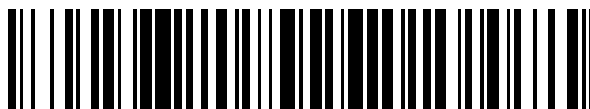


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 169**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C40B 30/04 (2006.01)

C40B 70/00 (2006.01)

G01N 33/483 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2007** **E 07710634 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 1991694**

54 Título: **Análisis de expresión génica con oligonucleótidos etiquetados con elementos**

30 Prioridad:

13.02.2006 US 772588 P

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

09.09.2016

73 Titular/es:

FLUIDIGM CANADA INC. (100.0%)
70 Esna Park Drive, Unit 12
Markham, ON L3R 6E7, CA

72 Inventor/es:

ORNATSKY, OLGA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 582 169 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

Análisis de expresión génica con oligonucleótidos etiquetados con elementos

Campo de la invención

5 La invención se define mediante las reivindicaciones. En términos generales la invención se refiere a un ensayo rápido y sensible que emplea el análisis elemental para el análisis de la expresión génica usando oligonucleótidos complementarios marcados con etiquetas de elementos o adheridos a soportes con elementos incrustados.

Introducción

10 “Muestras” biológicas se refiere a cualquier muestra de naturaleza biológica que requiere análisis. Por ejemplo, las muestras pueden incluir moléculas biológicas, tejidos, fluidos, y células, de un animal, planta, hongo, o bacteria. Éstas también pueden incluir moléculas de origen viral. Muestras típicas incluyen, pero no se limitan a, esputo, sangre, células sanguíneas (por ejemplo, glóbulos blancos), muestras de tejido o biopsia por punción, orina, fluido peritoneal, y fluido pleural, o células de los mismos. Las muestras biológicas pueden incluir también secciones de tejidos tales como secciones congeladas tomadas para fines histológicos. Otra fuente típica de muestras biológicas son los virus y cultivos celulares de animales, plantas, bacterias y, hongos, donde los estados de la expresión génica se pueden manipular para explorar la relación entre los genes. Otros ejemplos son conocidos por los expertos en la técnica.

20 “Muestra de ARN” es una preparación de ácido ribonucleico (ARN) de una muestra biológica. Ésta incluye no sólo el ARNm maduro sino también los intermedios del procesamiento de ARN y los transcritos del pre-ARNm nascente. Por ejemplo, el ARNm total purificado con columna poli (T) contiene moléculas de ARN con colas poli (A). Estas moléculas ARN poli A+ podrían madurar en ARNm, intermediarios de procesamiento de ARN, transcritos nascentes o intermediarios de degradación.

25 “Ácido nucleico” como se emplea en esta memoria se refiere tanto a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos de cadena única o doble tal como cualquier ADN o ARN o molécula híbrida de ADN/ARN. El término se refiere a cualquier ADN incluido, pero no limitado a, ADN genómico, ADN mitocondrial, ADN plasmídico, ADN cloroplástico, ADNc, fragmentos de ARN, o ADN amplificado, ARN total, ARN mensajero, ARN nuclear pequeño.

“Oligonucleótido” es un ácido nucleico de cadena simple que comprende de 2 a aproximadamente 1000 nucleótidos, más típicamente comprende de 2 a aproximadamente 500 nucleótidos. También puede incluir moléculas de “ácido nucleico bloqueado” (LNA, de sus siglas en inglés).

30 “LNA” se refiere a análogos bi-cíclicos de ARN de alta afinidad en los que el anillo de furanosa del azúcar de ribosa está químicamente bloqueado en una conformación que imita el ARN mediante la introducción de un puente de metileno- C4, O2”, dando como resultado una afinidad de hibridación sin precedentes hacia moléculas de ADN y ARN complementarias. La estabilidad térmica y la discriminación mejorada de desapareamiento de oligonucleótidos cortos de LNA modificados les hacen útiles para los ensayos de genotipado de polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP), silenciamiento génico basado en la hebra antisentido y el perfilado de la expresión génica.

35 “Ácido nucleico diana” se refiere a un ácido nucleico (a menudo derivado de una muestra biológica y por lo tanto referido también como ácido nucleico muestra), al que se hibrida específicamente una sonda de oligonucleótidos complementaria. Los ácidos nucleicos diana se pueden derivar de cualquier fuente de ácidos nucleicos (por ejemplo, incluidos, pero no limitados a, síntesis química, reacciones de amplificación, muestras forenses, etc.). Está también la presencia o ausencia de uno o más ácidos nucleicos diana que tienen que detectarse, o la cantidad de uno o más ácidos nucleicos diana que tienen que cuantificarse. El ácido o los ácidos nucleicos diana que se detectan tienen preferiblemente secuencias de nucleótidos que son complementarias a la secuencia o secuencias de ácido nucleico de la sonda o sondas de oligonucleótidos correspondientes a la que se unen (hibridan) específicamente. El término ácido nucleico diana puede referirse a la secuencia específica de un ácido nucleico más largo al que se hibrida específicamente la sonda, o a la secuencia completa (por ejemplo, gen o ARNm,) cuya abundancia (concentración) y/o nivel de expresión se desea detectar. Otras variaciones de esta definición son conocidas por los expertos en la técnica.

50 “Sonda” se refiere a un ácido nucleico que se une a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través del emparejamiento de bases complementarias, usualmente por formación de un enlace de hidrógeno. Como se emplea en esta memoria, una sonda de oligonucleótidos puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas (por ejemplo, pero no limitados a, 7-desazaguanosina, inosina, etc.) como se conoce por los expertos en la técnica. Además, las bases en una sonda de oligonucleótidos puede estar unida mediante un enlace distinto de un enlace fosfodiéster, siempre que no interfiera con la hibridación. Por tanto, las sondas de oligonucleótidos pueden ser ácidos nucleicos peptídicos en los que las bases constituyentes están unidas mediante enlace peptídico así como enlaces fosfodiéster. Se puede detectar la expresión de una transcripción particular mediante una pluralidad de sondas, típicamente, 5, 10, 15, 20, 30 ó 40 sondas. Cada una de las sondas puede dirigirse a diferentes sub-regiones del producto de transcripción. Sin embargo, las sondas pueden solaparse sobre las regiones diana. Las sondas se pueden seleccionar o diseñar usando un programa de selección tal como Primer3 del Instituto de

Tecnología de Massachusetts (MIT). Según la invención, las sondas se pueden marcar con un elemento marcado en el extremo 3' o 5', o en la mitad del oligonucleótido. En una realización, las sondas son inmovilizadas al soporte a través de uno de los extremos. Otros ejemplos de sondas son conocidos por los expertos en la técnica.

Un "soporte" es una superficie que se ha funcionalizado mediante, por ejemplo, pero sin limitación a, pirrol-2,5-diona (maleimida), anión del ácido sulfónico, o p-(clorometilo) estireno. Un soporte puede ser, por ejemplo, una membrana sintética, una esfera (poliestireno, agarosa, sílice, etc), una superficie plana en micropocillos plásticos, placas de vidrio, tubos de reacción, etc (no limitados a ellos). La función de un soporte es actuar como una fase sólida para el acoplamiento de sondas o moléculas diana. Sin embargo, en otra variación de esta definición, que es conocida por los expertos en la técnica, soporte significa cualquier superficie entre dos estados de materia diferentes: líquido y sólido, sólido y sólido, líquido y líquido, líquido y gas, gas y sólido, etc.

"Unido a un soporte" significa unido directamente o indirectamente al mismo incluyendo la fijación mediante enlace covalente, enlace de hidrógeno, interacción iónica, interacción hidrofóbica, o usando ligandos específicos unidos al final de la sonda de oligonucleótidos para interacción específica con moléculas de unión al ligando adheridas al soporte, por ejemplo una esfera. Por ejemplo, tal sistema puede incluir biotina-estreptavidina, donde la sonda transporta un resto de biotina y el soporte está recubierto con estreptavidina. La fijación química covalente de la sonda de oligonucleótidos al soporte puede producirse a través del 5-fosfato en el ácido nucleico al soporte recubierto a través de un enlace fosfoamidato. La unión al soporte se puede conseguir por medio de una molécula espaciadora que proporciona un espacio entre la parte de la doble cadena de la sonda y la diana¹. Tales métodos para la inmovilización de oligonucleótidos a soportes están bien establecidos en la técnica^{2,4}. Sin embargo en otra variación de esta definición, que se conoce por los expertos en la técnica, el acoplamiento al soporte comprende la unión funcional en la frontera entre dos estados de materia diferentes: líquido y sólido, sólido y sólido, líquido y líquido, líquido y gas, gas y sólido, etc.

"Perla marcada con un elemento" es un tipo de perla soporte (por ejemplo, pero no limitada a, poliestireno, agarosa, sílice, etc) que incorpora funcionalmente o lleva incrustado un elemento o multitud de elementos con uno o muchos isótopos. Como se conoce por los expertos en las técnicas relevantes, un elemento puede ser una parte atómica de un resto químico.

"Perla especialmente marcada" se refiere a una entidad física de una multitud de átomos de uno o más isótopos de uno o más elementos incrustados en una perla tal que un tipo de dicha perla marcada con un tipo de dichos elementos es distinguible de cualquier otro tipo de dichos elementos mediante análisis elemental. Cada soporte especialmente marcado soporta una multitud de oligonucleótidos similares o diferentes capaces de hibridarse específicamente a un ácido nucleico diana particular.

"Etiqueta de elemento" es un resto químico que incluye un átomo elemental o multitud de átomos elementales con uno o muchos isótopos adheridos a una estructura de soporte molecular. La etiqueta de elemento también comprende los medios de unión de la etiqueta a un sustrato, que puede incluir (pero sin limitarse a) pirrol-2,5-diona (maleimida), anión del ácido sulfónico, o p-(clorometil)estireno (para tiol, extremo-N, o extremo-C, respectivamente). Una etiqueta elemental puede ser distinguible de una multitud de otras etiquetas elementales en la misma muestra porque su composición elemental o isotópica es diferente de la de otras etiquetas.

"Elemento de transición" significa cualquier elemento que tiene los siguientes números atómicos, 21-29, 39-47, 57-79 y 89. Elementos de transición incluyen los elementos de tierra raras, lantánidos y metales nobles. (Cotton y Wilkinson, 1972).

"Producto de afinidad" o "reactivo de afinidad" se refiere a moléculas biológicas (anticuerpo, aptámero, lectina, péptido que se une a una secuencia específica, etc) que son conocidas por formar enlaces no-covalentes altamente específicos con las respectivas moléculas diana (péptidos, antígenos, moléculas pequeñas, etc). Un reactivo de afinidad etiquetado con una etiqueta elemental única es un producto de afinidad marcado con una etiqueta elemental que es única y distinguible de una multitud de otras etiquetas elementales en la misma muestra.

"Que hibridan específicamente a", se refiere a la unión, funcionamiento o hibridación de una molécula de ácido nucleico preferentemente a una secuencia de nucleótidos particular bajo condiciones estrictas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, celular total) de ADN o ARN. La optimización de las condiciones de hibridación es bien conocida por los expertos en la técnica y se analizan en la patente WO 95/21944 5. El término "condiciones estrictas" se refiere a condiciones bajo las que la sonda se hibridará preferentemente a su subsecuencia diana, y en menor medida, o en absoluto, a otras secuencias. Las condiciones estrictas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en las diferentes circunstancias. Secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas mayores. Típicamente, condiciones estrictas serán aquellas en las que la concentración de sal es de al menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M Na⁺ (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). Se pueden conseguir también condiciones estrictas con la adición de agentes estabilizantes tales como formamida, como es conocido por los expertos en la técnica.

“Hibridación in situ” se refiere a una técnica de hibridación en la que la reacción de hibridación entre la sonda del ácido nucleico monocatenaria complementaria y la diana endógena se lleva a cabo en células o secciones histológicas especialmente preparadas sin purificación del ácido nucleico diana.

5 “Intensidad de la señal de fondo” se refiere a las señales de hibridación resultantes de la unión no-específica, u otras interacciones, entre los ácidos nucleicos diana y el oligonucleótido marcado (por ejemplo, las sondas de oligonucleótidos, sondas control, etc.).

“Sondas de desemparejamiento” proporcionan un control para la unión no-específica o hibridación cruzada a un ácido nucleico en la muestra o distinta de la diana a la que se dirige la sonda.

10 “Oligo(dT)n-etiqueta elemental” es un oligonucleótido marcado con un metal que comprende un número (n) de nucleósidos de desoxitimidina trifosfato y nucleósidos adicionales como en complejo oligo(dT)-LNA, que se usa como sonda de hibridación para regiones de poliadenilación del ARNm. El número de nucleósidos de trifosfato de desoxitimidina puede variar en el intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 50.

15 “Análisis elemental” es un proceso donde se analiza la composición elemental de una muestra y a veces su composición isotópica. El análisis elemental se puede realizar mediante un número de métodos, que incluyen: espectroscopia atómica óptica, tal como la absorción atómica con llama, absorción atómica en horno de grafito, y emisión atómica de plasma acoplada inductivamente, que investigan la estructura electrónica exterior de los átomos; espectroscopia atómica por espectrometría de masas, tal como espectrometría de masas acoplado inductivamente, que investiga las masas de los átomos; fluorescencia por rayos-x, emisión de rayos-x inducida por partículas, espectroscopia de fotoelectrones de rayos-x y espectroscopia electrónica de Auger que investiga la estructura electrónica de los átomos interiores.

Un “analyzer elemental” es un instrumento para la cuantificación de la composición atómica de la muestra que emplea uno de los métodos del análisis elemental.

25 El análisis de una “partícula elemental” es un proceso donde una muestra analizada, compuesta de partículas dispersas en un líquido (perlas en tampón, por ejemplo), se interroga de tal manera que la composición atómica se registra para partículas individuales (esfera-a-esfera por ejemplo). Un ejemplo de un instrumento analítico es un espectrómetro de masas basado en un citómetro de flujo.

“Análisis elemental de una solución” es un proceso donde una muestra analizada se interroga de tal manera que la composición atómica se promedia sobre el volumen total de la muestra.

30 “Un patrón interno” se define como una cantidad conocida de un compuesto que se añade al desconocido, que es diferente para cada analito. La señal del analito se compara con la señal del patrón interno para descubrir cuánto analito está presente. Se puede usar un patrón interno para la interpretación de la cuantificación de la espectrometría de masas. Se puede usar también un patrón interno por otros medios conocidos por el experto en la técnica.

35 “Fijación e impermeabilización” se refiere al entrecruzamiento químico de componentes celulares mediante agentes tales como glutaraldehído, formaldehído, formalina, etanol, metanol, etc., y la creación de agujeros en la membrana celular mediante detergentes. Se pueden seleccionar fácilmente detergentes adecuados de entre los detergentes no iónicos. Deseablemente, estos detergentes se usan a una concentración de entre aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,1%. Un detergente que se puede usar es Triton X-100 (Sigma T9284). Ejemplos de otros detergentes adecuados incluyen Igepal y Nonidet P-40. Otro detergente adecuado se puede seleccionar fácilmente por un experto en la técnica.

40 El proyecto Genoma Humano ha abierto el acceso a una gran cantidad de información des secuencias génicas que ayudará en el diagnóstico y el tratamiento de muchas enfermedades humanas. Sin embargo, la identificación génica en medicina requiere del perfeccionamiento de los métodos existentes y de la introducción de nuevas tecnologías sensibles y robustas. Los métodos de cribado genómicos para la monitorización de miles de genes simultáneamente incluyen tecnologías tales como microarrays (micromatrices) de ADN, visualización diferencial, y análisis seriado de la expresión génica (SAGE). El principio básico de todos los arrays (matrices) es la hibridación de especies de ADNc o ARNc marcado con biotina o un fluorescente generado por la muestra de ARN por los nucleótidos o por moléculas de ADN complementarias adheridas a soportes sólidos. Actualmente, el conjunto de los chips genéticos son la plataforma de uso predominante, donde la superficie de placas de vidrio es el sustrato y la fluorescencia el método de detección⁶⁻¹⁰. Una alternativa a los microarrays planos son los arrays de perlas que se desarrollan por Luminex, BD Biosciences, Illumina y muchos otros. Los arrays de microesferas se crearon mediante impregnado de las perlas con diferentes proporciones de tinte fluorescente o combinaciones de puntos cuánticos o mediante grabado de códigos de barras en la superficie¹¹ de la perla. Los microarrays representan esencialmente señales acumulativas de muchas células individuales e implican la pérdida de información concerniente a células individuales. La preparación de la muestra y de patrones de referencia universal son críticos ya que la información genómica que se obtiene de la población de células heterogénea interferirá con el perfil genético de una célula cancerosa particular.

Los métodos de diagnóstico de ADN usualmente implican la amplificación de secuencias diana para incrementar la sensibilidad y especificidad de los ensayos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otras tecnologías de amplificación similares. En el método¹² PCR se preparan dos primeras secuencias que son complementarias a las regiones en las hebras complementarias opuestas de la secuencia diana. Se añade un exceso de desoxinucleósido trifosfatos en la mezcla de reacción con una ADN polimerasa termoestable (por ejemplo, Taq polimerasa). Si la secuencia diana está presente en una muestra, los cebadores se unirán a la diana y la polimerasa hará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia diana por adición de nucleótidos. Aumentando y disminuyendo la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos productos de la reacción se disociarán de las dianas para convertirse en nuevas dianas. El exceso de cebadores se unirá a la diana y a los productos de reacción y se repite el proceso.

Existen varios métodos para la detección multiplexada de ácidos nucleicos en células individuales, pero usualmente no combinan cuantificación con multiplexación masiva. La hibridación histoquímica semi-cuantitativa in situ (ISH) es una técnica que se usa para detectar la presencia y estimar la abundancia relativa de secuencias de ARN específicas en una célula^{13,14} simple. La visualización de la señal se consigue usualmente mediante sustratos cromogénicos o tinciones fluorocrómicas y no es fácilmente susceptible para multiplexación. Los citogenetistas han desarrollado también un método para la caracterización única cromosómica denominado hibridación in situ fluorescente (FISH)¹⁵⁻¹⁷, que usa ácidos nucleicos marcados fluorescentemente para visualizar secuencias complementarias por hibridación en ambas estructuras biológicas fijas y células vivas. El FISH de ARN ayuda a localizar el ARNm a su sitio de transcripción en un compartimento celular. El trabajo de Levsky y colaboradores¹⁸ empleando el microscopio fluorescente computacional avanzado y sondas de ADN oligomérico multiplexado ha demostrado la viabilidad de generar un perfil FISH simultáneo para once genes en el núcleo de células cultivadas in vitro. Además, utilizando la microscopía de video de lapso de tiempo es posible visualizar los sitios de transcripción de un array inducible, la síntesis de ARNm y de productos proteicos en células vivas¹⁹. Se ha sugerido la espectroscopia de Fourier basada en imágenes espectrales (Slm) para el análisis cuantitativo de especies²⁰ de ARN. Se detectaron cantidades relativas de ARN por hibridación para seis sondas de ADNc marcadas especialmente específicas para diferentes genes de tirosina quinasa y se analizaron imágenes espectrales usando espectros de referencia pregrabados y un programa de deconvolución. La hibridación in situ fluorescente cuantitativa (Q-FISH) en combinación con la citometría de flujo, llamado Flow-FISH, se ha aplicado también al estudio de la extensión telomérica en líneas celulares de leucemia usando condiciones optimizadas para análisis²¹ rápidos y rutinarios.

De este modo, el desarrollo de un sistema altamente sensible, cuantitativo y multiplexado para el análisis de la expresión génica y proteica en restos de células individuales sigue siendo una meta esquivada para la investigación y diagnóstico molecular. El análisis elemental, combinado con reactivos de objetivo específico tiene el potencial para lograr esta meta.

Las microesferas o perlas son una opción atractiva para soportar las superficies químicas de inmunoensayos. En una manera similar se pueden construir o añadir 96 pocillos, varias composiciones, capas o grupos conjugados para proporcionar la superficie química requerida. Una de las ventajas de las microesferas es la habilidad para incrementar el área de superficie de reacción por volumen o la mezcla de reacción, que proporciona medios fáciles para incrementar la capacidad y rango dinámico potencial de un inmunoensayo. En el siguiente ejemplo, se combinaron inmunoensayos con detección²² ICP-MS. La citometría de flujo desarrollada inicialmente por análisis celular multiparamétrico se usó también ampliamente para detectar antígenos y sondas de oligonucleótidos conjugadas con la superficie de microesferas²³.

La tecnología de microesferas convencional, basada en la detección de emisión de fluorocromo, se cree que es una gran promesa como herramienta para investigar ambas funciones genómica y proteómica. El análisis de partícula elemental de perlas marcadas especialmente está preparado para revolucionar los estudios de expresión génica, diagnósticos clínicos e investigación del cáncer. Las perlas de poliestireno con metales incrustados se recubren con una fina lámina de polisilano para prevenir la lixiviación elemental que se usa comúnmente vinculada en la fase de cromatografía. Las perlas de poliestireno se preparan según la polimerización de una emulsión convencional con estireno como monómero y persulfato potásico o peróxido de benzoilo como agentes de polimerización. Oligonucleótidos alelo-específicos (sondas complementarias) se inmovilizan covalentemente en la superficie. Las partículas pueden transportar 1 o más⁸ sondas de oligonucleótidos complementarias diferentes para los mismos genes. La hibridación se lleva a cabo con ARNm aislado o productos PCR de una muestra biológica (genes diana) al que se le añaden elementos etiquetados para la identificación diana. Las partículas se someten a análisis elemental de flujo, por ejemplo, flujo-ICP-MS una por una para identificar categorías de partícula y cuantificar el nivel de expresión génica. Las microesferas embebidas con un elemento (Eu) y derivadas con residuos carboxilo están disponibles por Seradyn Inc. y están ensayadas como prueba de su principio en experimentos de enseñanza del solicitante. Los requerimientos para una marcaje elemental son flexibles en comparación con aquellos para un marcaje fluorescente ya que la naturaleza química de un elemento no es importante para su detección por ICP-MS. Un fundamento del método requiere que los elementos marcados contengan un número reproducible y, preferiblemente largo de átomos de un isótopo dado. Una base para el análisis cuantitativo es la reproducibilidad en el número de átomos idénticos incorporados, y un incremento en el número de estos átomos mejora la sensibilidad linealmente.

Se puede usar un nuevo instrumento basado en el flujo ICP-MS para el perfil de la expresión génica de células individuales de leucemia por análisis elemental de partícula. Para esta propuesta se pueden detectar abundantes especies de ARNm mediante hibridación in situ. La multiplexación se puede conseguir marcando las sondas de oligonucleótidos con diferentes metales raros con elementos marcados que se pueden identificar especialmente mediante el instrumento ICP-MS. La sensibilidad de la detección de ARN se puede mejorar mediante el uso de tres a ocho sondas de oligonucleótidos por transcripción y cada sonda estar marcada con múltiples marcas de un elemento dado. Antes de los experimentos de multiplexación con varios genes, cada transcripción se hibrida separadamente para garantizar que el nivel de expresión es independiente de la multiplexación. Se estima que una célula individual expresa aproximadamente a 10.000 especies de ARNm con una cantidad total de ARN alrededor de 1-10 pg. Las transcripciones medias ricas oscilan desde 20 a 100 copias por célula, mientras que las altamente ricas más de 1000 copias de transcripciones de fusión en muestras de pacientes de leucemia. La comparación directa del perfil de ARN de una célula simple mediante flujo-ICP-MS con un análisis previamente realizado con microarrays puede servir para validar el nuevo método. La selección de genes de interés se puede realizar con la ayuda de bases de datos disponibles públicamente tales como NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>), Análisis Molecular Integrado de Genomas y su Expresión (de sus siglas en inglés, IMAGE) Consortium and The Institute for Genomic Research (<http://www.tigr.org>). Además, la hibridación in situ usando elementos marcados complementarios a oligonucleótidos y realizada con muestras de células homogéneas (cultivo de líneas celulares, muestras de pacientes con leucemia en crisis blástica) se puede analizar mediante ICP-MS de la solución para determinar el promedio del perfil de la expresión génica promediada en la totalidad de la muestra (la representación esquemática se da en la Figura 2A.).

Preparadas las sondas de hibridación de ADNc para algunos genes relevantes de leucemia (receptor G-CSF, Bax, Bcl-2, c-Fos, etc) se marcan con biotina que se puede obtener de fuentes comerciales (Maxium Biotech Inc., GeneDetect Inc.) y laboratorios de investigación. Se diseñan sondas de oligonucleótidos usando programas algorítmicos (comercial y públicamente disponibles) que seleccionan una secuencia con parámetros de hibridación óptimos que se conocen por los expertos en la técnica tal como la temperatura de fusión (Tm), contenido 50% G+C, medida deseada de la sonda. En el proceso de selección se realizó un ensayo para minimizar la formación de estructuras en horquilla y dímeros entre las sondas y disminuir el cruzamiento homólogo con otras secuencias diana. Los oligonucleótidos se pueden sintetizar mediante métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tales como los que están disponibles comercialmente en Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, se pueden sintetizar oligonucleótidos fosforotionato mediante el método de Stein et al²⁴. En la enseñanza del solicitante los oligonucleótidos carboxilo o amino alil-modificados se pueden adherir a elementos marcados o a soportes marcados especialmente, por ejemplo esferas, a través de la química funcional. La colocación de un grupo funcional en el 5' terminal de la hebra de ADN y empleando un reactivo adecuado para unir el ADN modificado a la superficie de soportes especialmente marcados, por ejemplo esferas, facilitarán la unión covalente de los ácidos nucleicos al los soportes. Por ejemplo, se puede usar la química para unir un amino marcado de ADN a partículas de carboxilo modificado, carbodiimida (EDC).

La invención como se define mediante las reivindicaciones, proporciona una mayor sensibilidad y precisión en la rapidez de análisis de cientos de miles de moléculas de ARNm. La invención proporciona además una eficiencia y precisión de detección mejorada de los niveles de expresión génica por exclusión del marcado fluorescente de ARNm dianas, al mismo tiempo que garantiza una medición cuantitativa y mayor rendimiento de los niveles de ARN en una muestra biológica. La invención como se define en las reivindicaciones, se puede usar también para detectar otros ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN genómico. Por ejemplo, una hebra de ADN simple se une a una etiqueta elemental en un extremo y la molécula entera se hibrida a un oligonucleótido complementario amarrado a un soporte especialmente marcado (por ejemplo una perla).

Compendio

Estas y otras características de las enseñanzas del solicitante se establecen en la presente memoria.

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. En más detalle, la presente invención proporciona un método para el análisis celular en una célula o partícula celular, en donde dicha célula es una célula entera de origen animal, vegetal, bacteriano, o fúngico, o una partícula celular de un cromosoma aislado, un núcleo aislado, un mitocondria aislada, un cloroplasto aislado, o un virus aislado, comprendiendo el método: (a) fijar y permeabilizar la célula o partícula celular; (b) incubar la célula o partícula celular en una solución de hibridación con una sonda de ácido nucleico específica para un ácido nucleico diana, donde la sonda marcada con una etiqueta elemental única tal que un tipo de dicha sonda marcada con un tipo de dicha etiqueta es distinguible de cualquier otro tipo de dicha sonda marcada con un tipo diferente de dicha etiqueta mediante análisis elemental que comprende ICP-MS; (c) separar la sonda no hibridada de la sonda hibridada al ácido nucleico diana mediante estrictas condiciones de lavado; y (d) analizar la célula o partícula celular mediante ICP-MS para identificar la sonda y cuantificar la sonda unida al ácido nucleico diana, en donde cada etiqueta elemental comprende una resto químico que incluye un átomo elemental o multitud de átomos elementales con uno o más isótopos unidos a una de estructura molecular de soporte, y en donde la etiqueta elemental comprende además unos medios de sujeción de dicha etiqueta al sustrato. También se describe en la presente memoria un método para análisis celular que comprende: (a) proporcionar una célula o una partícula celular; (b) fijar la célula o la partícula celular; (c) incubar la célula o la partícula celular en una solución de hibridación con una sonda específica para un ácido nucleico diana, la sonda marcada con un etiqueta

elemental única tal que un tipo de dicha sonda marcada con un tipo de dicha etiqueta es distinguible de cualquier otro tipo de dicha sonda marcada con un tipo diferente de dicha etiqueta mediante análisis elemental; (d) separar la sonda no hibridada de la sonda hibridada al ácido nucleico mediante estrictas condiciones de lavado; y (e) analizar la célula o partícula celular mediante análisis elemental para identificar la sonda y cuantificar la sonda unida al ácido nucleico diana. Se pueden hibridar dos o más sondas diferentes marcadas con diferentes etiquetas elementales para dos o más ácidos nucleicos diana. El ácido nucleico diana se puede seleccionar del grupo que consiste en moléculas de ácidos nucleicos intracelulares, ARN matriz, ARN micro, ARN precursor de la transcripción génica, ARN mensajero, ARN transportador, ARN ribosómico, ADN cromosómico, ADN mitocondrial, ADN cloroplástico, ADN viral, ARN viral, ADN bacteriano, ARN bacteriano, y ADN plasmídico. Los métodos comprenden además análisis simultáneos de superficie y/o moléculas proteínicas intracelulares, de superficie y/o moléculas lipídicas intracelulares, de superficie y/o moléculas polisacáridas intracelulares, y/o de superficie y/o moléculas pequeñas intracelulares. Las moléculas pequeñas se pueden seleccionar del grupo que consiste en vitaminas, hormonas, haptenos y nucleósidos (por ejemplo, ATP, ADP, AMP cíclico y NADH).

Además de lo anterior, la célula o partícula celular puede reaccionar con reactivos de afinidad específicos para moléculas de superficie o/y intracelulares, y los reactivos de afinidad están marcados con etiquetas elementales que comprenden una fracción química de una multitud de átomos de uno o más isótopos de uno o más elementos adheridos a una estructura molecular de soporte tal que un tipo de dicho reactivo de afinidad marcado con un tipo de dicha etiqueta es distinguible de cualquier otro tipo de dicha etiqueta mediante análisis elemental, y seguido de separación de los reactivos de afinidad no unidos de los reactivos de afinidad unidos. Las moléculas de superficie o/y intracelulares pueden ser proteínas, lípidos, polisacáridos y/o moléculas pequeñas. Los reactivos de afinidad se pueden seleccionar del grupo que consiste en anticuerpos, aptámeros, lectinas y moléculas pequeñas. La célula puede ser una célula entera de un animal, planta, bacteria, u hongo. La partícula celular se puede seleccionar del grupo que consiste en un cromosoma aislado, un núcleo aislado, una mitocondria aislada, un cloroplasto aislado, un virus aislado, y una bacteria aislada. La sonda se puede seleccionar del grupo que consiste en una sonda de oligonucleótidos, una molécula de ácido nucleico bloqueado (LNA), una molécula de un ácido nucleico peptídico (PNA), un ADN plasmídico, un ADN amplificado, un amplificado, un fragmento de ARN y un fragmento de ADN genómico.

También se describe en la presente memoria un método para el análisis homogéneo de moléculas biológicas, que comprende: (a) incubar moléculas biológicas con reactivos de afinidad marcados con etiquetas elementales y partículas especialmente marcadas tales que un tipo de dichas partículas marcadas con un tipo de dichas etiquetas es distinguible de cualquier otro tipo de dicha partícula marcada con un tipo diferente de dichas etiquetas por análisis elemental, en condiciones que permiten a los reactivos de afinidad unirse con las moléculas biológicas; (b) separar las partículas con moléculas biológicas unidas de las partículas no unidas; (c) medir las partículas unidas mediante análisis elemental de partícula en donde las partículas están dispersas en un líquido para medir cuantitativamente la composición atómica e isotópica de partículas individuales, con lo que se detectan los tipos y los números de moléculas biológicas unidas a dichas partículas. Las partículas pueden ser perlas. Las moléculas biológicas pueden ser de una muestra de tejido celular. La muestra se puede seleccionar del grupo que consiste en una muestra de un animal, una muestra de una planta, una muestra bacteriana, y una muestra fúngica. Las moléculas biológicas se pueden seleccionar del grupo que consiste en ARNm, proteína, lípidos, polisacáridos y moléculas pequeñas. La unión de moléculas biológicas con reactivos de afinidad pueden comprender la hibridación de moléculas de ARNm con oligonucleótidos adheridos a microesferas especialmente etiquetadas. Los oligonucleótidos pueden comprender un número de nucleósidos de desoxitimidina trifosfato y sondas de ácidos nucleicos complementarios unidos a microesferas especialmente etiquetadas. Las sondas de ácido nucleico complementario se pueden seleccionar del grupo que consiste en oligonucleótidos, LNA, PNA y ADN plasmídico. Las moléculas biológicas se pueden seleccionar del grupo que consiste en proteínas, lípidos, polisacáridos y moléculas pequeñas y se unen con reactivos de afinidad elementales marcados unidos a microesferas especialmente etiquetadas. Los reactivos de afinidad se pueden seleccionar del grupo que consiste en anticuerpos, aptámeros, y lectinas, ácidos nucleicos, péptidos de unión, receptores proteicos, y fosfolípidos.

También se describe en la presente memoria un kit para la detección y medición de un elemento en una muestra, donde el elemento medido es una etiqueta elemental unida a una sonda específica complementaria para un ácido nucleico de interés, que comprende: (a) una etiqueta elemental para etiquetar directamente una sonda complementaria; y (b) una sonda complementaria. El kit puede comprender además instrucciones para i) el etiquetado directo de la sonda con la etiqueta elemental; ii) fijar y permeabilizar una célula o partícula celular; iii) incubar la célula o partícula celular con la sonda etiquetada con el elemento en una solución de hibridación; iv) separar la sonda unida de la sonda no unida; v) disolver la célula o partícula celular con material hibridado, y vi) detectar y medir la sonda con el etiquetada con el elemento. La detección y medición se puede hacer por análisis elemental del volumen o análisis elemental de partícula.

También se describe en la presente memoria un kit para la detección y medición de un elemento en una muestra, donde el elemento medido es una etiqueta elemental fijada a una sonda específica complementaria a un ácido nucleico de interés, que comprende: (a) una sonda complementaria etiquetada con una etiqueta elemental. El kit puede comprender además instrucciones para i) fijar y permeabilizar una célula o partícula celular; ii) incubar la célula o partícula celular con la sonda etiquetada con el elemento en una solución de hibridación; iii) separar la

sonda unida de la sonda no unida; iv) disolver la célula o partícula celular con material hibridado, y v) detectar y medir la sonda del etiquetada con el elemento.

Los kits descritos anteriormente pueden comprender además una multitud de sondas específicas complementarias a una multitud de ácidos nucleicos y una multitud de etiquetas elementales únicas para cada tipo de sonda especialmente etiquetada. Los kits descritos anteriormente pueden comprender además (a) un reactivo de afinidad para una molécula biológica intra o extracelular seleccionada del grupo que consiste en una proteína, un lípido, un polisacárido, y una molécula pequeña; y (b) una etiqueta elemental para marcar el reactivo de afinidad para la molécula biológica. Los kits pueden comprender instrucciones para (i) etiquetar el reactivo de afinidad para la molécula biológica, (ii) incubar la célula o partícula celular con el reactivo de afinidad para la molécula biológica; (iii) separar el reactivo de afinidad unido para la molécula biológica del reactivo no unido para la molécula biológica; y (iv) detectar y medir el reactivo unido para la molécula biológica. Finalmente, los kits pueden comprender una multitud de reactivos específicos para una multitud de moléculas biológicas y una multitud de etiquetas elementales para marcar especialmente cada tipo de reactivo de afinidad para cada tipo de molécula biológica.

También se describe en la presente memoria un kit para la detección y medición de un elemento, donde el elemento medido es una etiqueta elemental unida a un oligo(dT)_n que está unido a partículas marcadas con un elemento distinguible, que comprende: (a) una etiqueta elemental para etiquetar directamente el oligo(dT)_n; (b) oligo(dT)_n; (c) una multitud de partículas marcadas con elementos distinguibles; y (d) una multitud de sondas complementarias. El kit puede comprender además instrucciones para i) unir directamente la multitud de sondas complementarias para partículas marcadas con elementos distinguibles; ii) realizar la purificación del ácido nucleico; iii) unir del elemento marcado al oligo(dT)_n; iv) hacer reaccionar las sondas complementarias con el elemento marcado oligo(dT)_n; v) hibridar las sondas complementarias adheridas al elemento marcado oligo(dT)_n que están adheridas a partículas con elementos marcados distinguibles en una solución con un ácido nucleico diana; vi) separar partículas unidas de las partículas no unidas; vii) detectar y medir las partículas unidas mediante análisis elemental de partículas. Las partículas pueden ser esferas. La multitud de sondas complementarias se pueden marcar directamente con elementos marcados distinguibles.

También se describe en la presente memoria un kit para la detección y medición de un elemento, donde el elemento medido es un elemento marcado unido a un oligo(dT) que está unido a partículas marcadas con un elemento distinguible, que comprende: (a) un elemento marcado para marcar directamente el oligo(dT)_n; (b) oligo(dT)_n; (c) una multitud de sondas complementarias adheridas a una multitud de partículas marcadas con un elemento distinguible. El kit puede comprender además instrucciones para i) realizar la purificación del ácido nucleico; ii) unir la etiqueta elemental al oligo(dT)_n; iii) hacer reaccionar las sondas complementarias con el oligo(dT)_n etiquetado con el elemento; iv) hibridar las sondas complementarias unidas al oligo(dT)_n etiquetado con el elemento que están unidas a partículas con etiquetas elementales distinguibles en una solución con un ácido nucleico diana; v) separar las partículas unidas de las partículas no unidas; vi) detectar y medir las partículas unidas mediante análisis elemental de partículas.

También se describe en la presente memoria un kit para la detección y medición de un elemento, donde el elemento medido es una etiqueta elemental unida a un oligo(dT)_n y elementos de partículas marcadas especialmente unidas a una sonda complementaria, que comprende: (a) un oligo(dT)_n marcado con una etiqueta elemental; y (b) una multitud de sondas complementarias adheridas a una multitud de partículas especialmente marcadas. El kit comprende además instrucciones para i) realizar la purificación del ácido nucleico; ii) hibridar las sondas complementarias unidas a partículas especialmente marcadas con ácido nucleico purificado; iii) hacer reaccionar partículas especialmente marcadas con el oligo(dT)_n marcado con metal; iv) separar las partículas unidas de las partículas no unidas; v) detectar y medir los elementos de las partículas unidas mediante análisis elemental de partículas.

La partícula se puede sustituir por un soporte sólido. Por ejemplo el soporte podría ser una placa plana (por ejemplo vidrio o plástico), un pocillo, una sonda (insertada dentro de la muestra) u otro material sólido. En este caso, la superficie sólida no tiene que estar necesariamente marcada con elemento, ya que la posición (en la placa o pocillo) podría indicar la identidad de la sonda complementaria que está unida a ella. Las instrucciones serían similares a los apartados (i) a v) descritos anteriormente, pero en este caso sólo se mide el elemento unido al oligo(dT)_n.

Los kits descritos anteriormente pueden comprender además reactivos y dispositivos que se seleccionan del grupo que consiste en soluciones de disociación, columnas giratorias con membranas de unión a ácido nucleico, columna de purificación para aislamiento y purificación de ácidos nucleicos de muestras biológicas, reactivos y soluciones para amplificación de ácidos nucleicos purificados, patrones, tampón diluyente, tampón de disociación, tampón de lavado, tampón de hibridación y tampón de ensayo. Los ácidos nucleicos endógenos se pueden amplificar in situ en células morfológicamente intactas. El elemento se puede medir utilizando un espectrómetro de masas. El elemento puede ser un isótopo o ión. El elemento se puede seleccionar del grupo que consiste en elementos de transición, metales nobles, lantánidos, elementos de tierras raras, oro, plata, platino, rodio, iridio y paladio. El elemento puede incluir más de un elemento y/o más de un isótopo y/o más de un átomo de un isótopo. Los productos de afinidad se pueden seleccionar del grupo que consiste en un anticuerpo, Fab, aptámero, antígeno, hormona, factor de crecimiento, receptor, proteína y ácido nucleico. Los kits también pueden incluir la instrucción para el análisis elemental de partículas.

Breve descripción de las figuras

La persona experta en la técnica entenderá que las figuras, descritas a continuación, son sólo para fines ilustrativos. Las figuras no pretenden limitar el alcance de las enseñanzas del solicitante de ninguna manera. La invención se ilustra en las figuras, que entiende que son ilustrativas y no limitantes.

- 5 Figura 1. (A) Hibridación in situ y detección por citometría de flujo de ARNr 28S usando oligonucleótidos antisentido biotinilados ("oligos") en tres condiciones diferentes. (1) – corresponde al control negativo de células hibridadas con un oligonucleótido biotinilado sin-sentido ("oligo"), (2) – células fijadas con un 4% de paraformaldehído durante 15 minutos, seguido por Proteinasa K (5U/ml) durante 15 minutos a temperatura ambiente e hibridado con oligo ARNr 28S; (3) – células tratadas con un 4% de paraformaldehído durante 15 minutos y Proteinasa K (5U/ml) durante 15 minutos a 37°C e hibridado con oligo ARNr 28S; (4) – células fijadas con un 4% de paraformaldehído durante 15 minutos, seguido por un 0,3% de Triton-X100, seguido de Proteinasa K (5U/ml) durante 15 minutos a 37°C e hibridado con oligo ARNr 28S. Las condiciones indicadas por (4) se eligieron para experimentos relacionados. (B) Comparación de la hibridación in situ de ARNr 28S analizado mediante citometría de flujo (gráfico izquierdo) e ICP-MS (gráfico derecho).
- 10
- 15 Figura 2. BCR/Abl (del inglés, Break point cluster región/Abelson leukemia) análisis de la expresión génica en células de leucemia mediante ICP-MS. (A) Esquema de la hibridación in situ de células fijadas/permeabilizadas con una sonda de oligonucleótidos biotinilada para el gen de fusión BCR/Abl. La biotina se identifica mediante estreptavidina (StrAv) marcada con terbio (Tb). El sedimento celular se disuelve en HCL y se analiza por análisis elemental ICP-MS de la solución. (B) Resultados experimentales para células KG-1a (gráfica izquierda) y células K562 (gráfica derecha), hibridada con BCR/Abl antisentido, ARNr 28S (control positivo) y sondas oligo sin-sentido (B/A) y sin sonda (control); se restaron los valores de fondo y de respuesta a la sonda sin-sentido. Las muestras se realizaron por triplicado. Los datos se presentan como la razón normalizada de terbio (Tb) a iridio (Ir) en señal estándar interna.
- 20
- 25 Figura 3. Análisis de la expresión génica del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en células de carcinoma adherente por ICP-MS. Las células A431 se hibridaron con sondas génicas específicas para EGFR, ciclina-D, ARNr 28S (control positivo) y control negativo sin-sentido, B/A. (B/A es un oligo aleatorio usado con el nombre aleatorio de control negativo). Las muestras se hicieron correr por triplicado. Los datos se presentan como la razón normalizada de señal de patrón interno terbio (Tb) a iridio (Ir).
- 30 Figura 4. Análisis simultáneo de la expresión génica y proteica en células de leucemia K562 mediante ICP-MS. (A) Hibridación in situ con ARNr 28S y sondas oligo sin-sentido (B/A); (B) inmunomarcado de proteína BCR/Abl y valores de IgG de control negativo durante la hibridación. Las muestras se hicieron correr por triplicado. Los datos se presentan como la razón normalizada de señal de patrón interno europeo (Eu) o terbio (Tb) a iridio (Ir).
- 35 Figura 5. Diagrama de flujo de trabajo para el análisis de hibridación in situ y de la expresión génica por ICP-MS.
- Figura 6. Diagrama de flujo de trabajo para el análisis de la expresión génica de una perla marcada con un elemento mediante análisis elemental de partículas.
- Figura 7. Diagrama de flujo de trabajo para la expresión génica y proteica simultánea mediante análisis ICP-MS.

Descripción de varias realizaciones

- 40 La presente divulgación comprende el uso de etiquetas elementales. La elección del elemento a emplear en los métodos de las enseñanzas del solicitante se selecciona preferiblemente basándose en su abundancia natural en la muestra objeto de investigación y de si es tóxico para la muestra objeto de investigación.

- 45 Se prevén para su uso en la enseñanza del solicitante muchos metales de los grupos de transición y tierras raras. Conviene elegir elementos que tengan baja o nula citotoxicidad y tengan una baja abundancia en el medio de crecimiento y en las muestras biológicas. Por ejemplo, vanadio y mercurio pueden ser tóxicos para ciertas células, mientras que Fe, Cu, y Zn se pueden presentar en mayores concentraciones en algunas células del medio de cultivo. Por otro lado, Pr, Ho, Tb, La, por ejemplo, son normalmente bien tolerados por células mamíferas y no abundan en el medio ambiente.

- 50 Se puede usar una composición inusual de isótopos del elemento etiquetado para distinguir entre elementos presentes naturalmente en la muestra y el material de la etiqueta. Es una ventaja si la abundancia relativa de los elementos etiquetados es suficientemente diferente de la abundancia relativa de los elementos en una muestra dada objeto de análisis. Por "suficientemente diferente" significa que bajo los métodos de la presente invención es posible detectar la etiqueta elemental diana sobre los elementos de fondo incluidos en la muestra objeto de análisis. De hecho, es la diferencia en las razones inter-elementales de los elementos etiquetados y la matriz de la muestra que se puede usar ventajosamente para analizar la muestra.

- 55 Es viable seleccionar etiquetas elementales, que no produzcan señales de interferencia durante el análisis (por ejemplo, que no den superposición de señales por tener las mismas masas). Por lo tanto, se pueden realizar dos o

más determinaciones analíticas simultáneamente en una muestra. Además, debido a que la etiqueta elemental puede contener muchas copias de los mismos átomos, la señal medida se puede amplificar enormemente.

Los aspectos de las enseñanzas del solicitante se pueden comprender además a la luz de los siguientes ejemplos, que no deberían interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de las presentes enseñanzas.

5 Experimento 1

En una realización, en donde el diagrama de flujo de trabajo se presenta en la Figura 5, la hibridación in situ para la detección por ICP-MS se realiza tratando primero el tejido o muestra celular de tal manera que dé ácidos nucleicos cromosómicos y extracromosómicos diana disponibles para la hibridación a sondas complementarias (fijación/permeabilización); después se expone la muestra a una sonda o múltiples sondas marcadas con diferentes
10 etiquetas elementales y complementarias a genes de interés; en tercer lugar, se lava la muestra para eliminar el exceso de sonda no unida y que no interacciona específicamente; finalmente la muestra se somete a análisis elemental de partículas o de solución.

Experimento 2

Para el análisis génico de una perla marcada con un elemento mediante ICP-MS (diagrama de flujo de trabajo mostrado en la Figura 6), se aisló ARN total a partir de una muestra biológica y se hibridó con esferas especialmente
15 marcadas conjugadas a sondas de oligonucleótidos; la sonda oligo(dT)20 etiquetada con el elemento; se añaden a la mezcla; finalmente, las perlas se someten a un análisis ICP-MS de partículas simples.

Se aisló el ARN total a partir de una muestra dada usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el método de extracción ácida en guanidinio-fenol-coloroformo o se puede usar un reactivo comercial tal como Reactivo TRIzol GIBCOL Life Technologies) para el aislamiento de ARN a partir de un tejido de mamífero. Adicionalmente, el ARN mensajero se puede aislar por cromatografía en columna de oligo dT o mediante el uso de
20 perlas magnéticas (dT)n (véase, por ejemplo, Sambrook et al.²⁵, F. Ausubel et al.²⁶). Convenientemente, el ARN total se puede aislar a partir de células mamíferas usando un kit de aislamiento de ARN Total RNeasy, por ejemplo (QIAGEN). Puede ser beneficioso una segunda limpieza después del paso de precipitación de etanol en la extracción TRIzol usando el kit de aislamiento de ARN total RNesay. Se puede requerir una segunda ronda de amplificación de ARN (Kit Ambion). Será apreciado por un experto en la técnica que esto proporciona una reserva antisentido (ARNa). Cuando se usa ARN anti-sentido como un ácido nucleico diana, se eligen sondas de oligonucleótidos que sean complementarias a subsecuencias de los ácidos nucleicos anti-sentido. En cambio,
25 cuando la reserva de ácido nucleico diana es una reserva de ácidos nucleicos sentido, se seleccionan sondas de oligonucleótidos que sean complementarias a subsecuencias de ácidos nucleicos sentido. Finalmente, cuando la reserva de ácido nucleico es de doble hebra, las sondas pueden ser tanto sentido o anti-sentido ya que los ácidos nucleicos diana incluyen ambas hebras sentido o anti-sentido.

Los controles en el nivel de expresión son sondas que hibridan específicamente con genes expresados constitutivamente en la muestra biológica y que se usan para la normalización. Prácticamente cualquier gen
35 expresado constitutivamente proporciona una diana adecuada para los controles del nivel de expresión. Típicamente las sondas de control del nivel de expresión tienen secuencias complementarias a subsecuencias de "genes constitutivos" expresados constitutivamente que incluyen, pero no se limitan al gen de beta-actina, el gen receptor de transferencia, el gen GAPDH, HPRT, CPB, G6PD, ARNr 28S y similares.

El método descrito en la presente memoria se puede usar para la detección de ácido nucleico, junto con la detección de proteína para la identificación de bacterias, ciencia forense, y análisis de la expresión génica y proteica
40 simultánea.

El método puede usar también un soporte conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo un portaobjetos, placa o pocillo, en lugar de las esferas o las partículas.

En una variación de este método, las moléculas biológicas (por ejemplo, pero no limitadas a, proteínas, lípidos, polisacáridos), moléculas pequeñas de unión específica (por ejemplo, pero no limitadas a, fármacos, hormonas, feromonas, azúcares) que se marcan con etiquetas elementales que se unen a soportes especialmente etiquetados
45 recubiertos con "reactivos de afinidad" frente a moléculas biológicas. Los soportes se analizan después mediante análisis elemental para identificar la reacción de dichas moléculas biológicas con las moléculas pequeñas (por ejemplo, como un receptor de unión a un factor de crecimiento). En este caso, las moléculas pequeñas están etiquetadas directamente y el reconocimiento de los análisis de moléculas pequeñas es en virtud de su unión, a través de un reactivo de afinidad a una perla marcada con un elemento, y la concomitancia de la firma elemental de la perla con la firma de la etiqueta de la molécula pequeña confirma y cuantifica la molécula pequeña.
50

Experimento 3

En otra realización, las primeras series de ejemplos se realizaron usando la instrumentación convencional ICP-MS como detector y reactivos de afinidad comerciales que contienen metales (lantánidos). Se entiende que se pueden
55 usar otros de metales y que se puede usar otra instrumentación para análisis elemental. Se usaron experimentos

que emplean sondas de oligonucleótidos biotinilados anti-sentido diseñados para hibridarse in situ a genes específicos de enfermedades relevantes en células de leucemia humanas. Las sondas se identificaron mediante asociación con estreptavidina marcada con lantánido (véase la Figura 2A).

La viabilidad de realizar la hibridación in situ con detección ICP-MS se ensayó sobre un modelo de una línea celular de leucemia humana y los resultados se compararon por citometría de flujo como se muestra en la Figura 1. Los experimentos se llevaron a cabo para definir las condiciones de fijación y permeabilización óptimas y los parámetros de hibridación in situ para células en suspensión que se usaron posteriormente para el análisis de la expresión génica por ICP-MS. Las células KG-1A se fijaron como se indica en la Figura 1 (leyenda) y después se incubaron en solución de hibridación con 500 ng/ml de sonda de ARNr 28S biotinilada (5'-biotina- ATCCAACGCTTGGTGAATTC-3', ARNr ribosómico 28S humano GI:337381) o una sonda biotinilada anti-sentido (B/A; control negativo). Después de lavar y bloquear, se añadió estreptavidina-PerCP (estreptavidina marcada con proteína peridina clorofila). La Figura 1A muestra los histogramas de la intensidad de la fluorescencia obtenida en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). La Figura 1B muestra un volumen de análisis por ICP-MS: las células hibridadas reaccionaron con estreptavidina-Tb (DELFI), se lavaron y se disolvieron en HCl concentrado con 1ppb de Ir (patrón de iridio interno). Hay una clara señal de hibridación para ARNr 28S humano detectada mediante citometría de flujo (FCM) e ICP-MS. Así, usando reactivos de afinidad secundarios marcados con metal (estreptavidina-Tb) se establecieron las condiciones experimentales para identificar satisfactoriamente las abundantes transcripciones constitutivas en células de leucemia mediante ICP-MS.

Experimento 4

La siguiente realización demuestra que la hibridación in situ con detección ICP-MS es lo suficientemente sensible para detectar moderadamente la abundancia de especies de genes específicos para leucemia. Para este objetivo se usaron una línea celular de leucemia mieloide crónica humana (K562), que es conocida por expresar la quinasa oncogénica BCR/Abl codificada por el gen b3a2, y oligonucleótidos anti sentido. En la Figura 2A se muestra un esquema para el experimento. Comparamos la expresión de la fusión del gen b3a2 en células K562 y en células KG-1A (modelo de línea celular de leucemia mieloide aguda; no expresa la transcripción BCR/Abl) usando una sonda antisentido específica 5'-BCR/Abl biotinilada (BCR/ABL), una sonda 5'-ARNr 28S biotinilada (control positivo) y una sonda biotinilada anti-sentido (B/A). Las células se fijaron y se permeabilizaron como se describe en la Figura 1, después de separar las muestras celulares se incubaron en una solución de hibridación que contiene tanto sondas BCR/Abl biotinilada, ARNr 28S, anti-sentido, o sin sondas. Después de lavar y bloquear se añadió estreptavidina-Tb. Se realizó el análisis por análisis elemental de la solución donde las células marcadas se disolvieron en HCl/Ir y la muestra entera (células 0,3e6 KG1a y células 3e6 KG562 por muestra) se sometieron a análisis elemental por instrumentación convencional ICP-MS. Los resultados se presentan en la Figura 2B. El gráfico de la izquierda demuestra que mientras el nivel de ARNr 28S en células KG-1a es muy alto, la señal de la sonda BCR/Abl está a los niveles de las respuestas de la anti-sentido (B/A) y la de control negativo (ctrl). Por otro lado, las células K562 (gráfico derecho de la Figura 2B) se hibridan fuertemente con la sonda BCR/Abl, aproximadamente 14 veces menos que con ARNr 28S. Así, ICP-MS detecta de forma fiable los niveles del gen BCR/Abl en las células K562.

Experimento 5

En otra realización se realizó un experimento de hibridación in situ usando células adherentes A431 de carcinoma epidérmico humano. Estas células son conocidas por sobreexpresar el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Las células se sembraron dentro de un cultivo tisular en 96 placas multipocillos y se les dejó adherir y proliferar durante dos días (~75e3 células por pocillo). Las células se fijaron y permeabilizaron según el método (4) en la leyenda de la Figura 1; se lavaron e hibridaron con sondas de oligonucleótidos antisentido 5'-marcadas con biotina; ARNr 28S, EGFR, ciclina-D y B/A en los pocillos. Se estableció la triplicación de los pocillos para cada sonda. Las sondas reaccionaron con estreptavidina-Tb. Después de lavar, las células se disolvieron en HCl/Ir y se analizaron mediante solución ICP-MS. Como es evidente a partir de la Figura 3, las células A431 expresaron una mayor cantidad de EGFR en el ARNm, con niveles sustancialmente menores que los de ciclina-D (no proliferaron todas las células) y que muestra una respuesta robusta para la sonda positiva, ARNr 28S.

Experimento 6

El siguiente experimento ilustra la capacidad única de las enseñanzas del solicitante para detectar simultáneamente la expresión génica y proteica en las mismas células (véase la Figura 7). Se usaron para este objetivo el modelo de línea celular K562, que expresa altos niveles de proteína p210 BCR/Abl. Los anticuerpos que reconocen primero la proteína BCR/Abl (Cell Signalling Technol., Inc) o al isótopo control de IgG se aplicaron a las células fijadas y permeabilizadas en solución PermFlow (Invirion, Inc.). Las células se lavaron después con PBS y reaccionaron con el conjugado anti-conejo-Eu (DELFI, Perkin Elmer) (véase la Figura 4B). Tras el marcaje de las células inmunológicas se prehibridaron con DAKO en una solución de Hibridación In Situ (DAKO, Inc.) e hibridaron con la sonda antisentido de ARNr ribosómico 5'-biotinilada-28S o con la sonda sin-sentido B/A 5'-biotinilada así como la de control negativo durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron estrictos lavados con 4xSSC, 2xSSC, 0,2xSSC y PBS para minimizar la hibridación no-específica. Finalmente, las células se incubaron con estreptavidina-Tb conjugada (DELFI) y se disolvieron en HCl/Ir (Figura 4A). Como es evidente al comparar la Figura 4A y la Figura 4B, las células se tiñeron para la expresión de la proteína BCR/Abl (Eu) y demostraron una expresión génica

ribosomal (Tb) que daba señales significativamente mayores que las células que teñían para el control de IgG y la sonda B/A.

Kits:

5 También están descritos en la presente memoria los kits que comprenden los componentes para practicar los métodos descritos en la presente memoria.

10 Por ejemplo, se proporciona un kit para la detección y medición de un elemento en una muestra, donde el elemento medido es una etiqueta elemental unida a una sonda específica complementaria para un ácido nucleico de interés, que comprende: (a) una etiqueta elemental para el marcaje directo de una sonda complementaria; y (b) una sonda complementaria. El kit puede comprender además instrucciones para i) el marcaje directo de la sonda con la etiqueta elemental; ii) fijar y permeabilizar una célula o partícula celular; iii) incubar la célula o la partícula celular con la sonda marcada con el elemento en una solución de hibridación; iv) separar la sonda unida de la sonda no unida; v) disolver la célula o partícula celular con el material hibridado; y vi) detectar y medir la sonda marcada con el elemento. La detección y medición se puede hacer por análisis elemental de la solución o por análisis elemental de partículas.

15 Se proporciona también un kit para la detección y medición de un elemento en una muestra, donde el elemento medido es una etiqueta elemental unida a una sonda complementaria específica para un ácido nucleico de interés, que comprende: (a) una sonda complementaria marcada con un elemento marcado. El kit puede comprender instrucciones para i) fijar y permeabilizar una célula o partícula celular; ii) incubar la célula o partícula celular con la sonda con la etiqueta elemental en una solución de hibridación; iii) separar la sonda unida de la sonda no unida; iv) disolver la célula o partícula celular con material hibridado, y v) detectar y medir la sonda marcada con el elemento.

25 Los kits descritos anteriormente pueden comprender además una multitud de sondas complementarias específicas de ácidos nucleicos para una multitud de etiquetas elementales únicas para marcar especialmente cada tipo de sonda. Los kits descritos anteriormente pueden comprender además (a) un reactivo de afinidad para una molécula biológica intra o extracelular seleccionada del grupo que consiste en una proteína, un lípido, un polisacárido y una molécula pequeña; y (b) una etiqueta elemental para marcar el reactivo de afinidad para la molécula biológica. Los kits pueden comprender instrucciones para (i) etiquetar el reactivo de afinidad para la molécula biológica, (ii) incubar la célula o partícula celular con el reactivo de afinidad para la molécula biológica; (iii) separar el reactivo de afinidad unido a la molécula biológica del reactivo no unido a la molécula biológica; y (iv) detectar y medir el reactivo unido a la molécula biológica. Finalmente, los kits pueden comprender una multitud de reactivos específicos para una multitud de moléculas biológicas y una multitud de elementos marcados para el marcaje único de cada tipo de reactivo de afinidad para cada tipo de molécula biológica.

35 Se proporciona otro kit para la detección y medición de un elemento, donde el elemento medido es una etiqueta elemental unida a un oligo(dT)n y a elementos de partículas marcadas especialmente, que comprenden: (a) un elemento marcado para marcar directamente el oligo(dT)n; (b) oligo(dT)n; (c) una multitud de partículas marcadas especialmente; y (d) una multitud de sondas complementarias. El kit puede comprender además instrucciones para i) unir directamente la multitud de sondas complementarias a partículas especialmente marcadas; ii) realizar la purificación del ácido nucleico; (iii) unir la etiqueta elemental al oligo(dT)n; iv) hibridar las sondas complementarias unidas a partículas especialmente marcadas con ácido nucleico purificado; iii) hacer reaccionar partículas especialmente marcadas con el oligo(dT)n etiquetado con metal; iv) separar las partículas unidas de las partículas no unidas; v) detectar y medir los elementos de las partículas unidas mediante análisis elemental de partículas. Las partículas pueden ser perlas. En otro aspecto, la partícula puede reemplazarse por un soporte sólido. El soporte puede ser por ejemplo una placa plana (por ejemplo vidrio o plástico), placa de pocillo, una sonda (insertada dentro de la muestra) u otro material sólido. En este caso, la superficie sólida no tiene necesariamente que tener la etiqueta elemental, ya que la posición (en el plato o placa de pocillo) podría indicar la identidad de la sonda complementaria que está adherida a ella. Las instrucciones serán similares a los apartados de la (i) a la (v) descritas anteriormente, pero en este caso sólo se mide el elemento adherido al oligo(dT)n.

45 Se proporciona otro kit para la detección y medición de un elemento, donde el elemento medido es una etiqueta elemental unida al oligo(dT)n que está unido a partículas marcadas con un elemento distinguible, que comprende: (a) una etiqueta elemental para etiquetar directamente el oligo(dT)n; (b) oligo(dT)n; y (c) una multitud de sondas complementarias unidas a una multitud de partículas marcadas con un elemento distinguible. El kit puede comprender además instrucciones para (i) realizar la purificación del ácido nucleico; (ii) unir la etiqueta elemental al oligo(dT)n; (iii) hacer reaccionar las sondas complementarias con el oligo(dT)n etiquetado con el elemento; (iv) hibridar las sondas complementarias unidas al oligo(dT)n etiquetado con el elemento que está adherido a partículas marcadas con elementos distinguibles en una solución con un ácido nucleico diana; v) separar partículas unidas de las partículas no unidas; vi) detectar y medir las partículas unidas mediante análisis elemental de partículas.

En otro aspecto, la partícula puede reemplazarse por un soporte sólido. El soporte puede ser, por ejemplo, una placa plana (por ejemplo vidrio o plástico), placa de pocillos, una sonda (insertada dentro de la muestra) u otro material sólido. En este caso, la superficie sólida no tiene necesariamente que tener la etiqueta elemental, ya que la posición

(en el plato o placa de pocillo) podría indicar la identidad de la sonda complementaria que está unida a ella. Las instrucciones serán similares a los apartados de (i) a (v) descritos anteriormente, pero en este caso sólo se mide el elemento unido al oligo(dT)_n

- 5 Los kits descritos anteriormente pueden comprender además reactivos y dispositivos que se seleccionan del grupo que consiste en soluciones de disociación, columnas giratorias con membranas de unión a ácido nucleico, columna de purificación para aislamiento y purificación de ácidos nucleicos de muestras biológicas, reactivos y soluciones para amplificación de ácidos nucleicos purificados, patrones, tampón diluyente, tampón de disociación, tampón de lavado, tampón de hibridación y tampón de ensayo. Los ácidos nucleicos endógenos se pueden amplificar in situ en células morfológicamente intactas. El elemento se puede medir utilizando un espectrómetro de masas. El elemento puede ser un isótopo o ión. El elemento se puede seleccionar del grupo que consiste en elementos de transición, metales nobles, lantánidos, elementos de tierras raras, oro, plata, platino, rodio, iridio y paladio. El elemento puede incluir más de un elemento y/o más de un isótopo y/o más de un átomo de un isótopo. Los productos de afinidad se pueden seleccionar del grupo que consiste en un anticuerpo, Fab, aptámero, antígeno, hormona, factor de crecimiento, receptor, proteína y ácido nucleico. Los kits también pueden incluir la instrucción para el análisis elemental de partículas.
- 10
- 15

Los kits pueden comprender los siguientes componentes:

- (a) reactivos para amplificación in situ
- (b) reactivos y dispositivos para la purificación de ácido nucleico
- (c) tampón de hibridación in situ
- 20 (d) solución de fijación y permeabilización
- (e) solución de lavado
- (f) reactivo de disolución

Las enseñanzas del solicitante proporcionan los métodos divulgados anteriormente. Los métodos permiten:

- (a) la multiplexación
- 25 (b) el análisis simultáneo de la expresión génica y proteica
- (c) métodos con o sin etapas de amplificación
- (d) análisis de bajo coste sin enzimas polimerasa caras
- (e) el análisis genético en una sola célula
- (f) la cuantificación absoluta de la expresión génica

30

LISTA DE REFERENCIAS

- 5 1. Lockhart, D. J., Chee, M., Gunderson, K., Lai, C., Wodicka, L., Cronin, M. T., Lee, D., Tran, H. M., Matsuzaki, H., Gall, G. H., Barone, A. D., Mcgall, G. H., Chaoqiang, L., y Lee, D. H. Identifying differences in nucleic acid levels between samples - using arrays comprising probe oligo:nucleotide(s) which can form hybrid duplexes with nucleic acids in the samples. AFFYMETRIX INC, Lockhart, D. J., Chee, M., Gunderson, K., Lai, C., Wodicka, L., Cronin, M. T., Lee, D. H., Tran, H. M., Matsuzaki, H., Mcgall, G. H., y Barone, A. D. [EP880598-A; WO9727317-A; WO9727317-A1; AU9722533-A; EP880598-A1; US6344316-B1; JP2002515738-W; US2003064364-A1; US6858711-B2; US2005158772-A1; US2005191646-A1].
- 10 2. Pease, A. C.; Solas, D.; Sullivan, E. J.; Cronin, M. T.; Holmes, C. P.; Fodor, S. P. A. Light-Generated Oligonucleotide Arrays for Rapid Dna-Sequence Analysis Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1994, 91, 5022-26.
- 15 3. Guo, Z.; Guilfoyle, R. A.; Thiel, A. J.; Wang, R.; Smith, L. M. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports Nucleic Acids Res. 1994, 22, 5456-65.
- 15 4. Gravitt, P. E.; Peyton, C. L.; Apple, R. J.; Wheeler, C. M. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method Journal of Clinical Microbiology 1998, 36, 3020-27.
- 20 5. Rosenberg, M., Debouck, C., y Bergsma, D. Methods and compsns. for identifying genes which are differentially expressed - in a normal healthy animal and an animal having a selected disease or infection. SMITHKLINE BEECHAM CORP. [WO9521944-A; EP743989-A; EP743989-A4; WO9521944-A1; EP743989-A1; JP9508800-W].
- 20 6. Lipshutz, R. J.; Fodor, S. P.; Gingeras, T. R.; Lockhart, D. J. High density synthetic oligonucleotide arrays Nat. Genet. 1999, 21, 20-24.
- 25 7. Churchill, G. A. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays Nat. Genet. 2002, 32 Suppl, 490-95.
- 25 8. Churchill, G. A. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays Nat. Genet. 2002, 32 Suppl, 490-95.
- 25 9. Weeraratna, A. T.; Nagel, J. E.; Mello-Coelho, V.; Taub, D. D. Gene expression profiling: from microarrays to medicine J Clin. Immunol. 2004, 24, 213-24.
- 30 10. Wang, D., Li, G., Ma, X., Liu, C., Zhou, Y., y Cheng, J. Detecting a target nucleic acid molecule, for use in clinical diagnosis, comprises incubating the cell lysate, without nucleic acid purification, with a nucleic acid probe, allowing hybridization. UNIV QINGHUA and CAPITAL BIOCHIP CO LTD. [WO2005017193-A1; AU2003257371-A1; CN1580283-A1].
- 30 11. Venkatasubbarao, S. Microarrays--status and prospects Trends Biotechnol. 2004, 22, 630-37.
- 35 12. Mullis, K. B., Arnheim, N., Saiki, R. K., Erlich, H. A., Horn, G. T., Scharf, S. J., Banks, Mullis K., y Keichi, Saiki R. Process for amplifying detecting or cloning nucleic acid sequences - useful in disease diagnosis and in prepn. of transforming vectors. CETUS CORP, HOFFMANN LA ROCHE & CO AG, and HOFFMANN LA, R. O. C. H. [EP200362-A2; EP200362-A3; JP92067957-B2; JP92067960-B2; EP200362-A1; EP200362-B; EP200362-A; AU8655322-A; AU8655323-A; JP61274697-A; JP62000281-A; DK8601448-A; DK8601449-A; US4683195-A; US4683202-A; ES8706822-A; ES8706823-A; ZA8602334-A; ZA8602335-A; ES8800356-A; ES8800357-A; CA1237685-A; US4800159-A; US4683202-B; IL78281-A; CA1291429-C; IL78284-A; JP92067957-B; JP92067960-B; EP200362-B1; DE3687537-G; JP6007166-A; DK171160-B; DK171161-B; JP2546576-B2; IE83456-B; IE83464-B; US4683195-B; CA1340121-E].
- 40 13. Kadkol, S. S.; Gage, W. R.; Pasternack, G. R. In situ hybridization - Theory and practice Molecular Diagnosis 1999, 4, 169-83.
- 45 14. Jonker, A.; deBoer, P. A. J.; vandenHoff, M. J. B.; Lamers, W. H.; Moorman, A. F. M. Towards quantitative in situ hybridization Journal of Histochemistry & Cytochemistry 1997, 45, 413-23.
- 45 15. Raap, A. K. Advances in fluorescence in situ hybridization Mutat. Res. 1998, 400, 287-98.
- 50 16. Tanke, H. J.; Dirks, R. W.; Raap, T. FISH and immunocytochemistry: towards visualising single target molecules in living cells Curr. Opin. Biotechnol. 2005, 16, 49-54.
- 50 17. Levsky, J. M.; Singer, R. H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future J Cell Sci. 2003, 116, 2833-38.
- 50 18. Levsky, J. M.; Shenoy, S. M.; Pezo, R. C.; Singer, R. H. Single-cell gene expression profiling Science 2002, 297, 836-40.

19. Janicki, S. M.; Tsukamoto, T.; Salghetti, S. E.; Tansey, W. P.; Sachidanandam, R.; Prasanth, K. V.; Ried, T.; Shav-Tal, Y.; Bertrand, E.; Singer, R. H.; Spector, D. L. From silencing to gene expression: Real-time analysis in single cells *Cell* 2004, 116, 683-98.
- 5 20. Weier, H. U.; Chu, L. W.; Murnane, J. P.; Weier, J. F. Applications and technical challenges of fluorescence in situ hybridization in stem cell research *Blood Cells Mol.Dis.* 2004, 32, 68-76.
21. Derradji, H.; Bekaert, S.; Van Oostveldt, P.; Baatout, S. Comparison of different protocols for telomere length estimation by combination of quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) and flow cytometry in human cancer cell lines *Anticancer Res.* 2005, 25, 1039-50.
- 10 22. Baranov, V. I.; Quinn, Z.; Bandura, D. R.; Tanner, S. D. A sensitive and quantitative element-tagged immunoassay with ICPMS detection *Analytical Chemistry* 2002, 74, 1629-36. [WO2005/003767 A2]
23. Zhang, Q. Y.; Garner, K.; Viswanatha, D. S. Rapid detection of leukemia-associated translocation fusion genes using a novel combined RT-PCR and flow cytometric method *Leukemia* 2002, 16, 144-49.
24. Stein, C. A.; Subasinghe, C.; Shinozuka, K.; Cohen, J. S. Physicochemical Properties of Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides *Nucleic Acids Research* 1988, 16, 3209-21.
- 15 25. Sambrook et al., in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
26. Ausubel et al., in *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences (1987).

REIVINDICACIONES

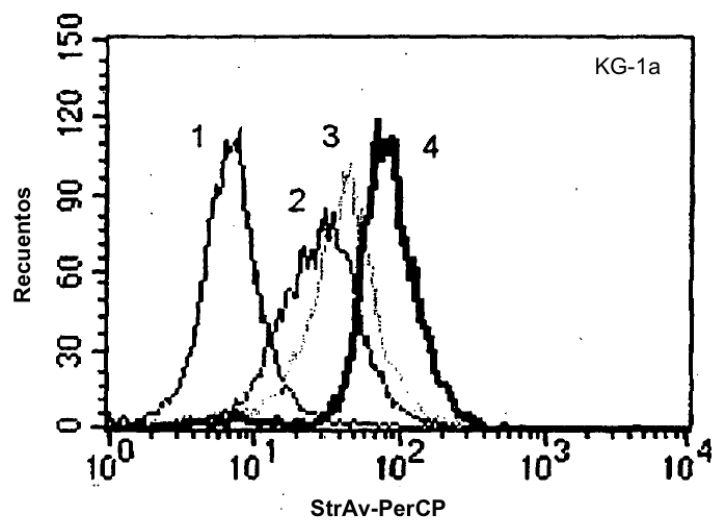
1. Un método para el análisis celular en una célula o partícula celular, en donde dicha célula es una célula entera de origen animal, vegetal, bacteriano o fúngico, o dicha partícula celular se selecciona del grupo que consiste en un cromosoma aislado, un núcleo aislado, una mitocondria aislada, un cloroplasto aislado, y un virus aislado, comprendiendo el método:
 - (a) fijar y permeabilizar la célula o la partícula celular;
 - (b) incubar la célula o la partícula celular en una solución de hibridación con una sonda de ácido nucleico específica para un ácido nucleico diana, donde la sonda marcada con una etiqueta elemental única tal que un tipo de dicha sonda marcada con un tipo de dicha etiqueta es distinguible de cualquier otro tipo de dicha sonda marcada con un tipo diferente de dicha etiqueta por análisis elemental ICP-MS;
 - (c) separar la sonda no hibridada de la sonda hibridada al ácido nucleico diana mediante estrictas condiciones de lavado; y
 - (d) analizar la célula o partícula celular mediante ICP-MS para identificar la sonda y cuantificar la sonda unida al ácido nucleico diana,
- en donde cada elemento marcado comprende un resto químico que incluye un átomo elemental o una multitud de átomos elementales con uno o muchos isótopos unidos a una estructura molecular de soporte, y en donde la etiqueta elemental comprende además unos medios de unión de dicha etiqueta a un sustrato.
2. El método de la reivindicación 1 en donde dos o más sondas diferenciales marcadas con etiquetas elementales diferenciales están hibridadas a dos o más ácidos nucleicos diana.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, donde el ácido nucleico diana se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ácidos nucleicos intracelulares, ARN matriz, ARN micro, ARN precursor del producto de transcripción génica, ARN mensajero, ARN transportador, ARN ribosómico, ADN cromosómico, ADN mitocondrial, ADN cloroplástico, ADN viral, ARN viral, ADN bacteriano, ARN bacteriano, y ADN plasmídico.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además el análisis simultáneo de moléculas proteicas de superficie y/o intracelulares.
5. El método de la reivindicación 1, donde después de la etapa (b) la célula o partícula celular se hace reaccionar con un reactivo de afinidad específico para una molécula de superficie y/o una intracelular y el reactivo de afinidad se marca con una etiqueta elemental, tal que un tipo de dicho reactivo de afinidad marcado con un tipo de dicha etiqueta es distinguible de cualquier otro tipo de dicha etiqueta por ICP-MS, y seguido de separación del reactivo de afinidad no unido del reactivo de afinidad unido.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la molécula de superficie o/y intracelular es un lípido, un polisacárido, o una molécula pequeña.
7. El método de la reivindicación 5, en donde el reactivo de afinidad se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un aptámero, una lectina, y una molécula pequeña.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la sonda se selecciona del grupo que consiste en una sonda de oligonucleótidos, una molécula de un ácido nucleico bloqueado (LNA), una molécula de un ácido nucleico peptídico (PNA), un ADN plasmídico, un ADN amplificado o un fragmento del mismo, un ARN amplificado o un fragmento del mismo, un fragmento de ARN, y un fragmento de ADN genómico.
9. Un método para el análisis de moléculas de ARNm en solución homogénea, que comprende:
 - (a) incubar las moléculas de ARNm con oligonucleótidos, en donde los oligonucleótidos están marcados con etiquetas elementales que comprenden un elemento de transición, y están marcados con una microesfera especialmente etiquetada, tal que cada uno de los tipos de dicha microesfera etiquetada con un tipo de dicha etiqueta es distinguible de un tipo diferente de dicha microesfera marcada con un tipo diferente de dicha etiqueta mediante ICP-MS, bajo condiciones que permiten a los oligonucleótidos hibridarse con las moléculas de ARNm diana;
 - (b) separar las microesferas unidas a las moléculas de ARNm diana de las microesferas no unidas; y
 - (c) medir las microesferas unidas mediante ICP-MS en donde las microesferas están dispersas en un líquido para medir cuantitativamente la composición atómica e isotópica de las microesferas individuales, y así detectar los tipos y los números de moléculas de ARNm diana unidas a dichas microesferas.
10. El método de la reivindicación 9, en donde las moléculas de ARNm son de una muestra de tejido o célula.

11. El método de la reivindicación 10, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra animal, una muestra de una planta, una muestra bacteriana, y una muestra fúngica.
12. El método de la reivindicación 9 en donde los oligonucleótidos comprenden un número de nucleósidos de desoxitimidina trifosfato, y sondas complementarias de ácido nucleico unidas a microesferas especialmente etiquetadas.

5

FIG. 1

A



B

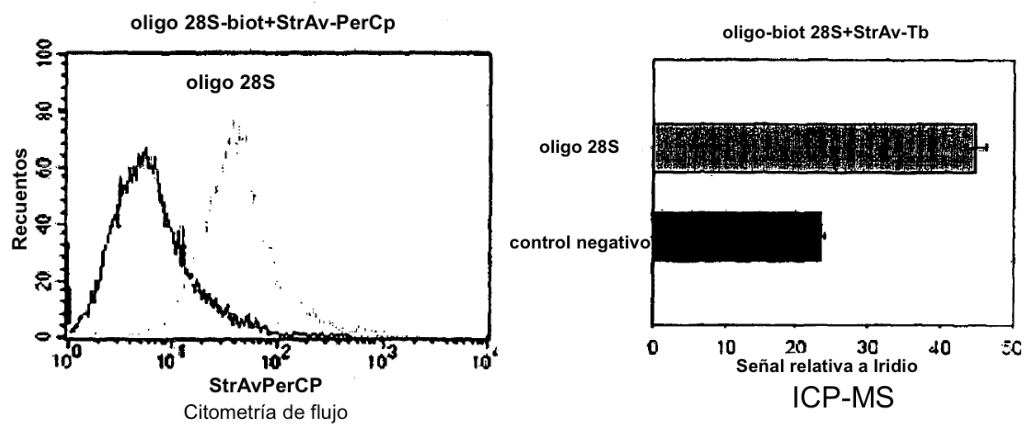
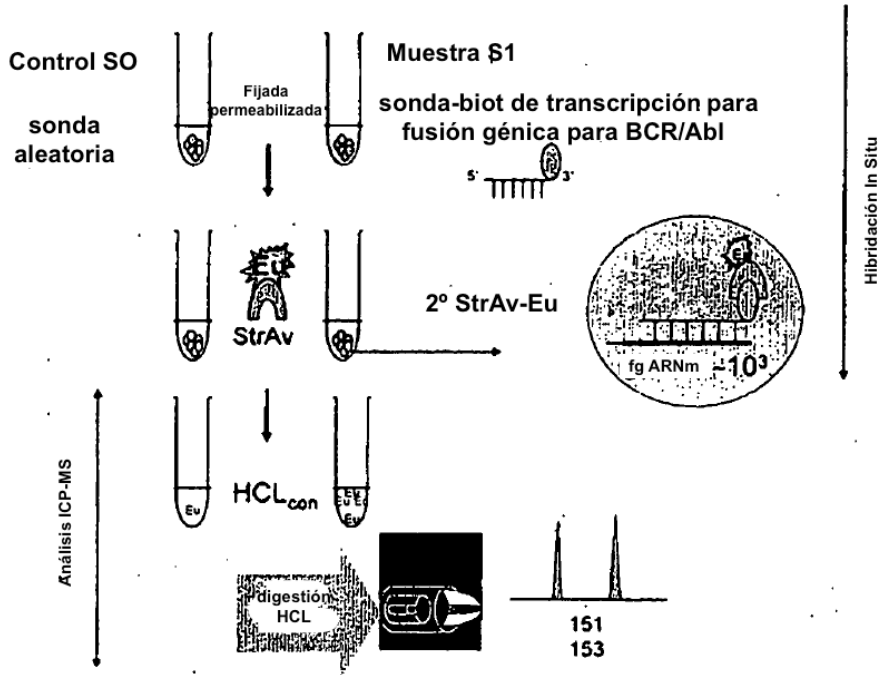


FIG 2

A Células/muestra K562 1e6



B

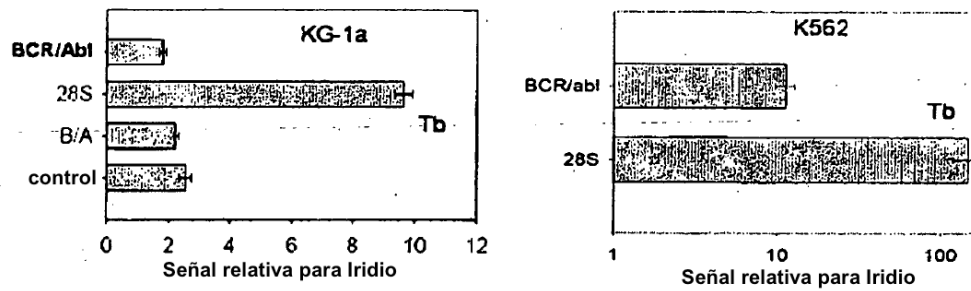


FIG. 3

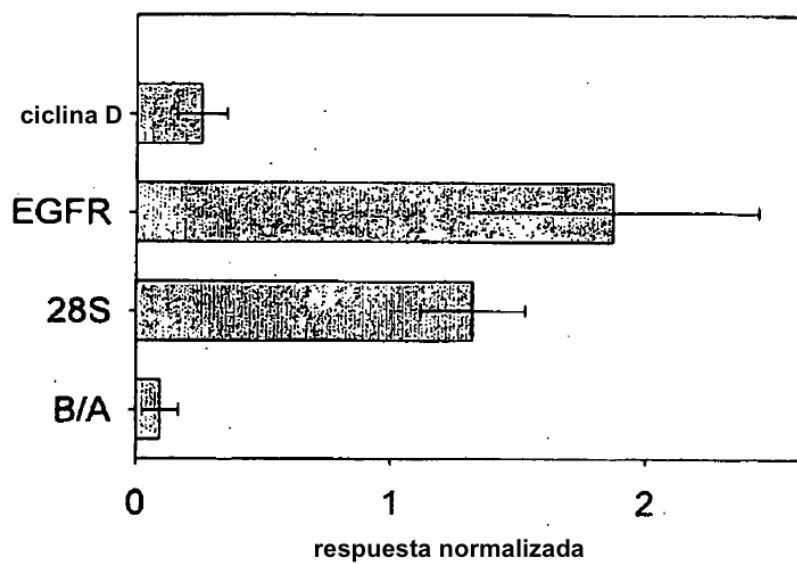


FIG. 4

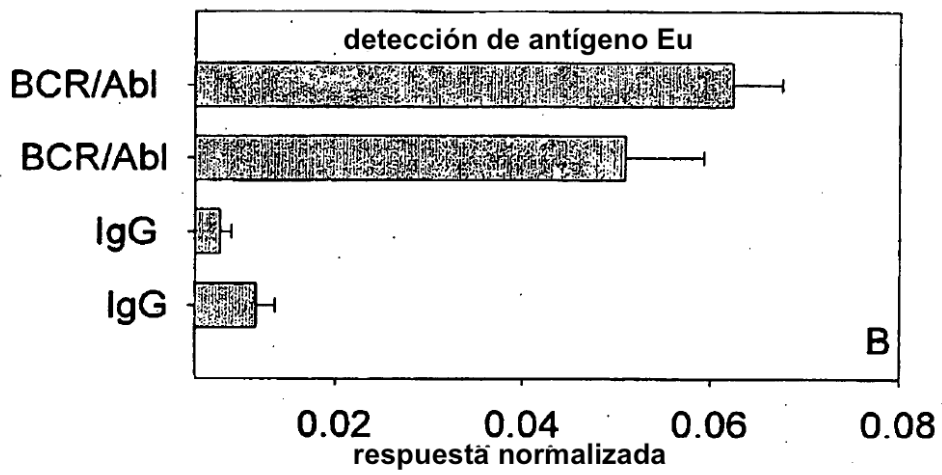
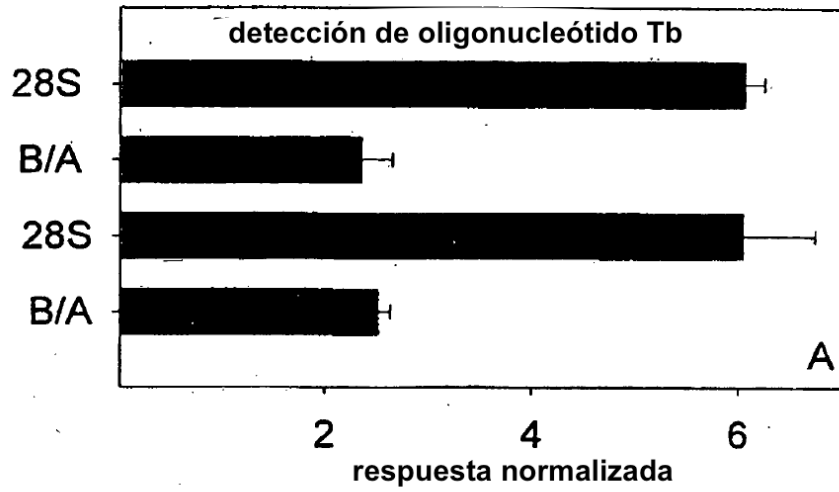


FIG. 5

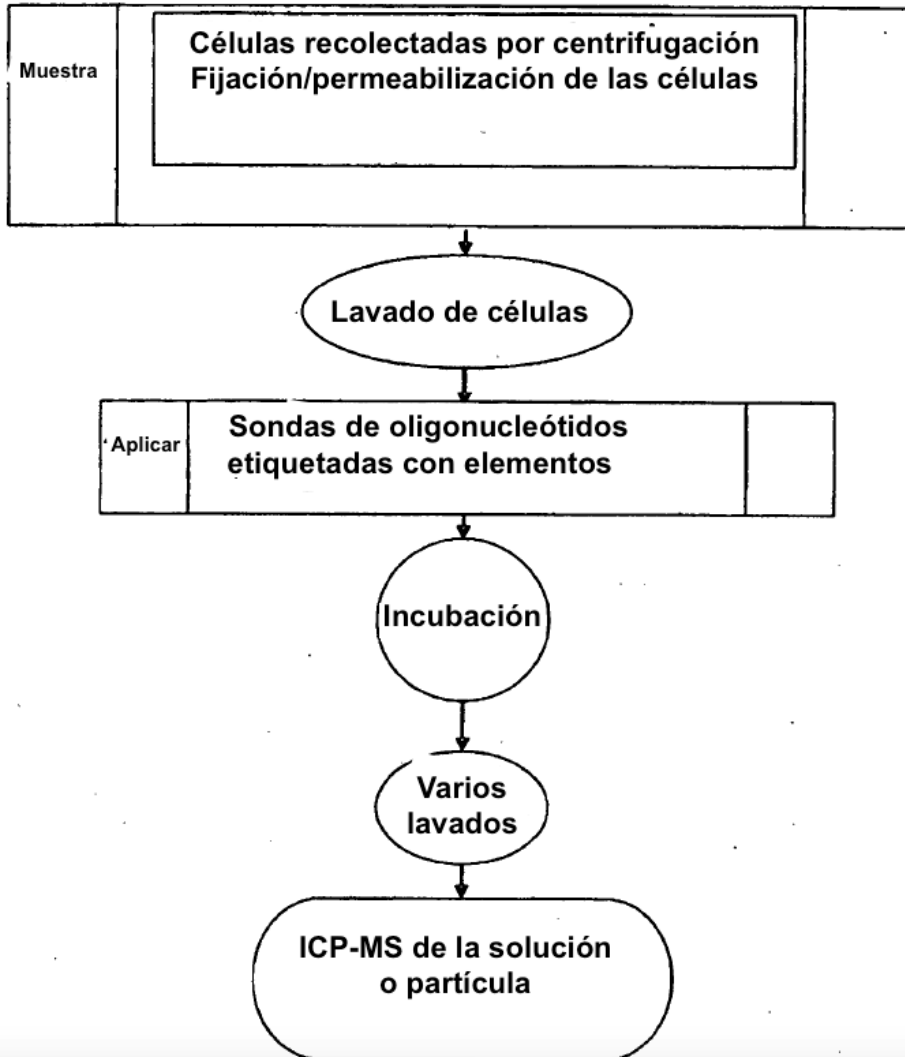


FIG. 6

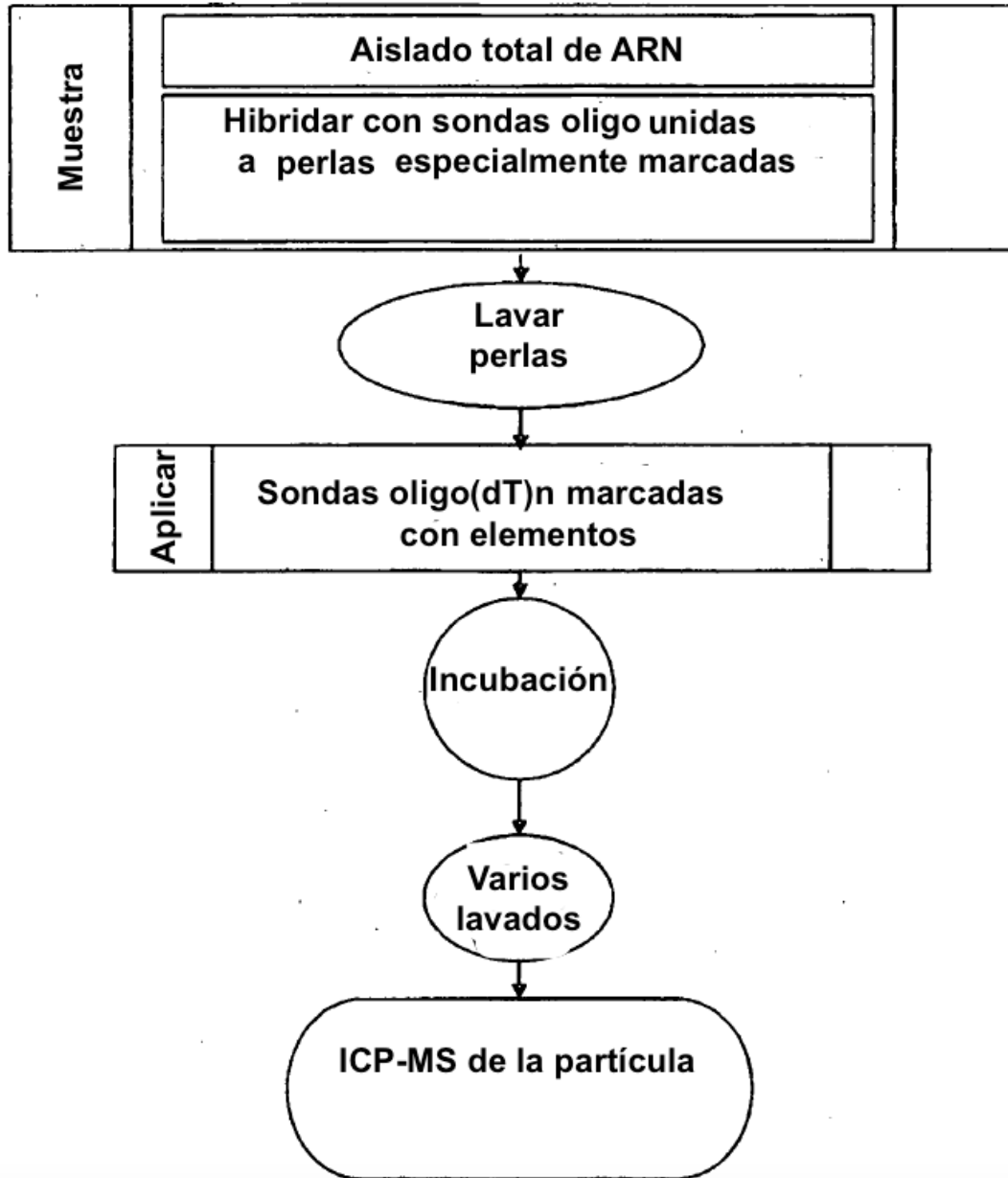


FIG. 7

