

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 732**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2011 E 11763703 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2625284**

54 Título: **Método para lisis celular en un tampón de reacción de RT-PCR**

30 Prioridad:

04.10.2010 EP 10186416
04.10.2010 EP 10186417

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.04.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HOFFMANN, INGRID y
WALCH, HEIKO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 533 732 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

Método para lisis celular en un tampón de reacción de RT-PCR

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo del análisis de expresión de ARN por medio de PCR. Más específicamente, la presente invención proporciona un método para llevar a cabo análisis de expresión partiendo de un material de solamente unas pocas células, y análisis directo posterior de dicho ARN de muestra por medio de PCR en tiempo real.

10 Antecedentes de la invención

15 En las últimas décadas, la PCR se ha convertido en el "caballo de trabajo" para el análisis de ADN, ya que permite la amplificación exponencial de los ácidos nucleicos. En particular, la PCR en tiempo real (también denominada qPCR) se ha convertido en una herramienta poderosa ya que permite el análisis simultáneo del ácido nucleico amplificado durante la amplificación, o sin apertura intermedia, directamente después de la reacción de amplificación por medio de análisis de curva de fusión.

20 Por otra parte, la automatización de PCR así como de RT-PCR ha hecho progresos significativos, ya que ahora están disponibles sistemas de qPCR que permiten un rendimiento de 96, 384 o 1536 reacciones en paralelo en formatos de placas de microtitulación. Los sistemas también se han vuelto más fáciles de usar. Por ejemplo, en el mercado están disponibles placas de microtitulación, en las que cada recipiente de reacción ya comprende los compuestos necesarios para realizar la amplificación por PCR o RT-PCR o amplificación y detección en una forma liofilizada, y el cliente solamente tiene que añadir la muestra que comprende el ácido nucleico a analizar, antes a la reacción real en sí. Advalytics proporciona un sistema alternativo (AG 480F) que permite la amplificación por PCR y la detección en portaobjetos de vidrio.

30 Sin embargo, todavía es un desafío mejorar aún más el flujo de trabajo para el análisis de PCR y RT-PCR, en particular, si el análisis se puede realizar solamente en el ARN que se origina solamente a partir de un pequeño número de células. En PCR en tiempo real tradicional, el ADN o el ARN se aísla primero a partir de células en un procedimiento que requiere mucho tiempo que puede conducir a una pérdida de material. Después de la cosecha, las células se lisan y el ADN se purifica al menos parcialmente a partir del lisado, porque de otro modo, la amplificación por PCR se podría inhibir al menos cuantitativamente.

35 Stahlberg A. *et al.* "Single-cell gene expression profiling using reverse transcription quantitative real-time PCR", abril de 2010, METHODS 50 (4): 282-288) informa de un método para recoger células individuales mediante capilares de vidrio o citometría de flujo, seguido de evaluación por perfiles ARNm cuantitativa usando transcripción inversa y PCR en tiempo real.

40 En este contexto, el problema técnico que subyace en la presente invención era proporcionar un método de alto rendimiento mejorado y que se pudiera automatizar que permite un protocolo adicional de análisis de ácidos nucleicos simplificado.

45 Sumario

La presente invención proporciona un método a la amplificación de un ácido nucleico diana de ARN, que comprende las etapas de

50 a) transferir una muestra de líquido con un primer volumen inferior a 2 μ l que comprende una o más células eucariotas vivas en un recipiente,

b) añadir a dicho recipiente un tampón de reacción de RT-PCR en una etapa que comprende una ADN polimerasa termoestable capaz de realizar una RT-PCR en una etapa, y dNTP, con un segundo volumen, mientras que dicho segundo volumen es al menos 2x tan grande como dicho primer volumen,

55 b') incubar dicha muestra a una temperatura entre 37 °C y 65 °C de 30 segundos a 5 min, c) calentar dicho recipiente durante al menos 20 segundos a al menos 90 °C,

60 d) amplificar dicha diana en dicho recipiente por medio de una reacción en cadena de la polimerasa con una ADN polimerasa termoestable capaz de realizar una RT-PCR en una etapa sin realización de una etapa de purificación intermedia,

65 en el que la relación del número de dichas células vivas de la etapa a) frente al volumen de líquido en el que la reacción en cadena de la polimerasa de la etapa d) no es superior a 2 células/ μ l, dicha relación es de al menos 1 célula/25 μ l.

Dicho tampón de reacción de RT-PCR en una etapa de la etapa b) puede comprender además al menos una pareja de cebadores de amplificación y opcionalmente cualquiera de al menos una sonda de hibridación marcada o un compuesto fluorescente que se une a ADN bicatenario.

5 Como alternativa, dicho recipiente comprende una composición seca de al menos una pareja de cebadores de amplificación por PCR y opcionalmente al menos una sonda de hibridación marcada o un compuesto fluorescente que se une a ADN bicatenario.

En una realización, la actividad de dicha ADN Polimerasa termoestable se activa térmicamente durante la etapa c).

10 Además, en una realización que no es mutuamente excluyente con la realización que se ha desvelado anteriormente, dicha polimerasa es la Tth Polimerasa.

15 En una realización del método de la invención, dicho líquido que comprende al menos una o más células vivas se ha obtenido mediante un método de clasificación de células antes de la etapa a).

20 Preferentemente, el ácido nucleico que se amplificará es ARN. También está dentro del alcance de la presente invención, si el ARN diana solamente se expresa en cantidades muy bajas y/o se transcribe a partir de de ADN de una sola copia.

En otro aspecto, se proporciona un kit que comprende una pluralidad de recipientes de reacción diseñados para que se ajusten en un instrumento termociclador, y un tampón de reacción de PCR que comprende una ADN polimerasa termoestable capaz de realizar una RT-PCR en una etapa y dNTP.

25 En un aspecto, dicho kit comprende adicionalmente al menos una pareja de cebadores de amplificación, y opcionalmente cualquiera de al menos una sonda de hibridación marcada o un compuesto fluorescente que se une a ADN bicatenario.

30 En un aspecto alternativo, dichos recipientes de reacción dentro de dicho kit comprenden una composición seca de al menos una pareja de cebadores de amplificación por PCR y opcionalmente cualquiera de al menos una sonda de hibridación marcada o un compuesto fluorescente que se une a ADN bicatenario

Dicha pluralidad de recipientes de reacción se pueden conectar físicamente entre sí en una forma de una placa de microtitulación o una tira lineal de recipientes de reacción.

35 Además, dicha polimerasa termoestable dentro de dicho kit se puede activar preferentemente por vía térmica por medio de incubación durante al menos 1 minuto a 90 °C.

Descripción Detallada

40 En términos generales, la presente invención proporciona un método que permite la lisis de una muestra celular en un entorno líquido que posteriormente se usa directamente para análisis de expresión de ARN por medio de aplicación de una RT-PCR en una etapa sin ninguna etapa de purificación intermedia o procedimientos complejos de manipulación de líquidos. De forma más precisa, la presente invención proporciona un método para amplificación de un ácido nucleico diana de ARN, que comprende las etapas de

a) transferir una muestra de líquido con un primer volumen inferior a 2 µl que comprende una o más células eucariotas vivas en un recipiente,

50 b) añadir a dicho recipiente un tampón de reacción de RT-PCR en una etapa que comprende una ADN polimerasa termoestable capaz de realizar una RT-PCR en una etapa, y dNTP, con un segundo volumen, mientras que dicho segundo volumen es al menos 2x tan grande como dicho primer volumen,

55 b') incubar dicha muestra a una temperatura entre 37 °C y 65 °C de 30 segundos a 5 min, c) calentar dicho recipiente durante al menos 20 segundos a al menos 90 °C,

d) amplificar dicha diana en dicho recipiente por medio de una reacción en cadena de la polimerasa con una ADN polimerasa termoestable capaz de realizar una RT-PCR en una etapa sin realización de una etapa de purificación intermedia,

60 en el que la relación del número de dichas células vivas de la etapa a) frente al volumen de líquido en el que la reacción en cadena de la polimerasa de la etapa d) no es superior a 2 células/µl, dicha relación es de al menos 1 célula/25 µl.

65 De acuerdo con un aspecto de la presente invención es posible que todas las etapas a), a), c) y d) se realicen dentro del mismo recipiente de reacción.

Tal como se demostrará con los ejemplos, la presente divulgación proporciona un método que se puede aplicar de forma sorprendente para realizar un análisis de RT-PCR en 1 etapa partiendo de solamente de una sola célula viva como material de muestra original. Además, es posible amplificar de forma reproducible y analizar ADN diana a partir de un gen de una sola copia a partir de solamente unas pocas células o incluso una sola célula.

El ácido nucleico diana puede ser cualquier ARN, que incluye pero no se limita a ARNm con el fin de controlar los respectivos niveles de expresión de ARN. Por lo tanto se requiere para amplificar el ácido nucleico diana de ARN con una polimerasa termoestable que comprende tanto actividad de polimerasa dependiente del molde de ARN (actividad de Transcriptasa Inversa) como actividad dependiente del molde de ADN. Un ejemplo importante para tal enzima es la Tth ADN polimerasa (Nº de Cat.: 480 022 001 de Roche Applied Science). Como alternativa, la ADN polimerasa termoestable que comprende actividad de transcriptasa inversa así como actividad de polimerasa dependiente de ADN puede ser una mezcla de una enzima con actividad de transcriptasa inversa y una actividad de ADN polimerasa dependiente del ADN. Por ejemplo, el sistema de *C. therm* Polimerasa (Nº de Cat.: 016 346 001 de Roche Applied Science) consiste en una mezcla de *C. therm* polimerasa y Taq Polimerasa.

Las temperaturas elevadas de actividad de Tth ADN Polimerasa (óptima de +55 °C a +70 °C, máxima de +95 °C) superan los problemas planteados por la estructura secundaria del ARN. El ADNc resultante se puede amplificar por PCR usando la misma enzima en presencia de iones Mg^{2+} . La capacidad de la Tth ADN Polimerasa para realizar tanto transcripción inversa como amplificación de ADN a temperaturas elevadas permite que esta enzima se use para RT-PCR cuantitativa, clonación, y análisis de expresión genética. La Tth ADN Polimerasa se usa para amplificación por RT-PCR de ARN de hasta 1 kb.

La actividad de Tth ADN Polimerasa es resistente a incubaciones prolongadas a temperaturas elevadas (+95 °C), y por lo tanto se puede usar para amplificación por PCR.

En presencia de iones Manganese (Mn^{2+}) la Tth ADN Polimerasa tiene una actividad de transcriptasa inversa intrínseca muy eficaz (RT), que es mucho más elevada que la actividad informada para ADN polimerasa de *E. coli* y Taq ADN polimerasa (Saiki, R.K., *et al.*, Science 239 (1988) 487-491).

Etapa a)

La una o más células vivas de acuerdo con la etapa a) son células eucariotas de origen humano, animal o vegetal. Las células pueden tener su origen en líneas celulares, sangre o biopsias.

La muestra líquida que contiene las células puede ser cualquier líquido, tampón o medio en el que dichas células sobreviven durante al menos un determinado periodo de tiempo, que es preferentemente no superior a 30 minutos. Dicho líquido, por ejemplo puede ser un medio en el que las células que viven y crecen en suspensión se han cultivado de fama satisfactoria. En el caso de células adherentes, el líquido puede ser un tampón, en el que las células se han separado del soporte sólido. Sin embargo, tal tampón está libre preferentemente de cualquier proteasa que pudiera tener un efecto de inhibición en la reacción de amplificación posterior de PCR o RT-PCR mediada por polimerasa. Tal efecto, si se observa, se puede evitar sometiendo las células a una etapa de lavado adicional antes de la deposición en el recipiente.

La transferencia del líquido en el recipiente se puede conseguir de forma manual por medio de una primera preparación de una serie de dilución apropiada de una muestra celular y a continuación pipeteando un equivalente de solamente una o varias células en dicho recipiente. Preferentemente, la transferencia se consigue usando una estación apropiada de pipeteo automatizado o, lo más preferente, un clasificador celular. En la técnica se conocen bien tales máquinas de clasificación celular y están disponibles en el mercado a través de una serie de diferentes fabricantes. Debido a la tecnología subyacente de los clasificadores celulares, de vez en cuando sucederá que los clasificadores celulares reconocen de forma errónea como células las partículas grandes de residuos celulares. Debido a este efecto, en el caso de análisis de una sola célula, algunas muestras pueden no dar resultados durante la reacción de PCR o RT-PCR posterior.

Preferentemente, el número de células transferidas al recipiente de reacción se debería limitar ya que sin ninguna etapa de purificación, la presencia de residuos celulares en concentraciones más elevadas puede inhibir la reacción de amplificación posterior. De forma ventajosa, el número de células transferidas al recipiente de reacción se ajusta de modo que la etapa d) tal como se desvela a continuación se realice de una manera tal que la muestra no supere una relación de 2 equivalentes celulares/ μ l.

También preferentemente, el número de células transferidas al recipiente de reacción no debería ser bajo, porque de otro modo puede hacer difícil la realización de una reacción de PCR o RT-PCR para la amplificación de los ARN que solamente se expresan con abundancia baja. Por lo tanto, el número de células transferidas al recipiente de reacción se ajusta de modo que la etapa d) tal como se desvela a continuación se realice de una manera tal que la muestra comprenda una relación de al menos 1 equivalente celular/25 μ l.

El volumen del líquido es lo suficientemente pequeño de modo que la adición del tampón de reacción de PCR-RT de 1 etapa en la etapa b) y – si fuera necesario – la adición de compuestos adicionales necesarios para la reacción de amplificación posterior por último da como resultado un volumen final que todavía es razonablemente pequeño para realizar dicha RT-PCR.

5 En el caso de deposición automatizada de líquido que contiene la una o más células el volumen puede ser muy bajo en el intervalo de sub- μ l. En particular, si se usa un clasificador celular, un volumen que contiene solamente un equivalente celular es aproximadamente inferior a 100 nl. Incluso si en el último caso la muestra se seca, el inventor ha demostrado que el nuevo método es todavía eficaz. En la realización en particular de análisis de una sola célula, el volumen final no supera preferentemente los 25 μ l.

10 El recipiente de reacción puede ser cualquier tipo de recipiente de reacción, en el que se puede realizar una reacción de amplificación. Por lo tanto, la única limitación esencial es que el recipiente tenga suficiente resistencia al calor, dato que durante el protocolo de termociclado llegará a estar expuesto de forma repetida a temperaturas elevadas de 90 °C o superiores.

15 En una realización, el recipiente de reacción es un pocillo de una placa de microtitulación que está adaptado o diseñado para su colocación en un instrumento termociclador. Esto permite la ejecución del método de la presente invención en un número de muestras de una manera altamente paralela. Las placas de microtitulación que comprenden 96, 384, y 1536 pocillos se conocen en la técnica y están disponibles en el mercado en una multitud de proveedores diferentes. Las placas de microtitulación disponibles en la técnica permiten volúmenes de reacción de al menos 2 μ l. Tales placas de microtitulación se pueden someter a temperatura elevada de al menos 90 °C mediante su colocación en un bloque de calentamiento apropiado, o, como alternativa, directamente en un instrumento Termociclador de PCR que está diseñado para incorporar placas de microtitulación.

20 En una segunda realización, el recipiente de reacción puede ser un solo tubo de reacción o un tubo de reacción que es una parte de una tira de tubos de reacción que están conectados entre sí de modo que se pueden colocar en conjunto en el bloque de calentamiento de un instrumento termociclador. En una realización más, el recipiente de reacción es un capilar específico que se puede colocar en un instrumento de capilaridad LightCycler (Cat. Nº 023 531 414 001 de Roche Applied Science).

Etapa b)

25 En el contexto de la presente invención, la expresión "tampón de reacción de RT-PCR en 1 etapa" que se añade a la etapa b) de la presente invención se entiende como cualquier líquido en el que la muestra se somete posteriormente a una reacción de RT-PCR sin ninguna etapa de purificación intermedia. El segundo volumen mencionado del tampón de reacción añadido debería ser al menos dos veces (2 x) el mismo volumen y preferentemente 5 veces (5x) tan grande como el primer volumen. Esto permitirá la amplificación eficaz del ácido nucleico diana durante la reacción posterior de RT-PCR en 1 etapa.

30 El "tampón de reacción de RT-PCR en 1 etapa" comprende al menos una ADN polimerasa termoestable que comprende tanto actividad transcriptasa inversa como de ADN polimerasa dependiente de ADN, y una mezcla de desoxinucleósido-trifosfatos (dNTP). En una realización, el "tampón de reacción de RT-PCR en 1 etapa" ya contiene compuestos que se necesitan adicionalmente para la realización de una reacción de PCR. Por lo tanto, dicho "tampón de reacción de RT de 1 etapa" puede comprender adicionalmente al menos una pareja apropiada de cebadores de amplificación. El "tampón de reacción de RT-PCR de 1 etapa" también que de comprender un compuesto de taponamiento del pH apropiado (por ejemplo, Tris), una sal de Mg^{2+} , una sal de Mn^{2+} , un componente de inicio en caliente y similares.

35 En una realización específica, el "tampón de reacción de RT-PCR en 1 etapa" ya puede comprender compuestos que son necesarios para el control de la amplificación del ADN diana en tiempo real. En particular, estos compuestos son sondas de hibridación fluorescentes o un colorante de unión a ADN bicatenario. La especificidad de diversos formatos posibles de detección se analizará a continuación.

40 Como alternativa, también está dentro del alcance de la invención, si lo hubiera, todos y cada uno de los componentes que se han mencionado anteriormente o cualquier otro compuesto adicional se añaden posteriormente a la etapa de lisis c) pero antes de la realización de la reacción de amplificación real de acuerdo con la etapa d).

Etapa c)

45 De acuerdo con la presente invención, la lisis de las células se produce dentro del tampón de reacción de RT-PCR en 1 etapa, sin ninguna adición anterior de un reactivo específico de etapa de lisis usado convencionalmente en la técnica. En su lugar, la lisis de la una o más células vivas se produce mediante incubación de la muestra durante un periodo de al menos 20 segundos a al menos 90 °C. Normalmente, un periodo inferior a 1 min de incubación a temperatura elevada es suficiente para una lisis completa de un número moderado que células (no superior a 64 células) que permite la amplificación y detección posterior de transcriptos expresados con baja abundancia. Sin

embargo, también está dentro del alcance de la presente invención, si dicho periodo se prolonga hasta un periodo de 30 pero preferentemente no superior a 15 minutos.

La temperatura usada para lisis celular no debería superar 100 °C y preferentemente debería ser de 95 °C o inferior porque a temperaturas elevada se existe un aumento del riesgo de destrucción de los componentes contenidos en el tampón de reacción que son necesarios para la reacción posterior de PCR. Por ejemplo incluso las ADN polimerasas termoestables tales como Taq ADN polimerasa se están desnaturalizando o degradando básicamente temperaturas superiores a 100 °C.

Etapa d)

Tal como se pone en evidencia con los ejemplos, se puede realizar una reacción de RT-PCR en 1 etapa usando el lisado directamente sin etapa de purificación intermedia. Dependiendo de la realización, sin embargo está dentro del alcance de la presente invención, si se añaden compuestos adicionales necesarios para dicha reacción a la muestra posterior a la lisis.

Dado que la presente invención se puede aplicar para análisis de ácidos nucleicos que se originan a partir de solamente muy pocas células o incluso células individuales, es ventajoso para el diseño del experimento de acuerdo con la presente invención, si se tiene en consideración la relación entre el número de células analizadas y el volumen en el que se produce la reacción de RT-PCR real de acuerdo con la etapa d). Por otro lado, la reacción se debería realizar en un volumen mínimo con el fin de conseguir un grado óptimo de sensibilidad si se tuviera que analizar una cantidad tan baja de material de partida. Por lo tanto, se ha demostrado que es ventajoso, si la relación del número de dichas células de la etapa a) frente al volumen de líquido en el que se realiza la reacción en cadena de la polimerasa de la etapa d) es de al menos 1 célula/20 µl de volumen de reacción.

Dado que no existe etapa de purificación intermedia, la muestra lisada contendrá residuo celular que puede interferir con la eficacia de la reacción de PCR. En este contexto, se ha demostrado que es ventajoso, si la relación del número de dichas células vivas o equivalentes celulares de la etapa a) frente al volumen de líquido en el que se realiza la reacción en cadena de la polimerasa de la etapa d) no es superior a 2 células/µl. incluso es más ventajosa una relación entre 1 célula/ 25 µl y 2 células/µl. Tal como se ha determinado experimentalmente, una relación dentro de este intervalo permite un análisis de una sola copia en ADN que se origina a partir de solamente 1 célula individual así como un número de células mucho más elevado.

Los compuestos usados para reacción de RT-PCR en 1 etapa pueden ser compuestos convencionales usados en la técnica: La preparación de la reacción reactiva comprende el ARN diana, dNTP, una ADN Polimerasa termoestable que también es capaz de realizar RT PCR en 1 etapa con el fin de usar el método de la invención para controlar la expresión genética, al menos una pareja de cebadores de amplificación.

De forma ventajosa, los cebadores se diseñan de una manera tal que el producto de amplificación generado es relativamente pequeño. Los productos de amplificación con un tamaño de hasta 1 kb se han generado de forma cuantitativa con el método de acuerdo con la presente invención, pero son altamente preferentes tamaños de amplicón inferiores a 300 bp o incluso inferiores a 120 bp.

También de forma ventajosa, los cebadores se diseñan de manera tal que abarcan una secuencia de intrón, es decir una parte de un cebador respectivo se dirige frente a un primer exón y la otra parte de dicho cebador se dirige frente a un segundo exón consecutivo. Tal diseño permite crear de forma específica producto de amplificación derivado del ARN en la muestra y ex piloto sirio de generar productos de amplificación que se pueden original a partir del respectivo fragmento de ADN genómico.

La parte de transcripción inversa de la RT PCR en 1 etapa no requiere una programación separada dentro de un instrumento termociclador. En su lugar, la etapa de transcripción inversa se produce durante las etapas iniciales de aumento, hibridación y elongación del protocolo de termociclado. Esto está de acuerdo con las observaciones que se desvelan en el documento de patente EP 1 978 109.

Sin embargo, para volúmenes de muestra pequeños de 2 µl o inferiores, los inventores han observado de forma sorprendente, que la detección de la expresión es incluso más sensible, en el caso de una etapa de incubación previa antes de la etapa de lisis térmica real a una temperatura que está alrededor de la óptima para una reacción de transcriptasa inversa. Por lo tanto, dicha muestra tiene un volumen inferior a 2 µl y entre la etapa b) y c) dicha muestra se incubaba a una temperatura entre 37 °C y 65 °C de 30 segundos a 5 min. probablemente, tal efecto positivo se debe al pequeño volumen de muestra inferior a 2 µl, que da como resultado un secado inmediato y posterior destrucción de las membranas de las pocas células clasificadas. Como consecuencia, el ADN celular puede quedar disponible para la reacción de transcripción inversa.

El análisis del ADN amplificado se puede conseguir posteriormente normalmente por medio de Electroforesis en Gel. Sin embargo, en una realización más importante, la reacción de RT-PCR puede ser una reacción de PCR en tiempo

real, en la que la evolución de la amplificación se controla continuamente usando, por ejemplo cualquiera de los siguientes formatos de detección:

- Formato de sonda de Hidrólisis de TaqMan:

Una Sonda de Hibridación monacatenaria se marca con dos componentes. Cuando el primer componente se excita con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere al segundo componente, el denominado inactivador, de acuerdo con el principio de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación se une al ADN diana y se degrada mediante la actividad de exonucleasa en las posiciones 5'-3' de la Taq Polimerasa durante la fase de elongación posterior. Como resultado, el componente fluorescente excitado y el inactivador se separan espacialmente entre sí y por lo tanto se puede medir una emisión de fluorescencia del primer componente. Ensayos de sonda de TaqMan se desvelan con detalle en la Patente de Estados Unidos Nº 5.210.015, Patente de Estados Unidos Nº 5.538.848, y en la Patente de Estados Unidos Nº 5.487.972. Sondass de hibridación de TaqMan y mezclas de compuestos se desvelan en la Patente de Estados Unidos Nº 5.804.375.

En una realización específica, las sondas de hibridación de Taqman son sondas de UPL de la Biblioteca Universal de Sondass que está disponible en Roche Applied Sciences (Cat. 2010/2011, p. 577).

- Balizas Moleculares:

Estas sondas de creación también se marcan con un primer componente y con un inactivador, estando colocadas las marcas preferentemente en ambos extremos de la sonda. Como resultado de la estructura secundaria de la sonda, ambos componentes están en vecindad espacial en solución. Después de hibridación a los ácidos nucleicos diana, ambos componentes se separan entre sí de modo que después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se puede medir la emisión de fluorescencia del primer componente (Patente de Estados Unidos Nº 5.118.801).

- Sondass de hibridación de FRET:

El formato de ensayo de Sonda de Hibridación de FRET es especialmente útil para todos los tipos de ensayos de hibridación homogénea (Matthews, J.A., y Kricka, L.J., *Analytical Biochemistry* 169 (1988) 1-25). Se caracteriza por dos sondass de hibridación monacatenarias que se usan simultáneamente y son complementarias a sitios adyacentes de la misma hebra del ácido nucleico diana amplificado. Ambas sondass se marcan con diferentes componentes fluorescentes. Cuando se excita con luz de una longitud de onda adecuada, un primer componente transfiere la energía absorbida al segundo componente de acuerdo con el principio de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia de modo que se puede medir una emisión de fluorescencia del segundo componente cuando ambas sondass de hibridación se unen a posiciones adyacentes de la molécula diana a detectar. Como alternativa al control del aumento de fluorescencia en el componente aceptor de FRET, también es posible controlar la disminución de fluorescencia del componente dador de FRET como una medida cuantitativa del suceso de hibridación.

En particular, el formato de Sonda de Hibridación de FRET se puede usar en PCR en tiempo real, para detectar el ADN diana amplificado. Entre todos los formatos de detección conocidos en la técnica de PCR en tiempo real, el formato de Sonda de Hibridación de FRET ha demostrado que es altamente sensible, exacto y fiable (documento de patente WO 97/46707; documento de patente WO 97/46712; documento de patente WO 97/46714). Como una alternativa al uso de dos sondass de hibridación de FRET, también es posible usar un cebador marcado con fluorescencia y solamente una sonda de oligonucleótido marcada (Bernard, P.S., *et al.*, *Analytical Biochemistry* 255 (1998) 101-107). A este respecto, se puede elegir de forma arbitraria, si el cebador está marcado con el compuesto dador de FRET o aceptor de FRET.

- Formato de colorante de unión a ADN Bicatenario:

También está dentro del alcance de la invención, si se realiza PCR en tiempo real en presencia de un aditivo de acuerdo con la invención en caso de que el producto de amplificación se detecte usando un resto de unión ácido nucleico bicatenario. Por ejemplo, el producto de amplificación respectivo también se puede detectar de acuerdo con la invención mediante un colorante de unión a ADN fluorescente que emite una señal de fluorescencia correspondiente después de la interacción con el ácido nucleico bicatenario después de excitación con luz de una longitud de onda adecuada. Los colorantes SybrGreen1 y SybrGold (Molecular Probes) se usa frecuentemente en la técnica. Otro colorante particularmente útil es el colorante de 480 Resolight LightCycler (Nº de Cat.: 04 909 640 001 de Roche Applied Science).

PCR de inicio en caliente

La preparación de la reacción de PCR puede contener algunos compuestos que están proporcionando un efecto de inyección caliente, es decir la inhibición de hibridación de cebador inespecífico y posterior elongación a temperatura ambiente, que en ocasiones da como resultado productos de amplificación inespecíficos tales como formación de

dímero de cebador. Después del aumento de temperatura, esta inhibición se consigue eliminar debido a la liberación del compuesto de inicio en caliente a partir de cualquier asociado de unión con la consecuencia de que la ADN Polimerasa termoestable se va convirtiendo en térmicamente activa y se puede producir extensión de cebador catalizado por polimerasa específica. En la técnica se conoce muchos ejemplos para tales compuestos. Un ejemplo específico se proporciona en la Patente de Estados Unidos N° 5.338.671, que desvela un anticuerpo de Polimerasa como un compuesto de inicio en caliente. Ejemplos más recientes para tales compuestos de inicio en caliente se desvelan en el documento de patente EP 1 989 324 A y en el documento de patente EP 2 163 556.

Dichos compuestos inició en caliente SE pueden añadir a la muestra después de la lisis junto con la polimerasa y cualquier otro compuesto de RT-PCR antes de la etapa d). Preferentemente, sin embargo, dichos compuestos de inicio en caliente ya están incluidos en el "tampón de reacción de RT-PCR en 1 etapa" que se está añadiendo durante la etapa b). Como consecuencia, la activación térmica de la ADN polimerasa termoestable ya se puede conseguir a través de la incubación a al menos 90 °C durante la etapa c).

En una realización en particular, la ADN polimerasa se inactiva de forma reversible como resultado de una modificación química. De forma más precisa, en la polimerasa se introducen grupos de bloqueo lábiles en caliente que hacen que la enzima sea inactiva a temperatura ambiente (Patente de Estados Unidos N° 5.773.258). Estos grupos de bloqueo se retiran a temperatura elevada durante una etapa de pre-PCR de modo que la enzima se está llegando a activar. Por ejemplo, tal modificación lábil en caliente se puede obtener por acoplamiento de Anhídrido Citracónico o Anhídrido Aconítrico a los restos de Lisina de la enzima (Patente de Estados Unidos N° 5.677.152).

En una realización preferente, la característica de inicio en caliente se consigue usando Tth ADN Polimerasa en combinación con Aptámeros. La Tth ADN Polimerasa es una enzima termoestable con actividad de transcriptasa inversa dependiente de ARN y actividad de polimerasa dependiente de ADN, lo que permite la combinación de transcripción inversa (RT) y PCR en una reacción en un solo tubo.

Los aptámeros son oligonucleótidos dedicados que se unen al centro activo de la polimerasa y evitan la unión a dianas de ácido nucleico a temperaturas inferiores a la temperatura óptima de la reacción de la enzima Tth. Por lo tanto, no se produce elongación del cebador durante la preparación de la reacción y la fase de calentamiento posterior antes de la etapa de RT. A temperaturas más elevadas, los Aptámeros se liberan de la enzima, y se puede iniciar la RT o polimerización de ADN. La temperatura de incubación recomendada para RT con la Tth ADN Polimerasa (+61 °C) puede superar la de las estructuras secundarias del ARN. Esto da como resultado una síntesis de ADNc altamente específica y eficaz, que conduce a PCR altamente específica y sensible.

El inicio en caliente con Aptámeros es altamente eficaz y muy conveniente porque no requiere etapas de incubación adicional, etapas de pipeteo, o una prolongación del tiempo de reacción. El protocolo de inicio en caliente con Aptámeros no interfiere con otros procesos enzimáticos, la detección en línea de productos de amplificación, o etapas de manipulación posteriores.

Placas de microtitulación que comprenden una composición seca de reactivos de PCR

Tal como se ha reservado anteriormente, se pueden usar placas de microtitulación para realizar un método de acuerdo con la presente invención. Si éste es el caso, cada recipiente o pocillo de reacción de la placa de microtitulación ya puede comprender en su superficie una composición seca de reactivos que posteriormente son necesarios para la PCR. La composición seca de la mezcla maestra se resuelve por medio de la adición del "tampón de reacción de RT-PCR en 1 etapa" en la etapa b). En el contexto de la presente invención, la expresión "composición seca" se usa para enfatizar que la cantidad disolvente, preferentemente de disolventes acuosos se reduce a una cantidad inferior a un 5 % en peso.

Por ejemplo, tal composición seca puede comprender o consistir solamente en al menos una pareja de cebadores de amplificación. En este caso, el "tampón de reacción de RT-PCR en 1 etapa" no incluye ningún cebador de amplificación. Cada pocillo de una placa de microtitulación puede comprender la misma pareja de cebadores de amplificación lo que permite de este modo un análisis en paralelo de múltiples muestras, o, básicamente cada pocillo puede comprender diferentes parejas de cebadores de amplificación, lo que permite de este modo un análisis de múltiples parámetros de una o solamente unas pocas muestras diferentes. Por supuesto, la disposición de la placa también se puede diseñar de acuerdo con una mezcla de los dos conceptos así como para análisis por duplicado, triplicado o cuadruplicado. Los métodos para producir composiciones secas de ácidos nucleicos tales como cebadores de amplificación para PCR son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, métodos de secado por congelación, liofilización o secado al vacío. El documento de patente WO 2008/36544 describe el uso de los denominados materiales de carga para proporcionar composiciones secas, y dichos materiales de carga son por ejemplo hidratos de carbono tales como FICOLL™, sacarosa, glucosa, trehalosa, melecitosa, DEXTRAN™ o manitol, proteínas tales como BSA, gelatina o colágeno y polímeros tales como PEG o polivinil pirrolidona (PVP). Se han desvelado la liofilización (Patente de Estados Unidos N° 5.593.824) o el secado al vacío (Patente de Estados Unidos N° 5.565.318) para el secado de los materiales secos en una matriz polimérica de hidrato de carbono.

Además, tales composiciones secas pueden comprender opcionalmente cualquiera de al menos una sonda de hibridación marcada o un compuesto fluorescente que se une a ADN bicatenario con el fin de permitir el control de PCR en tiempo real. Además, dicha composición seca puede comprender adicionalmente una ADN polimerasa termoestable y/o dNTP. En este caso, el "tampón de reacción de RT-PCR en 1 etapa" no incluye ningún reactivo que forme parte de la composición seca.

En la técnica también se desvelan varios métodos para producir composiciones secas que comprenden proteínas o enzimas. La liofilización o secado por congelación es una técnica bien establecida para el almacenamiento de proteínas que se desvela muchos documentos de vanguardia (por ejemplo, Passot, S., *et al.*, *Pharmaceutical Development and Technology* 12 (2007) 543-553; Carpenter, J.F., *et al.*, *Pharmaceutical Research* 14 (1997) 969-975; Schwegman, J.J., *et al.*, *Pharmaceutical Development and Technology* 10 (2005) 151-173). En particular, la Patente de Estados Unidos N° 7.407.747 desvela que una Taq polimerasa se puede secar en una mezcla que consiste en solución de tampón, nucleótidos, BSA y trehalosa. Además, la Patente de Estados Unidos N° 2010/0159529 desvela que la adición de un aptámero a la solución líquida aumentaba la estabilidad de la Taq polimerasa, en la que dicha estabilización era suficientemente buena no solamente para secar, sino también para almacenar la mezcla seca.

Tal como lo entenderá el experto en la materia, el método que se desvela incluye un número de variaciones. Por ejemplo, si la composición seca comprende solamente cebadores de amplificación, se puede añadir una mezcla maestra para RT-PCR en 1 etapa que comprende la ADN Polimerasa termoestable, dNTP y los demás compuestos de PCR necesarios para amplificación como "tampón de reacción de RT-PCR en 1 etapa" durante la etapa b. Opcionalmente cualquiera del "tampón de reacción de RT-PCR en 1 etapa" o la mezcla maestra para RT-PCR en 1 etapa puede comprender además un medio para controlar la amplificación en tiempo real tal como una sonda de hibridación marcada con fluorescencia, o, como alternativa un colorante de unión a ADN bicatenario fluorescente.

En otro ejemplo, la composición seca puede comprender todos los compuestos necesarios para la amplificación, es decir al menos una pareja de cebadores de amplificación, la ADN Polimerasa termoestable, dNTP y opcionalmente al menos una sonda de hibridación marcada con fluorescencia o colorante de unión a ADN bicatenario fluorescente. A continuación, el "tampón de reacción de RT-PCR en 1 etapa" de la etapa b) puede ser simplemente agua, o, si fuera necesario puede comprender compuestos auxiliares adicionales tales como un sistema de taponamiento del pH (por ejemplo, sal Tris), sal de Mg²⁺ y similares.

Kits

La presente divulgación también proporciona un nuevo tipo de kits para realizar análisis de PCR en tiempo real. Los kits comprenden un componente reactivo y un componente desechable, que en conjunto se pueden usar y se adaptan de forma específica para cualquiera de los métodos que se han desvelado anteriormente.

Por lo tanto, tal kit comprende una pluralidad de recipientes de reacción diseñados para que se ajusten en un instrumento termociclador, y un tampón de reacción de RT-PCR en una etapa que comprende una ADN polimerasa termoestable que comprende actividad de transcriptasa inversa y de ADN polimerasa dependiente de ADN o una mezcla de polimerasas que en conjunto proporcionan ambas actividades, y dNTP. Por lo tanto, tal kit proporciona al científico por primera vez una herramienta útil que contiene un conjunto completo de todos los reactivos y elementos desechables necesarios para análisis de expresión genética.

Ejemplos importantes de enzimas adecuadas son la Tth ADN polimerasa (N° de Cat.: 11 480 022 001 de Roche Applied Science) o el sistema de C. therm Polimerasa (N° de Cat.: 12 016 346 001 de Roche Applied Science). En una realización altamente preferente, una característica de inicio en caliente se pone en práctica mediante el uso de Tth ADN Polimerasa en combinación con Aptámeros. La Tth ADN polimerasa es una enzima termoestable con actividad de transcriptasa inversa dependiente de ADN y actividad de polimerasa dependiente de ADN, lo que permite la combinación de transcripción inversa (RT) y PCR en una reacción en un solo tubo. Preferentemente, dicha polimerasa termoestable dentro de dicho kit se puede activar de forma térmica por medio de incubación durante al menos 1 minuto a 90 °C.

Preferentemente, los recipientes de reacción están conectados físicamente entre sí en forma de una placa de microtitulación. La placa de microtitulación puede ser preferentemente una placa de microtitulación de 96, 384, o 1536 pocillos. Como alternativa, dichos recipientes de reacción están conectados físicamente entre sí en forma de una tira lineal de recipientes de reacción.

En una realización, dicho kit comprende adicionalmente al menos una pareja de cebadores de amplificación, y opcionalmente cualquiera de al menos una sonda de hibridación marcada o un compuesto fluorescente que se une a ADN bicatenario. Estos reactivos se almacenan dentro de recipientes separados y se pueden añadir al tampón de reacción de PCR antes del inicio del experimento.

En una realización alternativa, dichos recipientes de reacción dentro de dicho kit comprenden una composición seca de al menos una pareja de cebadores de amplificación por PCR y opcionalmente cualquiera de al menos una sonda de hibridación marcada o un compuesto fluorescente que se une a ADN bicatenario.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

qPCR para amplificación del gen GAPDH y del gen RPL13A a partir de células clasificadas de hibridoma de ratón

10 Un número definido de células de Hibridoma de Ratón se depositó en pocillos separados de una placa de microtitulación de 96 pocillos usando un Clasificador Celular (Beckton Dickinson, FACS Aria I) de una manera tal que el haz líquido siempre estaba orientado en el centro del pocillo. Debido a la tecnología subyacente del Clasificador Celular, sin embargo, no se pudo excluir más un porcentaje menor de las partículas clasificadas que no eran células enteras intactas sino residuos celulares. Por lo tanto, en lo sucesivo, el número de material clasificado se denomina equivalente celular.

15 Las células clasificadas tal como se desvela se distribuyeron en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Nº de Cat.: 04 729 692 001 de Roche Applied Science) diseñada para el instrumento de PCR en tiempo real LC480 (Roche Applied Science Nº de Cat.: 05 015 278 001) de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

20 1 equivalente celular/pocillo de la columna 1-4
 2 equivalentes celulares/pocillo en la columna 5-6
 4 equivalentes celulares/pocillo en la columna 7-8
 25 8 equivalentes celulares/pocillo en la columna 9
 16 equivalentes celulares/pocillo en la columna 10
 32 equivalentes celulares/pocillo en la columna 11
 64 equivalentes celulares/pocillo en la columna 12

30 A cada pocillo, se añadió una mezcla maestra que contenía

Cebador directo agcttgcatcaacgggaag 0,4 µM (SEC ID Nº: 1)
 Cebador inverso ttgatgtagtgggtctcg 0,4 µM (SEC ID Nº: 2)

35 Sonda de UPL 0,2 µM (Nº de Cat.: 04 685 075 001 de Roche Applied Science, Nº 9)
 Mezcla Maestra para Sonda LC480 1x (Nº de Cat.: 04 902 343 001 de Roche Applied Science)

40 El cebador directo e inverso se diseñaron para amplificar el gen GAPDH de ratón, que se sabe que está presente en el genoma de ratón con números de copias elevados.

En una placa separada, se añadió la misma mezcla maestra, pero cebadores y sonda se diseñaron para amplificar el gen RPL13A, que está presente solamente en 12 copias del genoma del ratón. Cebadores y sonda eran como sigue a continuación:

45 Cebador directo catgaggtcgggtggaagta 0,4 µM (SEC ID Nº: 3)
 Cebador inverso gcctgttccgtaacctca 0,4 µM (SEC ID Nº: 4)
 Sonda de UPL 0,2 µM (de Roche Applied Science Nº de Cat.: 04 686 993 001, Nº 25)

50 La Mezcla Maestra para Sonda de LightCycler comprender la ADN polimerasa FastStart termoestable, que es una enzima de inicio en caliente que está modificada químicamente. La activación se induce por medio de retirada de dicha modificación a través de incubación a temperatura elevada.

Se realizó qPCR en un instrumento LC480 para PCR en tiempo real de acuerdo con el siguiente protocolo de termociclado:

55

Incubación previa	1x	95 °C	10'
Desnaturalización	45x	95 °C	10"
Hibridación	45x	60 °C	30"
Elongación	45x	72 °C	1"
Tasas de aumento de enfriamiento	2,2 °C/s		
Tasas de aumento de calentamiento	4,4 °C/s		

La detección de las señales de amplificación y el cálculo de los valores de cp (valores de cp bajos que indican un nivel elevado de amplificación) se realizó de acuerdo con las instrucciones de los manuales del Fabricante.

5 La siguiente tabla desvela los valores medios de cp obtenidos para los diferentes números de células analizadas:

Número de células	Valor Medio de cp	
	GAPDH	RPL113A
1	33,00	36,10
2	31,40	34,00
4	31,28	33,92
8	29,38	33,35
16	29,02	31,67
32	28,46	31,37
64	28,29	30,99

10 Tal como se puede observar a partir de la tabla, las señales que se originan a partir del gen GAPDH de ratón de número de copias elevadas así como del gen de RPL113A, que está presente en 12 copias en el genoma de ratón, se pueden detectar incluso si solamente se usa 1 celular como material de partida.

Además, se puede observar que los valores de cp se correlacionan de forma inversa con el número de células/pocillo. Por lo tanto, se puede concluir evidentemente que la adición del tampón de reacción de PCR y la incubación posterior durante 10' a 95 °C era evidentemente suficiente para lisar las células de una manera cuantitativa.

15 Ejemplo 2

qPCR a la amplificación del gen Kcnj2 a partir de células clasificadas de hibridoma de ratón

20 El experimento se realizó básicamente tal como se desvela para el ejemplo 1 con la diferencia de que cebadores y sonda se diseñaron para amplificar la única copia del gen Kcnj2 de ratón. Cebadores y sonda eran como sigue a continuación:

- 25 Cebador directo ctgtcttgcccttgctct (SEC ID N°: 5)
- Cebador inverso agcagggtatcaacaaaa (SEC ID N°: 6)
- Sonda de UPL (N° de Cat.: 04 688 996 001 de Roche Applied Science, N° 76)

La tabla desvela los valores medios de cp obtenidos para los diferentes números de células analizadas:

Número de células	Valor medio de cp
1	38,31
2	36,64
4	36,26
8	36,10
16	33,93
32	32,88
64	34,03

30 Tal como se puede observar a partir de la tabla, se pueden obtener señales de amplificación que se originan a partir del gen Kcnj2 de ratón de un solo número de copias, incluso si se usa solamente una célula como material de partida. En otras palabras, la presente invención proporciona una solución para amplificación de genes de una sola copia a partir de muestras de una sola célula.

35 Además, se puede observar que el valor de cp aumenta, si la muestra se origina a partir de un número de células más elevado tal como 64 células. Esto se puede explicar con el hecho de que debido a la lisis dentro del tampón de reacción de PCR a 95 °C, la concentración de residuo celular dentro del volumen de reacción dado aumenta y por lo

tanto puede inhibir la eficacia de la amplificación de la reacción de PCR. Se puede concluir que la presente invención es especialmente aplicable para PCR en muestras que se originan a partir de números de células más bajos.

Además, la siguiente tabla desvela los valores de cp obtenidos a partir de muestras individuales de una sola célula:

5

40,00	36,96	36,71	35,92	-	40,00	-	-
37,71	40,00	-	40,00	39,56	37,19	37,22	38,50

Tal como se puede deducir a partir de la tabla, no se obtuvieron señales de amplificación en aproximadamente 4 de 16 reacciones en paralelo. Teniendo en cuenta los resultados del ejemplo 2, que demuestra que no cada resultado de suceso de clasificación individual en la separación y administración reales de una sola célula en un recipiente de reacción, este resultado se puede explicar. En otras palabras, el hecho de que en algunos casos no se observe señal de amplificación se debe al hecho de que los pocillos individuales no contenían una célula, pero no se debe al hecho de que el procedimiento de lisis y amplificación en sí mismos tenga una determinada tasa de fallo.

10

Ejemplo 3

15

qPCR para amplificación del gen Kcnj2 a partir de células clasificadas de hibridoma de ratón usando placas de microtitulación que contienen reactivos secos

El experimento se realizó básicamente tal como se desvela para el ejemplo 2 con los siguientes cambios:

20

se cargaron 10 µl de una solución que contenía los cebadores y sonda necesarios en cada tufillo de una placa de microtitulación. La placa de microtitulación se incubó durante 12 h a 25 °C y 20 kPa, y posteriormente durante 4 h a 25 °C y 5 kPa, de modo que los cebadores y sondas se secaron en la superficie de cada pocillo de reacción de la placa de microtitulación.

25

Posteriormente, la deposición de células se realizó como sigue a continuación:

- 1 equivalente celular/pocillo de la columna 1-6
- 2 equivalentes celulares/pocillo en la columna 7
- 4 equivalentes celulares/pocillo en la columna 8
- 8 equivalentes celulares/pocillo en la columna 9
- 16 equivalentes celulares/pocillo en la columna 10
- 32 equivalentes celulares/pocillo en la columna 11
- 64 equivalentes celulares/pocillo en la columna 12

35

Después de la adición de 20 µl de mezcla maestra, se realizó el análisis de PCR en tiempo real. La tabla desvela los valores medios de cp obtenidos para los diferentes números de células analizados:

Número de células	Valor medio de cp
1	38,14
2	37,45
4	36,22
8	35,14
16	34,89
32	33,76
64	33,27

40

También es importante indicar que a partir de los 48 pocillos usados para análisis de una sola célula, solamente 10 reacciones de amplificación fueron negativas. Estas reacciones no se incluyeron en el cálculo del valor medio de cp.

Ejemplo 4

45

qPCR para amplificación del gen Kcnj2 a partir de células individuales de hibridoma de ratón usando placas de microtitulación que contienen reactivos secos

Con el fin de analizar qué porcentaje de equivalente celular corresponde realmente a una célula viva en lugar de residuo celular, se depositaron 3 x 30 equivalentes clasificados cada uno en un portaobjetos de microscopio y se

hizo recuento. Se pudieron identificar 28, 28 y 29 células, respectivamente por inspección visual a través de un microscopio. Esto corresponde con un 94 % de células vivas frente a un 6 % de residuo celular por el equivalente celular (suceso de clasificación).

- 5 En lo sucesivo, el experimento se realizó básicamente en dos placas de microtitulación tal como se desvela para el ejemplo 3 con la diferencia de que en ambas placas de microtitulación, cada pocillo de reacción solamente contenía un solo equivalente celular. Los resultados fueron los que siguen a continuación:

Placa N°	Número de pocillos <u>sin</u> amplificación detectable	Porcentaje de pocillos <u>con</u> amplificación detectable	Valor medio de cp de pocillos con amplificación detectable	Valor de desviación estándar de cp
1	16/96	84 %	38,85	1,14
2	5/96	95 %	38,31	1,01

- 10 Los resultados muestran que es posible realizar análisis de una sola célula de acuerdo con el método de PCR tal como se proporciona en la presente invención. Además, también si se pretende el análisis de una sola célula, los cebadores y sonda se secan en la superficie de la placa de microtitulación.

Ejemplo 5

- 15 RT-PCR en 1 etapa para detección de la expresión de ActB, y B2M y 1

Las células se clasificaron y se colocaron en una placa de microtitulación tal como se desvela en el ejemplo 1, dando como resultado un volumen de muestra inferior a 2 µl.

- 20 A cada pocillo, se añadió una sonda de Hidrólisis Maestra de ARN LC480 1x (N° de Cat.: 04 991 885 001 de Roche Applied Science, que contiene T.th polimerasa y un aptámero de inicio en caliente).

La mezcla maestra contenía además los siguientes cebadores y sondas:

- 25 Fila 1-2: RT-PCR en 1 etapa de ActB

Cebador directo AAGGCCAACCGTGAAAAGAT 0,4 µM (SEC ID N°: 7)
 Cebador inverso GTGGTACGACCCAGAGGCATAC 0,4 µM (SEC ID N°: 8)
 Sonda de UPL 0,2 µM (N° de Cat.: 56 de Roche Applied Science)

- 30

- Fila 3-4: RT-PCR en 1 etapa de B2M

Cebador directo TACGCCTGCAGAGTTAAGCA 0,4 µM (SEC ID N°: 9)
 Cebador inverso GGTTCAAATGAATCTTCAGAGCA 0,4 µM (SEC ID N°: 10)
 Sonda de UPL 0,2 µM (N° de Cat.: 117 de Roche Applied Science)

- 35

- Fila 5-6: RT-PCR en 1 etapa de ARN de 18s

Cebador directo GCCGCTAGAGGTGAAATTCTT 0,4 µM (SEC ID N°: 11)
 Cebador inverso CGTCTTCGAACCTCCGACT 0,4 µM (SEC ID N°: 12)
 Sonda de UPL 0,2 µM (N° de Cat.: 93 de Roche Applied Science)

- 40

45 En una primera placa, se realizó RT-PCR en 1 etapa en un instrumento de PCR en tiempo real LC480 de acuerdo con el siguiente protocolo de termociclado:

Incubación previa	1x	95 °C	30"
Desnaturalización	45x	95 °C	10"
Hibridación	45x	60 °C	30"
Elongación	45x	72 °C	1"
Tasas de aumento de enfriamiento	2,2 °C/s		
Tasas de aumento de calentamiento	4,4 °C/s		

ES 2 533 732 T3

En una segunda placa, se realizó RT-PCR en 1 etapa en un instrumento de PCR en tiempo real LC480 de acuerdo con un protocolo de termociclado que incluye una etapa de incubación previa adicional a 61 °C.

Incubación previa	1x	61 °C	3'
Incubación previa	1x	95 °C	30"
Desnaturalización	45x	95 °C	10"
Hibridación	45x	60 °C	30"
Elongación	45x	72 °C	1"
Tasas de aumento de enfriamiento	2,2 °C/s		
Tasas de aumento de calentamiento	4,4 °C/s		

- 5 La detección de las señales de amplificación y cálculo de los valores de cp (valores de cp bajos que indican un nivel elevado de amplificación) se realizó de acuerdo con las instrucciones de los manuales del Fabricante.

- 10 Con el fin de demostrar que los valores de cp medidos reflejan realmente la detección de la expresión del ARNm en lugar de la del ADN, el tamaño correcto de los amplicones se confirmó posteriormente mediante electroforesis en gel. La siguiente tabla desvela los valores medios de cp obtenidos para los diferentes números de células analizados.

Diana/ Número de células	Sin incubación previa a 61 °C		Con incubación previa a 61 °C	
	Cp Medio	Cp STD	Cp Medio	Cp STD
Actb/1	32,06	0,60	30,55	0,35
Actb/2	31,60	1,12	29,12	0,50
Actb/4	31,15	0,71	28,71	0,47
Actb/8	29,92	0,11	27,78	0,07
Actb/16	29,13	0,30	27,05	0,39
Actb/32	28,24	0,22	25,98	0,23
Actb/64	26,47	0,13	24,11	0,01
B2M/1	36,04	0,38	31,64	0,00
B2M/2	36,13	0,43	30,99	0,06
B2M/4	35,54	0,24	30,88	0,22
B2M/8	34,64	0,48	30,69	0,25
B2M/16	34,52	0,01	30,21	0,13
B2M/32	34,19	0,13	30,15	0,08
B2M/64	34,59	0,07	30,13	0,10
18s/1	27,90	0,55	24,43	1,36
18s/2	27,27	0,32	23,59	0,74
18s/4	26,81	0,44	22,43	0,57
18s/8	25,74	0,19	22,49	0,21
18s/16	25,21	0,49	21,62	0,16
18s/32	24,66	0,18	20,78	0,25
18s/64	23,44	0,06	19,38	0,03

- 15 Tal como se puede observar a partir de la tabla, la expresión de los genes sometidos a ensayos se puede detectar en materia que se origina a partir de solamente una célula como un material de partida. Se puede observar que los valores de cp se correlacionan de forma inversa con el número de células/por pocillo. La etapa de transcripción inversa se produce durante las etapas iniciales de aumento, hibridación y elongación del protocolo de termociclado.

Tal como se puede deducir adicionalmente a partir de la tabla, de forma sorprendente la detección de la expresión es incluso más sensible, en el caso de una etapa de incubación previa durante 3 minutos a 61 °C antes de la lisis real a 95 °C. Probablemente tal efecto positivo se debe al pequeño volumen de muestra inferior a 2 µl, que da como resultado un secado inmediato y destrucción de las pocas células clasificadas, de modo que el ARN celular queda disponible para la reacción de transcripción inversa.

Ejemplo 6

Comparación entre PCR y RT-PCR en 1 etapa de ADN en la diana 18s

Las células se clasificaron y se colocaron en una placa de microtitulación tal como se esperan en ejemplo 1 de acuerdo con el siguiente esquema de pipeteo:

Para 3 lacas idénticas N° 1-3, se añadieron sondas de Hidrólisis Maestra de ARN LC480 1x (N° de Cat. 04 991 885 001 de Roche Applied Science, que contenían T.th polimerasa y un aptámero de inicio en caliente) con el fin de amplificar un ARN con una reacción de RT PCR en una etapa. Se diseñaron cebadores de una manera tal que durante esta reacción, tanto el ARN como su fragmento de ADN genómico correspondiente se podían amplificar. Para una cuarta placa N° 4, se usó una mezcla maestra para sondas de ADN lista en Tiempo Real (d N° de Cat.: 05 502 381 001e Roche Applied Science) que comprendía una ADN Polimerasa dependientes de ADN termoestable sin ninguna actividad de transcriptasa inversa.

Además las 4 preparaciones contenían los siguientes cebadores y son más adecuados para amplificación de ARN y ADN de 18s

- Cebador directo GCCGCTAGAGGTGAAATTCTT 0,4 µM (SEC ID N°: 11)
- Cebador inverso CGTCTTCGAACCTCCGACT 0,4 µM (SEC ID N°: 12)
- Sonda de UPL 0,2 µM (N° de Cat.: 93 de Roche Applied Science)

Para la Placa 1, se realizó RT-PCR en 1 etapa con una etapa de incubación previa a 61 °C en un instrumento de PCR en tiempo real LC480 de acuerdo con el siguiente protocolo de termociclado:

Incubación previa	1x	95 °C	1'
Incubación previa:	1x	61 °C	3'
Incubación previa	1x	95 °C	30"
Desnaturalización	45x	95 °C	10"
Hibridación	45x	60 °C	30"
Elongación	45x	72 °C	1"
Tasas de aumento de enfriamiento	2,2 °C/s		
Tasas de aumento de calentamiento	4,4 °C/s		

Para la placa 2 y 3, se realizó RT-PCR sin ninguna ovación previa a 61 °C:

Incubación previa	1x	95 °C	30" (placa 2) o 2' (placa 3)
Desnaturalización	45x	95 °C	10"
Hibridación	45x	60 °C	30"
Elongación	45x	72 °C	1"
Tasas de aumento de enfriamiento	2,2 °C/s		
Tasas de aumento de calentamiento	4,4 °C/s		

Para la placa 4 se usó en el mismo protocolo que para la placa 3 con el fin de realizar una PCR sin ninguna actividad de transcripción inversa.

La detección de las señales de amplificación y cálculo de los valores de cp (valores de cp bajos que indican un nivel elevado de amplificación) se realizó de acuerdo con las instrucciones de los manuales del Fabricante.

Con el fin de demostrar que los valores de cp medidos reflejan realmente la detección de la expresión del ARNm en lugar de la del ADN, el tamaño correcto de los amplicones se confirmó posteriormente mediante electroforesis en

ES 2 533 732 T3

gel. La siguiente tabla desvela los valores medios de cp obtenidos para los diferentes números de células analizados.

Nº de células	Placa 1 RT-PCR		Placa 2 RT-PCR sin etapa de RT Con 30" de incubación previa		Placa 3 RT-PCR sin etapa de RT Con 2' de incubación previa		Placa 4 PCR	
	Cp Medio	Cp STD	Cp Medio	Cp STD	Cp Medio	Cp STD	Cp Medio	Cp STD
1	25,24	1,11	27,90	0,55	29,13	0,70	34,18	0,68
2	23,97	0,54	27,27	0,32	28,48	0,47	32,99	0,41
4	23,74	0,86	26,81	0,44	27,67	0,17	31,98	0,38
8	22,48	0,14	25,74	0,19	26,95	0,21	30,93	0,23
16	21,82	0,14	25,21	0,49	25,63	0,15	29,05	0,36
32	19,92	0,12	24,66	0,18	25,18	0,26	28,16	0,04
64	18,89	0,01	23,44	0,06	23,87	0,05	27,60	0,33

5 Tal como se puede observar a partir de la tabla, los resultados a partir de la RT-PCR proporcionan valores de cp más bajos en comparación con los resultados de las reacciones de PCR correspondientes. Esto es indicativo de una concentración de partida más elevada de ácido nucleico diana, que de acuerdo con las condiciones como resultados elegidos para amplificación tanto del ARN respectivo como de su secuencia genética correspondiente dentro de la preparación para RT-PCR.

10 Cuando se comparan los resultados de RT-PCR con 3 minutos a 61 °C y sin incubación previa a 61 °C, es evidente que no es necesaria una incubación previa pero da como resultado un aumento de la sensibilidad de la detección del ARN. Tal como se desvelan el ejemplo 5 el último efecto observado se puede deber para muestra de volumen pequeña inferior a 2 µl, que da como resultado un secado inmediato y destrucción de las pocas células clasificadas, de modo que el ARN celular queda disponible para la reacción de transcripción inversa.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Método para lisis celular en un tampón de reacción de RT-PCR

<130> 30629 WO

25 <150> EP 10186417.1
<151> 04-10-2010

<150> EP 10186416.3
<151> 04-10-2010

30 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador directo

<400> 1
agcttgcat caacggaag 20

45 <210> 2
<211> 21
<212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> cebador inverso	
	<400> 2	
	tttgatgta gtgggtctc g	21
10	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador directo	
	<400> 3	
	catgaggtcg ggtgaagta	20
20	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador inverso	
	<400> 4	
30	gcctgttcc gtaacctcaa	20
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo	
40	<400> 5	
	ctgtctgcc ttcgtgctct	20
	<210> 6	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso	
50	<400> 6	
	agcagggcta tcaacaaaa	20
	<210> 7	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> cebador directo	
	<400> 7	
	aaggccaacc gtgaaaagat	20
65	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> cebador inverso	
	<400> 8	
	gtggtacgac cagaggcata c	21
10	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador directo	
	<400> 9	
	tacgcctgca gagttaagca	20
20	<210> 10	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador inverso	
	<400> 10	
30	ggtcaaatg aatcttcaga gca	23
	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo	
	<400> 11	
40	gccgctagag gtgaaattct t	21
	<210> 12	
	<211> 19	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso	
50	<400> 12	
	cgctctcgaa cctccgact	19

REIVINDICACIONES

1. Método para amplificación de un ácido nucleico diana de ARN, que comprende las etapas de
- 5 a) transferir una muestra de líquido con un primer volumen inferior a 2 µl que comprende una o más células eucariotas vivas en un recipiente,
b) añadir a dicho recipiente un tampón de reacción de RT-PCR en una etapa que comprende una ADN polimerasa termoestable capaz de realizar una RT-PCR en una etapa, y dNTP, con un segundo volumen, mientras que dicho segundo volumen es al menos 2x tan grande como dicho primer volumen,
10 b') incubar dicha muestra a una temperatura entre 37 °C y 65 °C de 30 segundos a 5 min.
c) calentar dicho recipiente durante al menos 20 segundos a al menos 90 °C,
d) amplificar dicha diana en dicho recipiente por medio de una reacción en cadena de la polimerasa con una ADN polimerasa termoestable capaz de realizar una RT-PCR en una etapa sin realización de una etapa de purificación intermedia,
- 15 en el que la relación del número de dichas células vivas de la etapa a) frente al volumen de líquido en el que la reacción en cadena de la polimerasa de la etapa d) no es superior a 2 células/µl, dicha relación es de al menos 1 célula/25 µl.
- 20 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que dicho tampón de reacción de RT-PCR de la etapa b) comprende además al menos una pareja de cebadores de amplificación y opcionalmente cualquiera de al menos una sonda de hibridación marcada o un compuesto fluorescente que se une a ADN bicatenario.
- 25 3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que dicho recipiente comprende una composición seca de al menos una pareja de cebadores de amplificación por PCR y opcionalmente cualquiera de al menos una sonda de hibridación marcada o un compuesto fluorescente que se une a ADN bicatenario.
4. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, caracterizado por que la actividad de dicha ADN polimerasa termoestable se activa térmicamente durante la etapa c).
- 30 5. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en el que dicha polimerasa es la Tth Polimerasa.
6. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, caracterizado por que antes de la etapa a) dicho líquido que comprende al menos una o más células vivas se ha obtenido con un método de clasificación de células.