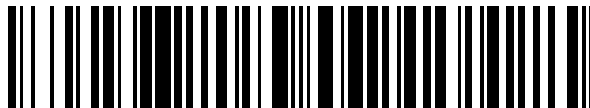


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 803**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2003** **E 09013546 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 2143803**

54 Título: **Composiciones y métodos mejorados para la síntesis de ADNc**

30 Prioridad:

**03.09.2002 US 407248 P**

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

**16.08.2016**

73 Titular/es:

**QUANTA BIOSCIENCES, INC. (100.0%)  
202 PERRY PARKWAY, SUITE 1  
GAITHERSBURG, MD 20877, US**

72 Inventor/es:

**RASHTCHIAN, AYOUB y  
SCHUSTER, DAVID M.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 579 803 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

Composiciones y métodos mejorados para la síntesis de ADNc

**Campo de la Invención**

5 La presente invención se refiere a una mezcla de reactivo almacenable adecuada para usarse en una reacción de transcripción inversa de al menos un ácido nucleico molde, en donde la mezcla de reactivo está lista para uso como una mezcla maestra y se puede usar directamente para una reacción de transcripción inversa.

La invención proporciona métodos y composiciones para la preparación de ADNc.

**Antecedentes de la Invención**

10 En el examen de la estructura y la fisiología de un organismo, tejido o célula, con frecuencia es deseable determinar su contenido genético. El marco genético de un organismo está codificado en la secuencia de doble cadena de bases de nucleótido en el ácido desoxirribonucleico (ADN) que está contenido en las células somáticas y germinales del organismo. El contenido genético de un segmento particular de ADN, o gen, solamente se manifiesta en la producción de la proteína codificada por el gen. Para producir una proteína, se produce una copia complementaria de una cadena de la doble hélice de ADN (la cadena "codificadora") mediante enzimas polimerasa, dando como resultado una secuencia específica de ácido ribonucleico (ARN). Este tipo particular de ARN, puesto que contiene el mensaje genético a partir del ADN para la producción de una proteína, se denomina ARN mensajero (ARNm).

15 Dentro de una célula dada, tejido u organismo, existe muchas especies de ARNm, cada uno codifica una proteína separada y específica. Este hecho proporciona una poderosa herramienta a los investigadores interesados en el estudio de la expresión genética en un tejido o célula. Las moléculas de ARNm se pueden aislar y además manipular mediante diversas técnicas biológicas moleculares, permitiendo de este modo la elucidación del completo contenido genético funcional de una célula, tejido u organismo. La identidad y los niveles de ARNms específicos presentes en una muestra particular proporciona pistas a la biología del tejido o la muestra particular a estudiar. Por lo tanto, la detección, análisis, transcripción y amplificación de los ARNs están entre los procedimientos más importantes en la biología molecular moderna.

20 Un acercamiento común al estudio de la expresión génica es la producción del ADN complementario (ADNc). En esta técnica, se aíslan las moléculas de ARNm de un organismo a partir de un extracto de las células o tejidos del organismo. A partir de estas moléculas de ARNm purificadas, las copias de ADNc se pueden realizar usando la enzima transcriptasa inversa (RT, del Inglés "Reverse Transcriptase") o ADN polimerasas que tienen actividad RT, lo cual da como resultado la producción de moléculas de ADNc de cadena sencilla. El término "transcriptasa inversa" describe una clase de polimerasas caracterizadas como ADN polimerasas dependientes de ARN. Todas las transcriptasas inversas conocidas requieren un cebador para sintetizar un transcrito de ADN a partir de un patrón de ARN.

25 La transcriptasa inversa del virus de la mioblastosis avial (AMV, del Inglés "Avian Myoblastosis Virus") fue la primera ADN polimerasa dependiente de ARN ampliamente usada (Verma, *Biochem. Biophys. Acta* 473:1 (1977)). La enzima tiene actividad ADN polimerasa dirigida por 5'-3' ARN, actividad ADN polimerasa dirigida por ADN 5'-3', y actividad RNasa H. La RNasa H es una ribonucleasa 5' y 3' de deslizamiento específica para la cadena de ARN para híbridos ARN ADN (Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", Nueva York: Wiley & Sons (1984)). Los errores en la transcripción no pueden ser corregidos por la transcriptasa inversa debido a que las transcriptasas inversas víricas conocidas carecen de la actividad exonucleasa 3'-5' necesaria para la corrección de pruebas ("proofreading") (Saunders and Saunders, "Microbial Genetics Applied to Biotechnology", Londres: Croom Helm (1987)). Un estudio detallado de la actividad de la transcriptasa inversa de AMV y su actividad RNasa H asociada ha sido presentada por Berger et al., *Biochemistry* 22:2.365-2.372 (1983).

30 Otra transcriptasa inversa que se usa extensamente en biología molecular es la transcriptasa inversa que se origina a partir del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLV, del Inglés "Moloney murine leukemia virus"). Véase, por ejemplo, Gerard, G.R., *DNA* 5:271-279 (1986) y Kotewicz, M.L., et al., *Gene* 35:249-258 (1985). También se ha descrito la transcriptasa inversa de M-MLV que carece sustancialmente de actividad RNasa H. Véase, por ejemplo, el documento de Patente U.S. N° 5.244.797.

35 Históricamente, la transcriptasa inversa se ha usado principalmente para transcribir ARNm en ADNc que a continuación se puede clonar en un vector para manipulación adicional. Los ADNc de cadena sencilla se pueden convertir en una copia de ADN de doble cadena completa (es decir, un ADNc de doble cadena) del ARNm original (y así de la secuencia de ADN de doble cadena original, que codifica este ARNm, contenida en el genoma del organismo) mediante la acción de una ADN polimerasa. A continuación, los ADNc de doble cadena se pueden insertar en un vector, transformar en un hospedante celular bacteriano, de levadura, animal o vegetal apropiado, y propagarse como una población de células hospedantes que contienen una colección de clones de ADNc, o genoteca de ADNc, que representa los genes, o porciones de genes presentes en la muestra de ARNm original.

40 Alternativamente, el ADNc puede ser marcado con un resto indicador apropiado y se usó como sonda de hibridación

para cuestionar las secuencias dianas definidas inmovilizadas sobre portaobjetos de vidrio, filtros u otros soportes sólidos adecuados. La identidad y la relativa abundancia de un ARNm dado en una muestra se pueden inferir a partir de la intensidad de señal para una secuencia diana específica sobre el soporte sólido.

5 Una de las técnicas más ampliamente usadas para estudiar la expresión génica aprovecha el ADNc de primera cadena para la(s) secuencia(s) de ARNm como patrón para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (del Inglés, "Polymerase Chain Reaction"). Este método, con frecuencia se refiere como PCR de ARN o PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR), aprovecha la alta sensibilidad y la especificidad del proceso de PCR y ampliamente se usa para la detección y la cuantificación de ARN.

10 Recientemente, la capacidad de medir las cinéticas de una reacción PCR mediante detección en línea en combinación con estas técnicas RT-PCR ha sido capaz de medición exacta y precisa de secuencias de ARN con alta sensibilidad. Esto ha llegado a ser posible mediante la detección del producto de RT-PCR a través del seguimiento de la fluorescencia y medición del producto de PCR durante el proceso de amplificación mediante tecnologías de sonda de hibridación marcada duales fluorescentes, tales como el ensayo de 5' nucleasa fluorogénica "TaqMan" descrita por Holland et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7.276 (1991)), Gibson et al. (*Genome Res.* 6, 99 (1996)), y Heid et al. (*Genome Res.* 6, 986 (1996)), o "Molecular Beacons" (Tyagi, S. and Kramer, F.R. *Nature Biotechnology* 14, 303 (1996)). Nazarenko et al. (*Nucleic. Acids Res.* 25, 2.516 (1997)) han descrito el uso de los cebadores horquilla marcados duales, así como modificaciones recientes que utilizan cebadores marcados con solamente un fluoróforo único (Nazarenko et al., *Nucleic. Acids Res.* (2002)). Uno de los métodos más ampliamente usados es la adición de tintes fluorescentes específicos a ADN de doble cadena a la reacción tales como: bromuro de etidio (Higuchi et al., *Biotechnology* (1992) y Higuchi et al., *Biotechnology* 11, 102610, 413 (1993)), YO-PRO-1 (Ishiguro et al., *Anal. Biochem.* 229, 207 (1995)), o SYBR Green I (Wittwer et al., *Biotechniques* 22, 130 (1997)). Estos mejoramientos en el método de la PCR han permitido la amplificación simultánea y la detección homogénea del ácido nucleico amplificado sin purificación del producto de PCR o separación mediante electroforesis en gel. Este planteamiento combinado disminuye la manipulación de la muestra, ahorra tiempo y reduce mucho el riesgo de contaminación del producto para reacciones posteriores, ya que no hay necesidad de eliminar las muestras de sus recipientes cerrados para más análisis. El concepto de combinar amplificación con análisis de producto se ha llegado a conocer como PCR "en tiempo real", también referida como PCR cuántica, o qPCR.

30 Los principios generales para la cuantificación de patrón mediante PCR en tiempo real se describieron primero mediante Higuchi R., G. Dollinger, P.S. Walsh and R. Griffith, "Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences", *Bio/Technology* 10:413-417, 1992; Higuchi R., C. Fockler G. Dollinger and R. Watson, "Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions", *Bio/Technology* 11:1.026-1.030. Este planteamiento más simple para PCR cuantitativa utiliza un tinte fluorescente específico de doble cadena, bromuro de etidio, añadido a la reacción de amplificación. La señal fluorescente generada en cada ciclo de PCR es proporcional a la cantidad de producto PCR. Una gráfica de fluorescencia frente al número de ciclo se usa para describir las cinéticas de amplificación y se usó un nivel umbral de fluorescencia para definir un número de ciclo fraccional relacionado con la concentración de patrón inicial. Específicamente, el logaritmo de la concentración de patrón inicial es inversamente proporcional al número de ciclo fraccional (ciclo umbral, o Ct), definido como la intersección de la fluorescencia frente a la curva del número de ciclo con el umbral de fluorescencia. Mayores cantidades de patrón de inicio dan como resultado la detección de PCR a un menor valor de Ct, mientras que menores cantidades requieren un mayor número de ciclos de PCR para alcanzar un umbral fluorescente equivalente (Ct) y se detectan a mayores valores de Ct. Generalmente, el ajuste de este umbral de fluorescencia está definido como un nivel que representa un aumento estadísticamente significativo sobre el ruido fluorescente de fondo. Puesto que esto ocurre en una fase temprana en el proceso de PCR cuando los sustratos críticos no son limitantes, la cuantificación del patrón de inicio ocurre sobre un amplio intervalo dinámico con alta exactitud, precisión y sensibilidad. Un problema principal en el entendimiento de los patrones de expresión génica para el descubrimiento de gen e identificación de las vías metabólicas es las limitaciones de los métodos actuales para la cuantificación exacta. El uso de métodos de PCR en tiempo real proporciona un mejoramiento significativo hacia este objetivo. Sin embargo, la cuantificación por PCR en tiempo real de ARNm está todavía unida a las limitaciones del proceso de transcripción inversa.

50 El procedimiento de la RT-PCR, llevado a cabo como o bien un ensayo punto final o en tiempo real, implica dos síntesis moleculares separadas: (i) la síntesis de ADNc a partir de un patrón de ARN; y (ii) la replicación del recientemente sintetizado ADNc a través de amplificación por PCR. Para intentar abordar los problemas técnicos con frecuencia asociados con RT-PCR, se han desarrollado un número de protocolos que tienen en cuenta las tres etapas básicas del procedimiento: (a) la desnaturalización de ARN y la hibridación del cebador inverso, (b) la síntesis de ADNc; y (c) amplificación por PCR. En el denominado procedimiento de RT-PCR "desacoplado" (por ejemplo, RT-PCR en dos etapas), la transcripción inversa se realiza como una etapa independiente usando la condición tampón óptima para la actividad de la transcriptasa inversa. Después de la síntesis de ADNc, se diluyó la reacción para disminuir  $MgCl_2$ , y las concentraciones de desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) a condiciones óptimas para la actividad de la ADN polimerasa Taq, y la PCR se lleva a cabo de acuerdo con condiciones estándar (véase los documentos de Patentes de US N° 4.683.195 y 4.683.202). Por el contrario, los métodos de RT-PCR "acoplados" usan un tampón común o comprimido para las actividades de la transcriptasa inversa y de la ADN polimerasa Taq. En una versión, el alineamiento del cebador inverso es una etapa separada que precede a la adición de enzimas, las cuales a continuación se añaden al recipiente de reacción sencilla. En otra versión, la

actividad de la transcriptasa inversa es un componente de la ADN polimerasa Tth termoestable. El alineamiento y la síntesis de ADNc se realizan en presencia de  $Mn^{++}$  a continuación se lleva a cabo la PCR en presencia de  $Mg^{++}$  después de la eliminación de  $Mn^{++}$  mediante un agente quelante. Finalmente, el método "continuo" (por ejemplo, RT-PCR en una etapa) integra las tres etapas de RT-PCR en una reacción continua sencilla que evita la apertura del tubo de reacción para la adición de la enzima o el componente. La RT-PCR continua ha sido descrita como un sistema de enzima única que usa la actividad de la transcriptasa inversa de la ADN polimerasa Taq y la polimerasa Tth y como un sistema de dos enzimas que usa AMV RT y ADN polimerasa Taq en donde se omitió la etapa de desnaturalización de ARN a 65°C.

La RT-PCR en una etapa proporciona diversas ventajas sobre la RT-PCR desacoplada. La RT-PCR en una etapa requiere menos manejo de los reactivos de la mezcla de reacción y productos de ácidos nucleicos que la RT-PCR desacoplada (por ejemplo, apertura del tubo de reacción para la adición del componente o la enzima entre las dos etapas de reacción), y por lo tanto es menos intensa en trabajo, reduciendo el número requerido de horas por persona. La etapa de RT-PCR en una etapa también requiere menos muestras, y reduce el riesgo de contaminación (Sellner and Turbett, 1998). La sensibilidad y especificidad de la RT-PCR en una etapa ha probado buena adecuación para estudiar los niveles de expresión de uno a varios genes en una muestra dada o la detección de ARN patógeno. Generalmente, este procedimiento ha sido limitado al uso de cebadores específicos a gen para iniciar la síntesis de ADNc.

Por el contrario, el uso de cebador no específico en el procedimiento de la RT-PCR "desacoplada" proporciona la oportunidad de capturar todas las secuencias de ARN en una muestra en ADNc de primera cadena, permitiendo así el perfilado y la medición cuantitativa de muchas secuencias diferentes en una muestra, cada una para una PCR separada. La capacidad de aumentar la cantidad total de ADNc producido, y más particularmente de producir ADNc que representa verdaderamente la población de ARNm de la muestra proporcionaría una ventaja significativa en el estudio de la expresión del gen. Específicamente, tales avances mejorarían mucho la probabilidad de identificar los genes que son responsables de enfermedad en diversos tejidos.

Idealmente, la síntesis de una molécula de ADNc se inicia en o cerca de los terminales 3' de las moléculas de ARNm y termina en el extremo 5', generando de este modo el ADNc "de longitud completa". El inicio de la síntesis de ADNc en los terminales 3' en la cola de poli A que usa un cebador oligo dT asegura que el mensaje 3' de los ARNms se representará en las moléculas de ADNc producidas. Sería muy deseable que la síntesis de ADNc se iniciase en el extremo 3' y continuase al extremo 5' de los ARNms sin reparar en la longitud del ARNm y la transcriptasa inversa usada. Sin embargo, debido a muchos factores tales como la longitud, la composición de secuencia de nucleótido, la estructura secundaria de ARNm y también la procesabilidad inadecuada de las transcriptasas inversas, la síntesis de ADNc termina prematuramente dando como resultado representación no cuantitativa de diferentes regiones de ARNm (es decir, secuencias del extremo 3' o secuencias del extremo 5'). Se ha demostrado que el uso de transcriptasas inversas mutantes carece de actividad de RNasa H dando como resultado síntesis de ADN más larga y mejor representación, y mayor sensibilidad de detección. Sin embargo, generalmente se cree que usando el cebador oligo dT da como resultado el sesgo de la secuencia de ADNc de la región del extremo 3' del ARNm.

En estudios que implican el análisis cuantitativo de la expresión del gen, el sesgo de secuencia en el ADNc y la representación no cuantitativa de las diferentes partes del ARNm pueden producir datos de expresión inexactos. Debido a estos problemas se ha usado un método alternativo de inicio para la síntesis de ADNc utilizando cebadores aleatorios. Debido a la secuencia aleatoria, se cree que estos cebadores inician no específicamente la síntesis de ADNc en sitios arbitrarios a lo largo del ARNm dando como resultado fragmentos de ADNc más cortos que representan colectivamente todas las partes del ARNm en la población de ADNc. Gerard and D'Alessio (1993, *Methods in Molecular Biology* 16:73-93) han informado que la relación entre cebador aleatorio y ARNm es crítica para la síntesis eficiente de ADNc mediante M-MLV RT o sus derivados deficientes de RNasa H. Aumentar las concentraciones de hexámero aleatorio dio como resultado rendimientos aumentados de ADNc, sin embargo, la longitud promedio de ADNc disminuyó acorde. A concentraciones iguales de hexámero, el uso de RNasa H<sup>-</sup> RT dio como resultado rendimientos de ADNc que eran aproximadamente 4 veces mayores que los obtenidos con M-MLV RT. Las relaciones entre hexámero y ARNm de 10:1 para M-MLV H<sup>-</sup> RT y 40:1 para M-MLV RT se informaron que producen rendimientos razonables de ADNc sin sacrificar la longitud. Esto indica que la concentración de cebador debe estar optimizada para diferentes cantidades de patrón de ARN de inicio para alcanzar eficacia de síntesis de ADNc eficiente. Puesto que el cebador aleatorio tiene el potencial de omitir la secuencia cerca de la cola de ARNm poliA, en algunos protocolos, se han usado el cebador oligo dT y los cebadores aleatorios como mezclas y combinan ambos métodos de priming.

La elección y la concentración del cebador puede tener un impacto profundo sobre la representación cuantitativa de diferentes transcritos de ARNm en el ADN de primera cadena. Por lo tanto, es aparente que composiciones y métodos mejorados para mejorar el rendimiento del ADNc producido que usan la transcripción inversa son muy deseados. También es aparente que los nuevos métodos para realizar colecciones o genotecas de ADNc a partir de células o tejido que representan más exactamente las cantidades relativas de los ARNms presentes en las células o tejidos son altamente a desear. También es aparente que son deseables composiciones y kits más convenientes para usarse en tales métodos.

El documento de patente de US 6.300.073 se refiere a una composición de enzima que comprende una ADN

polimerasa termoestable mutante.

El documento de patente de US 5.614.387 se refiere a un método de preparación de una composición de enzima estabilizada en un recipiente único.

### Compendio de la Invención

5 El problema subyacente de la presente invención está resuelto mediante el asunto objetivo de las reivindicaciones independientes adjuntas. Particularmente las realizaciones preferidas se pueden tomar a partir de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención está resuelto mediante una mezcla de reactivo almacenable adecuada para usarse en una reacción de transcripción inversa de al menos un ácido nucleico molde, en donde la mezcla de reactivo está lista para uso como mezcla maestra y se puede usar directamente para una reacción de transcripción inversa sin añadir transcriptasa inversa adicional, y en donde dicha mezcla de reactivo comprende:

- a) glicerol en una concentración entre 10% y 40%,
- 15 b) una transcriptasa inversa, en donde dicha transcriptasa inversa se selecciona entre el grupo que consiste en AMV RT, RSV RT, MMLV RT, HIV RT, EIAV RT, RAV2 RT, THERMOSCRIPT RTMMLV, ASLV y sus mutantes de RNasa H-, SUPERSSCRIPT II RT, y SUPERSSCRIPT I RT, y
- c) un tampón, en donde dicho tampón además comprende: un ion metálico necesario para la actividad de la transcriptasa inversa; y nucleósido trifosfatos.

20 En una realización, dicho tampón comprende además al menos un cebador adecuado para iniciar la transcripción inversa de un patrón mediante dicha transcriptasa inversa.

En una realización, dicho tampón comprende una proteína inhibidora de RNasa.

En una realización, dicho tampón comprende una sal de potasio, una sal de magnesio, nucleósido trifosfatos, DTT, al menos un cebador adecuado para iniciar la transcripción inversa de un patrón mediante dicha transcriptasa inversa, al menos un detergente no iónico, y una enzima inhibidora de RNasa.

25 En una realización, la mezcla comprende además al menos una ADN polimerasa termoestable.

En una realización, la mezcla comprende al menos dos enzimas de transcriptasa inversa vírica.

En una realización, dicha transcriptasa inversa vírica se selecciona entre el grupo que consiste en: AMV RT o un mutante de RNasa H<sup>-</sup> de la misma; RSV RT o un mutante de RNasa H<sup>-</sup> de la misma; MMLV RT o un mutante de RNasa H<sup>-</sup> de la misma; SUPERSSCRIPT II RT; y SUPERSSCRIPT I RT.

30 En una realización, dicha transcriptasa inversa vírica seleccionada entre el grupo que consiste en: HIV RT; EIAV RT; RAV2 RT.

En una realización, dicho ion metálico necesario para la actividad de la transcriptasa inversa es ion de magnesio.

En una realización, dicho tampón comprende un catión monovalente seleccionado entre el grupo que consiste en Li, Na, K, y NH<sub>4</sub>.

35 En una realización, dicho tampón comprende un agente de reducción.

En una realización, dicho tampón comprende un detergente no iónico.

La presente descripción proporciona métodos mejorados de síntesis de una molécula o moléculas de ADNc a partir de un patrón de ARNm o población de patrones de ARNm bajo condiciones suficientes para aumentar la cantidad total del ADNc producido, y/o el sesgo de secuencia de ARN reducido en el producto de ADNc resultante. Específicamente, la descripción se refiere al uso de una mezcla de cebador oligo(dT) y cebador aleatorio (por ejemplo, hexamérico, heptamérico, octamérico, nonamérico, etc.) en una reacción de síntesis de ADNc de primera cadena. De acuerdo con la descripción se puede usar cualquier condición que mejore el inicio. Tales condiciones preferiblemente incluyen, pero no se limitan a, optimizar las concentraciones de cebador, optimizar las temperaturas de reacción y/o optimizar la longitud o especificidad del cebador. Tales resultados también se pueden conseguir de acuerdo con la descripción mediante la optimización de la reacción de transcripción inversa, preferiblemente mediante el balance de la composición de sales o incluyendo agentes potenciadores que alteran la estructura secundaria del ARN o mejoran la procesabilidad de la transcriptasa inversa.

La presente invención también está dirigida a composiciones como las definidas en las reivindicaciones que comprenden las mezclas de reactivos, incluyendo transcriptasas inversas, tampones, cofactores y otros componentes, adecuados para el uso inmediato en la conversión de ARN en ADNc y RT PCR sin dilución o adición

de componentes adicionales. Estas composiciones son útiles, solas o en forma de kits, para la síntesis de ADNc o la amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa) o por cualquier procedimiento que utilice transcriptasas inversas en una diversidad de aplicaciones de investigación, médicas, de diagnóstico, forenses y agrícolas.

5 Por lo tanto, es un objetivo de esta descripción proporcionar nuevos métodos para la transcripción inversa de una o más moléculas de ácidos nucleicos que comprenden la incubación de uno o más patrones de ácidos nucleicos en un tampón bajo condiciones suficientes para realizar una o más primeras moléculas de ácidos nucleicos complementarias a todas o una porción de los uno o más patrones, donde el tampón comprende al menos una transcriptasa inversa, una cantidad eficaz de una mezcla de cebadores aleatorios, donde los cebadores aleatorios  
10 están presentes en una concentración de al menos aproximadamente 5 ng/μl, y una cantidad eficaz de oligo(dT), donde el oligo(dT) está presente en una concentración de menos de aproximadamente 2 μM.

De acuerdo con aspectos adicionales de la descripción los cebadores aleatorios pueden estar presentes en una concentración de entre aproximadamente 5 ng/μl y aproximadamente 20 ng/μl. El oligo(dT) puede estar presente en una concentración de entre aproximadamente 25 nM y aproximadamente 2 μM. Los cebadores aleatorios pueden  
15 ser de entre 5 y 10 nucleótidos de longitud, y pueden ser hexámeros aleatorios. El oligo(dT) puede consistir esencialmente en entre aproximadamente 12 y aproximadamente 25 residuos dT, y puede ser una molécula de oligo(dT) anclada que contiene un nucleótido o dinucleótido no-T terminal. El oligo(dT) puede ser oligo(dT)<sub>12-18</sub> o oligo(dT)<sub>20</sub> o sus equivalentes anclados.

De acuerdo con la invención tal como se define en las reivindicaciones la transcriptasa inversa se selecciona entre el grupo que consiste en AMV RT, RSV RT, MMLV RT, HIV RT, EIAV RT, RAV2 RT, TTH ADN polimerasa, ADN polimerasa de *C. hidrogenoformans*, Superscript II RT, Superscript I RT, Thermoscript RT MMLV, ASLV y sus  
20 mutantes de RNasa H<sup>-</sup>. Se pueden usar las mezclas de cualquiera de estas transcriptasas inversas. En particular, se pueden usar las mezclas de enzimas RT víricas, tal como las mezclas de MMLV y ASLV, y/o se pueden usar RNasa H reducida o análogos de RNasa H<sup>-</sup>.

Es otro objetivo de la descripción proporcionar métodos para la transcripción inversa de una o más moléculas de ácido nucleico que comprenden la incubación de uno o más patrones de ácidos nucleicos en un tampón bajo condiciones suficientes para producir una o más primeras moléculas de ácidos nucleicos complementarias a todas o una porción de los uno o más patrones, donde el tampón comprende al menos una transcriptasa inversa, uno o más  
25 cebadores adecuados para iniciar la transcripción inversa de los uno o más patrones; y una cantidad eficaz de ion de Li.  
30

De acuerdo con la invención tal como se define en las reivindicaciones la transcriptasa inversa puede ser una transcriptasa inversa vírica, seleccionada entre el grupo que consiste en AMV RT, RSV RT, MMLV RT, HIV RT, EIAV RT, RAV2 RT, Superscript II RT, Superscript I RT, Thermoscript RT MMLV y sus mutantes de RNasa H<sup>-</sup>.

En un aspecto de la descripción el ion de Li puede estar presente en una concentración de entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 200 mM. El tampón además puede comprender al menos un catión monovalente adicional en una concentración entre aproximadamente 20 mM y 200 mM, donde el catión monovalente se selecciona entre el grupo que consiste en Na, K y NH<sub>4</sub>, y donde la concentración total del ion de Li y el catión monovalente adicional es menor de o igual a aproximadamente 200 mM. El catión monovalente adicional puede ser K.  
35

Es otro objetivo de la invención proporcionar una mezcla de reactivo adecuada para usarse en una reacción de transcripción inversa de al menos un ácido nucleico molde, que comprende glicerol en una concentración entre aproximadamente 10% y aproximadamente 40%, un tampón y una transcriptasa inversa, donde la mezcla de reactivo demuestra estabilidad prolongada cuando se almacena a -20°C y se puede usar directamente para una  
40 reacción de transcripción inversa sin añadir la transcriptasa inversa adicional.

En un aspecto de la invención, el tampón puede comprender un catión monovalente seleccionado entre el grupo que consiste en Li, Na, K y NH<sub>4</sub>, una sal de magnesio, un agente de reducción, nucleósido trifosfatos, y al menos un detergente no iónico. El tampón puede comprender además al menos un cebador adecuado para iniciar la transcripción inversa de un patrón mediante la transcriptasa inversa. La mezcla también puede comprender una proteína inhibidora de la RNasa. En una realización, el tampón comprende una sal de potasio, una sal de magnesio, nucleósido trifosfatos, DTT, al menos un cebador adecuado para priming la transcripción inversa de un patrón  
45 mediante la transcriptasa inversa, al menos un detergente no iónico, y una proteína inhibidora de RNasa.  
50

En cualquiera de estos métodos y composiciones, se pueden usar dos o más transcriptasas inversas, incluyendo cualquier transcriptasa inversa como las descritas anteriormente. En cualquiera de estos métodos y composiciones al menos una ADN polimerasa termoestable puede estar presente.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención llegarán a ser aparentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debería entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque se indique las realizaciones preferidas de la invención, son dados únicamente a modo de ilustración.  
55

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es la Tabla 1 que muestra secuencias de Cebadores de qPCR e información de Secuencia de ARNm Diana.

5 La Figura 2 es la Tabla 2 que muestra valores  $C_T$  promedios para SYBR Green qRT-PCR de los ADNcs de primera cadena iniciados con cantidades variantes de hexámero aleatorio u oligo(dT)<sub>20</sub>.

La Figura 3 es la Tabla 3 que muestra valores de  $C_T$  promedios para SYBR Green qRT-PCR de los ADNcs de primera cadena sintetizados en presencia de diferentes cationes. El texto en negrita indica el  $C_T$  promedio más bajo para cada conjunto de reacción. (NA = no amplificación)

10 La Figura 4 es la Tabla 4 que muestra la información de estabilidad para diversas mezclas de reacción para usarse en reacciones de transcripción inversa.

**Descripción detallada de la invención**

15 Sorprendentemente, se ha encontrado que variando la concentración y las relaciones de oligo dT y los cebadores aleatorios, la eficacia de la síntesis de ADNc y la representación uniforme de las secuencias de ARNm se pueden mejorar enormemente. Estos mejoramientos se realizaron usando una cantidad fijada de una mezcla de oligo(dT) y cebador aleatorio sobre un amplio intervalo de cantidades de patrón de ARN de inicio. Aunque la relación de cebador y ARNm variase sobre 6 órdenes de magnitud, tanto la representación relativa como absoluta de la secuencia de ARNm se mantenía en la ADNc. A diferencia de los descubrimientos de estudios anteriores, sorprendentemente se ha descubierto que incluso cuando se usa transcriptasas inversas tipo salvaje con completa actividad de RNasa H, la sensibilidad de detección se puede mejorar debido a mejor conversión y más eficiente de ARNm en ADNc.

20 Un sorprendente descubrimiento adicional es que las condiciones de reacción mejoradas para la síntesis de ADNc se pueden obtener a través de la inclusión de una cantidad eficaz de una sal de litio en la mezcla de reacción, dando como resultado rendimiento de ADNc inesperadamente aumentado, particularmente a bajas concentraciones de patrón de ARN. Otros aspectos de la descripción se refieren a mezclas de reacción concentradas estabilizadas para la síntesis de ADNc de primera cadena que simplifican y mejoran la fiabilidad de la transcripción inversa.

25 Por lo tanto, la presente descripción se refiere a métodos de aumento de la eficacia de síntesis de ADNc y más particularmente, de aumento de la sensibilidad y exactitud de cuantificación de la expresión génica. Por tanto, la presente descripción proporciona síntesis de ADNc mejorada útil en el descubrimiento del gen, investigación genómica, diagnósticos e identificación de genes expresados diferentemente e identificación de genes de importancia a enfermedad.

Uso de combinaciones de cebador

30 Específicamente, la presente descripción describe nuevas combinaciones de cebador que proporcionan inicio más eficiente y uniforme para la síntesis de ADNc. La concentración y combinaciones de los cebadores aleatorios y oligo dT usados proporcionan conversión eficiente y representativa de secuencias de ARNm en ADNc. Este método proporciona conversión superior y no sesgada de secuencias de ARNm en ADNc sin reparar en la distancia a partir del extremo 3' del ARNm.

40 De acuerdo con la descripción los cebadores aleatorios se pueden mezclar con oligo dT para iniciar la síntesis de ADNc. Una diversidad de concentraciones y relaciones de cada tipo de cebador se pueden usar de acuerdo con el método de la descripción. Sorprendentemente se ha encontrado que la amplificación óptima de algunos genes requiere oligo dT mientras que otros requieren cebadores aleatorios. Al combinar tanto los tipos de cebador como una mezcla de esta descripción produce síntesis de ADNc óptima y amplificación para todos los ARNm sin reparar en la proximidad de la región de amplificación a los extremos 3' o 5'. Lo cebadores aleatorios usados de acuerdo con la descripción varían en tamaño desde 5 bases a 12 bases.

45 La longitud del oligo dT puede variar de 8 bases a 30 bases. Se pueden usar otros tipos de cebadores con diferente composición en lugar de oligo dT. Ejemplos de tales composiciones incluyen, pero no se limitan a, oligo dT donde la base 3' es A o C, o G (dT anclado). Alternativamente, dos bases en el extremo 3' pueden ser variables y pueden ser cualquier combinación de A, C o G. También se pueden usar otras secuencias o restos que pueden emparejarse por base con secuencias de poli A de ARNm. Un ejemplo, sin limitación, es la deoxi uridina (dU).

50 La cantidad de cebadores aleatorios pueden variar entre 25 ng y 800 ng para cada reacción (20 uL), por ejemplo, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600 o 700 ng o valores intermedios. De acuerdo con los métodos de la descripción la concentración de oligo dT puede ser 25 nM o 500 nM, por ejemplo, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 2.000, 3.000 o 4.000 nM o valores intermedios. Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden usar diversas relaciones de cebadores aleatorios y oligo dT.

Los expertos en la técnica reconocerán que cuando las concentraciones de los cebadores aleatorios o oligo dT

están especificadas como relaciones peso/volumen, las concentraciones de reactivo obtenidas usando tales cantidades variarán dependiendo de la longitud del cebador y del cambio auxiliar en el peso molecular. Por ejemplo, el experto sabrá que, cuando un método emplea 12,5 ng/ml de hexámeros aleatorios, se requiere un ajuste de la cantidad para alcanzar una concentración equivalente cuando se usan nonámeros aleatorios. Se realizan ajustes similares cuando se usan diferentes longitudes de cebadores oligo dT, tales como oligo(dT)<sub>20</sub> y oligo(dT)<sub>12-18</sub>.

Uso de ion de litio en reacciones de RT y RT-PCR

De acuerdo con la presente descripción, se ha encontrado que cuando se incluyen compuestos que contienen litio en la reacción de ADNc se mejora la eficacia de la síntesis de ADNc, dando como resultado mayor sensibilidad de detección y cuantificación más exacta (véase Ejemplos). Se pueden usar una diversidad de sales y compuestos que contienen litio, y el experto apreciará que la identidad y concentración de la sal se puede variar para optimizar los resultados. En el contexto de la presente descripción, la cantidad eficaz de una sal de litio es una cantidad suficiente para permitir la actividad de RT, o en el caso de las reacciones de RT que contienen un catión monovalente adicional tal como K, que produce síntesis de ADNc mejorada en comparación con los resultados producidos en ausencia de Li.

Es sorprendente que se pueda usar litio en las reacciones de RT debido a que previamente se pensó que el ion Li era inhibidor para una diversidad de enzimas retrovirales y el litio se sabe que inhibe la replicación vírica. El hecho de que el litio no solamente inhiba la reacción sino que produzca resultados mejorados es particularmente sorprendente.

Composiciones de reactivo convenientes y estables

Un aspecto de la presente invención es la forma en la que se prepara la mezcla de reacción y se mantiene de manera estable. Tradicionalmente, los componentes de reacción de ADNc han sido suministrados como un número de componentes separados que se juntan en una mezcla de reacción completa antes de empezar la síntesis de ADNc. De hecho, hay un prejuicio ampliamente extendido en la técnica de que estos componentes necesitan mantenerse separados con propósito de almacenamiento. Un kit típico para la síntesis de ADNc contiene los siguientes componentes:

- A Oligo(dT)<sub>12-18</sub>. 50 µl de una disolución a 5 mg/ml.
- B Hexámeros aleatorios. 50 µl de una disolución a 5 ng/µl. Esta es una disolución 25 µM.
- C 10X tampón de RT. 1 ml de una disolución que contiene TrisCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM.
- D MgCl<sub>2</sub> 25 mM. 500 µl suministrados.
- E DTT 0,1 M. 250 µl.
- F Mezcla dNTP. 250 µl de una disolución que contiene 10 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP.
- G SuperScript II RT. 50 µl de enzima a 50 U/µl.
- H RNasa H de E. coli. 50 µl de enzima a 2 U/µl.
- I Agua tratada con DEPC. 1,2 ml.
- J Inhibidor de la Ribonucleasa Recombinante RNaseOUT™. 100 µl suministrados a 40 unidades/µl.

Cada uno de los anteriores componentes son proporcionados por separado y se congelan a -20°C para almacenamiento. Los componentes anteriores son los componentes del sistema de síntesis de primera cadena SuperScript® para RT PCR de "Invitrogen Corporation" y se proporciona como ejemplo típico de los kits de síntesis de ADNc. Todos los otros kits comercialmente disponibles son muy similares. La creencia general ha sido que los componentes no se pueden mezclar para almacenamiento a largo plazo. Un componente clave de estos sistemas es la transcriptasa inversa que siempre se almacena en tampón de almacenamiento especial con glicerol al menos al 50%, y solamente se añade a la mezcla de reacción inmediatamente antes del inicio de la síntesis del ADNc.

Sorprendentemente, hemos encontrado que algunos o todos los componentes de la reacción de síntesis de ADNc se pueden combinar y almacenar como una mezcla conveniente preparada para usar que es estable para almacenamiento prolongado a -20°C y que simplemente se puede añadir a una disolución patrón de ácidos nucleicos cuando se necesita. La mezcla de reacción de preparada para usar puede contener glicerol al entre aproximadamente 10 y 40%, lo cual es significativamente menos del 50% o más que lo que previamente se pensó necesario para mantener la estabilidad de la enzima de RT que está presente en la mezcla.

Lo siguiente es una formulación para una 5 X mezcla maestra de ADNc que se ha producido con éxito y se ha usado para una diversidad de aplicaciones. Los componentes mínimos que se pueden proporcionar provechosamente para la mezcla son el glicerol, el RT y un componente tampón adecuado. Los compuestos tampón adecuados, tales como



Tris-HCl, HEPES, etc, son bien conocidos en la técnica. Los iones metálicos necesarios para la actividad de RT, tal como Mg y un catión monovalente tal como Li, K, Na o NH<sub>4</sub> pueden estar presentes en concentraciones que son adecuadas para la actividad RT sobre la adición a una disolución de patrón. Los componentes adicionales que pueden estar presentes son un agente de reducción, tal como DTT, moléculas cebador tales como cebadores específicos a gen, cebadores aleatorios de cualquier longitud adecuada, compuestos de oligo(dT) de cualquier longitud adecuada, moléculas de oligo(dT) ancladas de longitud adecuada, detergentes o mezclas de detergentes tales como Tween, NP-40 y Igepal CA-630 y reactivos equivalentes, dNTPs, y una o más proteínas inhibidoras de RNasa. Las cantidades relativas contenidas en la mezcla de tales reactivos necesarios para usarse en las reacciones de RT, cuando están presentes, pueden ser fácilmente determinadas por los expertos en la técnica. Además, al menos una polimerasa de ADN termoestable también puede estar presente, la cual se puede usar para reacciones de PCR posteriores o similares.

Por consiguiente, la presente invención proporciona configuraciones recientemente mejoradas, convenientes y preparadas para usar para la síntesis de ADNc. La invención reduce el número de adiciones para la reunión de las reacciones de síntesis de ADNc que es altamente buscada por los investigadores especialmente en aplicaciones de alta producción.

De acuerdo con la invención, las mezclas preparadas para usar para la síntesis de ADNc se pueden realizar a diferentes concentraciones y proporcionar como 1X a 20X "mezclas maestras". Lo siguiente es un ejemplo de una 5X mezcla maestra para la síntesis de ADNc que contiene todos los componentes necesarios para la síntesis de ADNc de acuerdo con los métodos de esta invención. Usando 4 uL de esta mezcla maestra y la preparación de ARN de interés a un volumen total de 20 uL proporciona una mezcla de reacción completa para la conversión de ARN en ADNc. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente cómo preparar las 1x a 20x mezclas maestras adecuadas.

Formulación para la 5X mezcla maestra de ADNc:

5X Tampón (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,4, KCl 0,25 M)

LiCl 0,1 M

25 MgCl<sub>2</sub> 25 mM

dNTP 2,5 mM (cada uno)

DTT 50 mM

Oligo(dT)<sub>20</sub> 500 nM

Cebador aleatorio 50 ug/ml

30 Glicerol al 30%

Igepal CA-630 al 0,005%

Tween 20 al 0,005%

MMLV RT 10.000 U/ml

Proteína inhibidora de RNasa 5.000 U/ml

35 Además de la anterior formulación, se prepararon otras tres mezclas maestras que contenían todos los reactivos excepto los cebadores.

Mezcla RT 1 no tenía cebadores.

Mezcla RT 2 contenía oligo dT como cebadores.

Mezcla RT 3 contenía hexámeros aleatorios y octámeros como cebadores.

40 Se encontró que todas las anteriores 5X mezclas maestras de ADNc eran estables durante meses cuando se almacenaban a -20°C. La Tabla 4 muestra los resultados y la eficacia de la síntesis de ADNc con estas mezclas maestras comparadas con los reactivos almacenados por separado bajo condiciones recomendadas en la bibliografía.

45 Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden usar una diversidad de diferentes transcriptasas inversas de acuerdo con la invención. Las transcriptasas inversas pueden incluir, sin limitación, AMV RT, RSV RT, MMLV RT, mutantes de RNasa H<sup>-</sup> de diversas transcriptasas inversas, HTV RT, EIAV RT, RAV2 RT, TTH ADN polimerasa, ADN polimerasa de *C. hydrogeniformans*, Superscript II RT, Superscript I RT, Thermoscript RT y mezclas de los mismos. También será obvio que uno o más de los componentes de la anterior mezcla maestra se puede sustituir con otro reactivo o proteína equivalente. Por ejemplo, hay un número de diferentes proteínas

inhibidoras de RNasa que se pueden usar. Si se desea, la proteína inhibidora de RNasa también se puede excluir de la mezcla puesto que no siempre es necesaria para la síntesis de ADNc. Las ADN polimerasas termoestables adecuadas para usarse en las mezclas maestras son bien conocidas en la técnica e incluyen ADN polimerasas Taq, Tth, Tne, Tma, Tli, Pfu, Pwo, Bst, Bca, Sac, Tac, Tfl/Tub, Tru, Mth, Mtb y Mlep y similares.

- 5 También se puede variar la composición del 5X tampón, por ejemplo, mediante el uso de otros tampones tales como tampones que contienen sulfato o tampones basados en acetato que se han usado para la síntesis de ADNc. Será aparente para los expertos en la técnica que se pueden optimizar las diferentes formulaciones para diferentes aplicaciones.

- 10 Tal como se ha descrito anteriormente, la amplificación de las secuencias de ARN mediante PCR se pueden conseguir mediante un protocolo de dos etapas o de una etapa. Las formulaciones de mezcla maestra se pueden preparar por el uso de RT PCR en una etapa cambiando los cebadores y mediante la inclusión de una ADN polimerasa termoestable apropiada tal como ADN polimerasa Taq. Se han descrito una diversidad de formulaciones para la RT PCR en una etapa, sin embargo, en todos los casos los tampones y las enzimas se mantienen por separado y solamente se mezclan inmediatamente antes de la reacción de transcripción inversa. De acuerdo con los métodos de la invención, la transcriptasa inversa, la ADN polimerasa Taq y tampones, dNTP's, cofactores y todos los otros componentes para la RT PCR en una etapa se pueden mezclar juntos en una diversidad de concentraciones diferentes para proporcionar una mezcla maestra preparada para usar.

### Ejemplos

#### Métodos:

- 20 Aislamiento y purificación del ARN:

Se aisló ARN total de célula HeLa S3 usando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con la recomendación del fabricante. Después del tratamiento con ADNasa libre de RNasa para degradar la contaminación de ADN genómico residual, se purificó el ARN mediante un cartucho de centrifuga de sílice, RNeasy, (Qiagen), y se cuantificó mediante absorbancia óptica a 260 nm.

- 25 Síntesis de ADNc:

- 30 La síntesis de ADNc de primera cadena se llevó a cabo usando componentes suministrados del Sistema de Síntesis de Primera Cadena SuperScript para RT PCR, (Invitrogen). En ciertos experimentos, M-MLV RT, diluido a 50 U/μl en tampón de almacenamiento de enzima, se sustituyó por SuperScript II RT. Los cebadores para la síntesis de ADNc, hexámero, octámero, u oligo(dT)<sub>20</sub> eran de Oligos Etc. Las reacciones (volúmenes de 20 μl) se juntaron sobre hielo con todos los componentes requeridos incluyendo: tampón (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM); 0,5 mM cada dNTP, cloruro de magnesio 5 mM, ditiotreitól (DTT) 10 mM, 20 unidades de proteína inhibidora de RNasa, 50 unidades de transcriptasa inversa, variando cantidades de ARN total de célula HeLa, y cebador(es) como se indica en cada ejemplo. Las reacciones de primera cadena se incubaron 5-10 min a 25°C, seguido de 30 minutos a 42°C. Después de la síntesis de primera cadena, las reacciones se finalizaron por calor a 85°C durante 5 min, se diluyeron en tampón TE y se almacenaron a 4°C.

PCR cuantitativa en tiempo real:

- 40 La PCR en tiempo real se llevó a cabo en volúmenes de reacción de 50 μl usando el iCycler y iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) de acuerdo con la recomendación del fabricante. Las mezclas maestras específicas objeto se prepararon con 300 nM cada cebador y se dispensaron como volúmenes de 40 μl en placas de PCR de 96 pocillos. Se añadió la muestra de ADNc (10 μl) a los pocillos apropiados y la placa se selló con una película de sellado por calor clara (Marsh Bio Products). Las reacciones se mezclaron mediante agitación por vortex a continuación se centrifugaron brevemente para recoger los contenidos en el fondo de cada pocillo. Las qPCRs se incubaron durante 3 min a 95°C seguido de 45 ciclos de 95°C, 3 min; 60°C, 30 s. Se recogió la señal fluorescente y se analizó en la etapa de alineamiento/extensión a 60°C.

- 45 Secuencias de cebador para qPCR:

Los cebadores usados para la PCR en tiempo real con SYBR Green I se diseñaron usando el programa de ordenador OLIGO (Molecular Biology Insights) o Cebador Express (Applied Biosystems). La información del cebador y la secuencia diana están resumidas en la tabla 1.

- 50 La presente invención, generalmente así descrita, se entenderá más fácilmente en referencia a los siguientes ejemplos, los cuales están proporcionados a modo de ilustración y no se entienden como limitantes de la presente invención.

**Ejemplo I:** el método de inicio del ADNc influye en la cuantificación de ARNm mediante RT-PCR en tiempo real

Se usaron diversas cantidades de hexámero aleatorio (25 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng o 400 ng) u oligo(dT)<sub>20</sub> (25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 0,5 μM, 1μM o 2μM) o una mezcla de 250 ng de hexámero y oligo(dT)<sub>20</sub> 100 nM para iniciar

la síntesis de ADNc de primera cadena a partir de o bien 200 ng o 200 pg del ARN total de la célula HeLa en volúmenes de 20  $\mu$ l tal como se ha descrito anteriormente o bien con SuperScript II o M-MLV RT. Cada reacción se realizó por triplicado. Después de la finalización de la síntesis de primera cadena, se diluyeron las reacciones a 200  $\mu$ l con Tris-HCl 10 mM, pH 8,4, se usaron EDTA 0,5 mM y alícuotas de 10  $\mu$ l como patrón para PCR en tiempo real con SYBR Green con conjuntos de cebador específicos para una diversidad de transcritos humanos incluyendo: proteína A de replicación (RPA, del Inglés "Replication Protein A"), inhibidor 1B de la quinasa dependiente de ciclina (Kip1)), proteína de unión a caperuza nuclear (CBP, del Inglés "Cap Binding Protein"), el extremo 3' o el extremo 5' de la adenosina deaminasa específica a ARN (ADAR), el extremo 3' o el extremo 5' de la adenomatosis poliposis coli (APC), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH),  $\beta$ -actina o r18s. Los resultados para los valores umbrales del ciclo promedio ( $C_T$ ) obtenidos para cada qPCR están resumidos en la Tabla 2.

La sensibilidad máxima (el  $C_T$  más bajo) para cada transcrito específico varió con la elección y la cantidad de cebador de ADNc. En general, mayores concentraciones de hexámero aleatorio dieron como resultado aumento de la sensibilidad de detección con resultados óptimos obtenidos entre 200 y 400 ng de hexámero cebador. Los resultados eran consistentes tanto si se empezaba con 200 ng o con 200 pg del patrón de ARN total. Estos datos contradicen estudios anteriores que enfatizan la importancia de optimizar la relación entre cebador aleatorio y patrón de ARN. Además, estos resultados contradicen aquellos de Deprez et al., 2002, *Anal Biochem.* 307.63-69, quienes encontraron el uso de cebador aleatorio muy insuficiente para la PCR en tiempo real cuantitativa.

Para algunas secuencias diana, el uso de oligo(dT)<sub>20</sub> dio como resultado detección más sensible que el hexámero cebador. RPA fue detectada aproximadamente 2  $C_T$  antes (~4 veces) cuando se inició el ADNc con oligo(dT)<sub>20</sub> en comparación con el hexámero. Sorprendentemente, la sensibilidad de detección para ADNc cebado con oligo(dT) fue relativamente consistente desde 50 nM hasta 2  $\mu$ M para o bien SuperScript II o M-MML RT. La mayoría de los protocolos de ADNc publicados que usan cebador oligo dT, o derivados de oligo dT, usan entre 0,5 y 5  $\mu$ M oligo dT. Estos datos demuestran que se puede obtener síntesis de ADNc eficiente usando concentraciones de cebador mucho más bajas.

Sorprendentemente, la eficacia del ADNc iniciado con oligo dT con M-MLV era comparable a la obtenida con SuperScript II. Los resultados de qPCR comparables se obtuvieron para regiones 5' de patrones que requerían transcripción inversa de largas secuencias de ARNm tales como genes ADAR o APC.

Para otras secuencias diana (GAPDH,  $\beta$ -actina, extremo 3' de ADAR) se obtuvieron sensibilidades comparables con uno u otro método de inicio.

Lo más significativamente, el uso de una mezcla de hexámero y oligo dT dio como resultado sensibilidades de detección para todas las secuencias diana que eran comparables a las obtenidas usando el método de inicio de ADNc preferido para cualquier secuencia diana dada. Por lo tanto, el uso de una mezcla de oligo dT y cebador aleatorio es probablemente para dar como resultado realización más consistente y eficacias de síntesis de ADNc uniformes en estudios que implican la realización del perfil de la amplia expresión del genoma.

**Ejemplo II:** El litio mejora el rendimiento del ADNc y la cuantificación de ARNm mediante RT-PCR en tiempo real.

Las síntesis del ADNc de primera cadena se realizaron esencialmente tal como se ha descrito anteriormente en volúmenes de reacción de 20  $\mu$ l usando 50 unidades de MMLV RT y 200 ng o 200 pg de ARN total de HeLa. Las reacciones se iniciaron usando una mezcla de oligo(dT)<sub>20</sub> 100 nM, 125 ng de hexámero aleatorio y 12 ng de octámero aleatorio. Las reacciones control contenían un tampón de Tris 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM. Otras reacciones se suplementaron con LiCl 20 mM, KCl 20 mM, NaCl 20 mM o sulfato de amonio 20 mM. Cada reacción se realizó por duplicado. Después de la finalización de la síntesis de primera cadena, se diluyeron las reacciones a 200  $\mu$ l con Tris HCl 10 mM, pH 8,4, se usaron EDTA 0,5 mM y alícuotas de 10  $\mu$ l (1/20 de cada reacción de ADNc) como patrón para la PCR en tiempo real con SYBR Green con conjuntos de cebador específicos para la diversidad de transcritos humanos incluyendo: proteína A de replicación (RPA), inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina (Kip1), el extremo 3' o 5' de la adenosina deaminasa específica de ARN (ADAR), el extremo 3' o el extremo 5' de adenomatosis poliposis coli (APC), el extremo 3' o el extremo 5' de MAP4,  $\beta$ -actina o r18s. Los resultados para los valores de umbral de ciclo ( $C_T$ ) promedio obtenidos para cada qPCR están resumidos en la Tabla 3.

En general, la inclusión de ion litio en la reacción de ADNc dio como resultado la detección del producto de ADNc a  $C_T$ s menores, indicando una mayor eficacia de síntesis de ADNc y rendimiento del producto de ADNc. La adición de litio 20 mM, potasio o sodio mejoró la qRT-PCR desde bajas cantidades de aporte del ARN total (200 pg) en comparación con las reacciones control, con la excepción del extremo 3' de MAP4. La adición de ion de amonio 20 mM o bien tenía pequeño efecto sobre  $C_T$  o daba como resultado rendimiento de ADNc inferior como lo reflejado en los  $C_T$ s retrasados para la detección del producto de RT-PCR. En promedio, la inclusión de litio redujo el  $C_T$  para la detección del producto de RT-PCR desde 10 pg del ARN total de inicio mediante 0,6 ciclos en comparación con las reacciones control y 0,4 ciclos en comparación con la adición de potasio o sodio 20 mM. La adición de litio mejoró significativamente la sensibilidad de detección para el extremo 3' del transcrito APC, ya que este producto de RT-PCR no se detectó en el control, o reacciones de ADNc suplementadas con potasio o sodio adicional. Similarmente, el extremo 5' del transcrito de ADAR no fue detectado en la reacción control de ADNc. Sin embargo, el producto de RT-PCR fue fácilmente detectado en reacciones de ADNc que contenían litio y fue detectado aproximadamente 2

5 ciclos antes (rendimiento de ADNc ~4 veces mayor) en comparación con las reacciones de ADNc suplementadas con una cantidad equivalente de potasio. La qRT-PCR en dos etapas desde cantidades superiores de patrón total de ARN (200 ng) también mostró sensibilidades de detección mejoradas cuando el litio estaba incluido en la reacción de ADNc. En promedio, el  $C_T$  para el producto de qRT-PCR a partir de reacciones de ADNc que contenían litio fueron de 0,3 ciclos más bajo que las reacciones control o las reacciones suplementadas con potasio 20 mM, y 0,4 ciclos más bajo que las reacciones de ADNc que contenían sodio 20 mM. Colectivamente estos datos demuestran que el ion litio mejora la eficacia y el rendimiento de la síntesis de ADNc mediante transcriptasa inversa retroviral.

**Ejemplo III. Estabilidad de las mezclas maestras de ADNc:**

10 Se prepararon tres mezclas maestras de ADN de acuerdo con las formulaciones descritas anteriormente y se almacenaron a -20°C. A los tiempos indicados (tabla 4) los reactivos se ensayaron funcionalmente mediante la síntesis de ADNc usando 1 ug de ARN de HeLa como patrón. Como control también se usaron un conjunto de reactivos idénticamente preparado que se había almacenado por separado (en tampones recomendados en la bibliografía) para juntar una reacción de ADNc recientemente producido. La síntesis de ADNc se inició a temperatura ambiente durante 5 minutos seguido de 30 min de incubación a 42°C. Las reacciones se pararon por inactivación por calentamiento a 85°C durante 5 min y se diluyeron 10 veces con el tampón TE. Las muestras diluidas se almacenaron congeladas hasta que se ensayaron por Q-PCR usando un conjunto de cebadores para beta actina. El protocolo de amplificación está descrito en la anterior sección de amplificación usando IQ SYBR Green supermix y BioRad IQ cycler. Las amplificaciones se realizaron por triplicado usando 1/20 de la reacción de ADNc (50 ng de ARN analizado en cada reacción de amplificación).

20

**Listado de secuencias**

- <110> QUANTA BIOSCIENCES, INC.
- <120> Composiciones y métodos mejorados para la síntesis de ADNc
- <130> Q 10002 EP/D-I
- 5 <150> 60/407,248
- <151> 2002-09-03
- <160> 26
- <170> Patent In Ver. 2.1
- <210> 1
- 10 <211> 20
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- 15 <400> 1
- ttttttttt ttttttttt 20
- <210> 2
- <211> 18
- <212> DNA
- 20 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <220>
- <221> característica\_miscelánea
- 25 <222> (13)..(18)
- <223> Esta región puede abarcar 0-6 nucleótidos
- <400> 2
- ttttttttt tttttttt 18
- <210> 3
- 30 <211> 20
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador
- 35 <400> 3
- cagcggccag acagttcctg 20
- <210> 4
- <211> 19
- <212> DNA
- 40 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador
- <400> 4
- tgcccaccgt cgttctcgt 19
- 45 <210> 5
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

<400> 5  
 cccaactcca gtgaataaca 20

5 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

10 <400> 6  
 agaatggcgc ttaggactt 19

<210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

<400> 7  
 actgcggtca aaaatgtccc 20

20 <210> 8  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

<400> 8  
 tctccagaac ggcttgatac ag 22

30 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

35 <400> 9  
 gcaggaccag ggcgttatag 20

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

<400> 10  
 cgtcatggca agtgtgtcaa a 21

45 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

50 <400> 11

cagtcttggc acccacat 18  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador  
 <400> 12  
 agctctgctg gagaacctaa 20  
 10 <210> 13  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador  
 <400> 13  
 aatccgcggc aggggtatt 19  
 <210> 14  
 <211> 19  
 20 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador  
 <400> 14  
 25 tgggagctgc cccttgaga 19  
 <210> 15  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador  
 <400> 15  
 gaagtggaag gtcggagtc 19  
 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador  
 <400> 16  
 40 gaagatggtg atgggatttc 20  
 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 45 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador  
 <400> 17  
 ggctacagct tcaccaccac 20  
 50 <210> 18

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador  
  
 <400> 18  
 tggccatctc tgctcgaag 20  
  
 <210> 19  
 <211> 19  
 10 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador  
  
 <400> 19  
 15 ccggtggacc acgaagagt 19  
  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador  
  
 <400> 20  
 gctcgcctct tccatgtctc 20  
  
 <210> 21  
 <211> 18  
 25 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador  
  
 <400> 21  
 30 cggtcaggca cacaaggg 18  
  
 <210> 22  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador  
  
 <400> 22  
 gcatacacac acaaaatgg ca 22  
  
 <210> 23  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 45 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador  
  
 <400> 23  
 cggcggcggg cagtt 15  
  
 <210> 24  
 <211> 24  
 50 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial



<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

<400> 24

ctggagatgg ttctgtaat gcat 24

5

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

<400> 25

gagggagcct cagaaacgg 19

<210> 26

<211> 20

15

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador

<400> 26

20

gtcgggagtg ggtaattgc 20

**REIVINDICACIONES**

1. Una mezcla de reactivo almacenable adecuada para usarse en una reacción de transcripción inversa de al menos un ácido nucleico molde, donde la mezcla de reactivo está lista para uso como una mezcla maestra y se puede usar directamente para una reacción de transcripción inversa sin adición de transcriptasa inversa adicional, y en donde dicha mezcla de reactivo comprende:
  - a) glicerol en una concentración entre 10% y 40% y,
  - b) una transcriptasa inversa, en donde dicha transcriptasa inversa se selecciona entre el grupo que consiste en AMV RT, RSV RT, MML RT, HIV RT, EIAV RT, RAV2 RT, THERMOSCRIPT RTMMLV, 1) y sus mutantes de RNasa H<sup>+</sup>, SUPERScript II RT, y SUPERScript 1RT, y
  - c) un tampón, en donde dicho tampón comprende además:  
un ion metálico necesario para la actividad de la transcriptasa inversa;  
y nucleósido trifosfatos.
2. La mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho tampón comprende además al menos un cebador adecuado para el inicio de la transcripción inversa de un patrón mediante dicha transcriptasa inversa.
3. La mezcla de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho tampón comprende una proteína inhibidora de RNasa.
4. La mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho tampón comprende una sal de potasio, una sal de magnesio, nucleósido trifosfatos, DTT, al menos un cebador adecuado para iniciar la transcripción inversa de un patrón mediante dicha transcriptasa inversa, al menos un detergente no iónico y una proteína inhibidora de RNasa.
5. La mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además al menos una ADN polimerasa termoestable.
6. La mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos dos enzimas transcriptasa inversa.
7. La mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha transcriptasa inversa vírica se selecciona entre el grupo que consiste en: AMV RT o un mutante de RNasa H<sup>+</sup> de la misma; RSV RT o un mutante de RNasa H<sup>+</sup> de la misma; MMLV RT o un mutante RNasa de la misma; SUPERScript II RT; Y SUPERScript I RT.
8. La mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha transcriptasa inversa vírica seleccionada entre el grupo que consiste en: HIV RT; EIAV RT; RAV2 RT.
9. La mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho ion metálico necesario para la actividad de la transcriptasa inversa es ion de magnesio.
10. La mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho tampón comprende un catión monovalente seleccionado entre el grupo que consiste en Li, Na, K y NH<sub>4</sub>.
11. La mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho tampón comprende un reactivo de reducción.
12. La mezcla de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho tampón comprende un detergente no iónico.

35

Nombre Cebador	Secuencia	ID Locus Genbank ARNm Diana	Longitud RNAm diana (nt)	Distancia Amplicon desde extremo ARNm (nt)
CBP 196U20 CBP 287L19	CAGCGGCCAGACAGTTCCTG TGCCACCCGTCGTTCTCGT	HUMNCBP	3066	2870
3'-APC 8433U20 3'-APC 8505L19	CCCAACTCCAGTGAATAACA AGAATGGCGCTTAGGACTT	HUMFAPAPC	8972	539
5'-APC 276U20 5'-APC 323L22	ACTGCGGTCAAAAATGTCCC TCTCCAGAACGGCTTGATACAG	HUMFAPAPC	8972	8696
RPA-32 1248U20 RPA-32 1370L23	GCAGGACCAGGGCGTTATAG CGTCATGGCAAGTGTGTCAAA	HUMREPA	1512	2648
3'-ADAR 5702U18 3'-ADAR 5844L20	CAGTCTTGGCACCCACAT AGCTCTGCTGGAGAACCTAA	NM_001111	6628	926
5'-ADAR 51U19 5'-ADAR 185L19	AATCCGCGGCAGGGGTATT TGGGAGCTGCCCTTGAGA	NM_001111	6628	6577
GAPDH 66U19 GAPDH 272L20	GAAGGTGAAGGTCCGAGTC GAAGATGGTGATGGGATTTT	HUMGAPDH	1268	1202
b-actin 630U20 b-actin 707L20	GGCTACAGCTTCACCAACCAC TGGCCATCTCTTGCTCGAAG	HSAC07	1761	1131
Kip1 103U19 Kip1 168L20	CCGGTGGACCACGAAGAGT GCTCGCCTCTTCCATGTCTC	CDKN1B	597	494
MAP4 4524U18 MAP4 4569L22	CGGTCAGGCACACAAGGG GCATACACACAACAAAATGGCA	HUMMAP4	5022	498
MAP4 63U15 MAP4 113L24	CGGCGGCGGGCAGTT CTGGAGATGGTTCTGTTAATGCAT	HUMMAP4	5022	4959
Hu 18s 535U19 Hu 18s 602L20	GAGGGAGCCTCAGAAACGG GTCGGGAGTGGTAATTTGC	HUMRGE	1969	1434

Tabla 1 Secuencias de Cebadores de qPCR e Información de Secuencia de ARNm Diana

Figura 1

Figura 2

RTasa	Amplicon	ng Cebador Hexámero										nM Cebador oligo(dT)20										250 ng hexámero + oligo dT 100 nM
		25	50	100	200	400	25	50	100	200	500	1000	2000	25	50	100	200	500	1000	2000		
MMLV	RPA	36.9	36.1	35.7	34.8	34.1	32.8	32.3	32.2	32.0	32.0	32.5	32.8	32.8	32.3	32.2	32.0	32.0	32.0	32.5	32.8	
SSII	RPA	36.8	36.7	36.6	34.8	34.7	33.3	33.1	32.8	32.3	32.7	33.0	33.6	33.6	33.1	32.8	32.3	32.7	32.7	33.0	33.6	
MMLV	RPA	27.4	28.5	25.7	24.8	24.3	22.3	22.3	22.3	22.4	22.4	22.5	22.8	22.8	22.3	22.2	22.4	22.4	22.4	22.5	22.8	
SSII	RPA	28.0	28.8	25.9	25.0	24.5	23.2	23.0	22.7	22.7	22.7	22.9	23.3	23.3	22.7	22.7	22.7	22.7	22.9	22.9	23.3	
MMLV	Kip1	32.8	31.9	31.2	31.5	30.7	35.1	33.3	33.4	33.6	33.7	33.6	31.5	31.5	33.3	33.4	33.6	33.7	33.6	33.6	31.5	
SSII	Kip1	35.9	34.5	33.7	32.8	31.8	36.6	36.8	35.7	35.4	37.8	35.6	33.0	33.0	38.8	35.7	35.4	37.8	35.6	33.0	33.0	
MMLV	Kip1	23.8	23.2	22.8	22.4	22.3	23.9	24.2	24.1	23.9	24.2	24.0	24.2	24.0	24.1	23.9	24.2	24.0	24.2	24.2	22.5	
SSII	Kip1	27.9	26.7	25.9	25.0	24.3	28.1	27.3	27.1	27.3	27.3	27.2	25.2	25.2	27.1	27.3	27.3	26.9	27.2	27.2	25.2	
MMLV	CBP	36.3	38.8	37.8	37.6	37.5	38.3	37.5	39.0	38.4	37.6	37.8	36.5	36.5	39.0	38.4	37.6	37.8	36.2	36.2	36.5	
SSII	CBP	37.6	39.1	37.2	36.9	38.6	37.6	42.6	38.4	39.2	37.9	38.3	37.4	37.4	38.4	39.2	37.9	38.3	36.3	36.3	37.4	
MMLV	CBP	26.5	27.0	26.7	25.5	26.0	27.3	26.9	27.9	28.0	27.4	27.6	25.3	25.3	28.0	27.4	27.6	26.8	26.8	25.3	25.3	
SSII	CBP	28.9	28.2	27.9	27.8	27.2	29.2	28.2	27.9	28.2	28.4	28.8	28.0	28.0	27.9	28.2	28.4	28.0	28.8	28.8	29.0	
MMLV	3'ADAR	30.4	31.2	29.3	30.3	29.6	30.2	30.0	30.0	29.9	29.9	29.9	29.5	29.5	30.0	29.9	29.9	28.9	29.9	29.9	29.5	
SSII	3'ADAR	31.5	31.0	30.3	29.9	29.7	31.3	30.9	31.3	31.2	31.0	30.7	30.4	30.4	30.9	31.2	31.0	31.3	30.7	30.4	30.4	
MMLV	3'ADAR	21.1	20.8	20.5	20.4	20.6	20.3	20.4	20.5	20.4	20.7	20.5	20.6	20.3	20.4	20.7	20.5	20.6	20.6	20.3	20.3	
SSII	3'ADAR	21.9	21.2	20.9	20.8	20.8	21.2	21.1	20.8	20.8	21.0	20.8	20.9	20.9	20.8	21.0	20.8	21.0	20.8	20.9	20.9	
MMLV	5'ADAR	33.3	32.4	32.8	32.8	32.8	35.3	36.6	37.2	34.8	35.6	35.5	32.9	32.9	37.2	34.8	35.6	36.8	35.5	32.9	32.9	
SSII	5'ADAR	36.9	37.3	38.8	35.3	34.2	37.3	39.4	37.2	37.5	38.7	37.4	38.3	35.7	37.2	37.5	38.7	37.4	38.3	35.7	35.7	
MMLV	5'ADAR	24.1	23.6	23.9	23.3	23.3	25.4	25.3	25.3	25.5	25.6	26.0	23.5	23.5	25.3	25.5	25.6	25.6	23.5	23.5	23.5	
SSII	5'ADAR	27.2	28.7	28.5	28.3	25.7	28.2	28.2	27.7	28.0	27.9	27.8	26.5	26.5	27.7	28.0	27.9	27.8	27.9	26.5	26.5	
MMLV	3'APC	35.5	33.4	34.1	34.0	34.5	33.5	34.0	34.3	33.0	33.7	34.9	32.7	32.7	34.3	33.0	33.7	34.7	34.9	32.7	32.7	
SSII	3'APC	35.0	35.8	35.3	34.5	33.9	34.3	33.7	34.4	34.1	34.2	34.5	34.4	34.4	34.4	34.1	34.2	34.5	33.5	34.4	34.4	
MMLV	3'APC	25.5	25.0	24.7	24.4	24.2	23.7	23.8	23.7	23.6	23.9	23.8	23.9	23.9	23.7	23.6	23.9	23.8	23.8	23.9	23.9	
SSII	3'APC	26.4	25.7	25.1	24.8	24.4	24.4	24.3	24.0	24.2	24.3	24.2	24.2	24.2	24.0	24.2	24.3	24.2	24.2	24.2	24.5	
MMLV	5'APC	34.6	34.0	34.7	33.6	33.6	35.0	36.7	35.8	34.5	34.3	34.2	34.8	33.5	35.8	34.5	34.3	34.2	34.8	33.5	33.5	
SSII	5'APC	35.8	34.6	34.4	33.9	33.4	36.5	36.1	35.8	35.7	34.8	34.4	34.1	34.1	35.8	35.7	34.8	34.5	34.4	34.1	34.1	
MMLV	5'APC	25.3	24.8	24.7	24.6	24.5	26.9	26.3	26.2	25.8	25.5	25.3	25.1	25.1	26.2	25.8	25.5	25.3	25.1	24.6	24.6	
SSII	5'APC	25.3	24.9	24.8	24.8	24.5	25.9	26.1	25.8	25.6	25.4	25.1	24.6	24.6	25.8	25.6	25.4	25.1	25.1	24.6	24.6	
MMLV	GAPDH	27.9	27.1	26.7	26.7	28.3	28.0	27.8	27.8	27.8	27.7	27.3	26.5	26.5	27.8	27.8	27.7	27.7	27.3	26.5	26.5	
SSII	GAPDH	27.3	26.6	26.7	25.9	25.6	27.0	26.8	26.7	26.8	26.5	26.5	26.0	26.0	26.7	26.8	26.5	26.5	26.5	26.0	26.0	
MMLV	GAPDH	17.8	17.4	18.8	18.5	18.2	17.8	17.5	17.3	17.3	17.4	17.3	16.3	16.3	17.5	17.3	17.4	17.3	17.3	16.3	16.3	
SSII	GAPDH	17.4	18.8	18.4	18.1	16.4	18.7	18.8	18.4	18.5	18.6	18.4	18.2	18.2	18.8	18.4	18.5	18.6	18.4	18.6	18.2	
MMLV	β-ACTIN	26.3	25.7	25.2	25.1	26.0	25.9	25.9	25.7	25.6	25.5	25.5	25.2	25.2	25.9	25.6	25.5	25.5	25.6	25.2	25.2	
SSII	β-ACTIN	27.0	26.3	27.8	25.5	25.0	26.7	26.3	26.2	26.2	26.2	26.2	25.6	25.6	26.2	26.2	26.0	25.9	25.6	25.6	25.6	
MMLV	β-ACTIN	16.8	16.4	18.1	15.9	15.8	16.4	16.1	15.9	16.1	16.1	16.1	15.9	15.9	16.4	16.1	16.1	16.1	16.3	15.9	15.9	
SSII	β-ACTIN	17.3	18.7	18.4	16.2	16.0	16.3	16.2	16.0	16.3	16.2	16.0	16.4	16.4	16.2	16.0	16.1	16.0	16.1	16.4	16.4	
MMLV	18s	16.9	16.0	15.4	14.9	14.6	20.8	20.7	20.7	20.9	21.0	21.2	21.7	21.7	20.7	20.9	21.0	21.2	21.7	21.0	21.0	
SSII	18s	18.0	17.3	18.5	16.2	15.7	23.1	22.8	22.7	22.8	22.3	22.0	22.2	22.2	22.8	22.7	22.3	22.0	22.2	22.2	22.2	
MMLV	18s	9.4	8.9	8.7	8.3	8.1	12.1	11.9	12.1	12.1	12.5	12.8	13.3	13.3	12.1	12.1	12.5	12.8	13.3	13.3	13.3	
SSII	18s	10.1	9.3	8.9	8.6	8.2	13.8	13.4	13.4	13.5	13.7	14.0	14.0	14.0	13.4	13.5	13.7	13.6	14.0	14.0	14.0	

**Tabla 2 (Página previa). Valores CT promedios para SYBR Green qRT-PCR de ADNc de primera cadena iniciada con cantidades variantes de hexámero aleatorio u oligo(dT)20.**

**Figura 2 (continuación)**

Transcrito	Aporte ADNc (1/20 de ARN)	Valor Ct promedio				
		Control (KCl 50 mM)	KCl 50 mM + LiCl 20 mM	KCl 50 mM + NaCl 20 mM	KCl 50 mM + NaCl 20 mM	KCl 50 mM + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 mM
3' APC	10 <b>pg</b>	NA	35.70	NA	NA	NA
	10 ng	27.15	26.85	27.30	27.45	27.40
5' APC	10 <b>pg</b>	39.98	36.85	34.98	35.36	NA
	10 ng	26.94	26.87	27.05	27.12	27.45
3' ADAR	10 <b>pg</b>	33.07	34.15	32.48	33.47	35.45
	10 ng	22.89	23.19	23.30	23.41	23.18
5' ADAR	10 <b>pg</b>	NA	35.81	37.66	36.75	36.66
	10 ng	26.71	26.35	26.58	26.73	26.73
3' MAP4	10 <b>pg</b>	33.57	34.19	33.78	35.60	35.19
	10 ng	24.56	24.07	24.48	24.71	24.82
5' MAP4	10 <b>pg</b>	33.93	33.60	36.02	34.71	35.08
	10 ng	24.56	24.02	24.37	24.51	24.59
Kipl	10 <b>pg</b>	33.96	32.06	33.57	33.12	33.31
	10 ng	23.27	22.99	23.38	23.54	23.76
RPA	10 <b>pg</b>	35.33	34.92	36.19	35.80	36.28
	10 ng	24.82	24.20	24.44	24.64	24.89
$\beta$ -actin	10 <b>pg</b>	28.32	27.87	28.06	28.19	28.41
	10 ng	18.31	17.85	18.25	18.33	18.38
r18s	10 <b>pg</b>	17.72	17.44	17.71	17.93	18.39
	10 ng	8.89	8.77	9.06	9.09	9.43

Tabla 3. Valores Ct promedios para SYBR Green qRT-PCR de ADNc de primera cadena sintetizado en presencia de diferentes cationes. El texto en negrita indica el más bajo Ct de promedio para cada conjunto de reacción. (NA = no amplificación)

Figura 3

Tabla 4 A: Estabilidad de Mezcla RT 1

Tiempo de almacenamiento	CT promedio	
	Mezcla RT 1	Reactivos de Control
Tiempo 0	16	16
2 semanas	16	15.90
1,5 meses	15.75	16
6.5 meses	16.2	16.7

Tabla 4 B: Estabilidad de Mezcla RT 2

Tiempo de almacenamiento	CT promedio	
	Mezcla RT 2	Reactivos de Control
Tiempo 0	17.2	17.5
2 semanas	16.75	17.2
2,5 meses	16.5	17.6
4,5 meses	16.6	17.1
6,5 meses	17.25	17.6
7,5 meses	17	17.5

Tabla 4 C: Estabilidad de Mezcla RT 3

Tiempo de almacenamiento	CT promedio	
	Mezcla RT 3.	Reactivos de Control
Tiempo 0	16.8	16.3
2 semanas	16.8	16.5
2,5 meses	18.2	16.8
4,5 meses	17.1	16.5
6,5 meses	18.2	17.7
7,5 meses	18.2	16.8

Figura 4