(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 539 856**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2009 E 09802454 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2015 EP 2310527**

(54) Título: **Lisis mejorada y transcripción reversa para la cuantificación de mRNA**

(30) Prioridad:

01.08.2008 EP 08013816

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2015

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)
124 Grenzacherstrasse
4070 Basel, CH y
TATAA BIOCENTER AB (50.0%)

(72) Inventor/es:

KUBISTA, MICHAEL;
STROEMBOM, LINDA y
ZORIC, NEVEN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 539 856 T3

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

DESCRIPCIÓN

Lisis mejorada y transcripción reversa para la cuantificación de mRNA

Campo técnico

La presente invención proporciona un nuevo método para la monitorización de la expresión génica por medio de la realización de RT-PCR. Más precisamente, la presente invención describe una posibilidad para lisar las células adherentes en el vial en el que se han cultivado y, posteriormente, transcribir de forma reversa el RNA contenido en el lisado en cDNA monocatenario en el mismo vial.

Antecedentes de la técnica

Las células en una población son, en muchos aspectos únicas en sus características, incluso en un cultivo o tejido aparentemente homogéneo. Los niveles de expresión génica muestran grandes variaciones entre células, debido a fuentes de factores externos (extrínsecos) e internos (intrínsecos). Del mismo modo, cuando se expone a estímulos idénticos, las células a menudo se comportan estocásticamente. Esto significa que los datos obtenidos a partir de una población de células no pueden ser asumidas para reflejar el comportamiento de la célula individual. Se ha sugerido que las células pueden responder a los estímulos por ráfagas en la actividad transcripcional y operar como un interruptor binario; es decir de una manera totalmente de todo o nada.

Por lo general, la expresión génica en el nivel de RNA se controla de forma rutinaria mediante un procedimiento de múltiples pasos. En primer lugar, la correspondiente muestra celular se retira del recipiente de cultivo. En el caso de haber células adherentes la recogida se pueden realizar con la ayuda de tripsina (tratamiento con una solución de tripsina-EDTA) con el fin de separar la células adherentes del soporte sólido. En segundo lugar, las células recogidas se sedimentan y se someten a lisis celular. El tercer paso se requiere generalmente para purificar al menos parcialmente el RNA o mRNA que está presente en la muestra (PE 0 389 063). Después, un paso de síntesis de la primera cadena de cDNA se realiza con una DNA polimerasa dependiente de RNA tal como la transcriptasa inversa AMV (Roche Applied Science Nº de Cat.: 11 495 062) o MMuLV (Roche 11 062 603).

Posteriormente, la cantidad de cDNA generado se cuantifica ya sea por medio de PCR cuantitativa (Sagner, G., y Goldstein, C., Biochemica 3 (2001) 15-17) o, alternativamente, por medio de la amplificación y posterior hibridación ción en un microarray de DNA (Kawasaki, ES, Ann. NY Acad. Sci. 1020 (2004) 92-100). En caso de PCR, se puede realizar una RT-PCR de un paso, caracterizado porque la primera síntesis de cDNA y la amplificación posterior son catalizadas por la misma polimerasa tal como la polimerasa T.th (Roche Applied Science Nº de Cat. 11 480 014).

En la RT-PCR a tiempo real tradicional o qRT-PCR, el RNA es aislado por primera vez a partir de células en un procedimiento largo que puede conducir a una pérdida de material. Usando el sistema de síntesis de cDNA CellsDirect (Invitrogen Nº de Cat. 11737-030), las células se lisan y el cDNA se genera a partir del lisado en un solo tubo con una manipulación mínima y no hay pérdida de la muestra. Se añade DNasa I para eliminar el DNA genómico antes de la síntesis de la primera cadena. Después de la síntesis, la primera cadena de cDNA se puede transferir directamente a la reacción de qPCR sin extracción orgánica intermedia o precipitación con etanol. Este equipo ha sido optimizado para muestras de células pequeñas, que van desde 10.000 células hasta una sola célula. Un protocolo similar se describe en (WO 08/135197).

En este contexto, el problema técnico que subyace en la presente invención era proporcionar un método de alto rendimiento que permita un protocolo de análisis de seguimiento de la expresión de genes más simplificado.

Breve descripción

Así, la presente invención está dirigida a un método para realizar una RT-PCR para amplificar un RNA diana que comprende los pasos de

a) el cultivo de una población de células adherentes en un recipiente de cultivo de células

b) la lisis de dicha población de células adherentes que se supone que contiene dicho RNA diana en dicho recipiente de muestras con un tampón de lisis que comprende entre 0,05 M y 1 M de un agente caotrópico

c) la adición de reactivos a dicho recipiente de muestras que son necesarios para realizar una reacción de transcripción inversa de forma que el agente caotrópico está presente en una concentración de aproximadamente de 10 a 60 mM en dicho recipiente de muestras, y la transcripción reversa de dicho RNA diana en la primera hebra de cDNA

d) amplificar dicha primera hebra de cDNA por medio de la realización de múltiples ciclos de un protocolo de termociclado.

En una realización importante, el paso de amplificación se monitoriza en tiempo real.

Preferiblemente, el agente caotrópico es tiocianato de guanidina

También preferiblemente, el tampón de lisis comprende entre aproximadamente 0,2 y 0,5 M del agente caotrópico.

Durante el paso c) del método de la invención, el agente caotrópico está presente en una concentración de aproximadamente 30 a 50 mM y preferiblemente de aproximadamente 40 mM.

También preferiblemente, el paso b) del nuevo método se lleva a cabo en presencia de un detergente no iónico que por ejemplo puede ser NP40. Durante el paso c), dicho detergente no iónico tiene un V / V entre 0,1 y 2%.

También preferiblemente, el paso a) comprende la adición de un hidrato de carbono, que puede ser un azúcar o un dextrano.

En una realización particular, se añade una DNAsa entre los pasos b) y c), o durante el paso c. Preferiblemente, dicha DNAsa es predominantemente una DNAsa específica de doble hebra, y preferiblemente DNAsa I o nucleasa Shrimp.

En otra realización particular, que no es mutuamente exclusiva con la descrito anteriormente, se añade proteinasa K, ya sea durante el paso b) o antes del paso c).

Breve descripción de las figuras

Todas las figuras comprenden un panel superior que representa una curva de amplificación qPCR y un panel inferior que representa un análisis de la curva de fusión. Las curvas de amplificación que aparecen más a la izquierda corresponden a réplicas de las mediciones, mientras que las curvas de amplificación que aparecen más a la derecha corresponden a los controles sin adición de enzima Transcriptor. Los picos de fusión en el lado derecho corresponden a productos de amplificación específicos de réplicas, mientras que los picos de fusión en el lado más a la izquierda corresponden a la formación de dímero cebador en los controles sin enzima Transcriptor.

Figura 1 qPCR y análisis de curva de fusión de la expresión de ACTB en astrocitos de ratón de acuerdo con la presente invención tal como se realiza en el ejemplo 1 (dilución de muestra 1:1)

Figura 2 qPCR y análisis de la curva de fusión de la expresión de ACTB en astrocitos de ratón de acuerdo con la presente invención tal como se realiza en el ejemplo 1 (dilución de muestra 1:4)

Figura 3 qPCR y análisis de la curva de fusión de la expresión de TUBB5 en astrocitos de ratón de acuerdo con la presente invención tal como se realiza en el ejemplo 1 (dilución 1:1)

Figura 4 qPCR y análisis de la curva de fusión de la expresión de ACTB en células HeLa de acuerdo con la presente invención tal como se realiza en el ejemplo 1 (dilución 1:1)

Descripción detallada

De acuerdo con la presente invención, es posible realizar una lisis de las células eucariotas adherentes o incluso células procariotas en un determinado recipiente de cultivo y en el mismo recipiente de cultivo en el que se realiza una reacción de la transcriptasa inversa con el fin de generar una sola hebra de cDNA.

Por lo tanto, la presente invención más precisamente está dirigida a un método para realizar una RT-PCR para amplificar un RNA diana que comprende los pasos de

a) el cultivo de una población de células adherentes en un recipiente de cultivo de células

b) la lisis de dicha población de células adherentes que se supone que contiene dicho RNA diana en dicho recipiente de muestras con un tampón de lisis que comprende entre 0,05 M y 1 M de un agente caotrópico

c) la adición de reactivos a dicho recipiente de muestras que son necesarios para realizar una reacción de transcripción inversa de forma que el agente caotrópico está presente en una concentración de aproximadamente de 10 a 60 mM en dicho recipiente de muestras, y la transcripción reversa de dicho RNA diana en la primera hebra de cDNA

d) amplificar dicha primera hebra de cDNA por medio de la realización de múltiples ciclos de un protocolo de termociclado.

Por lo tanto, el cultivo celular, la lisis, y la reacción de transcripción inversa, es decir, los pasos a) a c) se realizan todos ellos en el mismo recipiente. Como consecuencia de ello y en contraste con la mayoría de los métodos anteriores de la técnica, no es necesaria la purificación del lisado antes de la realización de la reacción de transcripción inversa. En otras palabras, el paso c) sigue el paso b) sin ninguna etapa de purificación intermedia.

El paso a), es decir, el cultivo de una población de células adherentes en un recipiente de cultivo celular se define como un paso de crecimiento de una población de dichas células adherentes en condiciones de cultivo apropiadas durante un período de tiempo definido de tal manera que las células tienen la posibilidad de dividirse y el número general de células vivas aumenta al menos en un factor de dos.

Además, es importante señalar que los protocolos tal como se utiliza en la técnica requieren un paso de tripsinización, lo que significa que con el fin de separar las células adherentes del soporte sólido el cultivo celular se incuba con una solución tampón apropiada que contiene tripsina-EDTA, que está disponibles en el mercado (por ejemplo, Invitrogen Nº de Cat. 25200 056, Genaxxon Nº de Cat. 4260.0500). Por contra, la presente invención no requiere el desprendimiento de las células del soporte sólido por la tripsina, debido a que las células se lisan directamente in situ.

La amplificación según el paso d) se realiza generalmente en la forma de una reacción de PCR utilizando un par de cebadores específico de amplificación, que están diseñados para permitir la detección de una especie de cDNA específico.

El método de acuerdo con la presente invención se puede usar para una variedad de diferentes aplicaciones cualitativas y cuantitativas. En principio, cualquier tipo de RNA puede ser transcrito y amplificado. Lo más importante, el método de acuerdo con la presente invención es aplicable para amplificar y detectar mRNA de una forma cualitativa y cuantitativa. Por lo tanto, la presente invención será particularmente aplicable para el control de la expresión génica.

Con el fin de controlar el proceso de recolección, la lisis celular y la transcripción inversa, las muestras pueden ser picadas con un control de RNA. El RNA de control preferiblemente es un RNA artificial, que durante el paso de transcripción inversa se transcribe en un cDNA que puede ser discriminado a partir del RNA de la muestra. En caso de utilizar cebadores específicos para el paso de transcripción inversa, el RNA artificial puede derivar de la transcripción in vitro de un molde de DNA por ingeniería genética que comprende una inserción o representa sólo parcialmente la secuencia diana que va a ser analizada.

La muestra biológica consiste preferiblemente en células eucariotas adherentes, es decir, las células se cultivan y unidas a un soporte sólido que es parte de un recipiente de cultivo. Para el método de la invención, cualquier tipo de recipiente de cultivo se puede utilizar. Ejemplos, que sin embargo, no son limitantes al alcance de la presente invención son placas de Petri y botellas de cultivo con una superficie interior que se adapta para ser un soporte sólido para el crecimiento de células adherentes. Estos tipos de botellas de cultivo permiten la preparación de un tipo específico de cDNA en grandes cantidades.

Otros ejemplos son placas de microtitulación en el formato de 6 pocillos, 24 pocillos, 96 pocillos, 384 pocillos, o de 1536 como los que se utilizan comúnmente en la técnica. En caso de que el método de acuerdo con la presente invención se realice en tales placas de microtitulación, es posible cultivar, lisar y realizar la transcripción inversa de múltiples muestras en paralelo. Más precisamente, el cultivo celular, la lisis celular, la dilución, cualquier adición de aditivos y la reacción de la transcriptasa inversa se llevan a cabo en el mismo recipiente de reacción. Por lo tanto, el método de la invención es particularmente útil para los análisis de alto rendimiento de múltiples muestras de células adherentes dentro de un proceso automatizado. Si los recipientes de reacción están dispuestos juntos en la forma de una placa de microtitulación de 24, 96, 384 o 1536 pocillos según las normas que se establecen en la técnica, el reactivo de lisis, los diversos aditivos y los reactivos necesarios para la realización de una reacción de transcriptasa inversa pueden añadirse a las muestras mediante instrumentos robóticos de manipulación de líquidos.

Por lo tanto, en un aspecto particular, la presente invención está dirigida a un método para realizar múltiples reacciones de RT-PCR para la amplificación de al menos un RNA diana en paralelo, que comprende los pasos de

a) el cultivo de una población de células adherentes en un recipiente de cultivo de células

b) la lisis de dicha población de células adherentes que se supone que contiene dicho RNA diana en dicho recipiente de muestras con un tampón de lisis que comprende entre 0,05 M y 1 M de un agente caotrópico

c) la adición de reactivos a dicho recipiente de muestras que son necesarios para realizar una reacción de transcripción inversa de forma que el agente caotrópico está presente en una concentración de aproximadamente de 10 a 60 mM en dicho recipiente de muestras, y la transcripción reversa de dicho RNA diana en cDNA de una sola hebra

d) amplificar dicho cDNA de una sola hebra mediante la realización de múltiples ciclos de un protocolo de termociclado.

Dentro del alcance de la invención, preferiblemente 6, 24, 96, 384 o incluso 1536 poblaciones se pueden procesar en paralelo. Una vez más, la amplificación de acuerdo con el paso d) se realiza generalmente en la forma de una reacción de PCR utilizando un par de cebadores específicos de amplificación, que está diseñado para permitir la detección de una especie de cDNA específico. En una realización, la pluralidad de múltiples pocillos puede contener diferentes poblaciones de células, procedentes de diferentes líneas celulares, o líneas celulares idénticas, que han sido pretratadas bajo diferentes condiciones. En este caso, las múltiples amplificaciones por PCR se realizan utilizando el mismo par de cebadores de amplificación con el fin de estudiar la expresión de un gen específico en diferentes condiciones.

Alternativamente, la mayoría de los pozos puede comprender el mismo tipo de población de células procedente del mismo origen. En este caso, varios pares de cebadores de amplificación diferentes pueden ser elegidos con el fin de estudiar la expresión de muchos genes diferentes en paralelo. Sin embargo, una persona experta en la técnica entenderá, que ambas aproximaciones tal como se describen no son mutuamente excluyentes y, dependiendo de la pregunta científica para ser analizada, será capaz de diseñar una forma de ensayo con un número apropiado de diferentes tipos de células y un número adecuado de diferentes pares de cebadores de PCR con el fin de lograr una utilización óptima del número completo de pocillos que están presentes en la correspondiente placa de microtitulación.

Además, el potencial de un análisis paralelo de este tipo puede incluso mejorarse mediante PCR multiplex, se caracteriza utilizan en que múltiples pares de cebadores para la amplificación de las diferentes especies de cDNA para la misma muestra. En particular, una configuración de este tipo es ventajosa para experimentos de cuantificación RT-PCR relativos, caracterizado porque la expresión de un determinado gen se controla en relación a la expresión de un gen de mantenimiento, que se expresa constitutivamente a niveles iguales. Ejemplos destacados de tales genes de mantenimiento son los genes PBDG, GAPDH y ACTB, así como los genes de RNA 18S y 26S.

De acuerdo con la presente invención, la lisis de las células adherentes se consigue por medio de la adición de un tampón de lisis directamente, mientras las células están todavía unidas a una superficie de soporte sólido. Esto sólo es posible, si el tampón de lisis comprende un reactivo caotrópico. De acuerdo con el entendimiento común en la técnica, un reactivo caotrópico es una sustancia que rompe la estructura tridimensional en macromoléculas tales como proteínas, DNA o RNA, y los desnaturaliza. Los agentes caotrópicos interfieren con las interacciones intramoleculares estabilizadoras mediadas por fuerzas no covalentes, tales como enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, y los efectos hidrofóbicos. Los reactivos caotrópicos incluyen, pero no se limitan a urea, algunas sales de litio como sales de perclorato de litio y de guanidinio, tales como cloruro de guanidinio. En el contexto de la presente invención, el agente particularmente preferido es tiocianato de guanidina.

A fin de permitir la posibilidad de realizar la reacción de la transcriptasa inversa directamente en el lisado sin ninguna etapa de purificación intermedia, es necesario utilizar sólo cantidades limitadas de dicho agente caotrópico para la lisis de la muestra de células, de tal manera que durante el paso b), la actividad de la transcriptasa inversa no se ve afectada de forma apreciable. Por lo tanto, el tampón de lisis añadido en el paso b) comprende preferiblemente entre aproximadamente 0,2 y 0,5 M del agente caotrópico. Además, después de la adición de reactivos adicionales al comienzo del paso c) el agente caotrópico está presente en una concentración de aproximadamente 30 a 50 mM y preferiblemente de aproximadamente 40 mM.

En una realización, el paso b) de la presente invención se lleva a cabo en presencia de un detergente no iónico tal como NP40. Alternativamente, el paso b) comprende la adición de un humectante compatible con PCR, lo que resulta en una evitación efectiva de los efectos de evaporación, si necesitan procesarse muestras con pequeños volúmenes. Preferiblemente, un carbohidrato tal como un azúcar o un dextrano puede ser utilizado como un humectante en el contexto de la presente invención. Si se añade NP40 u otro detergente no iónico, entonces la cantidad de detergente debe ser elegida de tal manera que durante el paso c) dicho detergente está presente en una cantidad V / V entre 0,1 y 2%.

La recolección de células y la lisis de acuerdo con la presente invención pueden llevarse a cabo a diversas temperaturas. El paso b) del método de la invención se realiza generalmente durante al menos 5 minutos entre 16 °C y 24 °C. El tiempo máximo que se requiere para la lisis bajo estas circunstancias es de unos 30 minutos. Del mismo modo, el paso b) se puede realizar durante al menos 10 minutos, incluso por debajo de la temperatura ambiente, pero por encima de 5 °C. El tiempo máximo que se requiere para la lisis bajo estas circunstancias es de unos 60 minutos. Estas condiciones son muy favorables para la evitación de los efectos de evaporación, si se procesan muestras con volúmenes pequeños. También elimina la necesidad de calentamiento.

Sin embargo, con el fin de acelerar y mejorar la lisis de las células adherentes cultivadas, el tampón de lisis puede suplementarse con proteinasa K. En este caso, el paso b) se realiza durante al menos 5 minutos a una temperatura entre aproximadamente 55 °C y 85 °C en presencia de proteinasa K en concentraciones de aproximadamente 0,05 a 5 mg / ml y preferiblemente de 0,1-1 mg / ml. Opcionalmente, dicha proteinasa K puede inactivarse irreversiblemente

mediante una incubación posterior, ya sea entre el paso b) y el paso c) o entre el paso c) y el paso d) durante al menos 5 minutos, pero normalmente no más de 30 minutos a una temperatura entre aproximadamente 80 °C y 90 °C.

De acuerdo con la presente invención, la lisis celular y la transcripción inversa se llevan a cabo en el mismo recipiente de reacción, se ha demostrado ser muy ventajoso si el DNA genómico que está contenido en las células lisadas se puede quitar selectivamente, mientras que el RNA celular se mantiene intacto. La posibilidad más eficaz de lograr este efecto es una eliminación enzimática por medio de la inclusión de un paso de digestión con DNAsa. Por lo tanto, en una realización principal de la presente invención, el paso b) se lleva a cabo en presencia de una DNAsa específica de doble cadena. Preferiblemente, dicha DNAsa, es una DNAsa exclusiva de DNA de doble hebra tal como DNAsa I (Roche Applied Science Nº Cat. 04 716 728) o DNAsa Shrimp (US 6541204) a una concentración de aproximadamente 0,1 unidades por 50 μl de reacción (USB, Nº Cat.: 73814). No obstante, ya que durante el paso d) el cDNA monocatenario además de ser sometido a una reacción de amplificación catalizada por una polimerasa de DNA tal como una reacción PCR, es altamente ventajoso inactivar dicha DNAsa antes de la reacción de amplificación. Por lo tanto, para la inactivación de la actividad de DNAsa, en una realización específica, la muestra se incuba durante al menos 5 minutos, pero no más de 60 minutos entre el paso b) y el paso c) o el paso c) y el paso d) a una temperatura entre aproximadamente 80 °C y 90°. Alternativamente, si la DNAsa es DNAsa Shrimp, la desnaturalización durante el primer ciclo de la reacción de PCR en el paso d) es normalmente suficiente.

Para la síntesis de la primera cadena de cDNA, se utilizan cebadores con una secuencia antisentido. Estos cebadores son o bien cebadores específicos, cebadores oligo-dT, que se unen a la cola poli-A de un mRNA, o cebadores aleatorios como cebadores hexámeros aleatorios. Para la PCR posterior, un cebador específico de secuencia en orientación directa se utiliza como un cebador directo. El cebador inverso es un cebador específico que puede ser idéntico al cebador específico utilizado en la primera reacción de síntesis de cadena de cDNA. Alternativamente, el cebador inverso, que se hibrida a una secuencia situada corriente arriba desde el lado de unión del cebador que se ha utilizado para la reacción de la transcriptasa inversa.

La presente invención es aplicable para la realización de RT-PCR de un solo paso de secuencias de prácticamente cualquier amplicón de tamaño hasta 5 kb.

La presente invención es particularmente útil para realizar RT PCR en dos pasos, es decir, en una primera reacción, el RNA se transcribe de forma inversa en cDNA monocatenario. Ejemplos de polimerasas de DNA dependientes de RNA que pueden utilizarse para este paso son la transcriptasa inversa AMV (Roche Applied Science Nº de Cat. 11 495 062), transcriptasa inversa MMuLV (Roche Applied Science Nº de Cat. 011 062 603), y la transcriptasa reversa recombinante Transcriptor (Roche Applied Science Nº de Cat. 03 531 317). Posteriormente, se añaden todos los reactivos que se requieren para amplificar los cDNA monocatenarios generados por medio de PCR, tal como polimerasas de DNA termoestables dependientes de DNA así como cebadores de amplificación reversos y directos específicos de diana.

El método de la invención también se puede utilizar para llevar a cabo PCR de un solo paso, caracterizado porque todos los reactivos y enzimas necesarias para la RT-PCR se añaden en el paso c) antes de la transcripción inversa. Por ejemplo, la polimerasa de DNA de Carboxydothermus hydrogenoformans es capaz de realizar PCR de un solo paso (Roche Applied Science Nº de Cat. 12016338001). Alternativamente, el método de RT-PCR de un paso de acuerdo con la presente invención se realiza usando una mezcla de enzimas que comprende una polimerasa de DNA termoestable dependiente de molde de DNA capaz de realizar una reacción de PCR y una polimerasa de DNA dependiente de molde de RNA capaz de realizar el paso de la transcriptasa inversa de la reacción de RT-PCR de un solo paso tal como la transcriptasa inversa AMV.

Por lo general, sin embargo, el material de la mayoría de los recipientes de cultivo celular utilizados para el cultivo de células adherentes no será termoestable, y los correspondientes viales no se ajustan a un instrumento de termociclado. Así, para un protocolo de RT-PCR de un paso, después del paso de la transcripción inversa, las muestras de la primera cadena de cDNA generada se transfieren desde los recipientes de cultivo a recipientes de reacción que pueden ser utilizados junto con un instrumento termociclador sin la adición intermedia de otros reactivos. Sin embargo, si el material de los recipientes de cultivo celular utilizados para el cultivo de dichas células adherentes es termoestable, entonces el paso d) puede también realizarse en dichos recipientes. En particular, si los recipientes de cultivo de células se disponen en un formato de placa de microtitulación, entonces dicha placa de microtitulación se puede transferir directamente a los instrumentos termocicladores que están configurados para incorporar dichas placas.

En una realización importante, el paso de amplificación se monitoriza en tiempo real. Dicha monitorización en tiempo real se caracteriza en que el progreso de dicha reacción RT-PCR en un solo paso se monitoriza en tiempo real. Diferentes formatos de detección son conocidos en la técnica. Los formatos de detección mencionados a continuación han demostrado ser útiles para la RT-PCR y así proporcionar una posibilidad de avance fácil y sencillo para el análisis de la expresión génica:

a) Formato de sonda de hidrólisis TaqMan:

Una sonda de hibridación de cadena simple 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, denominado quencher o desactivador, de acuerdo con el principio de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Durante el paso de hibridación de la reacción PCR, la sonda de hibridación se une al DNA diana y es degradado por la actividad 5'-3 'exonucleasa de la Taq polimerasa durante la posterior fase de elongación. Como resultado, el componente fluorescente excitado y el desactivador están separados espacialmente entre sí y por lo tanto se puede medir una emisión de fluorescencia del primer componente. Los ensayos de sonda TaqMan se describen en detalle en los documentos US 5.210.015, US 5.538.848 y US 5.487.972. Las sondas de hibridación TaqMan y mezclas de reactivos se describen en US 5.804.375.

b) Balizas moleculares:

Estas sondas de hibridación también se marcan con un primer componente y con un desactivador, estando los marcajes situados preferentemente en ambos extremos de la sonda. Como resultado de la estructura secundaria de la sonda, ambos componentes están en proximidad espacial en la solución. Después de la hibridación de los ácidos nucleicos diana ambos componentes se separan el uno del otro de tal manera que después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada la emisión de fluorescencia del primer componente puede ser medida (US 5.118.801).

c) Sondas de hibridación FRET:

El formato de prueba de sonda de hibridación FRET es especialmente útil para todo tipo de ensayos de hibridación homogénea (Matthews, JA, y Kricka, LJ, Analytical Biochemistry 169 (1988) 1-25). Se caracteriza por dos sondas de hibridación monocatenarias que se utilizan simultáneamente y son complementarias a sitios adyacentes de la misma hebra del ácido nucleico diana amplificado. Ambas sondas 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 según el principio de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia tal que una emisión de fluorescencia del segundo componente se puede medir cuando ambas sondas de hibridación se unen a posiciones adyacentes de la molécula diana a detectar. Alternativamente al seguimiento del aumento de fluorescencia del componente aceptor de FRET, también es posible monitorizar la disminución de la fluorescencia del componente donante de FRET como medición cuantitativa del evento de hibridación.

En particular, el formato de sonda de hibridación FRET puede utilizarse en la PCR en tiempo real, con el fin de detectar el DNA diana amplificado. Entre todos los formatos de detección conocidos en la técnica de PCR en tiempo real, el formato de sonda de hibridación FRET ha demostrado ser altamente sensible, exacto y fiable (WO 97/46707; WO 97/46712; WO 97/46714). Como alternativa a la utilización de dos sondas de hibridación FRET, también es posible utilizar un cebador marcado con fluorescencia y sólo una sonda de oligonucleótidos marcada (Bernard, P.S., et al., Analytical Biochemistry 255 (1998) 101-107) . En este sentido, puede ser elegido arbitrariamente, si el cebador se marca con el donador de FRET o el compuesto aceptor de FRET.

d) Formato SybrGreen

También está dentro del alcance de la invención, si la PCR en tiempo real se lleva a cabo en presencia de un aditivo de acuerdo con la invención en caso de que el producto de amplificación se detecte usando una porción de unión a ácido nucleico de doble hebra. Por ejemplo, el correspondiente producto de amplificación también puede detectarse de acuerdo con la invención mediante un colorante de unión a DNA fluorescente que emite una señal de fluorescencia correspondiente a la interacción con el ácido nucleico de doble hebra después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada. Los colorantes SybrGreenI y SybrGold (Molecular Probes) han demostrado ser particularmente adecuados para esta aplicación. Los colorantes intercalantes, alternativamente, pueden ser utilizados. Sin embargo, para este formato, para poder discriminar los diferentes productos de amplificación, es necesario realizar el correspondiente análisis de curva de fusión (US 6.174.670).

Equipos de acuerdo con la presente descripción

En otro aspecto, la presente descripción también proporciona un equipo que comprende

(i) un desechable para el cultivo de al menos una muestra de células,

(ii) un tampón de lisis, y

(iii) una polimerasa de DNA que comprende la actividad de la transcriptasa inversa (transcriptasa inversa)

El desechable (i) puede ser cualquier tipo de desechable que es adecuado para el cultivo de al menos una población de células. Preferiblemente, dicho desechable es una placa de microtitulación con preferiblemente 6, 24, 96, 384 o

1536 pocillos. En una realización específica, dicho desechable es termoestable y compatible con un instrumento termociclador.

El tampón de lisis (ii) es un tampón que comprende entre 0,05 M y 1 M de un agente caotrópico. El agente en sí es preferiblemente tiocianato de guanidina. Opcionalmente, el equipo puede contener la proteinasa K en el tampón de lisis en una concentración de aproximadamente 0,05 a 5 mg / ml y preferiblemente de 0,1-1 mg / ml, o como un reactivo independiente con una concentración al menos 5 veces mayor en la solución madre. También opcionalmente, el equipo puede contener un dextrano o un detergente no iónico, que es preferiblemente NP, ya sea dentro del tampón de lisis en una cantidad V / V de 0,1 a 2%, o, alternativamente, en un vial separado con una concentración al menos 5 veces mayor en la solución madre. También opcionalmente, el equipo puede contener una DNAsa predominantemente específica de doble cadena tal como DNAsa I o nucleasa Shrimp en un vial separado a una concentración de al menos 0,02 unidades.

La transcriptasa inversa (iii) es o bien una polimerasa de DNA dependiente exclusivamente de RNA como la transcriptasa Inversa AMV (Roche Applied Science Nº de Cat. 11 495 062), transcriptasa inversa MMuLV (Roche Applied Science Nº de Cat. 011 062 603), y la transcriptasa inversa recombinante Transcriptor (Roche Applied Science Nº de Cat. 03 531 317). El componente (iii) también puede ser una enzima de RT PCR de 1 paso tal como, la polimerasa de DNA de Carboxydothermus hydrogenoformans, o una mezcla de una enzima transcriptasa inversa y una polimerasa de DNA termoestable dependiente de DNA.

Un equipo de acuerdo con la presente descripción puede contener un tampón, trifosfatos de desoxinucleósidos que son necesarios para la síntesis de la primera hebra de cDNA, así como los correspondientes cebadores tales como un cebador oligo-dT, un cebador hexámero aleatorio o incluso un cebador específico. Junto con la polimerasa, uno, varios o todos estos reactivos pueden combinarse en un vial como la correspondiente mezcla maestra.

Además, dicho equipo de acuerdo con la presente descripción puede comprender una DNA polimerasa termoestable tal como la polimerasa Taq, y todos los demás reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de amplificación, incluyendo pero no limitado a un reactivo tampón, desoxinucleósidos trifosfato adicionales, y cebadores de amplificación específicos de secuencia. Además, el equipo puede comprender reactivos necesarios para la detección del amplicón durante la qPCR tal como al menos una sonda de hibridación marcada con fluorescencia, o un colorante fluorescente de doble cadena.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Las células de astrocitos de ratón se sembraron a dos concentraciones diferentes (1:1, 1:4) en una placa de cultivo celular de 384 pocillos con aproximadamente 1000 o 250 células por vial y se dejaron crecer. Después de aproximadamente 96 horas, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS frío. Se añadió 2 μl de tampón de lisis y se incubaron las células durante 10 minutos a temperatura ambiente. La composición del tampón de lisis fue la siguiente:

0,2M tiocianato de guanidina
10 ng / μl de ácido poliinosínico

Los reactivos de RT Transcriptor (Roche Applied Science Nº Cat. 03 531 317) se añadieron a un volumen final de RT de 20 μl. En los controles sin RT, la transcriptasa inversa fue omitida de la mezcla RT. La placa de cultivo celular que contiene las reacciones de RT se incubó acuerdo con el siguiente protocolo de termociclado:

25 °C durante 10 minutos
55 °C durante 30 minutos
85 °C a los 5 minutos
Enfriar en hielo

Posteriormente, el cDNA se diluyó hasta 50 μl en agua libre de nucleasa. Se analizaron 2 μl de cDNA en una PCR de 10 μl usando la premezcla Maestro de LightCycler 480 SYBR Green I (Roche Applied Science Nº de Cat. 04 707 516) y cebadores adecuados para amplificar ACTB y rRNA 18S (TATAA Biocenter, panel de control génico endógeno). El expresión de la ACTB y los genes rRNA 18S se cuantificó en un instrumento de PCR en tiempo real LightCycler 480 (Roche Applied Science Nº de Cat. 05 015 278) y se determinaron los valores Ct de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores bajos Ct corresponden a un alto grado de expresión.

Tabla 1: valores de Ct obtenidos para la dilución 1: 1

Nombre de la muestra	ACTB - Ct	rRNA 18S - Ct
Pocillo 1	27,62	11,52

Pocillo 2	27,23	11,49
Pocillo 3	27,9	12,06
Pocillo 4	27,8	11,81
No RT 1	36,95	32,56
No RT 2	37,35	30,45

Tabla 2: Valores de Ct obtenidos para la dilución 1:4

Nombre de la muestra	ACTB - Ct	rRNA 18S - Ct
Pocillo 1	26,82	10,56
Pocillo 2	27,06	10,52
Pocillo 3	28,85	11,7
Pocillo 4	26,47	10,06
No RT 1	38, 28	32,29
No RT 2	38,18	32,5

Como se puede deducir de las tablas, los valores de Ct obtenidos para los correspondientes cuadruplicados son altamente reproducibles, lo que indica la alta calidad del rendimiento de la invención reivindicada.

Además, los resultados de qPCR y el análisis de la curva de fusión posterior para el gen ACTB se muestran en la Fig. 1 (1:1) y 2 (1:4).

Ejemplo 2:

Las células de astrocitos de ratón se sembraron en una placa de cultivo celular de 384 pocillos con un número medio de aproximadamente 125 células por vial y se dejaron crecer. Después de aproximadamente 96 horas, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con tampón PBS frío. El tampón PBS se reemplazó con RNA más tarde (Ambion, Nº Cat. 7020), y las células se almacenaron en el frigorífico durante 11 días. El RNA se retiró posteriormente, y las células se lavaron una vez o dos veces con PBS frío. Se añadió 4 μl de tampón de lisis que contiene tiocianato de guanidina 0,2M y ácido poliinosínico 5 ng / μl y las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron los reactivos de RT Transcriptor a un volumen final de RT de 20 μl. En los controles sin RT la transcriptasa inversa fue omitida de la mezcla de RT. La placa de cultivo celular que contiene las reacciones de RT se incubó de acuerdo con el siguiente protocolo:

25 °C durante 10 minutos
50 °C durante 30 minutos
85 °C a los 5 minutos
Enfriar en hielo

El cDNA se diluyó hasta 50 μl en agua libre de nucleasa. De forma análoga al ejemplo 1, se analizaron 2 μl de cDNA en una PCR de 10 μl utilizando la premezcla maestra LightCycler 480 SYBR Green I. Se realizó la PCR en tiempo real midiendo los genes 18S rRNA, ACTB, GAPDH y TUBB5 con cebadores apropiados (TATAA Biocenter, panel génico de control endógeno) en un instrumento de PCR en tiempo real LightCycler 480. Los resultados de los valores de Ct obtenidos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3:

Nombre de la muestra	ACTB-Ct	18S rRNA-Ct	GAPDH-Ct	TUBB5-Ct
1 lavado con PBS pocillo 1	26,14	10,95	24,05	23,96
1 lavado con PBS pocillo 2	26,20	10,55	23,89	23,85
1 lavado con PBS pocillo 3	26,63	10,80	24,00	24,03
1 lavado con PBS pocillo No RT	32,06	28,19	28,74	40,00
2 lavados con PBS pocillo 1	27,67	11,58	24,65	25,32
2 lavados con PBS pocillo 2	27,17	11,31	24,51	25,20
2 lavados con PBS pocillo 3	27,13	11,34	24,48	25,17
2 lavados con PBS pocillo No RT	36,47	30,69	32,94	N/A

Una vez más, los valores de Ct obtenidos muy similares para los triplicados muestran el rendimiento superior del método de la invención independientemente del gen que se analiza. El rendimiento también se demuestra en la Fig. 3, que muestra las curvas de amplificación y de fusión obtenidas para el gen TUBB5.

Ejemplo 3:

Las células HeLa humanas cultivadas fueron sembradas en una placa de cultivo celular de 96 pocillos con un número aproximado de 4000 células por vial y se dejaron crecer. Después de aproximadamente 48 horas, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó después con RNA, y las células se almacenaron en la nevera durante 24 horas. El RNA se retiró posteriormente, y las células se lavaron con PBS frío. Se añadieron 12,5 μl de tampón de lisis de acuerdo con el ejemplo 1 y las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron reactivos de RT Transcriptor a un volumen final de RT de 50 μl. En los controles sin RT controla la transcriptasa inversa se omitió de la mezcla RT. La placa de cultivo celular que contenía las reacciones de RT se incubó acuerdo con el siguiente protocolo:

25 °C durante 10 minutos
50 °C durante 30 minutos
85 °C a los 5 minutos
Enfriar en hielo

De forma análoga al ejemplo 1, se analizaron 2 μl de cDNA en una reacción de PCR de 10 μl utilizando la premezcla maestra de LightCycler 480 SYBR Green I. Se realizó la PCR en tiempo real midiendo los genes ACTB, GAPDH, RPLP0 y HPRT1 con cebadores apropiados (TATAA Biocenter, panel génico de control endógeno) en un instrumento de PCR en tiempo real LightCycler 480. Los valores de Ct obtenidos se muestran en la tabla 4.

Nombre de la muestra	ACTB-Ct	GAPDH-Ct	RPLP0-Ct	HPRT1-Ct
Pocillo 1	21,0	19,83	21,71	24,74
Pocillo 2	21,71	21,63	23,57	26,09
Pocillo 3	21,19	20,95	22,86	25,88
Pocillo 4	21,8	20,94	23,2	25,7
Pocillo 5	23,03	22,0	24,49	26,7
NoRT	40,0	N/A	40,0	N/A

Los valores de Ct obtenidos muy similares para los quintuplicados muestran el rendimiento superior del método de la invención independientemente del tipo de célula analizada. El rendimiento también se demuestra en la Fig. 4, que muestra las curvas de amplificación y de fusión obtenidas para el gen ACTB.

REIVINDICACIONES

1. Método para realizar una RT-PCR para amplificar un RNA diana que comprende los pasos de

a) el cultivo de una población de células adherentes en un recipiente de cultivo de células

b) la lisis de dicha población de células adherentes que se supone que contiene dicho RNA diana en dicho recipiente de muestras con un tampón de lisis que comprende entre 0,05 M y 1 M de un agente caotrópico

c) la adición de reactivos a dicho recipiente de muestras que son necesarios para realizar una reacción de transcripción inversa de forma que el agente caotrópico está presente en una concentración de aproximadamente de 10 a 60 mM en dicho recipiente de muestras, y la transcripción reversa de dicho RNA diana en la primera hebra de cDNA

d) amplificar dicha primera hebra de cDNA mediante la realización de múltiples ciclos de un protocolo de termociclado.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paso de amplificación se monitoriza en tiempo real.

3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1-2 en el que dicho agente caotrópico es tiocianato de guanidina.

4. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en el que dicho tampón de lisis comprende entre aproximadamente 0,2 y 0,5 M de agente caotrópico.

5. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en el que el paso b) se lleva a cabo en presencia de un detergente no iónico que es preferiblemente NP40, y en el que dicho detergente no iónico durante el paso c) tiene un V / V de 0,1 a 2%.

6. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en el que se añade una DNAsa entre el paso b) y c).

7. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, en donde la proteinasa K se añade ya sea durante el paso b) o antes del paso c).

Fig. 1a

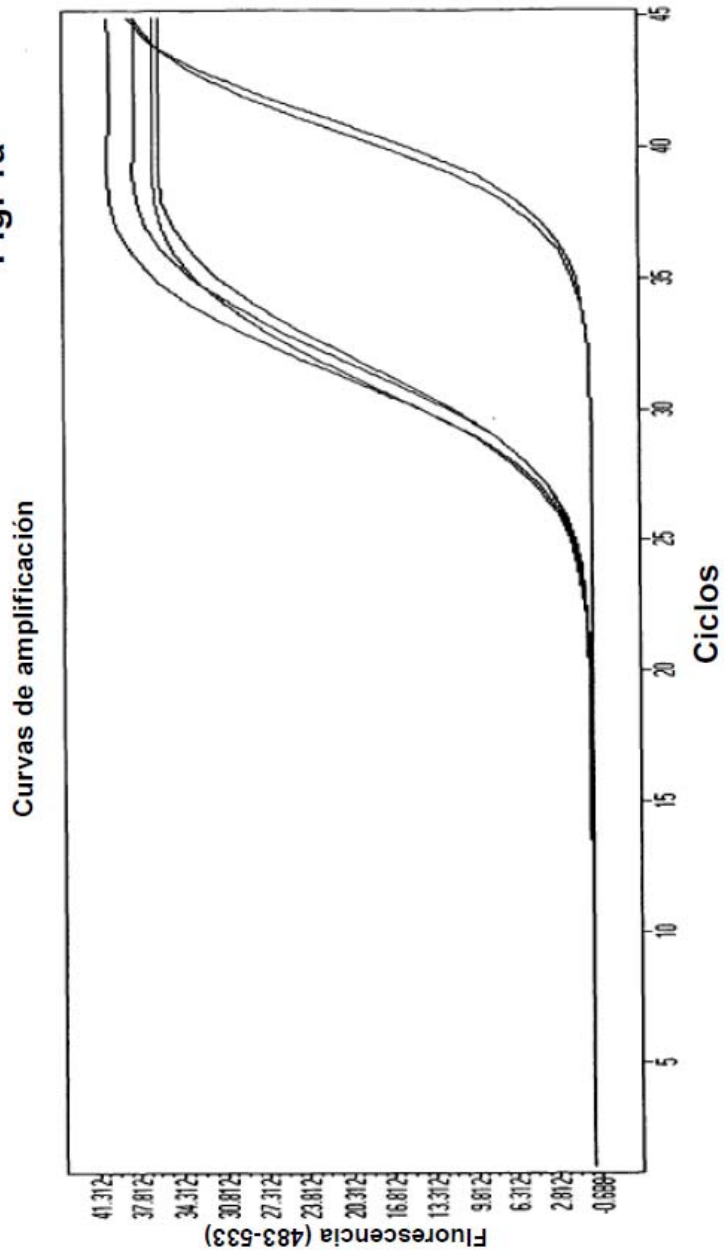
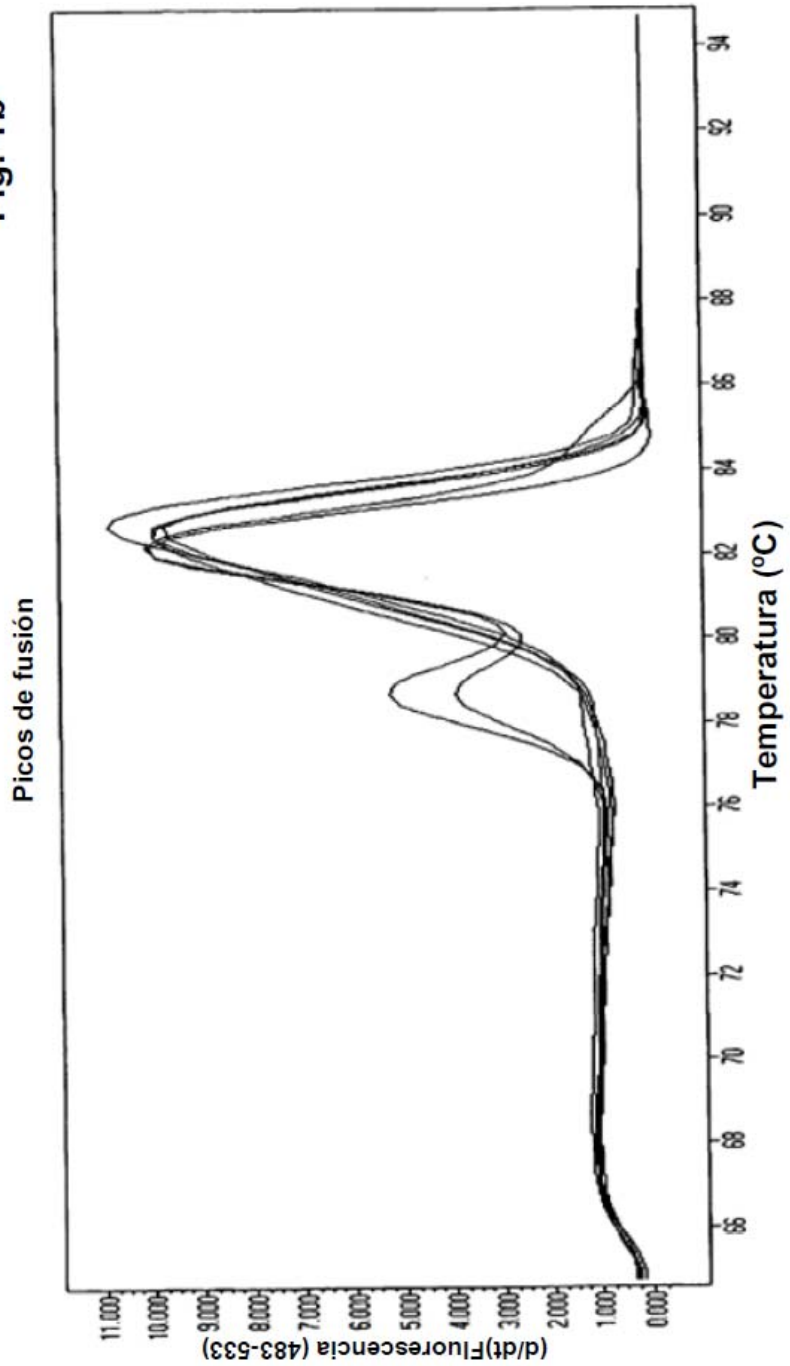

Curvas de amplificación
Fluorescencia (483-533)
41.312
37.812
34.312
30.812
27.312
23.812
20.312
16.812
13.312
9.812
6.312
2.812
-0.688
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Ciclos

Fig. 1b


Picos de fusión
(d/dt)Fluorescencia (483-533)
11.000
10.000
9.000
8.000
7.000
6.000
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000
0.000
66
68
70
72
74
76
78
80
82
84
86
88
90
92
94
Temperatura (ºC)

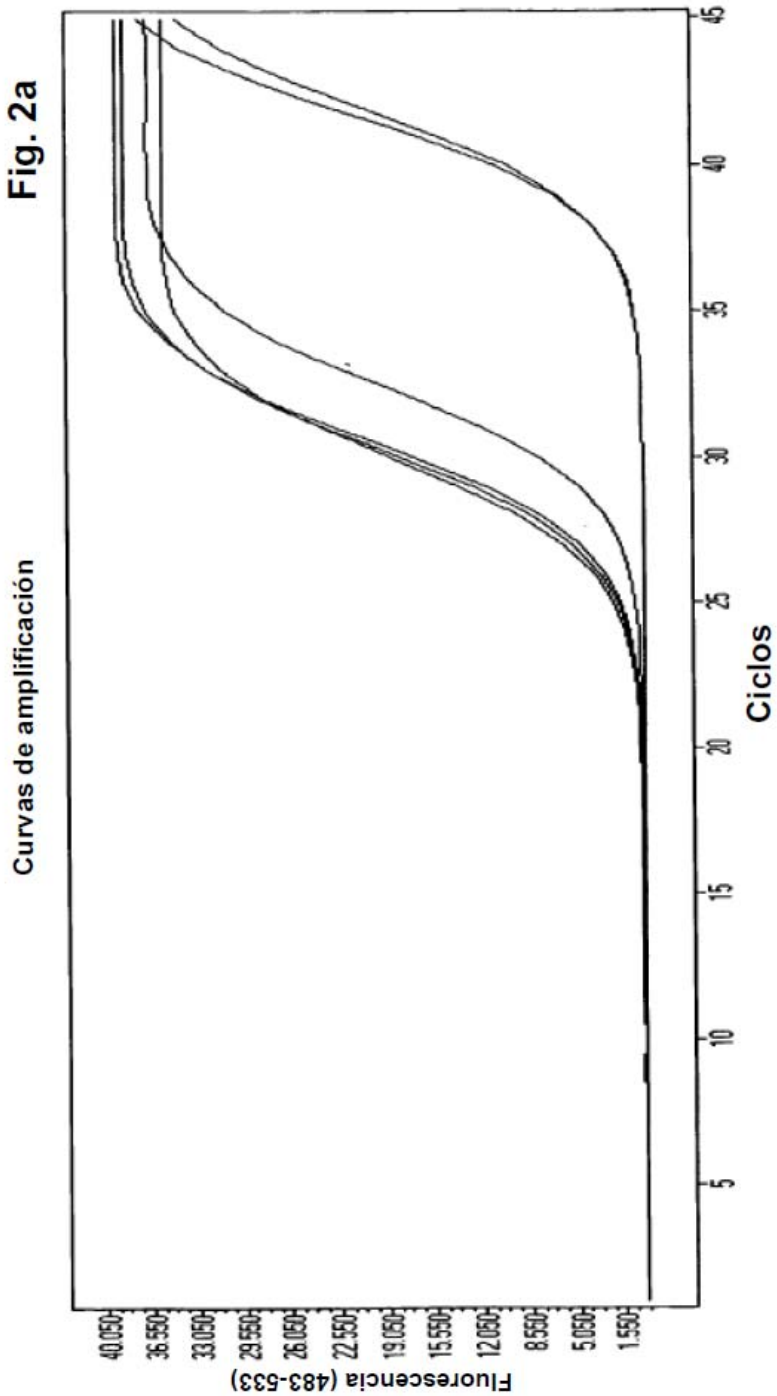

Curvas de amplificación
Fig. 2a
Fluorescencia (483-533)
40.050
36.550
33.050
29.550
26.050
22.550
19.050
15.550
12.050
8.550
5.050
1.550
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Ciclos

Fig. 2b

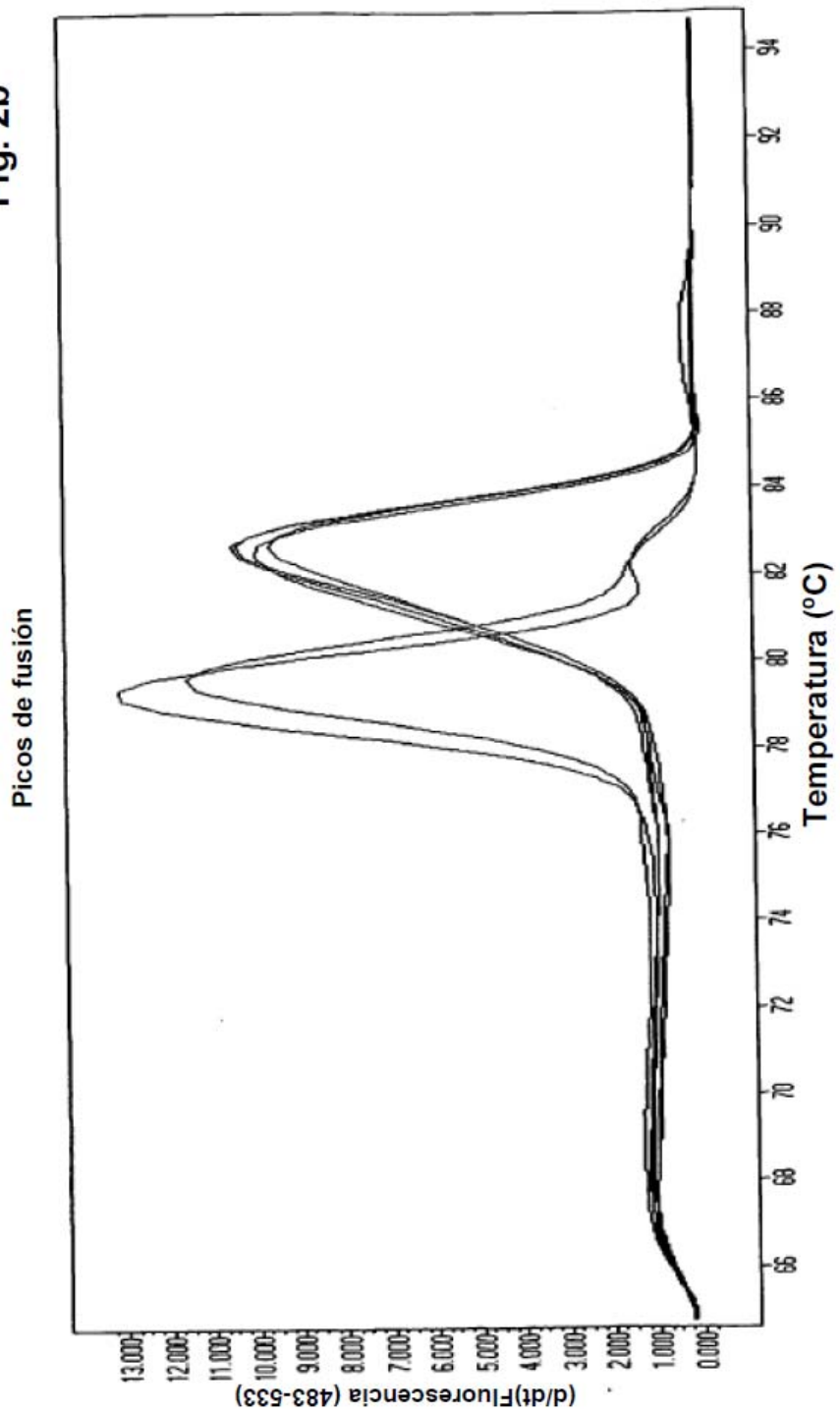
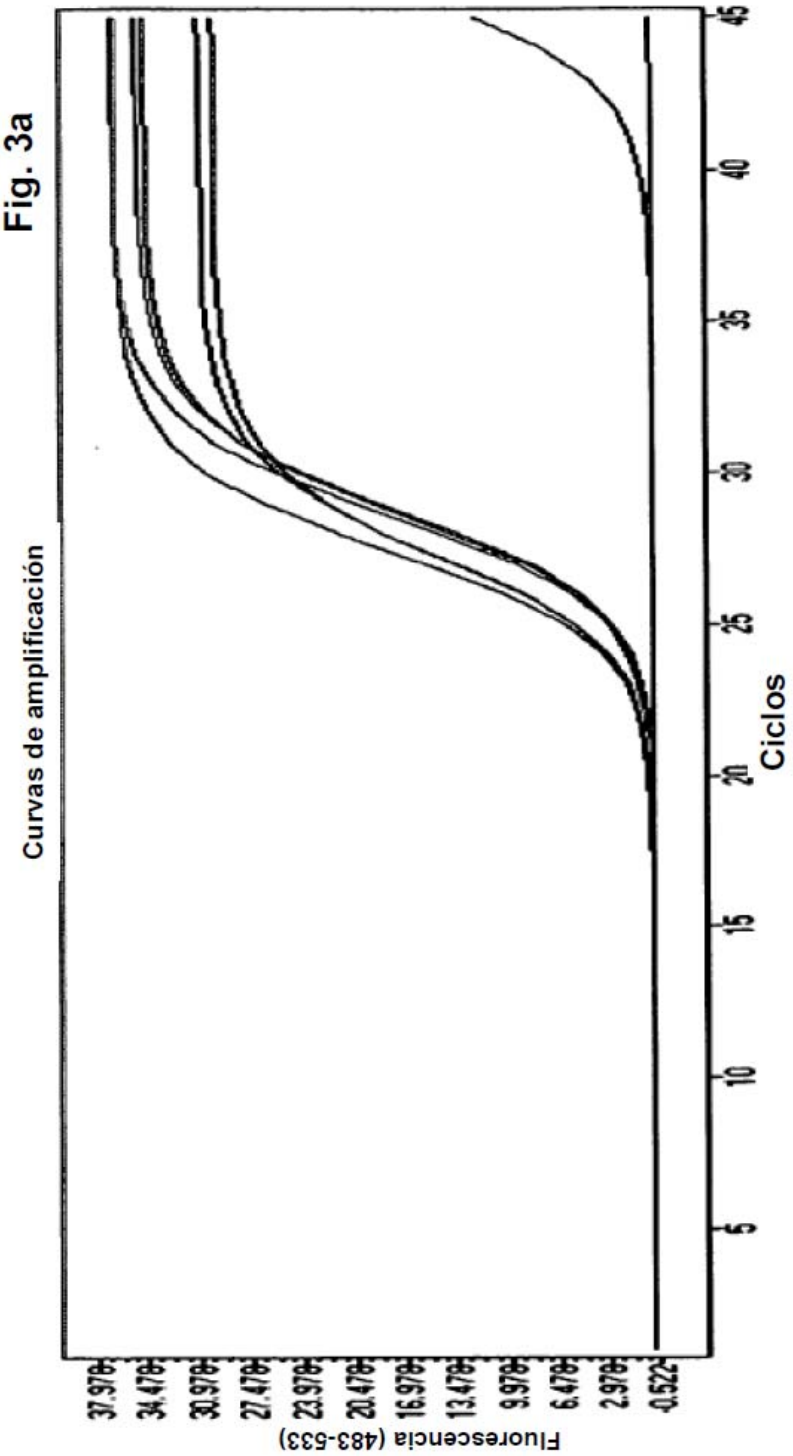

Picos de fusión
(d/dt)Fluorescencia (483-533)
13.000
12.000
11.000
10.000
9.000
8.000
7.000
6.000
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000
0.000
66
68
70
72
74
76
78
80
82
84
86
88
90
92
94
Temperatura (°C)

Fig. 3a


Curvas de amplificación
Fluorescencia (483-533)
37.97E
34.47E
30.97E
27.47E
23.97E
20.47E
16.97E
13.47E
9.97E
6.47E
2.97E
-0.522
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Ciclos

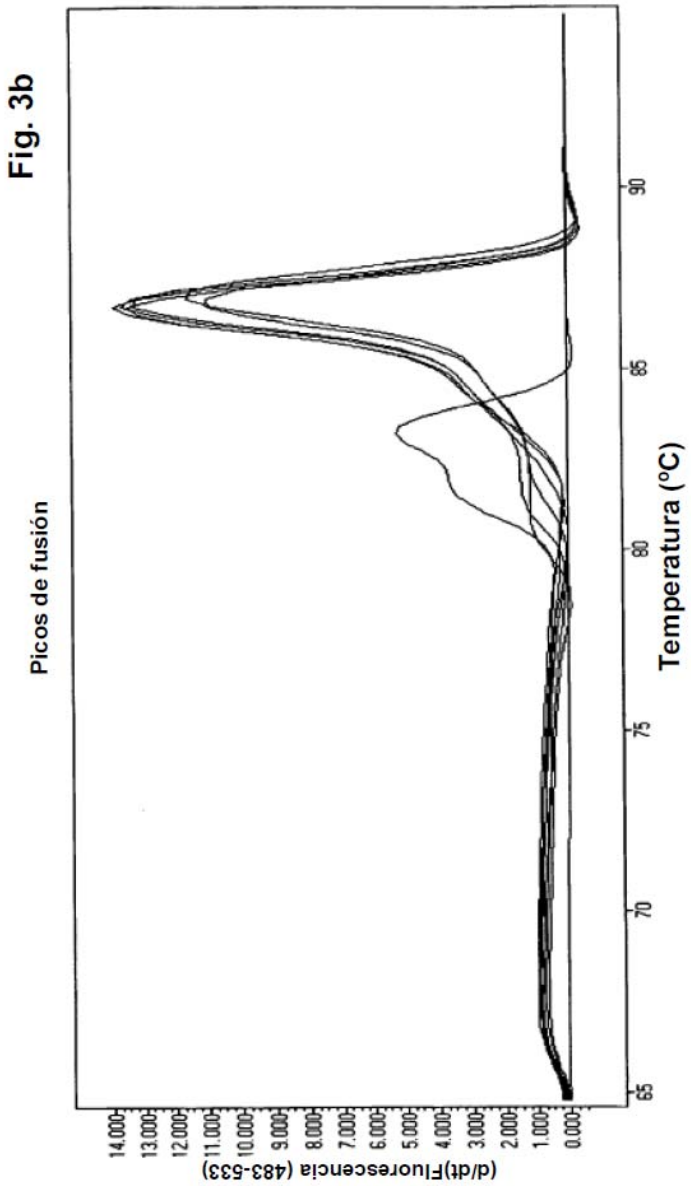


Fig. 3b
Picos de fusión
(d/dt)Fluorescencia (483-533)
14.000
13.000
12.000
11.000
10.000
9.000
8.000
7.000
6.000
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000
0.000
65
70
75
80
85
90
Temperatura (ºC)

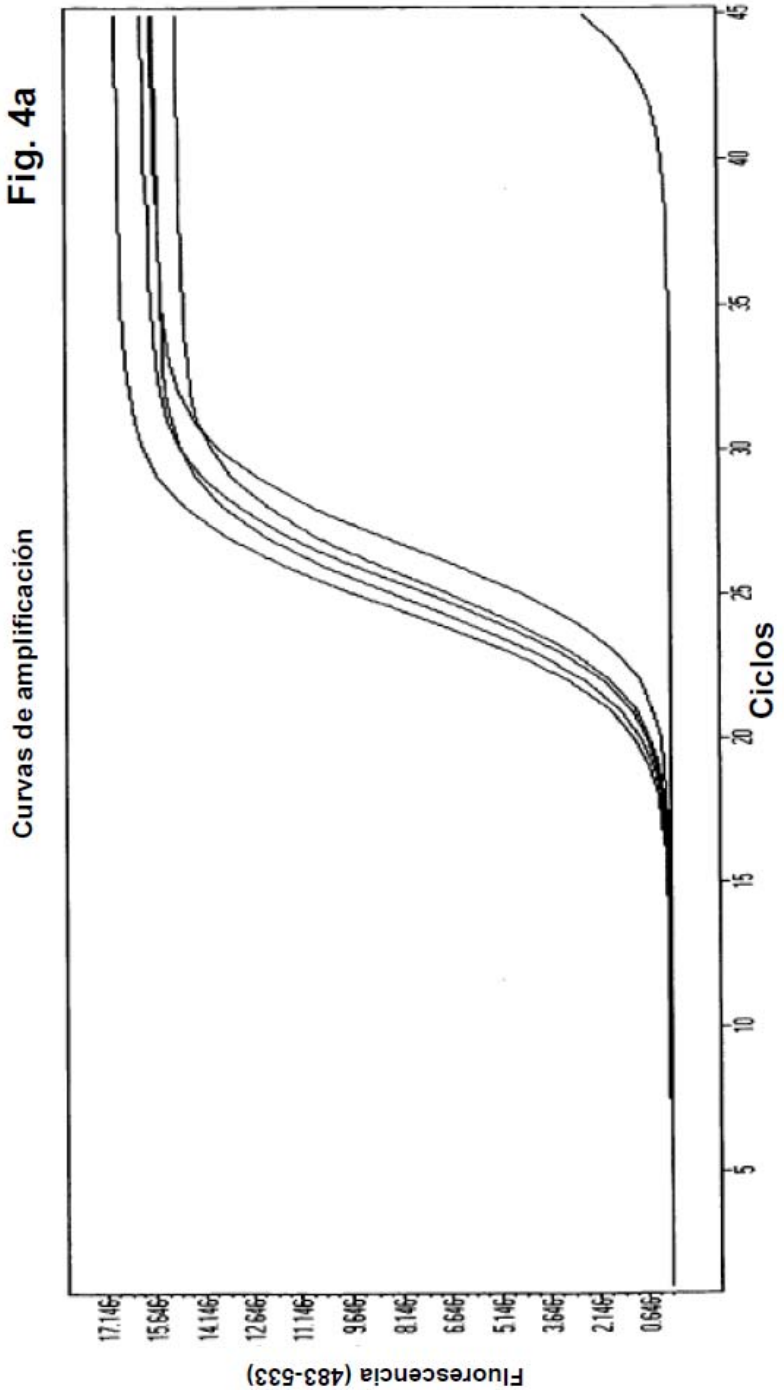
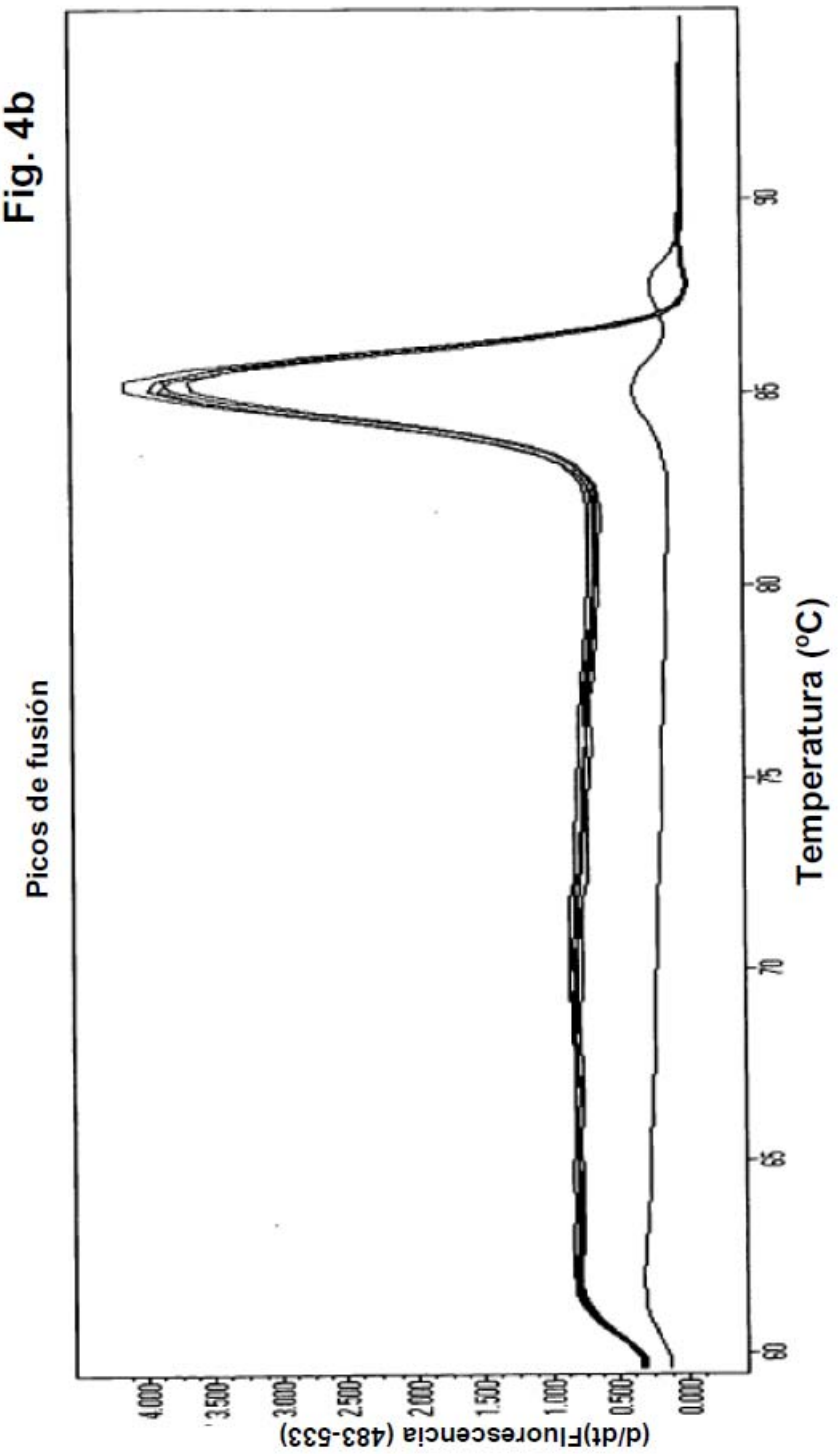

Curvas de amplificación
Fig. 4a
Fluorescencia (483-533)
17.146
15.646
14.146
12.646
11.146
9.646
8.146
6.646
5.146
3.646
2.146
0.646
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Ciclos

Fig. 4b


Picos de fusión
(d/dt)Fluorescencia (483-533)
4.000
3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
60
65
70
75
80
85
90
Temperatura (ºC)