

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 988**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2014 PCT/EP2014/069294**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015 WO15036434**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2014 E 14761866 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 3044326**

54 Título: **Aplicación de moléculas de oligo-dT para evitar la generación de productos de PCR de alta masa molecular inducida por transportador poliA**

30 Prioridad:

**13.09.2013 EP 13184307**

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

**07.03.2018**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH y  
ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BERGMANN, FRANK y  
FROEHNER, STEFANIE**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 657 988 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

Aplicación de moléculas de oligo-dT para evitar la generación de productos de PCR de alta masa molecular inducida por transportador poliA

5

Durante el aislamiento del ARN se usan ácidos nucleicos transportadores tales como ARN-poliA para aumentar el rendimiento del ARN aislado. Los ácidos nucleicos transportadores pueden dar lugar a productos de alta masa molecular que pueden interferir en etapas posteriores, tales como la transcripción inversa, la PCR y la electroforesis en gel. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento y a un kit para la transcripción inversa y el uso de una molécula de ácido nucleico bloqueante para bloquear el ARN-poliA transportador.

10

El aislamiento de bajas cantidades de ARN vírico del plasma requiere un procedimiento que garantice una baja tasa de pérdida de ARN, necesaria para un análisis adicional del genoma vírico. El ARN vírico se puede aislar usando diferentes procedimientos. Uno de los procedimientos más frecuentes es el aislamiento manual de ARN. Para el aislamiento manual de ARN del plasma que se realiza principalmente mediante procedimientos basados en columnas se usa un ARN transportador, como poliA, ARN de MS2 o ARNt para inhibir la unión irreversible del ARN diana al material de la columna. Además, se ha demostrado que el ARN transportador poliA sintético potencia la unión reversible del ARN a la superficie de sílice en las columnas de aislamiento, lo que también da como resultado un mayor rendimiento de ARN (DN. Hengen et al., Trends of Biochemical Sciences 1996, 21, 224-225; ML. Gallagher et al. Biochemical and Biophysical Research Communications 1987, 144, 271-276). El ARN transportador bloquea el material de la columna, de modo que el ARN diana se puede aislar cuantitativamente de la muestra de plasma. El uso de ARN transportador también puede tener efectos beneficiosos adicionales, tales como la mejora de la estabilidad del ARN diana (D. Andreasen et al., Methods 2010, 50, S6-S9; R. Kishore et al., J. Forensic. Sci. 2006, 51(5), 1055-1061).

15

20

25

Después del aislamiento se lleva a cabo una transcripción inversa del ARN para generar ADNc utilizado para la siguiente reacción de PCR. El uso de ARN-poliA como ARN transportador para la etapa de aislamiento y de cebadores hexámeros aleatorios para la etapa de transcripción inversa da lugar a productos de alta masa molecular inespecíficos y no deseados durante la reacción de PCR que resultan de la hibridación de moléculas de ARN-poliA con una porción de cebadores hexámeros aleatorios que se puede unir a ARN-poliA. Este producto de hibridación de alta masa molecular se amplifica luego durante la PCR que es visible como una mancha de alta masa molecular (AMM) en los geles de agarosa. La generación de los productos de AMM da finalmente como resultado una cantidad menor de ADN diana amplificado.

30

35

Además, el documento «RNA isolation, User manual, NucleoSpin RNA XS» (Macherey und Nagel, 31 de marzo de 2013 [http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/RNA\\_and\\_mRNA/UM\\_TotalRNA\\_NSXS.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/RNA_and_mRNA/UM_TotalRNA_NSXS.pdf)) describe un procedimiento de preparación de muestras para el aislamiento de ARN que se puede usar en una PCR-transcripción inversa posterior. El ARN transportador poli(A) se usa durante el procedimiento.

40

El objeto de la presente descripción es, por lo tanto, la provisión de un procedimiento que no muestre los inconvenientes mencionados anteriormente.

45

### Resumen de la invención

Se constató que los productos de AMM descritos anteriormente que afectan negativamente al procedimiento posterior a la transcripción inversa se pueden evitar si el ARN-poliA utilizado como transportador se bloquea mediante moléculas de oligo-dT que están bloqueadas en el extremo 3'.

50

Por lo tanto, la presente descripción se refiere a un procedimiento de transcripción inversa, en el que el procedimiento comprende las etapas de a) proporcionar una muestra que comprende ARN, b) poner en contacto la muestra con un ácido nucleico transportador generando de este modo una mezcla, c) aplicar la mezcla a una matriz en condiciones tales que se produzca la unión del ARN y del ácido nucleico transportador a la matriz, d) separar la matriz con el ARN y el ácido nucleico transportador unidos a la matriz de la mezcla, e) eluir el ARN y el ácido nucleico transportador de la matriz generando de este modo un eluido, f) añadir un ácido nucleico bloqueante al eluido en condiciones tales que se produzca la hibridación del ácido nucleico bloqueante con el ácido nucleico transportador, g) añadir un cebador al eluido de la etapa f) en condiciones tales que se produzca la hibridación del cebador con el ARN, y h) realizar una transcripción inversa del ARN en ADNc.

55

60

En un modo de realización específico, el ácido nucleico transportador es un ARN transportador. En un modo de realización más específico, el ARN transportador es ARN-poliA.

65

En un modo de realización específico, el ácido nucleico bloqueante es una molécula de oligo-dT. En un modo de realización más específico, la molécula de oligo-dT es 5'-(dT)<sub>n</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>n</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina n-mero, en el que n es 18, 19, 20, 21 o 22, en la que X se selecciona del grupo que

consiste en p, pC3, pC3p, pC3pC3 y pC3pC3p, y en la que X está unido al grupo hidroxilo del extremo 3' de (dT)n y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol. En un modo de realización incluso más específico, n es 20 y X es pC3pC3p. En un modo de realización específico, el cebador es un cebador aleatorio. En un modo de realización más específico, el cebador aleatorio es un cebador hexámero aleatorio.

En un modo de realización específico, la matriz comprende un vellón de fibra de vidrio.

En un modo de realización específico, la muestra se selecciona del grupo que consiste en suero, sangre, plasma, lágrimas, sobrenadante de cultivo celular, orina y leche materna, saliva, líquido cefalorraquídeo y esperma.

La presente descripción se refiere además al uso de una molécula de ácido nucleico bloqueante para bloquear el ARN-poliA transportador durante la transcripción inversa, en el que la molécula de ácido nucleico bloqueante es 5'-(dT)n-X-3', en la que (dT)n es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina n-mero, en el que n es 18, 19, 20, 21 o 22, en la que X se selecciona del grupo que consiste en p, pC3, pC3p, pC3pC3 y pC3pC3p, y en la que X está unido al grupo hidroxilo del extremo 3' de (dT)n y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol. En un modo de realización específico, n es 20 y X es pC3pC3p.

La presente descripción se refiere además a un kit para realizar la transcripción inversa, comprendiendo el kit a) ARN-poliA como transportador, y b) un ácido nucleico bloqueante como se describe anteriormente.

### Descripción de las figuras

**Fig. 1:** La figura muestra la comparación de productos de PCR que usan un cebador específico de VHC establecido para el genotipo 1a del VHC con y sin pretratamiento con oligo-dT antes de la transcripción inversa. Se comparan diferentes concentraciones de oligo-dT y diferentes concentraciones de ADNc del VHC.

**Fig. 2:** La figura muestra la comparación de productos de PCR que usan un cebador específico de VHC establecido para el genotipo 1a del VHC con y sin pretratamiento con oligo-dT antes de la transcripción inversa. Se comparan diferentes concentraciones de oligo-dT a una concentración específica de ADNc del VHC.

### Descripción detallada de la invención

Las siguientes definiciones se exponen para ilustrar y definir el significado y alcance de diversos términos usados en el presente documento.

Los términos «un», «una» y «el/la» incluyen, en general, referentes al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término «aproximadamente», como se usa en el presente documento, junto con un valor numérico modifica ese valor extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores. En general, el término «aproximadamente» modifica un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado con una varianza de un 5 % mayor o menor. Por ejemplo, un valor de «aproximadamente 100» significa un intervalo de «95 a 105».

El término «amplificación» se refiere, en general, a la producción de una pluralidad de moléculas de ácido nucleico a partir de un ácido nucleico diana en el que los cebadores hibridan con sitios específicos en las moléculas de ácido nucleico diana para proporcionar un sitio de inicio para la extensión por una polimerasa. La amplificación se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento conocido en líneas generales en la técnica, tal como, pero no limitado a: PCR estándar, PCR larga, PCR de inicio caliente, PCRc, RT-PCR y amplificación isotérmica.

El término «cebador bloqueado en 3'» se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a oligonucleótidos que están modificados en su grupo hidroxilo del extremo 3' por un grupo bloqueante que es capaz de prevenir la extensión del cebador mediante una reacción de polimerasa. Los grupos bloqueantes adecuados son, en particular, cualquier grupo que no contenga un resto 2'-desoxirribosa. Dichos grupos bloqueantes son, por ejemplo, pero no están limitados a, fosfato, fosfato sustituido como fosfato sustituido con alquilo o arilo, grupos éter como éter alquílico tales como metilo, etilo o bencilo, derivados de 3'-desoxirribosa como 2',3'-didesoxinucleósidos o cualquier otro grupo protector de hidroxilo que es estable en condiciones de amplificación como ésteres tales como benzoato o nitrato. Los fosfatos sustituidos se pueden incorporar de forma múltiple en el grupo hidroxilo del extremo 3' usando dioles tales como dioles de alcano como 1,3-propanodiol (en adelante denominado espaciador C3 o C3). Para facilitar la síntesis de dichos cebadores bloqueados con 3'-fosfato o fosfato sustituido se puede usar 3'-fosfato-CPG o 3'-espaciador C3 CPG o 3'-fosfato-CPG disponibles comercialmente junto con fosforamida de espaciador C3 (Glen Research Corporation, Sterling, VA). Particularmente adecuada es una modificación de 3'-hidroxilo tal como fosfato (p), fosfato-1,3-propanodiol (pC3),

fosfato-1,3-propanodiol-fosfato (pC3p), fosfato-1,3-propanodiol-fosfato-1,3-propanodiol (pC3pC3) o fosfato-1,3-propanodiol-fosfato-1,3-propanodiol-fosfato (pC3pC3p).

El término «ácido nucleico transportador» se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a diferentes tipos de ARN, tales como ARN-poliA, ARNt y ARN de MS2. Por lo general, dichos ARN transportadores diferentes proceden de bacteriófagos. El ácido nucleico transportador se usa para aumentar la recuperación de bajas cantidades de ácidos nucleicos diana, tales como ARN diana, durante el procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos. Dicho aislamiento significa la separación del ácido nucleico diana de una muestra, por ejemplo, usando una fase sólida. En general, el ácido nucleico transportador se añade a la muestra que comprende el ácido nucleico diana en una gran cantidad. La cantidad de ácido nucleico transportador es desproporcionadamente mayor en comparación con el ácido nucleico diana. El ácido nucleico transportador y el ácido nucleico diana compiten, por ejemplo, en los procesos de degeneración (enzimáticos, físicos, químicos), protegiendo de este modo el ácido nucleico diana. Debido a la gran cantidad de ácido nucleico transportador, este se ve afectado por dichos procesos en una medida proporcionalmente mayor en comparación con el ácido nucleico diana. Como consecuencia, el ácido nucleico diana se ve afectado en una medida mucho menor, aumentando de este modo el rendimiento del ácido nucleico diana. El ácido nucleico transportador es bien conocido en la técnica y está disponible comercialmente.

Como se usa en el presente documento, el término «hibridación» se usa en referencia al apareamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de la hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) se ve afectada por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, la rigurosidad de las condiciones involucradas, la Tf del híbrido formado y la relación G:C en los ácidos nucleicos. Aunque la invención no se limita a un conjunto particular de condiciones de hibridación, se emplean preferentemente condiciones de hibridación rigurosas. Las condiciones de hibridación rigurosas dependen de la secuencia y diferirán con parámetros ambientales variables (por ejemplo, concentraciones de sales y presencia de compuestos orgánicos). En general, las condiciones «rigurosas» se seleccionan para que sean de aproximadamente 5 °C a 20 °C más bajas que el punto de fusión térmico (Tf) para la secuencia de ácido nucleico específica a una fuerza iónica y un pH definidos. Preferentemente, las condiciones rigurosas son de aproximadamente 5 °C a 10 °C más bajas que el punto de fusión térmico para un ácido nucleico específico unido a un ácido nucleico complementario. La Tf es la temperatura (con una fuerza iónica y un pH definidos) a la cual un 50 % de un ácido nucleico (por ejemplo, ácido nucleico marcado) hibrida con una sonda perfectamente coincidente.

El término «matriz», como se usa en el presente documento, se refiere a una superficie a la que los ácidos nucleicos se unen específicamente, mientras que las sustancias contaminantes no lo hacen. Más específicamente, la matriz es una superficie de sílice del vellón de fibra de vidrio que se puede incluir en columnas de aislamiento de ácidos nucleicos. Al poner en contacto una muestra que comprende ácidos nucleicos con dicha matriz, los ácidos nucleicos se unen a la superficie del vellón de fibra de vidrio en presencia de una sal caotrópica. Esto permite que la matriz inmovilice específicamente ácidos nucleicos. Con el fin de unir el ARN a la matriz, las condiciones de unión se pueden optimizar en consecuencia para garantizar una mayor inmovilización de ARN. El aislamiento de ácidos nucleicos se realiza uniendo específicamente los ácidos nucleicos al vellón de fibra de vidrio, mientras que las sustancias contaminantes (tales como sales, proteínas y otros contaminantes tisulares) no se unen al mismo. Con el fin de eliminar el ADN de la matriz, los ácidos nucleicos unidos a la matriz se pueden digerir con DNasa directamente sobre la misma. Después de eliminar los fragmentos de ADN digeridos y otras sustancias contaminantes (por ejemplo, mediante lavado), el ARN aislado restante se puede eluir posteriormente en un pequeño volumen de agua o tampón con bajo contenido de sal.

El término «ácido nucleico» se refiere, en general, a ADN o ARN, ya sea un producto de amplificación, creado sintéticamente, productos de transcripción inversa de ARN o de origen natural. Típicamente, los ácidos nucleicos son moléculas monocatenarias o bicatenarias y están compuestos por nucleótidos naturales. Las moléculas de ácido nucleico bicatenario pueden tener nucleótidos protuberantes en el extremo 3' o 5' y, como tales, no es necesario ni se asume que sean completamente bicatenarios en toda su longitud. Además, el término ácido nucleico puede estar compuesto por nucleótidos no naturales y/o modificaciones de nucleótidos naturales. Los ejemplos se enumeran en el presente documento, pero no se limitan a: fosforilación de nucleótidos de los extremos 5' o 3' para permitir el ligado o la prevención de la degradación por exonucleasa / extensión por polimerasa, respectivamente; modificaciones de amino, tiol, alquino o biotínico para uniones covalentes y casi covalentes; fluoróforos y desactivadores; fosforioato, metilfosfonatos, fosforamidatos y enlaces fosfotriéster entre nucleótidos para prevenir la degradación; metilación; y bases o nucleótidos modificados tales como 2'-desoxiinosina, 5-bromo-2'-desoxiuridina, 2'-desoxiuridina, 2-aminopurina, 2',3'-didesoxicidina, 5-metil-2'-desoxicidina, ácidos nucleicos bloqueados (ANB), bases iso-dC y -dG, bases de ARN 2'-O-metilo y bases modificadas con flúor.

Como se usa en el presente documento, el término «oligo-dT» o «molécula de oligo-dT» se refiere a un homopolímero que consiste exclusivamente en timidinas. La longitud preferente de la molécula de oligo-dT es de 10 a 100 bases, más preferente es una longitud de 10 a 30 bases, la más preferente es una longitud de 20 bases. La molécula de oligo-dT está preferentemente bloqueada en su grupo 3'-hidroxilo por un grupo

bloqueante para prevenir la extensión mediante una reacción de polimerasa. El experto en la técnica sabe que las moléculas de oligo-dT también se pueden modificar, siempre que la molécula todavía sea capaz de hibridar con ARN-poliA. Las modificaciones son, pero no se limitan a, todos los tipos de análogos de timidina como 2'-desoxiuridina, 2'-O-metil-uridina, derivados timidina o uridina de ANB (ácido nucleico bloqueado), derivados timina o uracilo de ANP (ácido nucleico peptídico), derivados timidina o uridina de ANH (ácido nucleico de hexitol) o derivados de uracilo con bases modificadas como 5-propinil-uracilo, pero también modificación con marcadores como marcadores fluorescentes o haptenos o modificación con nucleótidos o secuencias de nucleótidos distintos de timidina y uridina.

Como se usa en el presente documento, el término «oligonucleótido» se refiere a una molécula que comprende dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, preferentemente más de tres, y habitualmente más de diez. El tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez depende de la función o el uso último del oligonucleótido. El oligonucleótido se puede generar de cualquier manera, incluyendo síntesis química, replicación de ADN, transcripción inversa, o una combinación de las mismas. El término oligonucleótido también se puede usar de manera intercambiable con el término «polinucleótido».

El término «reacción en cadena de la polimerasa» (o «PCR») se refiere a un procedimiento para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación ni purificación. Este procedimiento para amplificar la secuencia diana consiste en introducir un gran exceso de dos cebadores de oligonucleótidos en la mezcla de ADN que contiene la secuencia diana deseada, seguido de una secuencia precisa de ciclación térmica en presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores son complementarios de sus cadenas respectivas de la secuencia diana bicatenaria. Para efectuar la amplificación, la mezcla se desnatura y los cebadores hibridan a continuación con sus secuencias complementarias dentro de la molécula diana. Después de la hibridación, los cebadores se extienden con una polimerasa para formar un nuevo par de cadenas complementarias. Las etapas de desnaturalización, hibridación de cebadores y extensión por polimerasa se pueden repetir muchas veces (es decir, la desnaturalización, la hibridación y la extensión constituyen un «ciclo»; puede haber numerosos «ciclos») para obtener una alta concentración de un segmento amplificado de la secuencia diana deseada. La longitud del segmento amplificado de la secuencia diana deseada viene determinada por las posiciones relativas de los cebadores entre sí y, por lo tanto, dicha longitud es un parámetro controlable. La PCR permite amplificar una única copia de una secuencia diana específica en ADN genómico hasta un nivel detectable mediante diversas metodologías diferentes conocidas por los expertos en la técnica. Además del ADN genómico, se puede amplificar cualquier secuencia de oligonucleótido o polinucleótido con el conjunto apropiado de moléculas de cebador. En particular, los segmentos amplificados creados por el propio procedimiento de PCR son, en sí mismos, plantillas eficientes para posteriores amplificaciones por PCR. La PCR mediada por ligado se refiere a la PCR en la que los cebadores son homólogos (por ejemplo, complementarios) a los conectores que están ligados a los extremos del ADN (por ejemplo, fragmentos de ADN).

El término «PCRc» se refiere, en general, a la técnica de PCR conocida como reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o reacción en cadena de la polimerasa cinética. Esta técnica amplifica y cuantifica simultáneamente ácidos nucleicos diana usando PCR en la que la cuantificación se realiza en virtud de un colorante fluorescente intercalante o sondas específicas de secuencia que contienen moléculas indicadoras fluorescentes que solo son detectables tras la hibridación con un ácido nucleico diana.

Como se usa en el presente documento, el término «cebador» se refiere a un oligonucleótido, producido naturalmente como en una digestión por restricción purificada o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario de una cadena de ácido nucleico (es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados). El cebador es preferentemente monocatenario para una máxima eficacia en la amplificación, pero, de forma alternativa, puede ser bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se trata primero para separar sus cadenas antes de usarlo para preparar productos de extensión. Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluida la temperatura, la fuente del cebador y el uso del procedimiento.

Como se usa en el presente documento, el término «cebador hexámero aleatorio» se refiere a secuencias de oligonucleótidos de una longitud de 6 bases que se sintetizan completamente al azar utilizando una mezcla de las cuatro bases A, G, C y T en cada etapa de acoplamiento para proporcionar un amplio intervalo de todas las posibles secuencias de hexámeros (4096 secuencias) que tienen el potencial de hibridar con una pluralidad de secuencias complementarias en una secuencia de ácido nucleico y que actúan como un cebador para iniciar la síntesis de la primera cadena de ADNc. El término «ARN» se usa en el presente documento como es conocido para el experto en la técnica y se refiere a pre-ARNm, transcritos de pre-ARNm, ARNm, intermedios de procesamiento de transcritos, ARNmi, ARN no codificante, ARNm maduro usado para traducción y transcritos de un gen o genes, o ácidos nucleicos derivados de los mismos. El procesamiento de transcritos incluye procedimientos tales como empalme, edición, modificación y degradación. Las muestras que incluyen ARNm

incluyen, pero no se limitan a ARNm, transcritos de ARNm del gen o genes, ADNc que se origina a partir de ARNm usando transcripción inversa, ARN transcrito de ADN amplificado, ARNc transcrito de ADNc, ADN amplificado de los genes y similares. Además, dentro del alcance de la descripción, el término «ARN» también se puede referir a ARNt, ARNr, ARNmi y ARN transportador.

Como se usa en el presente documento, el término «muestra» se usa en su sentido más amplio. En un sentido, se pretende que incluya una muestra de ácido nucleico obtenida de cualquier fuente. Las muestras de ácidos nucleicos biológicos se pueden obtener de animales (incluidos humanos) y abarcan ácidos nucleicos aislados de fluidos, sólidos, tejidos, etc. La muestra de ácido nucleico biológico también puede provenir de animales no humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, vertebrados tales como roedores, primates no humanos, ovinos, bovinos, rumiantes, lagomorfos, porcinos, caprinos, equinos, caninos, felinos, aves, etc. Los ácidos nucleicos biológicos también se pueden obtener de procariotas, como bacterias, y otros eucariotas no animales, como plantas. Se contempla que la presente invención no está limitada por la fuente de la muestra de ácidos nucleicos, y cualquier ácido nucleico de cualquier reino biológico encuentra utilidad en los procedimientos que se describen en el presente documento.

Si el ARN se aísla de una muestra compleja mediante una matriz, los ácidos nucleicos transportadores se usan habitualmente para aumentar el rendimiento de ARN aislado. Dicho aumento es esencial, especialmente si el ARN de interés está contenido en la muestra compleja en cantidades muy bajas, por ejemplo, ARN vírico en plasma. Dicho aumento del rendimiento aumenta las probabilidades de éxito en los procedimientos posteriores, tales como la transcripción inversa seguida de PCR. Si se utiliza ARN-poliA como ácido nucleico transportador para la etapa de aislamiento y, además, si se usan hexámeros aleatorios para la etapa de transcripción inversa, se producen productos de alta masa molecular (AMM) inespecíficos y no deseados durante la reacción de PCR. Dichos productos de AMM resultan de la hibridación de moléculas de ARN-poliA con una porción de los cebadores hexámeros aleatorios, lo que da lugar a una secuencia de múltiples elementos de moléculas de ARN-poliA y cebadores hexámeros aleatorios. Dichos productos de AMM se amplifican durante la PCR, apareciendo como una mancha en el intervalo de AMM de los geles de agarosa. La generación de los productos de AMM da finalmente como resultado una cantidad menor de ADN diana amplificado.

El objetivo de la presente descripción era, por lo tanto, prevenir la aparición de los productos de AMM explicados anteriormente cuando se usa ARN-poliA y los cebadores hexámeros aleatorios para la generación de ADNc por transcripción inversa. Por lo tanto, se han sintetizado moléculas de oligo-dT que son capaces de hibridar con el ARN-poliA y que son capaces de bloquear las moléculas para evitar su hibridación con los hexámeros aleatorios y la generación de productos de AMM. Para garantizar que las moléculas de oligo-dT no den lugar a la elongación del extremo 3' de las moléculas de oligo-dT, las moléculas de oligo-dT comprenden un grupo bloqueante.

Un aspecto de la presente descripción es un procedimiento de transcripción inversa, en el que el procedimiento comprende las etapas de a) proporcionar una muestra que comprende ARN, b) poner en contacto la muestra con un ácido nucleico transportador generando de este modo una mezcla, c) aplicar la mezcla a una matriz en condiciones tales que se produzca la unión del ARN y del ácido nucleico transportador a la matriz, d) separar la matriz con el ARN y el ácido nucleico transportador unidos a la matriz de la mezcla, e) eluir el ARN y el ácido nucleico transportador de la matriz generando de este modo un eluido, f) añadir un ácido nucleico bloqueante al eluido en condiciones tales que se produzca la hibridación del ácido nucleico bloqueante con el ácido nucleico transportador, g) añadir un cebador al eluido de la etapa f) en condiciones tales que se produzca la hibridación del cebador con el ARN, y h) realizar una transcripción inversa del ARN en ADNc.

En un modo de realización específico, el ácido nucleico transportador es un ARN transportador. En un modo de realización más específico, el ARN transportador se selecciona del grupo que consiste en ARN-poliA, ARNt y ARN de MS2. En un modo de realización más específico, el ARN transportador es ARN-poliA. En un modo de realización incluso más específico, el ARN-poliA se origina a partir de un bacteriófago. Como se describe anteriormente en detalle, el ácido nucleico transportador se usa para aumentar la recuperación de bajas cantidades de ácidos nucleicos diana, tales como ARN diana, durante el procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos. El ARN-poliA tiene una masa molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 kDa y consiste en una serie de nucleótidos de adenosina.

En un modo de realización específico, el ácido nucleico bloqueante es una molécula de oligo-dT. En un modo de realización más específico, la molécula de oligo-dT comprende de 10 a 30 nucleótidos. En un modo de realización incluso más específico, la molécula de oligo-dT comprende de 15 a 25 nucleótidos. En un modo de realización incluso más específico, la molécula de oligo-dT comprende de 18 a 22 nucleótidos. En un modo de realización incluso más específico, la molécula de oligo-dT comprende 20 nucleótidos. En un modo de realización específico, la molécula de oligo-dT está bloqueada en el extremo 3'. En un modo de realización más específico, la molécula de oligo-dT está bloqueada en el grupo 3'-hidroxilo mediante un fosfato sustituido. En un modo de realización incluso más específico, el fosfato sustituido comprende C3. En un modo de realización incluso más específico, el C3 es un espaciador 1,3-propanodiol.

- 5 En un modo de realización específico, la molécula de oligo-dT es 5'-(dT)<sub>n</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>n</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina n-mero, en el que n es 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, en la que X se selecciona del grupo que consiste en p, pC3, pC3p, pC3pC3 y pC3pC3p, y en la que X está unido al grupo hidroxilo del extremo 3' de (dT)<sub>n</sub> y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol. En un modo de realización más específico, la molécula de oligo-dT es 5'-(dT)<sub>n</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>n</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina n-mero, en el que n es 18, 19, 20, 21 o 22, en la que X se selecciona del grupo que consiste en p, pC3, pC3p, pC3pC3 y pC3pC3p, y en la que X está unido al grupo hidroxilo del extremo 3' de (dT)<sub>n</sub> y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol. En un modo de realización preferente, n es 20 y X es pC3pC3p.
- 10 En un modo de realización más específico, la molécula de oligo-dT es 5'-(dT)<sub>20</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>20</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina 20-mero, en la que X se selecciona del grupo que consiste en p, pC3, pC3p, pC3pC3 y pC3pC3p, y en la que X está unido al grupo hidroxilo del extremo 3' de (dT)<sub>20</sub> y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol. En un modo de realización preferente, X es pC3pC3p.
- 15 Por lo tanto, en el modo de realización preferente, la molécula de oligo-dT es 5'-(dT)<sub>20</sub>-pC3pC3p-3', en la que (dT)<sub>20</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina 20-mero, y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol.
- 20 En un modo de realización específico, el cebador es un cebador aleatorio. En un modo de realización más específico, el cebador aleatorio comprende de 5 a 7 nucleótidos. En un modo de realización más específico, el cebador aleatorio comprende 6 nucleótidos, es decir, el cebador aleatorio es un cebador hexámero aleatorio. Los cebadores hexámeros aleatorios se sintetizan completamente al azar utilizando una mezcla de A, G, C y T en cada etapa de acoplamiento para proporcionar un amplio intervalo de todas las posibles secuencias de hexámeros (4096 secuencias). La pluralidad resultante de cebadores hexámeros aleatorios hibridan con una pluralidad de secuencias aleatorias en una secuencia de ácido nucleico y actúan como cebadores para iniciar la síntesis de la primera cadena de ADNc.
- 25 En un modo de realización específico, la matriz comprende una superficie de sílice. En un modo de realización más específico, la matriz comprende una superficie de sílice de un vellón de fibra de vidrio. En un modo de realización más específico, la matriz comprende un vellón de fibra de vidrio. La muestra que comprende ácidos nucleicos se pone en contacto con dicha matriz, en la que los ácidos nucleicos se unen a la superficie de sílice del vellón de fibra de vidrio. La unión de ARN a la matriz se puede aumentar optimizando en consecuencia las condiciones de unión. Las sustancias contaminantes no se unen a la matriz y se pueden eliminar mediante lavado. En un modo de realización específico, la muestra se obtiene de un primer organismo. En un modo de realización más específico, el primer organismo es un animal, tal como un ser humano. En un modo de realización específico, la muestra se obtiene de animales. En un modo de realización más específico, la muestra se obtiene de humanos. En un modo de realización incluso más específico, la muestra se selecciona del grupo que consiste en suero, sangre, plasma, lágrimas, sobrenadante de cultivo celular, orina y leche materna, saliva, líquido cefalorraquídeo y esperma.
- 30 En un modo de realización específico, el ARN procede de un segundo organismo. En un modo de realización más específico, el segundo organismo es un virus. En un modo de realización incluso más específico, el segundo organismo es un virus de la hepatitis C (VHC). En un modo de realización específico, el ARN es ARN vírico. En un modo de realización más específico, el ARN es el ARN del VHC. En un modo de realización específico, la muestra procedente del primer organismo comprende el ARN de los segundos organismos. En un modo de realización más específico, la muestra se selecciona del grupo que consiste en suero, sangre, plasma, lágrimas, sobrenadante de cultivo celular, orina y leche materna, saliva, líquido cefalorraquídeo y esperma. En un modo de realización incluso más específico, la muestra es plasma. En un modo de realización más específico, el plasma humano comprende ARN del VHC.
- 35 En un modo de realización más específico, la muestra se selecciona del grupo que consiste en suero, sangre, plasma, lágrimas, sobrenadante de cultivo celular, orina y leche materna, saliva, líquido cefalorraquídeo y esperma. En un modo de realización incluso más específico, la muestra es plasma. En un modo de realización más específico, el plasma humano comprende ARN del VHC.
- 40 Otro aspecto de la presente descripción es el uso de una molécula de ácido nucleico bloqueante para bloquear el ARN-poliA transportador, en la que la molécula de ácido nucleico bloqueante es 5'-(dT)<sub>n</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>n</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina n-mero, en el que n es 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, en la que X se selecciona del grupo que consiste en p, pC3, pC3p, pC3pC3 y pC3pC3p, y en la que X está unido al grupo hidroxilo del extremo 3' de (dT)<sub>n</sub> y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol.
- 45 En un modo de realización más específico, la molécula de oligo-dT es 5'-(dT)<sub>n</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>n</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina n-mero, en el que n es 18, 19, 20, 21 o 22, en la que X se selecciona del grupo que consiste en p, pC3, pC3p, pC3pC3 y pC3pC3p, y en la que X está unido al grupo hidroxilo del extremo 3' de (dT)<sub>n</sub> y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol. En un modo de realización preferente, n es 20 y X es pC3pC3p.
- 50 En un modo de realización incluso más específico, la molécula de ácido nucleico bloqueante es 5'-(dT)<sub>20</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>20</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina 20-mero, en la que X se selecciona del grupo
- 55 En un modo de realización incluso más específico, la molécula de ácido nucleico bloqueante es 5'-(dT)<sub>20</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>20</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina 20-mero, en la que X se selecciona del grupo
- 60 En un modo de realización incluso más específico, la molécula de ácido nucleico bloqueante es 5'-(dT)<sub>20</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>20</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina 20-mero, en la que X se selecciona del grupo
- 65 En un modo de realización incluso más específico, la molécula de ácido nucleico bloqueante es 5'-(dT)<sub>20</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>20</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina 20-mero, en la que X se selecciona del grupo

que consiste en p, pC3, pC3p, pC3pC3 y pC3pC3p, y en la que X está unido al grupo hidroxilo del extremo 3' de (dT)<sub>20</sub> y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol. En un modo de realización preferente, X es pC3pC3p.

- 5 Por lo tanto, en el modo de realización preferente, la molécula de oligo-dT es 5'-(dT)<sub>20</sub>-pC3pC3p-3', en la que (dT)<sub>20</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina 20-mero, y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol.

10 Otro aspecto de la presente descripción es un kit para realizar la transcripción inversa, comprendiendo el kit a) ARN-poliA como transportador, y b) un ácido nucleico bloqueante como se describe en el presente documento. En un modo de realización específico, el ácido nucleico bloqueante es una molécula de oligo-dT. En un modo de realización más específico, la molécula de oligo-dT comprende de 10 a 30 nucleótidos. En un modo de realización incluso más específico, la molécula de oligo-dT comprende de 15 a 25 nucleótidos. En un modo de realización incluso más específico, la molécula de oligo-dT comprende de 18 a 22 nucleótidos. En un modo de realización incluso más específico, la molécula de oligo-dT comprende 20 nucleótidos. En un modo de realización específico, la molécula de oligo-dT está bloqueada en el extremo 3'. En un modo de realización más específico, la molécula de oligo-dT está bloqueada en el grupo 3'-hidroxilo mediante un fosfato sustituido. En un modo de realización incluso más específico, el fosfato sustituido comprende C3. En un modo de realización incluso más específico, el C3 es un espaciador 1,3-propanodiol.

20 En un modo de realización específico, la molécula de oligo-dT es 5'-(dT)<sub>n</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>n</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina n-mero, en el que n es 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, en la que X se selecciona del grupo que consiste en p, pC3, pC3p, pC3pC3 y pC3pC3p, y en la que X está unido al grupo hidroxilo del extremo 3' de (dT)<sub>n</sub> y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol. En un modo de realización más específico, la molécula de oligo-dT es 5'-(dT)<sub>n</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>n</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina n-mero, en el que n es 18, 19, 20, 21 o 22, en la que X se selecciona del grupo que consiste en p, pC3, pC3p, pC3pC3 y pC3pC3p, y en la que X está unido al grupo hidroxilo del extremo 3' de (dT)<sub>n</sub> y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol. En un modo de realización preferente, n es 20 y X es pC3pC3p.

30 En un modo de realización más específico, la molécula de oligo-dT es 5'-(dT)<sub>20</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>20</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina 20-mero, en la que X se selecciona del grupo que consiste en p, pC3, pC3p, pC3pC3 y pC3pC3p, y en la que X está unido al grupo hidroxilo del extremo 3' de (dT)<sub>20</sub> y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol. En un modo de realización preferente, X es pC3pC3p.

35 Por lo tanto, en el modo de realización preferente, la molécula de oligo-dT es 5'-(dT)<sub>20</sub>-pC3pC3p-3', en la que (dT)<sub>20</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina 20-mero, y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol.

40 Los siguientes ejemplos 1 a 6 se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos establecidos sin apartarse del espíritu de la invención.

#### 45 **Ejemplo 1:**

Preparación de diluciones de virus

50 Se utilizó una muestra positiva para el virus de la hepatitis C (VHC) con un número definido de copias del virus VHC (EDTA plasma GT1A, Trina, Ref. DH1302, Lote 13BDH 28725, VHC: 876487 UI/ml = 2364 × 10<sup>6</sup> copias/ml) para preparar muestras del VHC que contenían cargas víricas de 5000, 25 000 y 100 000 copias/ml. Para la dilución de la muestra positiva para el VHC se utilizó material de plasma negativo para el VHC (Plasma-K3EDTA Hum. Pool PCR-NEG, Roche Diagnostics GmbH, Ref.: 03357163001, Lote: 10942000). El plasma positivo para el VHC, así como el material de plasma negativo para el VHC, se descongeló y centrifugó durante 10 min a 1898 × g para separar las impurezas sólidas que podrían inhibir la PCR posterior. Después de la etapa de centrifugación, se prepararon las diluciones.

#### 60 **Ejemplo 2:**

Aislamiento de ARN

65 El ARN del virus se aisló utilizando el kit High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume (Roche Diagnostics GmbH, Ref.: 05114403001). El principio del kit se basa en la tecnología de columna de centrifugación. El virus se lisa dentro de un tampón que contiene la sal caotrópica clorhidrato de guanidina, un tensioactivo no iónico y proteinasa K. La estructura de los ácidos nucleicos liberados se rompe en presencia de la sal caotrópica. Por lo tanto, se pueden unir al vellón de fibra de vidrio que está integrado en la columna de centrifugación. Los ácidos nucleicos unidos se purifican separándolos de los inhibidores de la PCR, proteínas, sales y otros compuestos.



Posteriormente, se eluyen con agua que restaura su estructura. El kit se aplica con ARN-poliA como transportador para aumentar la recuperación de ácidos nucleicos.

5 El aislamiento del ARN se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadió 1 ml de las muestras de plasma positivas para el VHC diluidas a un tubo de 15 ml. Se añadió 1 ml de tampón de unión suplementado con 15 µl de ARN-poliA y 250 µl de proteinasa K y se incubó durante 15 min a 70 °C. Posteriormente, se añadieron 400 µl de tampón de unión y se mezcló. A continuación, las muestras se transfirieron al High Pure Extender Assembly (conjunto de extensor de alta pureza). Por lo tanto, toda la muestra se pipeteó al depósito superior del High Pure Extender Assembly. Todo el conjunto de High Pure Filter Tube (tubo de filtrado de alta pureza) se introdujo entonces en una centrífuga de sobremesa estándar con un rotor de cubeta oscilante y se centrifugó durante 5 min a 4000 × g. Después de la centrifugación, el tubo de filtrado se retiró del High Pure Extender Assembly y se desechó la fracción no adsorbida. El tubo de filtrado se combinó con un nuevo tubo de recogida y se añadieron 500 µl de tampón de eliminación de inhibidor al depósito superior del tubo de filtrado y se centrifugó durante 1 min a 8000 × g. Después de la centrifugación, el tubo de filtrado se retiró del tubo de recogida y el tubo de filtrado se combinó con un nuevo tubo de recogida. La fracción no adsorbida se desechó nuevamente. Después de eso, se añadieron 450 µl de tampón de lavado al depósito superior del tubo de filtrado y se centrifugó durante 1 min a 8000 × g y la fracción no adsorbida se desechó de nuevo. Esta etapa de lavado se repitió. Después de eso, el conjunto del tubo de recogida y tubo de filtrado se colocó en la centrífuga y se centrifugó durante 30 segundos a la velocidad máxima para eliminar cualquier cantidad residual del tampón de lavado. El tubo de recogida se desechó y el tubo de filtrado se insertó en un tubo de microcentrífuga estéril exento de nucleasa de 1,5 ml. El ARN vírico se eluyó utilizando 50 µl de tampón de elución en el depósito superior del tubo de filtrado incubado durante 1 min a temperatura ambiente y el conjunto del tubo se centrifugó a continuación durante 1 min a 8000 × g. Después del aislamiento del ARN, el ARN extraído se concentra para obtener un volumen más pequeño para las siguientes etapas. Para este método se usaron las perlas Agencourt Ampure RNA Clean XP Beads (Beckman Coulter). Las perlas magnéticas se unen a los ácidos nucleicos y, al colocar la placa en la SPRI Plate 96 Super Magnet Plate (Beckman Coulter), las perlas se separaron de la solución. De esta forma, los contaminantes se eliminaron por lavado y los ácidos nucleicos se eluyeron después de las perlas. La concentración de ARN se determinó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30

### **Ejemplo 3:**

Síntesis de 5'-(dT)20-pC3pC3p-3'

35 El oligonucleótido bloqueante 5'-(dT)20-pC3pC3p-3' se sintetizó en una síntesis a escala de 1 µmol en un sintetizador de ADN ABI 394 usando un procedimiento automatizado de síntesis de ADN en fase sólida y aplicando química de fosoramidita. Como componentes básicos se usaron 3'-fosfato CPG (Glen Research, ref. 20-2900-41) y dT fosoramidita (Sigma Aldrich, ref. T111031), así como espaciador fosoramidita C3 (Glen Research, ref. 10-1913). Ambas fosoramiditas se aplicaron a una concentración de 0,1 M en acetonitrilo de grado ADN. Se usaron ciclos de ADN y reactivos estándares para el ensamblaje del oligonucleótido. A continuación, se aplicó un programa de escisión estándar para la escisión del oligonucleótido protegido con 5'-DMT del soporte mediante el uso de amoníaco conc. Los grupos protectores residuales se escindieron mediante tratamiento con amoníaco conc. (4 h a 56 °C). El oligonucleótido en bruto protegido con DMT se evaporó y se purificó mediante RP HPLC (columna: PRP1 (Hamilton, ref. 79352)) usando un gradiente de acetato de trietilamonio 0,1 M pH 7 / acetonitrilo. Las fracciones del producto se combinaron y desalaron mediante diálisis (MWCO 1000, SpectraPor 6, ref. 132638) frente a agua durante 3 días, escindiendo de ese modo también el grupo DMT. Finalmente, el oligonucleótido se liofilizó. Rendimiento: 360 nmoles.

40

45

### **Ejemplo 4:**

50

Bloqueo del ARN transportador

Para evitar la generación de productos de alta masa molecular, se añadieron 5 µg, 2,5 µg y 1,25 µg de oligo-dT (5'-(dT)20-pC3pC3p-3') al ARN aislado. Se usaron muestras de plasma con diferentes cargas víricas del VHC con las siguientes concentraciones: 5000 copias/ml; 25 000 copias/ml; 50 000 copias/ml (véase la Fig. 1).

55

Para evitar la generación de productos de alta masa molecular, se añadieron 2,5 µg, 1,25 µg y 0,625 µg de oligo-dT al ARN aislado. La concentración de carga vírica del VHC de las muestras de plasma fue de 5000 copias/ml (véase la Fig. 2).

60

### **Ejemplo 5:**

Transcripción inversa

65 Antes de la transcripción inversa, se añadieron diferentes cantidades de oligo-dT a la muestra de ARN concentrada como se describe en el ejemplo 4. La transcripción inversa se realizó entonces usando el kit

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (síntesis de primera cadena de ADNc de transcripción) (Roche Diagnostics GmbH, Ref.: 0489703001) en combinación con cebadores hexámeros aleatorios (HA) para cebado. Se mezclaron 13,5 µl de muestra con 4 µl de HA 400 µM, seguido de una etapa de desnaturalización durante 10 min a 65 °C. Después de eso, la muestra se puso inmediatamente en hielo y se añadieron 8 µl de la mezcla maestra de reactivos. Para cada reacción, la mezcla maestra consistió en 5 µl de tampón de reacción de transcriptasa (5 x), 0,5 µl de inhibidor de RNasa (40 U/µl), 2 µl de mezcla de dNTP (10 mM cada uno) y 0,5 µl de transcriptasa inversa (40 U/µl). La reacción se incubó durante 25 min a 25 °C (etapa de incubación), seguido de 60 min a 50 °C (transcripción inversa) y finalizó con 5 min a 85 °C (inactivación de la transcriptasa inversa). A continuación, se añadió 1 ml de RNasa (1 U/ml) con una incubación posterior durante 20 min a 37 °C. El ADNc generado se usó como plantilla para las siguientes reacciones de PCR.

### Ejemplo 6:

#### PCR

Para la amplificación se utilizó un cebador específico de VHC para el genotipo 1a del VHC. Para el amplicón de PCR se utilizaron el sistema Fast Start High Fidelity PCR (Roche Diagnostics GmbH, Ref.: 04738284001) y PCR Nucleotide Mix (mezcla de nucleótidos para PCR) (Roche Diagnostics GmbH, Ref.: 11581495001). La mezcla maestra estaba compuesta de 12,75 µl de H<sub>2</sub>O (grado PCR), 2,5 µl de tampón 10x Fast Start PCR Reaction Buffer (incl. MgCl<sub>2</sub> 18 mM), 1 µl de DMSO, 1 µl de dNTP (10 mM cada uno) y 0,75 µl de Fast Start High Fidelity Enzyme (5 U/µl). Se añadieron 2 µl de cebador directo e inverso (10 mM cada uno) y 3 µl de ADNc. La placa se selló, se centrifugó brevemente y se incubó como se representa en la tabla 1 (programa de amplificación).

Etapa	Temperatura en °C	Tiempo	Número de ciclos
<b>Desnaturalización</b>	95	3 min	1
<b>Amplificación</b>	95	30 s	45
	50	30 s	
	72	50 s	
<b>Elongación</b>	72	8 min	1

### Ejemplo 7:

#### Electroforesis en gel

Para analizar los productos de PCR generados, se realizó una electroforesis en gel con gel de agarosa al 1 %. Por lo tanto, se disolvió agarosa al 1 % en tampón TBE 1x (Tris-Borat-EDTA). La solución se calentó hasta que todos los cristales de agarosa se disolvieron. Se añadieron cuidadosamente 0,06 µl de bromuro de etidio por cada 1 ml de tampón TBE 1x a la solución enfriada. Posteriormente, la solución de agarosa se moldeó en el casete de gel deseado. Antes de cargar las muestras, una parte del tampón 10 x Blue Juice Loading Buffer (Invitrogen, Ref.: 10816015) se aplicó a cuatro partes de las muestras. Además, 6 µl de marcador XIII de masa molecular de ADN, escalera de 50 pares de bases (Roche Diagnostics GmbH, Ref.: 11721925001) se colocaron en otro bolsillo de gel. La electroforesis se realizó a 120 V durante 35 min y las bandas de ADN se visualizaron después utilizando una caja de luz UV. Los geles de agarosa se cargaron de la siguiente manera.

El gel de agarosa representado en la Fig. 1 se cargó de la siguiente manera: Carril derecho: 6 µl de marcador de masa molecular. N: control, control de agua sin mezcla de reactivos. Con oligo-dT: NC: control negativo, carriles NC 1, NC 2, NC 3 sin material de muestra incluido, se añadieron cebadores específicos de VHC a la mezcla de reactivos de PCR; en lugar de ADNc del VHC, se sustituyó por agua; se añadieron diferentes concentraciones de pretratamiento de oligo-dT a los controles negativos; NC 3 = 1,25 µg de oligo-dT, NC 2 = 2,5 µg de oligo-dT, NC 1 = 5 µg de oligo-dT. Muestra de oligo-dT 5: muestra de VHC 5000 copias/ml: el ADNc del VHC con una concentración de 5000 copias/ml se amplificó con pretratamiento con oligo-dT antes de la transcripción inversa a diferentes concentraciones de oligo-dT, carril 5-3 = 1,25 µg de oligo-dT, carril 5-2 = 2,5 µg oligo-dT, carril 5-3 = 5 µg de oligo-dT. Muestra de oligo-dT 25: muestra de VHC 25 000 copias/ml: el ADNc del VHC con una concentración de 25 000 copias/ml se amplificó con pretratamiento con oligo-dT antes de la transcripción inversa a diferentes concentraciones de oligo-dT, carril 5-3 = 1,25 µg de oligo-dT, carril 5-2 = 2,5 µg oligo-dT, carril 5-3 = 5 µg de oligo-dT. Muestra de oligo-dT 100: muestra de VHC 100 000 copias/ml: el ADNc del VHC con una concentración de 100 000 copias/ml se amplifica con pretratamiento con oligo-dT antes de la transcripción inversa a diferentes concentraciones de oligo-dT, carril 5-3 = 1,25 µg de oligo-dT, carril 5-2 = 2,5 µg oligo-dT, carril 5-3 = 5 µg de oligo-dT. Sin oligo-dT: Muestra 25: muestra de VHC 25 000 copias/ml: el ADNc del VHC con una concentración de 25 000 copias/ml se amplificó sin pretratamiento con oligo-dT antes de la transcripción

5 inversa. El gel de agarosa representado en la Fig. 2 se cargó de la siguiente manera: Carril derecho: 6 µl de  
 marcador de masa molecular. N: control, control de agua sin mezcla de reactivos. Con oligo-dT: NC: control  
 negativo (sin material de muestra incluido), se añadieron cebadores específicos de VHC a la mezcla de reactivos  
 de PCR; en lugar de ADNc del VHC, se sustituyó por agua; pretratamiento con oligo-dT a una concentración de  
 10 0,625 µg de oligo-dT. Muestra de oligo-dT 0,625 µg: la muestra de ADNc del VHC con una concentración de  
 5000 copias/ml se amplificó con pretratamiento con 0,625 µg de oligo-dT antes de la transcripción inversa.  
 Muestra de oligo-dT 1,25 µg: la muestra de ADNc del VHC con una concentración de 5000 copias/ml se amplificó  
 con pretratamiento con 1,25 µg de oligo-dT antes de la transcripción inversa. Muestra de oligo-dT 2,5 µg: la  
 muestra de ADNc del VHC con una concentración de 5000 copias/ml se amplificó con pretratamiento con 2,5 µg  
 de oligo-dT antes de la transcripción inversa. Muestra sin oligo-dT: la muestra de ADNc del VHC con una  
 concentración de 5000 copias/ml se amplificó sin pretratamiento con oligo-dT antes de la transcripción inversa.

Resultados observados:

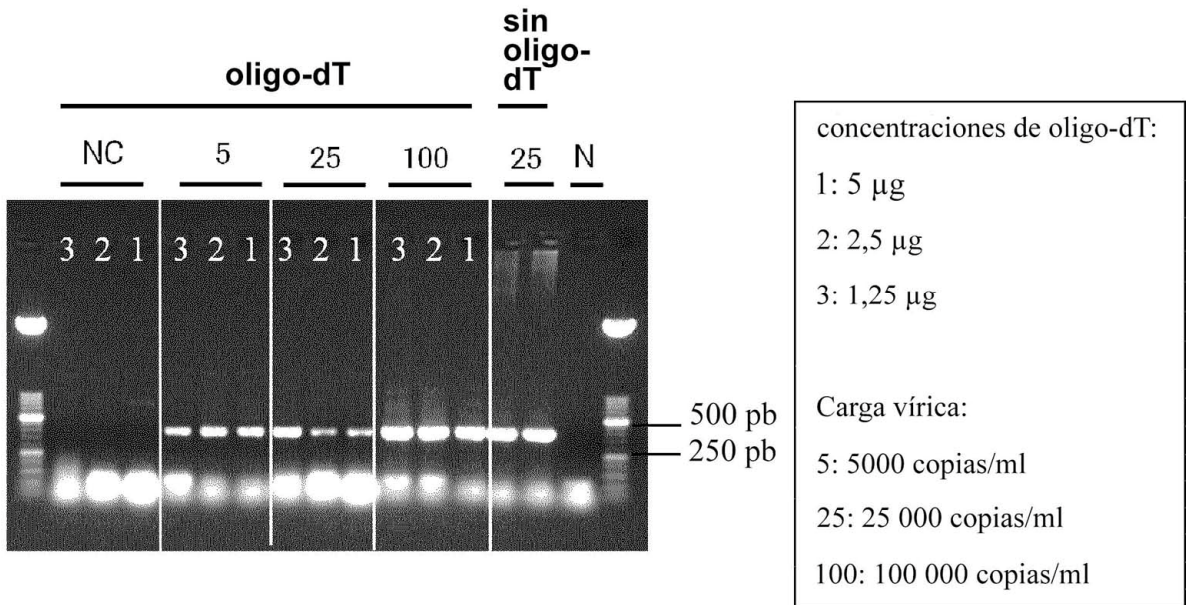
15 Como se puede deducir de la Fig. 1, el producto de PCR específico de 392 pb se generó para todas las muestras  
 de ADNc del VHC. No se generaron productos de alta masa molecular en las muestras con pretratamiento con  
 oligo-dT antes de la transcripción inversa (con oligo-dT: carriles 1, 2 y 3 para las muestras 5, 25 y 100,  
 respectivamente). Sin embargo, se generaron productos de alta masa molecular en las muestras sin  
 20 pretratamiento con oligo-dT antes de la transcripción inversa (sin oligo-dT: muestra 25, ambos carriles).

Como se puede deducir de la Fig. 2, el producto de PCR específico de 392 pb está presente en todas las  
 muestras excepto en una réplica en la muestra de oligo-dT de 2,5 µg y una réplica en la muestra sin oligo-dT. No  
 se generaron productos de alta masa molecular en las muestras con pretratamiento con oligo-dT antes de la  
 transcripción inversa (con oligo-dT: muestras de 0,625 µg, 1,25 µg y 2,5 µg). Se ha demostrado que 0,625 µg de  
 25 oligo-dT previenen completamente la generación de productos de alta masa molecular y se define como la  
 cantidad de oligo-dT que se utilizará. En la muestra sin oligo-dT, están presentes productos de alta masa  
 molecular.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de transcripción inversa, en el que el procedimiento comprende las etapas de
  - 5 a) proporcionar una muestra que comprende ARN,
  - b) poner en contacto la muestra con un ácido nucleico transportador generando de este modo una mezcla,
  - 10 c) aplicar la mezcla a una matriz en condiciones tales que se produzca la unión del ARN y del ácido nucleico transportador a la matriz,
  - d) separar la matriz con el ARN y el ácido nucleico transportador unidos a la matriz de la mezcla,
  - 15 e) eluir el ARN y el ácido nucleico transportador de la matriz generando así un eluido,
  - f) añadir un ácido nucleico bloqueante al eluido en condiciones tales que se produzca la hibridación del ácido nucleico bloqueante con el ácido nucleico transportador,
  - 20 g) añadir un cebador al eluido de la etapa f) en condiciones tales que se produzca la hibridación del cebador con el ARN, y
  - h) realizar una transcripción inversa del ARN en ADNc.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico transportador es un ARN transportador.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el ARN transportador es ARN-poliA.
- 30 4. El procedimiento de las reivindicaciones 1-3, en el que el ácido nucleico bloqueante es una molécula de oligo-dT.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la molécula de oligo-dT es 5'-(dT)<sub>n</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>n</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina n-mero, en el que n es 18, 19, 20, 21 o 22, en la que X se selecciona del grupo que consiste en p, pC3, pC3p, pC3pC3 y pC3pC3p, y en la que X está unido al grupo hidroxilo del extremo 3' de (dT)<sub>n</sub> y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol.
- 35 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que n es 20 y X es pC3pC3p.
- 40 7. El procedimiento de las reivindicaciones 1-6, en el que el cebador es un cebador aleatorio.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el cebador aleatorio es un cebador hexámero aleatorio.
9. El procedimiento de las reivindicaciones 1-8, en el que la matriz comprende un vellón de fibra de vidrio.
- 45 10. El procedimiento de las reivindicaciones 1-9, en el que la muestra se selecciona del grupo que consiste en suero, sangre, plasma, lágrimas, sobrenadante de cultivo celular, orina y leche materna, saliva, líquido cefalorraquídeo y esperma.
- 50 11. Uso de una molécula de ácido nucleico bloqueante para bloquear el ARN-poliA transportador durante la transcripción inversa, en el que la molécula de ácido nucleico bloqueante es 5'-(dT)<sub>n</sub>-X-3', en la que (dT)<sub>n</sub> es un oligonucleótido de homo-2'-desoxi-timidina n-mero, en el que n es 18, 19, 20, 21 o 22, en la que X se selecciona del grupo que consiste en p, pC3, pC3p, pC3pC3 y pC3pC3p, y en la que X está unido al grupo hidroxilo del extremo 3' de (dT)<sub>n</sub> y en la que p es un fosfato y C3 es un espaciador 1,3-propanodiol.
- 55 12. El uso de la reivindicación 11, en el que n es 20 y X es pC3pC3p.
13. Un kit para realizar la transcripción inversa, en el que el kit comprende
  - 60 a) ARN-poliA como transportador, y
  - b) un ácido nucleico bloqueante de acuerdo con las reivindicaciones 11 y 12.

**Fig. 1**



**Fig. 2**

