:

5 (a) amplificar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas en una reacción combinada de primera ronda que incluye una pluralidad de pares de cebadores externos, siendo cada par específico para una secuencia de ácido nucleico seleccionada, en donde la reacción de amplificación combinada amplifica más de aproximadamente 4 moléculas de ácido nucleico seleccionadas y en donde la reacción combinada de primera
10 ronda se deja proceder durante hasta aproximadamente 15 ciclos;

(b) diluir los amplicones y los componentes restantes de reacción de dicha reacción combinada de primera ronda en una pluralidad de reacciones de amplificación de segunda ronda incluyendo cada una al menos un par de cebadores internos, siendo cada par específico para una de dichas secuencias de ácido nucleico seleccionadas, en donde dicha dilución es tal que la cantidad de cebadores externos introducida en cada una de dichas reacciones de amplificación de segunda ronda es insuficiente para alterar la amplificación de dichas moléculas
15 de ácido nucleico seleccionadas usando dichos cebadores internos y en donde la dilución es una dilución de al menos un factor 25; y

(c) amplificar adicionalmente dichas moléculas de ácido nucleico seleccionadas en dicha pluralidad de reacciones de amplificación de segunda ronda, mediante lo cual cada reacción de segunda ronda amplifica
20 adicionalmente un subconjunto de dicha pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas respectivamente a partir de dichos cebadores internos.

2. Un método para amplificar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas a partir de una combinación de moléculas de ácido nucleico que comprende:

25 (a) amplificar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas en una reacción combinada de primera ronda que incluye una pluralidad de pares de cebadores de primera ronda que comprende cebadores externos, siendo cada par específico para una secuencia de ácido nucleico seleccionada, en donde la reacción de amplificación combinada amplifica más de aproximadamente 4 moléculas de ácido nucleico seleccionadas y en donde la reacción combinada de primera ronda se deja proceder durante hasta aproximadamente 15 ciclos;

(b) diluir los amplicones y los componentes restantes de reacción de dicha reacción combinada de primera ronda en una pluralidad de reacciones de amplificación de segunda ronda incluyendo cada una al menos un par de cebadores de segunda ronda, comprendiendo cada par un cebador interno y uno de dichos cebadores externos y siendo específico para una de dichas secuencias de ácido nucleico seleccionadas, en donde dicha dilución es tal que la cantidad de cebadores externos introducida en cada una de dichas reacciones de amplificación de
30 segunda ronda es insuficiente para alterar la amplificación de dichas moléculas de ácido nucleico seleccionadas usando dichos cebadores de segunda ronda y en donde la dilución es una dilución de al menos un factor 25; y

(c) amplificar adicionalmente dichas moléculas de ácido nucleico seleccionadas en dicha pluralidad de reacciones de amplificación de segunda ronda mediante lo cual cada reacción de segunda ronda amplifica
35 adicionalmente un subconjunto de dicha pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas respectivamente a partir de dichos cebadores de segunda ronda.

3. Un método para estimar la cantidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas a partir de una combinación de moléculas de ácido nucleico que comprende:

45 (a) amplificar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas en una reacción combinada de primera ronda que incluye una pluralidad de pares de cebadores externos siendo cada par específico para una secuencia de ácido nucleico seleccionada en donde la reacción de amplificación combinada amplifica más de aproximadamente 4 moléculas de ácido nucleico seleccionadas y en donde la reacción combinada de primera
50 ronda se deja proceder durante hasta aproximadamente 15 ciclos;

(b) diluir los amplicones y componentes restantes de reacción de dicha reacción combinada de primera ronda en una pluralidad de reacciones de amplificación de segunda ronda incluyendo cada una un indicador detectable y al menos un par de cebadores internos, siendo cada par específico para una de dichas secuencias de ácido nucleico seleccionadas, en donde dicha dilución es tal que la cantidad de cebadores externos introducida en
55 cada una de dichas reacciones de amplificación de segunda ronda es insuficiente para alterar la amplificación de dichas moléculas de ácido nucleico seleccionadas usando dichos cebadores internos y en donde la dilución es una dilución de al menos un factor 25;

(c) amplificar adicionalmente dichas moléculas de ácido nucleico seleccionadas en dicha pluralidad de reacciones de amplificación de segunda ronda mediante lo cual cada reacción de segunda ronda amplifica
60 adicionalmente un subconjunto de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas respectivamente a partir de dichos cebadores internos; y

(d) controlar cada reacción de amplificación de segunda ronda mediante dicho indicador detectable de modo que se estime la cantidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas de cada secuencia seleccionada.

65 4. Un método para estimar la cantidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas a partir de una combinación de moléculas de ácido nucleico que comprende:

- (a) amplificar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas en una reacción combinada de primera ronda que incluye una pluralidad de pares de cebadores externos siendo cada par específico para una secuencia de ácido nucleico seleccionada, en donde la reacción de amplificación combinada amplifica más de aproximadamente 4 moléculas de ácido nucleico seleccionadas y en donde la reacción combinada de primera ronda se deja proceder durante hasta aproximadamente 15 ciclos;
- (b) diluir los amplicones y componentes restantes de reacción de dicha reacción combinada de primera ronda en una pluralidad de reacciones de amplificación de segunda ronda incluyendo cada una un indicador detectable y al menos un par de cebadores de segunda ronda, comprendiendo cada par un cebador interno y uno de dichos cebadores externos y siendo específico para una de dichas secuencias de ácido nucleico seleccionadas, en donde dicha dilución es tal que la cantidad de cebadores externos introducida en cada una de dichas reacciones de amplificación de segunda ronda es insuficiente para alterar la amplificación de dichas moléculas de ácido nucleico seleccionadas usando dichos cebadores de segunda ronda y en donde la dilución es una dilución de al menos un factor 25;
- (c) amplificar adicionalmente dichas moléculas de ácido nucleico seleccionadas en dicha pluralidad de reacciones de amplificación de segunda ronda mediante lo cual cada reacción de segunda ronda amplifica adicionalmente un subconjunto de dicha pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas respectivamente; y
- (d) controlar cada reacción de amplificación de segunda ronda mediante dicho indicador detectable de modo que se estime la cantidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas de cada secuencia seleccionada.
5. Un método para estimar la cantidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas a partir de una combinación de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 o con la reivindicación 4 en donde dicho indicador fluorogénico es un colorante que se intercala en ADN bicatenario.
6. Un método para estimar la cantidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas a partir de una combinación de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 o con la reivindicación 4 en donde dicho indicador fluorogénico es una sonda fluorogénica que interacciona con ADN monocatenario.
7. Un método para estimar la cantidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas a partir de una combinación de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 o con la reivindicación 4 en donde dicha reacción de amplificación de segunda ronda incluye una pluralidad de pares de cebadores y una pluralidad de sondas fluorogénicas de modo que se amplifique y cuantifique una pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas de cada secuencia seleccionada.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que dichas moléculas de ácido nucleico incluyen moléculas de ADN.
9. Un método para amplificar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que dichos cebadores incluidos en dicha reacción de amplificación de segunda ronda tienen una Tm mayor que al menos uno de dichos cebadores externos incluidos en dicha reacción de amplificación de primera ronda, de modo que dicho cebado oligonucleotídico en dicha reacción de amplificación de segunda ronda se desvíe sustancialmente a favor de dichos cebadores que tienen dicha Tm mayor.
10. Un método para amplificar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que al menos uno de dichos cebadores externos incluye nucleótidos UTP mediante lo cual dicho cebador es susceptible a digestión por una enzima UNG.
11. Un método para amplificar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas de acuerdo con la reivindicación 10 en el que dichos cebadores externos se retiran al final de dicha primera ronda de amplificación por digestión con una enzima UNG evitando de este modo sustancialmente la contaminación de dicha reacción de amplificación de segunda ronda por dichos cebadores de primera ronda.
12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la reacción de amplificación combinada amplifica entre aproximadamente 4 y 150 moléculas de ácido nucleico seleccionadas.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 en el que la reacción de amplificación combinada amplifica entre aproximadamente 10 y 150 moléculas de ácido nucleico seleccionadas.
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13 en el que la reacción de amplificación combinada amplifica entre aproximadamente 20 y 100 moléculas de ácido nucleico seleccionadas.
15. Un método para amplificar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores cuando se usa en un método para detectar polimorfismos, mutaciones, inserciones y deleciones.

16. Un método para amplificar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores cuando se usa en un método de diagnóstico de enfermedades y trastornos.
- 5 17. Un método de acuerdo con la reivindicación 16 cuando se usa para el diagnóstico de una neoplasia.
18. Un método de acuerdo con la reivindicación 17 en el que dicha neoplasia es cáncer de mama.
19. Un método de acuerdo con la reivindicación 17 en el que dicha neoplasia es cáncer colorrectal.
- 10 20. Un método para amplificar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico seleccionadas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 cuando se usa para la detección e identificación de organismos seleccionados.
- 15 21. Un método de acuerdo con la reivindicación 20 en el que dichos organismos se detectan e identifican secuenciando dichos productos de ácido nucleico.
22. Un método de acuerdo con la reivindicación 20 o con la reivindicación 21 en el que dichos organismos se seleccionan entre el grupo de bacterias, virus, hongos, micoplasma y parásitos o combinaciones de los mismos.
- 20 23. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, en el que dicho método incluye análisis de curvas de fusión.
24. Un método de acuerdo con la reivindicación 23, en el que dicha curva de fusión se genera teniendo una resolución en el intervalo de aproximadamente 0,05 °C a aproximadamente 0,02 °C.
- 25 25. Un método de acuerdo con la reivindicación 23, en el que dicha curva de fusión se genera teniendo una resolución de menos de 0,02 °C.
- 30 26. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que las reacciones de amplificación se procesan automáticamente en un aparato termociclador.
27. Un método de acuerdo con la reivindicación 26 en el que dicho aparato termociclador es un aparato termociclador a tiempo real de múltiples pocillos.
- 35 28. Un método de acuerdo con la reivindicación 26 en el que dicho aparato termociclador es un dispositivo de PCR de flujo continuo.
- 40 29. Un método de acuerdo con la reivindicación 26 en el que dicho aparato termociclador es un aparato termociclador rotario.

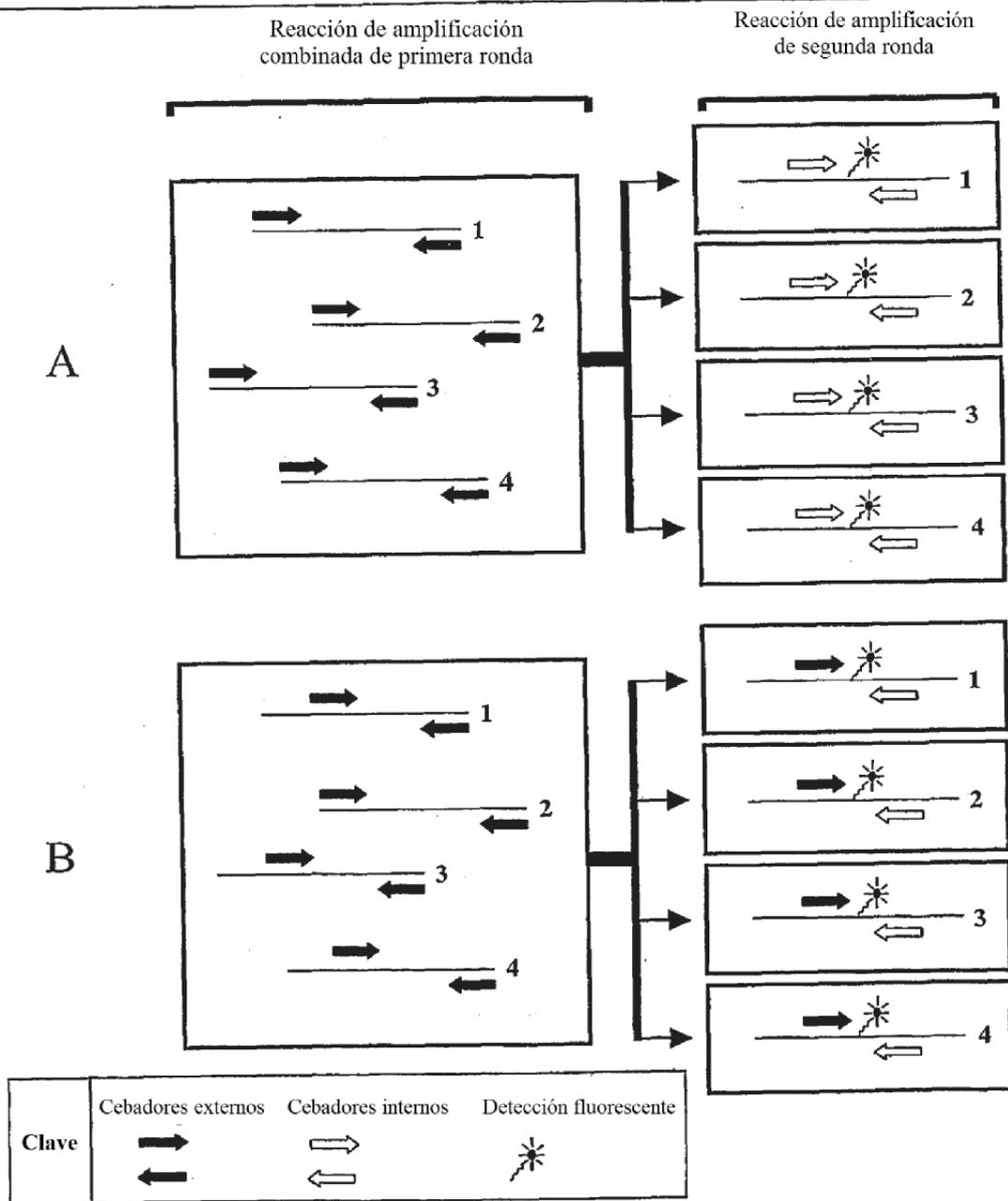
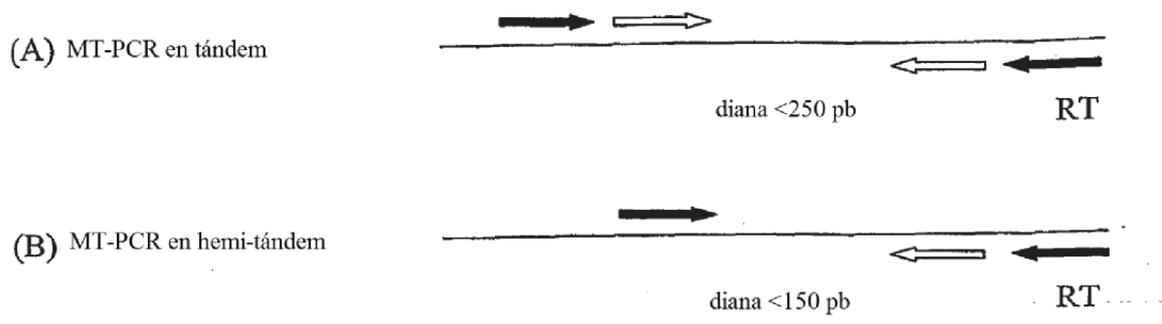


FIG. 1

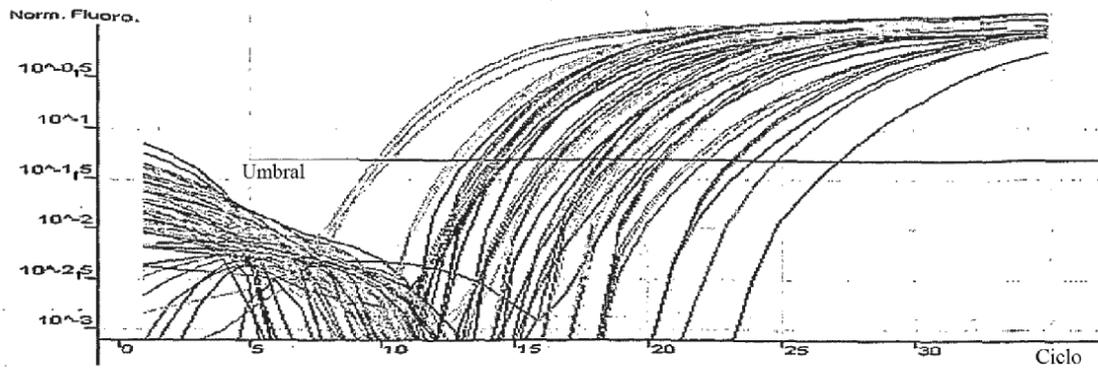


FIG. 2A

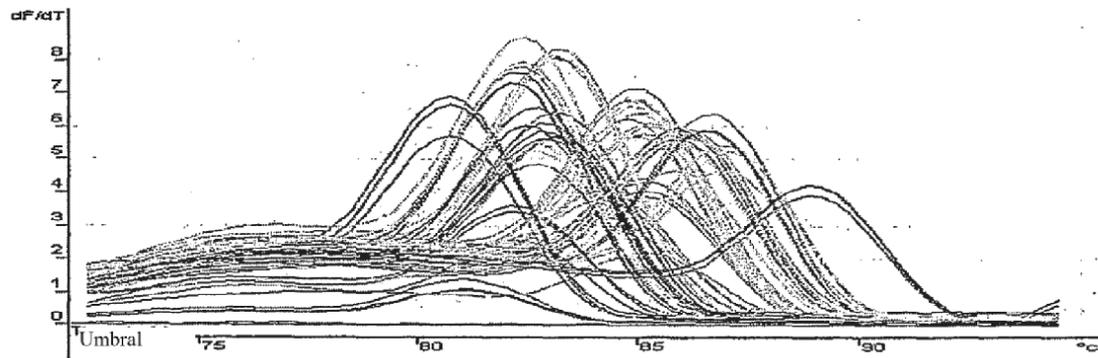


FIG. 2B



FIG. 2C

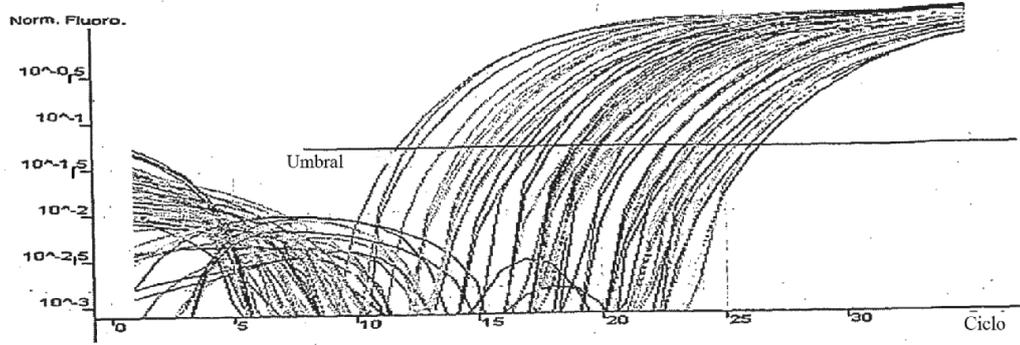


FIG. 3A

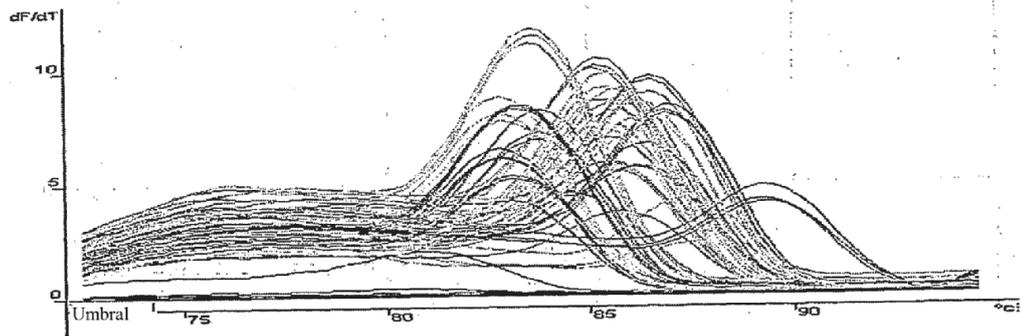


FIG. 3B

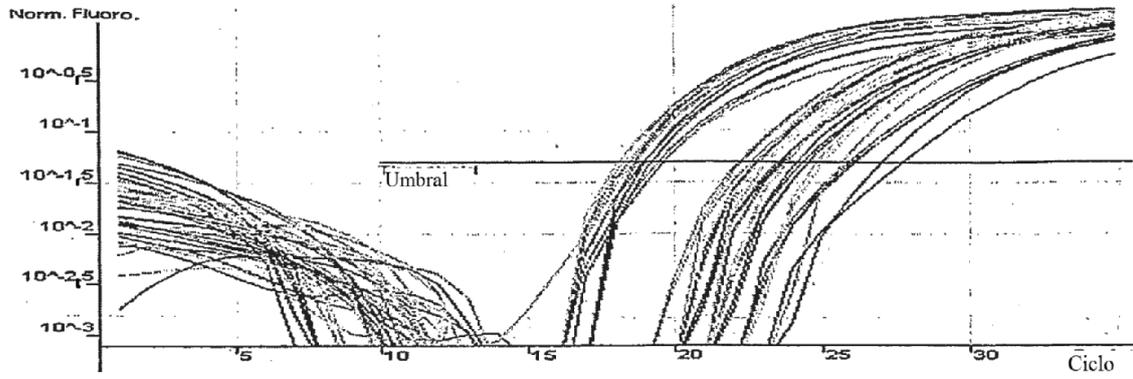


FIG. 4A

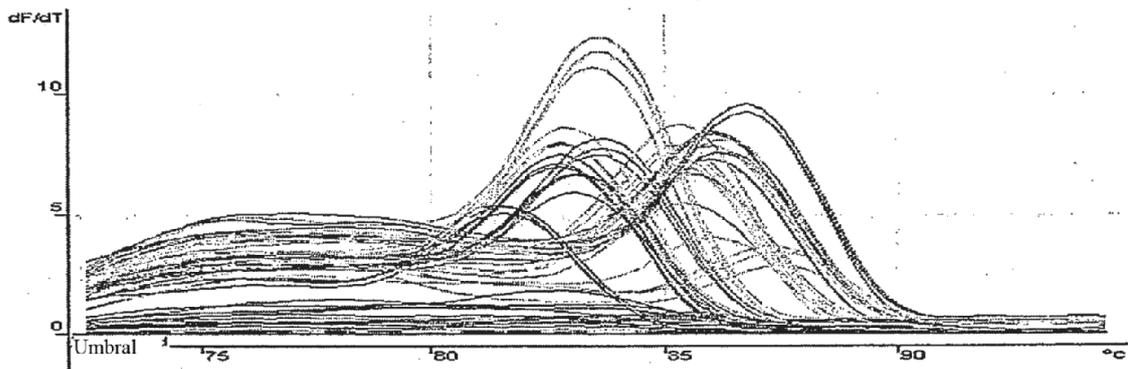


FIG. 4B

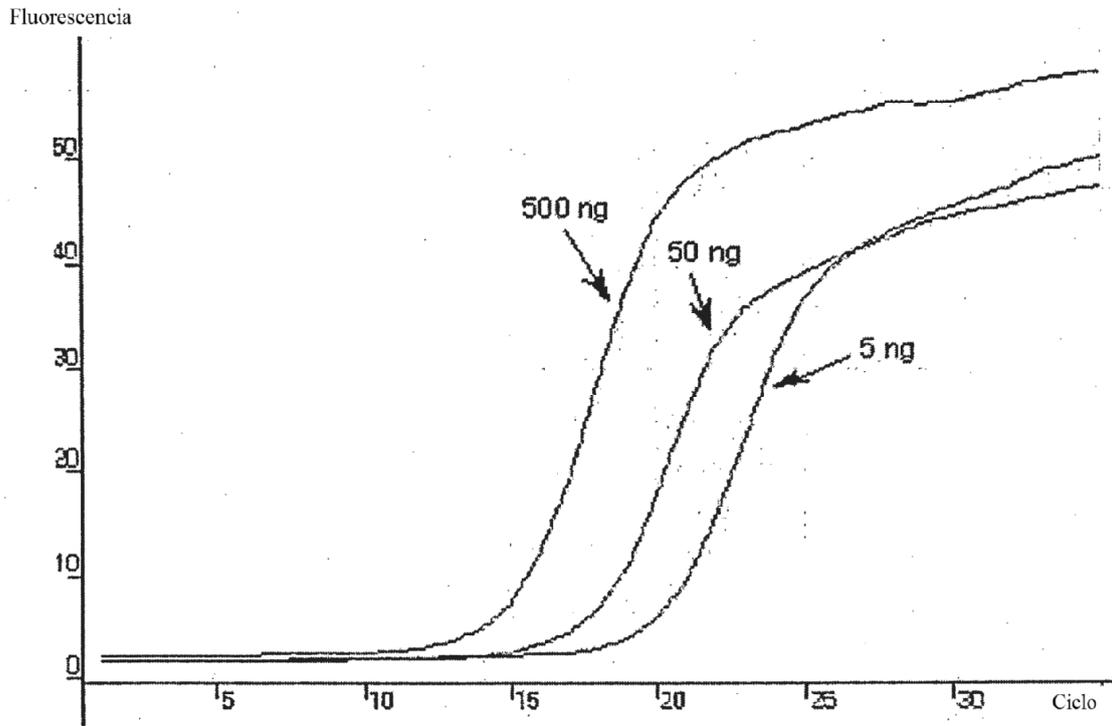


FIG. 5

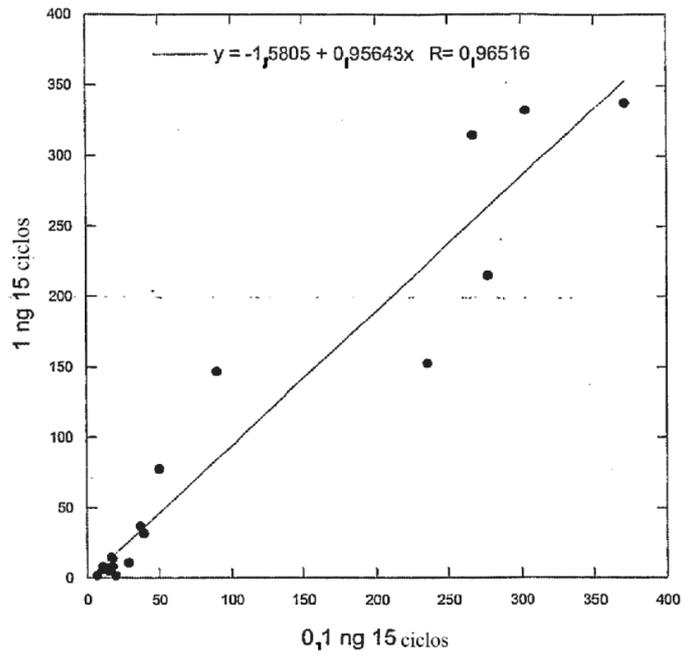


FIG. 6A

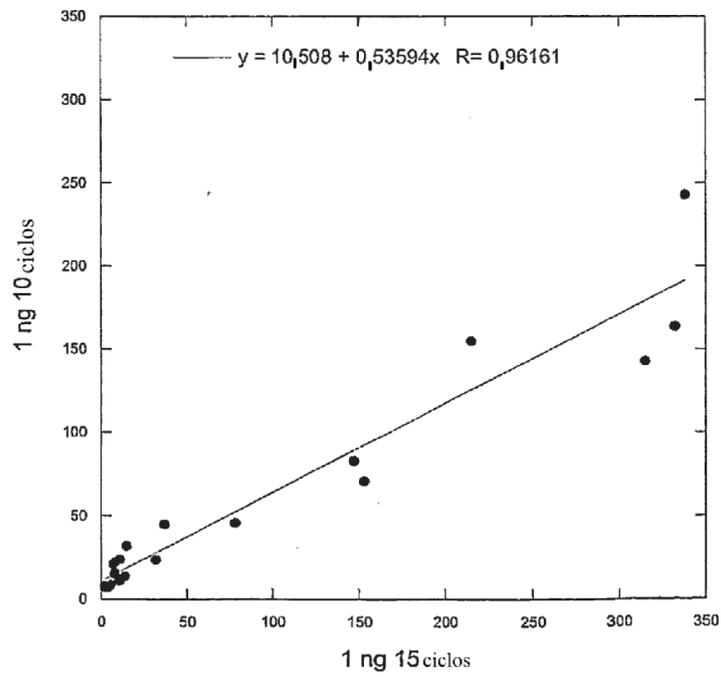


FIG. 6B

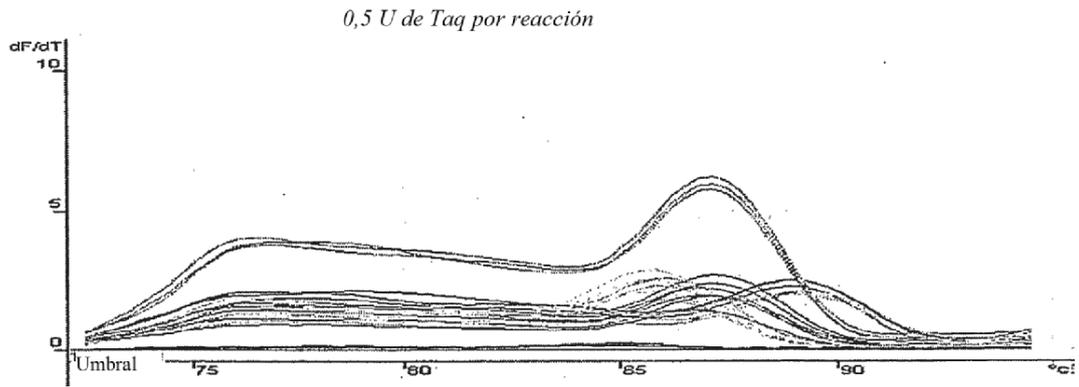


FIG. 7A

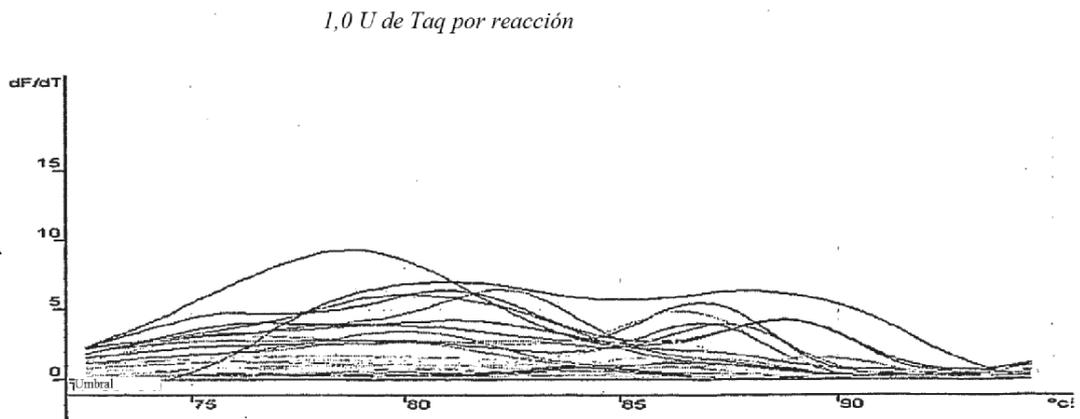


FIG. 7B

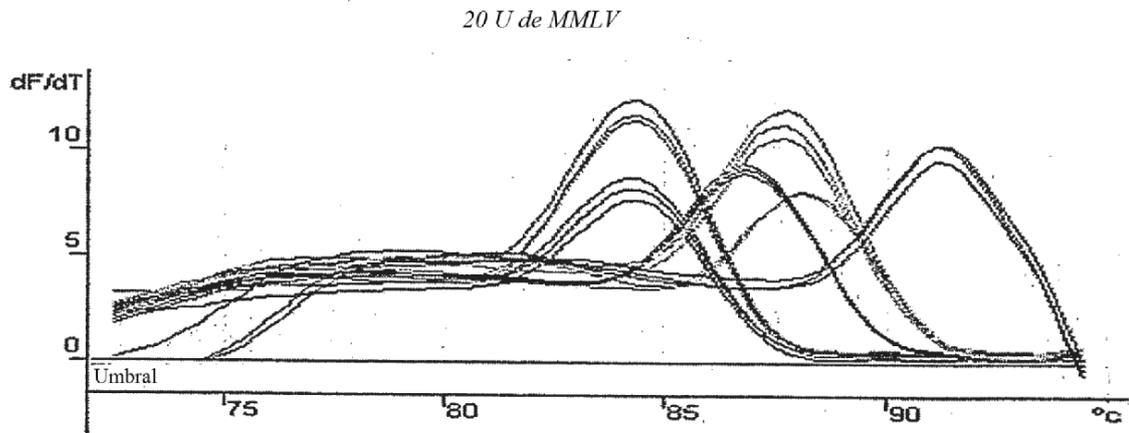


FIG. 7C

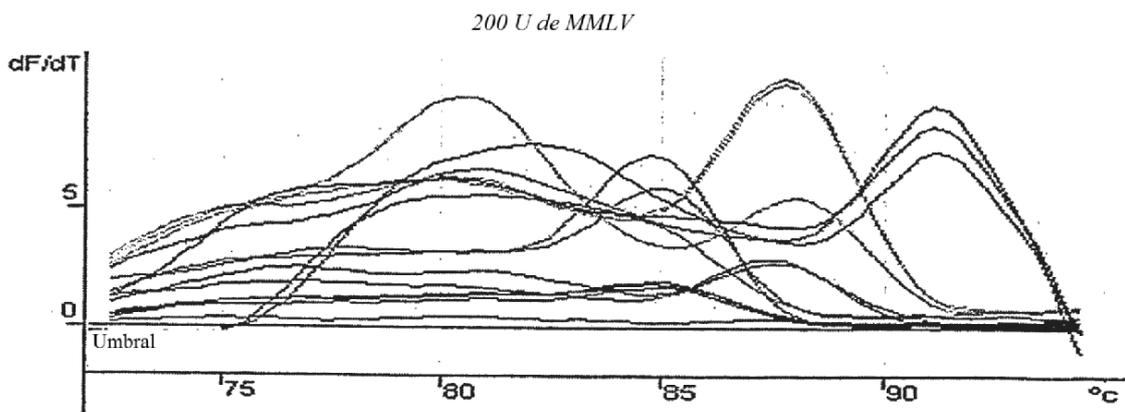


FIG. 7D

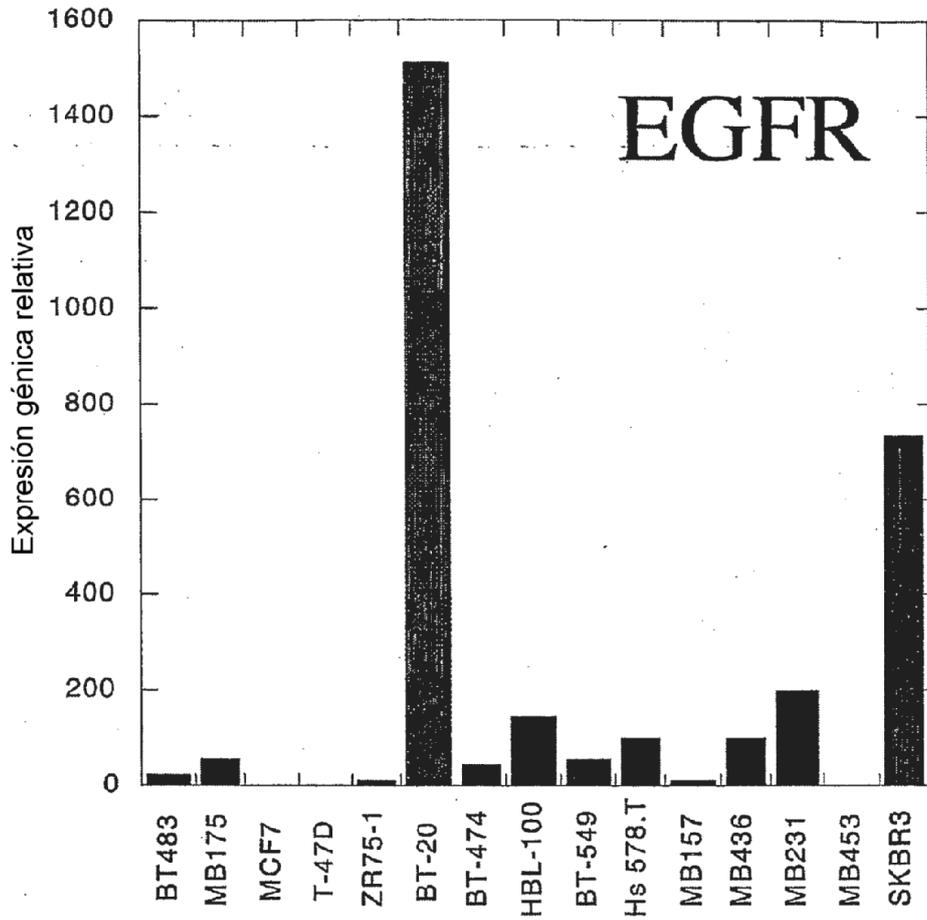


FIG. 8

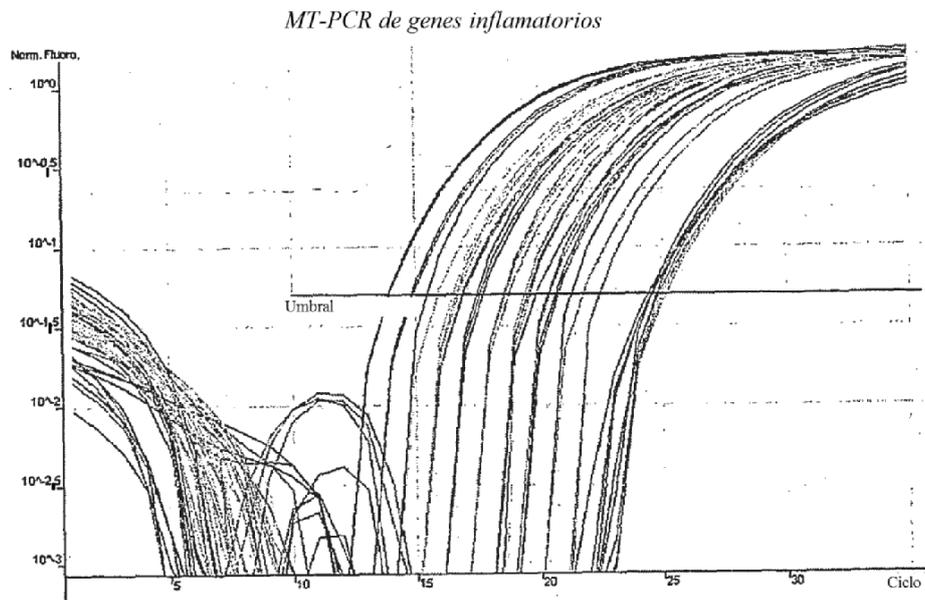


FIG. 9A

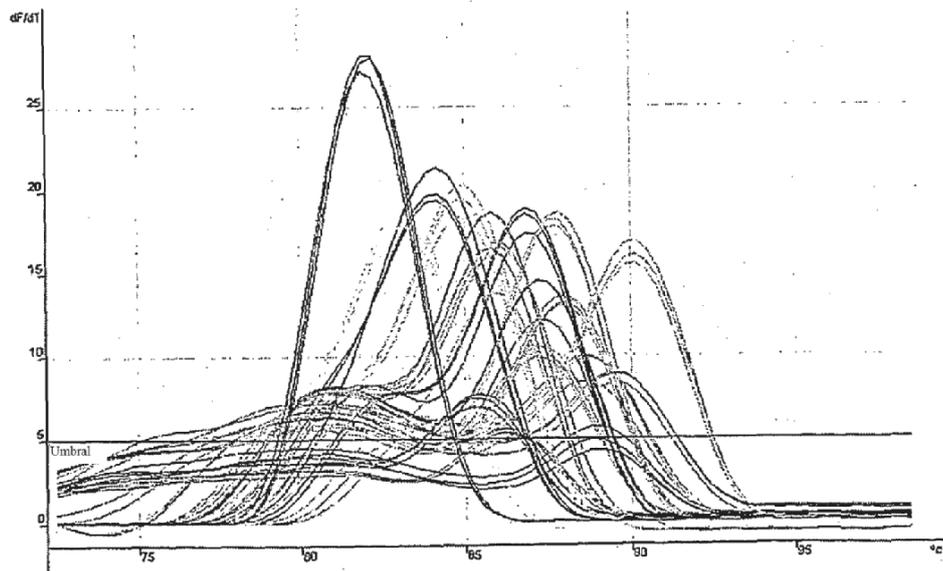


FIG. 9B

Análisis Bioanalyzer de productos de reacción

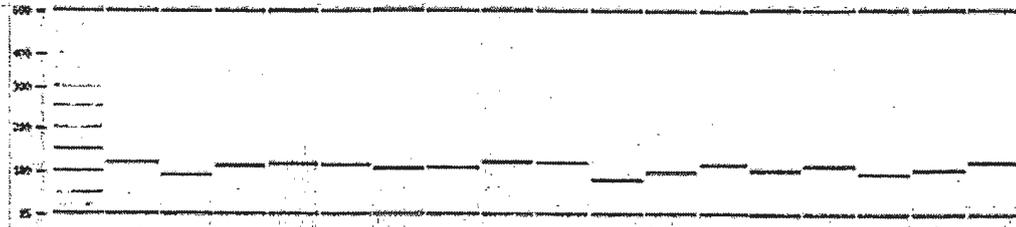


FIG. 9C

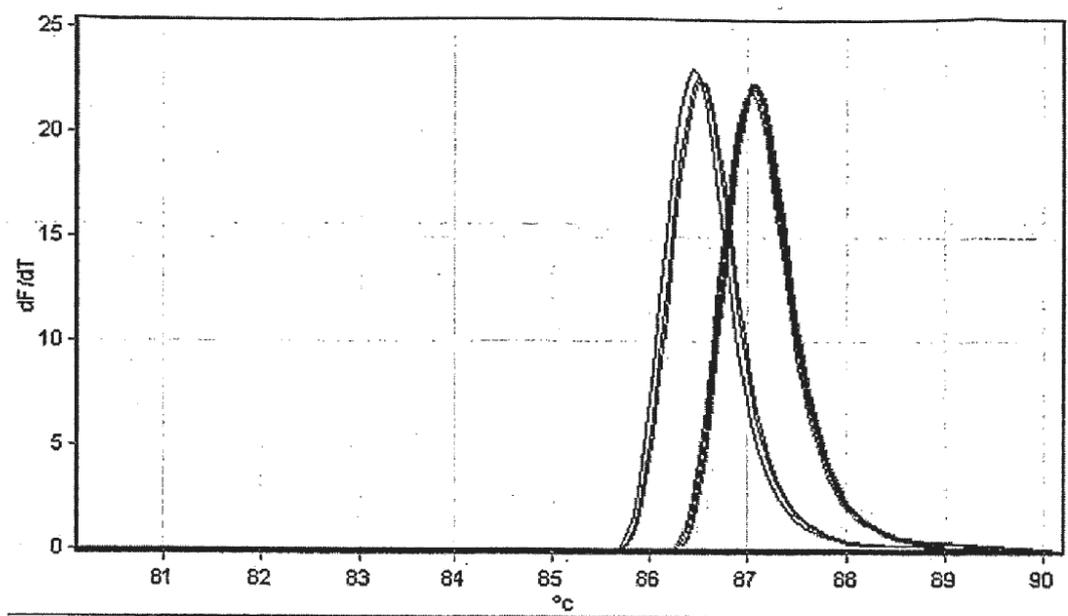


Fig 10A

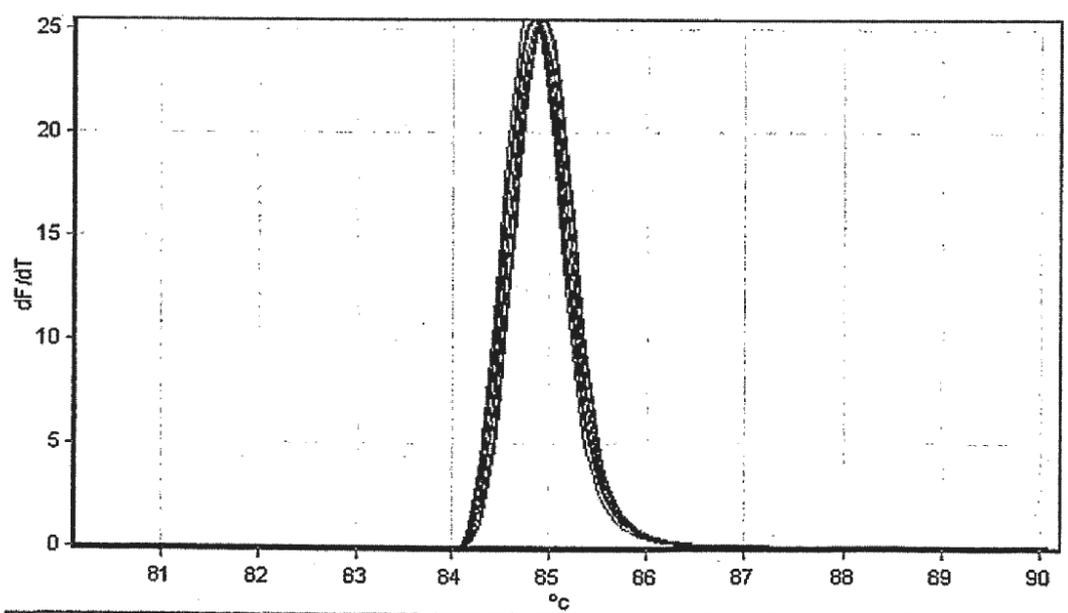


Fig 10B

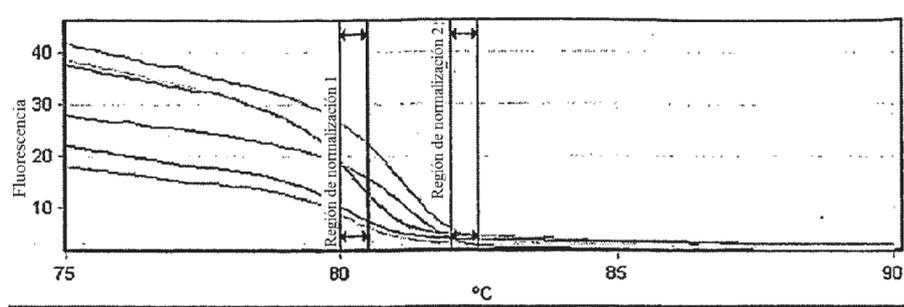


FIG. 11A

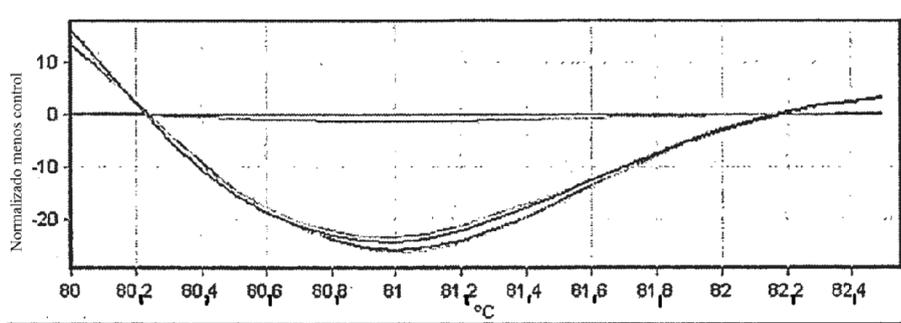


FIG. 11B