

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 763**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2010 PCT/AU2010/001131**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2011 WO11026182**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2010 E 10813163 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2473632**

54 Título: **Método mejorado de cuantificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

02.09.2009 AU 2009904258

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

27.04.2018

73 Titular/es:

**ACCUGEN PTY LTD (100.0%)
3-11 Primrose Avenue
Rosebery, New South Wales 2018, AU**

72 Inventor/es:

**DUGGAN, KAREN ANNETTE;
HA, HONG y
HODGE, GEORGE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 665 763 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método mejorado de cuantificación de ácidos nucleicos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para cuantificar ácidos nucleicos y, en particular, a un método universal mejorado para cuantificar ácidos nucleicos para estudios de expresión de genes sin que sea necesario normalizar los datos con respecto a un gen constitutivo o a un gen sintético de interés. Este método puede aplicarse a un uso de diagnóstico, forense y de investigación, aunque se apreciará que la invención no se limita a estos campos de uso concretos.

Antecedentes de la invención

10 Cualquier análisis de la técnica anterior realizado a lo largo de la memoria descriptiva no debe considerarse, de ninguna manera, el reconocimiento de que dicha técnica anterior sea ampliamente conocida ni que forme parte del conocimiento general habitual en el campo.

15 Las tecnologías de PCR para la cuantificación de la expresión de genes han mejorado por medio del desarrollo de termocicladores rápidos y la introducción del control de la fluorescencia de productos amplificados después de cada ciclo (PCR a tiempo real). La cuantificación de la expresión génica se logra mediante el uso de tintes, en particular tintes fluorescentes, y la detección de un aumento en la fluorescencia durante la fase exponencial de la amplificación con PCR que es proporcional a la cantidad de ácidos nucleicos en la muestra al comienzo de la reacción. La cuantificación se basa en el ciclo umbral, es decir, el primer ciclo con fluorescencia detectable, y puede realizarse de una manera absoluta con patrones externos (habitualmente un gen sintético) o de una manera relativa con un gen de referencia normalizante comparativo que actúa como calibrador interno (es decir, gen constitutivo, "housekeeping gene"). Los genes control o genes constitutivos se emplean para normalizar los niveles de ARNm entre diferentes muestras.

20 Es fundamental que el gen de referencia seleccionado no fluctúe, puesto que incluso unas variaciones marginales en la expresión del gen alterarán el perfil de cuantificación relativa del gen diana. Los errores de pipeteado y de dilución también alteran el nivel de la amplificación y, por tanto, alteran el perfil de cuantificación.

25 Los genes tales como gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), porfobilinógeno desaminasa (PBGD), beta2-microglobulina o beta-actina a menudo se emplean como calibradores internos en la PCR a tiempo real. Sin embargo, los genes mencionados anteriormente han demostrado que se mueven en respuesta a tratamientos o condiciones experimentales. Los genes que se expresan en abundancia, tal como 18S, tampoco son genes de referencia ideales, puesto que las condiciones de PCR deben restringirse para que no inunden la reacción.

30 Así, los genes constitutivos adecuados deben ser expresados de modo adecuado en el tejido de interés y, lo más importante de todo, deben mostrar una variabilidad mínima en su expresión entre las muestras y bajo los tratamientos o condiciones experimentales empleados.

35 Sin embargo, muchos de estos genes control pueden mostrar una variabilidad inaceptable en la expresión. Se ha demostrado que el nivel de expresión de dichos genes puede variar entre tejidos o células y puede cambiar bajo ciertas circunstancias, concretamente, diferentes tratamientos. Así, es fundamental validar los genes constitutivos en cualquier sistema experimental nuevo. A menudo, encontrar un gen constitutivo o gen de referencia que sea adecuado para su uso en un sistema experimental específico es una tarea larga y difícil. En algunas situaciones esto es imposible.

40 Becker *et al.* (1996, *Analytical Biochemistry*, 237, 204-207) describen un método cuantitativo para determinar las cantidades iniciales de ADN mediante una titulación del ciclo de la reacción en cadena con polimerasa y mediante la aplicación del tinte fluorescente SYBR Green I para visualizar las bandas amplificadas con PCR sobre geles de agarosa. Después de registrar las imágenes de los geles de agarosa con una cámara de video en un ordenador, las intensidades de las bandas se procesan y se analizan.

45 Vener *et al.* (1996, *BioTechniques*, 21, 248-255) describen métodos para la cuantificación del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) basándose en la PCR competitiva y el análisis de fragmentos.

50 Peccoud (1993, *Médecine/Sciences*, 9, 1378-1385) trata los problemas de los métodos para la medición cuantitativa de ADN, comenzando a partir de la amplificación con PCR. La cuantificación del producto es el primer problema a resolver, y la reproducibilidad y la calibración son cruciales debido a la sensibilidad de esta técnica. Se indica que la inclusión de referencias internas y externas es indispensable.

El uso de patrones externos (es decir, una secuencia sintética) en los estudios de expresión de genes en general requiere que el gen de interés se clone para proporcionar el gen de referencia sintético. En este método, cantidades conocidas de la secuencia del gen de referencia sintético se diluyen en serie y después se someten a una amplificación para producir una curva patrón. La producción de la secuencia clonada para este método en general

es una tarea larga y que requiere mucho trabajo y los errores de dilución se amplifican exponencialmente, lo cual puede conducir a una evaluación errónea de los niveles de los ácidos nucleicos. La estabilidad y la conservación de las secuencias clonadas muy diluidas también puede provocar dificultades.

5 Así, es necesario un método universal rápido y eficaz para cuantificar ácidos nucleicos que sea aplicable a cualquier situación experimental o condición de tratamiento que no requiera el uso de un gen constitutivo o un gen sintético de interés para normalizar los datos.

Un objeto de la presente invención es superar o mitigar al menos una de las desventajas de la técnica anterior o proporcionar una alternativa útil.

Sumario de la invención

10 En un aspecto amplio, la presente invención se refiere a un método para cuantificar ácidos nucleicos que no requiere el uso de un gen constitutivo o un gen de referencia sintético para normalizar los datos de expresión de los ácidos nucleicos. Por el contrario, el método de la presente invención utiliza un oligonucleótido de referencia universal (o puede utilizar uno o más de dichos oligonucleótidos) en combinación con un tinte adecuado, que puede utilizarse para generar una curva patrón a partir de la cual puede calcularse el nivel absoluto de un ácido nucleico diana amplificado en una muestra. Así, el método de la presente invención puede utilizar el mismo oligonucleótido de referencia para cuantificar diferentes ácidos nucleicos de interés, de modo individual o en una mezcla de dichos ácidos nucleicos de interés.

La presente invención también se refiere al uso de kits según se indica en las reivindicaciones adjuntas en el método de la invención.

20 La presente invención proporciona los aspectos tal como se indican en una cualquiera y en todas las reivindicaciones adjuntas 1 a 12.

En un primer aspecto, se proporciona un método según se indica en las reivindicaciones adjuntas para cuantificar un ácido nucleico diana a tiempo real que comprende:

- a) marcar un oligonucleótido de referencia que tiene una longitud predeterminada con un marcador detectable;
- 25 b) generar una curva patrón empleando diluciones en serie del oligonucleótido de referencia marcado representando gráficamente la intensidad del marcador detectable frente a la concentración del oligonucleótido de referencia marcado;
- c) amplificar un ácido nucleico diana en presencia de un marcador detectable que marca al ácido nucleico diana amplificado,
- 30 d) comparar con la curva patrón a tiempo real la intensidad del marcador detectable asociado con el ácido nucleico diana amplificado marcado y determinar la cantidad del ácido nucleico diana amplificado, en el que dicha curva patrón no se amplifica o coamplifica con el ácido nucleico diana.

La memoria descriptiva también proporciona un método para cuantificar un ácido nucleico diana que comprende:

- a) marcar un oligonucleótido de referencia que tiene una longitud predeterminada con un marcador detectable;
- 35 b) generar una curva patrón empleando diluciones en serie del oligonucleótido de referencia marcado representando gráficamente la intensidad del marcador detectable frente a la concentración del oligonucleótido de referencia marcado;
- c) amplificar un ácido nucleico diana;
- d) marcar el ácido nucleico diana amplificado con un marcador detectable;
- 40 e) comparar con la curva patrón la intensidad del marcador detectable asociado con el ácido nucleico diana amplificado marcado y determinar la cantidad del ácido nucleico diana amplificado, en el que dicha curva patrón no se amplifica o coamplifica con el ácido nucleico diana.

No es necesario que la secuencia del oligonucleótido de referencia presente homología con el ácido nucleico diana ni con cualquier otra secuencia de gen constitutivo. Sin embargo, debido al modo concreto en que el oligonucleótido de referencia se emplea en el método de la presente invención (es decir, para preparar una curva patrón tras una dilución en serie del oligonucleótido de referencia), la secuencia del oligonucleótido de referencia puede presentar un grado de homología o incluso identidad con una secuencia de ácido nucleico diana o un gen constitutivo o una parte más pequeña de estos. Una ventaja de la presente invención es que el método puede emplear el mismo oligonucleótido de referencia individual para cuantificar diferentes ácidos nucleicos diana. En la práctica, el oligonucleótido de referencia puede ser un oligonucleótido universal, con una longitud y un contenido en GC fijados concretos, generalmente un oligonucleótido de 100 pb y 50% de contenido en GC.

Preferiblemente, la amplificación del ácido nucleico diana se realiza mediante un método de reacción en cadena con polimerasa ("polymerase chain reaction", PCR). Generalmente, el ácido nucleico diana se amplifica a lo largo de 15 ciclos, pero esto no es crucial para el método de la presente invención. También puede realizarse la amplificación simultánea de múltiples ácidos nucleicos diana de interés en una reacción (es decir, PCR múltiplex).

5 El oligonucleótido de referencia puede tener la misma longitud o una longitud similar a la secuencia del ácido nucleico diana, pero no es necesario. El oligonucleótido de referencia puede ser más largo o más corto que el ácido nucleico diana. Preferiblemente, se prepara una única curva patrón con un único oligonucleótido de referencia y este se emplea para múltiples amplificaciones y cuantificaciones del ácido nucleico diana. Las múltiples amplificaciones y cuantificaciones del ácido nucleico diana pueden realizarse cada una en momentos distintos si se desea.

10 Preferiblemente, el marcador detectable es un tinte que se une al ADNbc y puede ser un tinte intercalante. Preferiblemente, el tinte es un tinte fluorescente. El tinte empleado puede seleccionarse de uno cualquier de SYBR Green I, SYBR Green II, CYBR Gold, Evagreen, amarillo de oxazol, naranja de tiazol, PicoGreen, TOTO o BEBO, Deep Purple™, aunque la elección del tinte no es crucial, puesto que pueden emplearse otros tintes adecuados y estos son conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, la estequiometría del tinte es de uno a uno,
15 pero puede ser más alta.

En otro aspecto se proporciona el uso de un kit según se indica en las reivindicaciones adjuntas en el método del primer aspecto, que comprende uno o más oligonucleótidos de referencia y un tinte fluorescente. Preferiblemente, en el kit solo está presente un único oligonucleótido de referencia. Si está presente más de un oligonucleótido, cada uno puede tener la misma longitud o una longitud diferente.

20 En ciertas realizaciones, el kit comprende uno o más oligonucleótidos de referencia marcados con un tinte fluorescente.

En ciertas realizaciones, el kit comprende diluciones en serie de uno o más oligonucleótidos de referencia marcados con un tinte fluorescente.

25 El oligonucleótido de referencia preferiblemente tendrá una longitud mayor que 60 pb y generalmente estará en el intervalo entre aproximadamente 60 pb y aproximadamente 170 pb. Lo más preferiblemente, el oligonucleótido de referencia tendrá una longitud de 100 pb, que puede emplearse para cuantificar ácidos nucleicos diana que habitualmente tienen una longitud que está en el intervalo entre aproximadamente 60 y aproximadamente 210 pb. El límite superior de longitud del oligonucleótido de referencia no es crucial y se decidirá tomando en cuenta consideraciones prácticas.

30 Resulta deseable que el contenido en GC de un oligonucleótido de referencia sea 45% o mayor. Generalmente, el contenido en GC del oligonucleótido de referencia puede seleccionarse en el intervalo de aproximadamente 45% a aproximadamente 75% y lo más preferiblemente es de 50%. El límite superior del contenido en GC no es crucial.

El oligonucleótido de referencia puede obtenerse a partir de una fuente biológica, natural u otra empleando técnicas conocidas, o puede prepararse de modo sintético.

35 A menos que el contexto indique claramente lo contrario, a lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, los términos "comprende", "comprendiendo" y similares deben entenderse en un sentido inclusivo, en oposición a un sentido excluido o exhaustivo, es decir, en el sentido de "incluye, pero no se limita a".

Breve descripción de la figuras

40 Figura 1: Fluorescencia de un patrón de oligonucleótido de referencia a diferentes concentraciones a lo largo de 15 ciclos. Cada línea horizontal representa una concentración. La falta de enzima en la mezcla de reacción asegura que la fluorescencia se mantiene sin cambios a lo largo de numerosos ciclos. La gráfica indica además la estabilidad y la reproducibilidad del complejo de tinte y oligonucleótido de referencia a lo largo de repetidos ciclos de desnaturalización y reasociación.

Figura 2: Curva patrón generada a partir de los datos de fluorescencia mostrados en la figura 1.

45 Figura 3: Curvas de ciclado para seis genes (definidos por los corchetes). A partir de estos datos se obtienen los ciclos requeridos para cada gen para lograr tres niveles de fluorescencia concretos f1, f2, f3 (por ejemplo, 65, 60 y 55).

50 Figura 4: Expresión de cinco genes de interés en los corazones de ratas SHR. La expresión de cada gen de interés se calcula empleado un oligonucleótido de referencia (barras blancas), un oligonucleótido de referencia más 20 pares de bases (barras rayadas) y un oligonucleótido de referencia más 100 pares de bases (barras negras). El aumento de la longitud del oligonucleótido de referencia no afecta significativamente al cálculo de la expresión del gen de interés. TNF α p = 0,3946; TGF β p = 0,7151; Ang0 p = 0,6158; CTGF p = 0,4955 y AT1a p = 0,5589, para el oligonucleótido de referencia frente al oligonucleótido de referencia más 20 y 100 pares de bases (ANOVA).

Figura 5: Expresión de cinco genes de interés en los corazones de ratas WKY que reciben una dieta con alto

contenido en sal en 3 grupos experimentales: un control de tiempo cero (14 semanas de edad), barras blancas; después de 4 semanas de infusión con vehículo control (18 semanas de edad), barras rayadas; y después de 4 semanas de tratamiento con VIP (18 semanas), barras negras.

5 Figura 6: Curvas patrón generadas a lo largo de 3 semanas. Las mezclas de reacción de tinte y oligonucleótido de referencia se congelaron y se conservaron a -20 °C entre las pruebas, se descongelaron para cada prueba y se volvieron a congelar. Tal como puede observarse, las curvas patrón generadas fueron estables a lo largo del tiempo y de la congelación y descongelación repetidas.

10 Figuras 7A-F: Resultados de cuantificación para seis genes de interés (angiotensinógeno, TGF β , TNF α , CTGF, At1a y NONO) empleando 5 oligonucleótidos de referencia que varían en longitud de 70 a 170 pares de bases y que varían en contenido en GC de 50% a 74%. Los oligonucleótidos de referencia mostrados en estos ejemplos son CTGF de 70 pares de bases, 50% de contenido en GC (CTGF 70/50), CTGF de 73 pares de bases, 74% de contenido en GC (CTGF 73/74), β -actina de 90 pares de bases, 50% de contenido en GC (actina 90/50), CTGF de 90 pares de bases, 50% de contenido en GC (CTGF 90/50) y CTGF de 170 pares de bases, 52% de contenido en GC (CTGF 170/52).

15 Figuras 8A-F: Muestra los resultados de cuantificación para seis genes de interés (angiotensinógeno, TGF β , TNF α , CTGF, At1a y NONO) empleando 4 oligonucleótidos de referencia que varían en longitud de 50 a 144 pares de bases y que varían en contenido en GC de 40% a 50%. Los oligonucleótidos de referencia mostrados en estos ejemplos son actina 144/40 (β -actina de 144 pares de bases, 40% de contenido en GC), CTGF 50/50 (CTGF de 50 pares de bases, 50% de contenido en GC), actina 90/50 (β -actina de 90 pares de bases, 50% de contenido en GC) y CTGF 90/50 (CTGF de 90 pares de bases, 50% de contenido en GC). * p<0,005, ** p<0,0005 frente a actina 90/50; # p<0,01, ## p<0,005, ### p<0,001 y #### p<0,0005 frente a CTGF 90/50.

20 Figure 9A: Efectos del tratamiento con VIP o enalaprilol sobre la expresión de angiotensinógeno (AGT), TGF β y CTGF en SHR, control de tiempo cero (barras blancas), control de vehículo (barras rayadas), infusión de VIP (barras negras) y tratamiento con enalaprilol (barras cuadrículadas). * p<0,05, ** p<0,025, ***p<0,0005 para VIP o enalaprilol frente al control de vehículo. # p<0,001, ## p<0,0005 para VIP o enalaprilol frente al control a tiempo cero.

25 Figura 9B: Efecto del tratamiento con VIP o enalaprilol sobre la expresión del receptor de NF Kappa B, TNF α y AT1a en SHR. * p<0,01, ** p<0,0005 para VIP o enalaprilol frente al control de vehículo; # p<0,05, ## p<0,0005 para VIP o enalaprilol frente al control a tiempo cero.

30 Figura 9C: Efecto del tratamiento con VIP o enalaprilol sobre la expresión de metaloproteinasa y TIMP en SHR. *p<0,025, ** p<0,0005 para VIP o enalaprilol frente al control de vehículo; # p<0,01, ## p<0,001, ### p<0,0005 para VIP o enalaprilol frente al control a tiempo cero. Los valores son el promedio \pm mee para n = 6 ratas.

Definiciones

35 El término y las expresiones "gen" o "ácido nucleico diana" o "gen diana" o "gen de interés" o "secuencia diana de interés" o "diana de interés" o "ácido nucleico de interés", tal como se emplean en la presente, se utilizan de modo intercambiable y se refieren al mismo concepto.

La expresión "ácido nucleico" se refiere a moléculas que están compuestas de cadenas de nucleótidos monoméricos. Tal como se emplea en la presente, la expresión pretende incluir ADN, ARN y sus variantes y derivados.

40 Un "gen", tal como se emplea en la presente, puede ser un gen natural (por ejemplo, genómico) o sintético que comprende secuencias reguladores transcripcionales y/o traduccionales y/o una región codificadora y/o secuencias no traducidas (por ejemplo, intrones, secuencias no traducidas 5' y 3'). La región codificadora de un gen puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos o un ARN funcional, tal como ARNt, ARNr, ARN catalítico, ARNip, miARN o ARN antisentido. El término "gen" también puede incluir ADNc que se corresponde con las regiones codificadoras (por ejemplo, exones) que comprenden opcionalmente las secuencias no traducidas 5' o 3' unidas a él. Un gen también puede ser una molécula de ácido nucleico amplificada producida *in vitro* que comprende toda o parte de la región codificadora y/o las secuencias no traducidas 5' o 3' unidas a ella.

45 La "amplificación" de secuencias de ácidos nucleicos puede lograrse de modo conveniente mediante una reacción en cadena con polimerasa (PCR), pero también puede lograrse mediante cualquier otro método adecuado, tal como una reacción en cadena con ligasa. En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "reacción en cadena con polimerasa" y su acrónimo "PCR" se emplean según su significado normal tal como lo entienden los expertos en la técnica. Pueden encontrarse ejemplos de métodos de PCR en los libros de texto de biología molecular habituales y los manuales de referencia empleados en la técnica. Por ejemplo, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (1989), ed. H. A. Erlich, Stockton Press, Nueva York. Para optimizar la amplificación por PCR, los cebadores pueden emplearse a diferentes concentraciones y proporciones. 55 La selección de estas y otras variables será comprendida por los expertos en la técnica, que pueden ponerla en práctica.

Un "amplicón" en el contexto de la presente invención se refiere a trozos de ADN o productos de ácidos nucleicos que se forman mediante reacciones de amplificación, tales como las realizadas mediante PCR o reacciones en cadena con ligasa. En un contexto, el amplicón puede ser el producto del "ácido nucleico diana" o "gen de interés" o "ácido nucleico de interés", etc.

- 5 El término "cebador" puede emplearse de modo intercambiable con "oligonucleótido", y puede ser natural, sintético o una de sus modificaciones y puede ser capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis de nucleótidos suficientemente complementarios con una secuencia de nucleótidos específica sobre una molécula molde.

10 El "oligonucleótido de referencia" o "secuencia de ácido nucleico de referencia" u "oligonucleótido de referencia universal", tal como se emplean en el contexto de la presente invención, son un ácido nucleico, preferiblemente ADN bicatenario, e incluyen cualquier ácido nucleico con el tamaño adecuado útil en la preparación de una curva patrón o adecuado de otra forma para la cuantificación de ácidos nucleicos diana de interés. Por tanto, el oligonucleótido de referencia puede ser un polinucleótido, pero también puede ser una secuencia más corta. Las características adecuadas del oligonucleótido de referencia se describen en la presente.

15 El oligonucleótido de referencia puede ser totalmente sintético o puede obtenerse a partir de fuentes naturales de ADN empleando una enzima de restricción adecuada para obtener un ácido nucleico de tamaño adecuado como oligonucleótido de referencia.

20 Para obtener cantidades grandes adecuadas, el oligonucleótido de referencia puede amplificarse empleando una reacción de amplificación (por ejemplo, PCR o reacción en cadena con ligasa) o puede expresarse de modo recombinante en un microorganismo y purificarse antes del uso. Si el tamaño del oligonucleótido de referencia lo permite, también puede prepararse en cantidad por medios sintéticos.

Un "gen constitutivo" ("housekeeping gene") generalmente es un gen constitutivo que es necesario para el mantenimiento de la función celular basal. Estos genes se encuentran en todas las células. Algunos genes constitutivos se expresan a niveles relativamente constantes, aunque otros genes constitutivos pueden variar en su expresión dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas.

25 Una "curva patrón" es una herramienta de investigación cuantitativa, un método para representar gráficamente datos de ensayos que se emplea para determinar la concentración absoluta de una sustancia, tal como ADN y proteínas.

La "cuantificación", tal como se emplea en el contexto de la presente invención, significa detectar la cantidad absoluta de una sustancia, en el presente caso el "gen diana de interés".

30 Una "dilución en serie" se refiere a cualquier forma de dilución necesaria para preparar una curva patrón que cubra un intervalo de concentraciones de una sustancia (por ejemplo, un ácido nucleico) a partir de la cual puede cuantificarse un "ácido nucleico diana".

35 En el contexto de la presente invención, "ADNbc" se refiere a ADN bicatenario, "pb" se refiere a pares de bases, "dNTP" se refiere a desoxinucleótido trifosfato, "ARN" se refiere a ácido ribonucleico, "ARNt" se refiere a ARN de transferencia, "ARNr" se refiere a ARN ribosómico, "ARNip" se refiere a ARN de interferencia pequeño, "miARN" se refiere a microARN, "ARNm" se refiere a ARN mensajero y "ADNc" se refiere a ADN complementario.

El "contenido en GC" de una secuencia de ácido nucleico, tal como un cebador, tiene un efecto sobre diversas propiedades de un cebador, que incluyen su temperatura de fusión (Tf).

Realización preferida de la invención

40 La presente invención ha sido motivada por la falta de un medio preciso y eficaz para cuantificar la expresión de ácidos nucleicos en grupos animales/humanos control y de tratamiento. También ha sido motivada por el hecho de que la mayoría de los genes constitutivos conocidos empleados en los estudios de expresión de genes se mueven en respuesta a tratamientos o condiciones experimentales, sesgando así los resultados.

45 Una ventaja de la presente invención es que los métodos descritos evitan la necesidad de genes constitutivos o genes de referencia sintéticos empleados para normalizar los datos y cuantificar la expresión génica. Otra ventaja de la presente invención es que la amplificación de un ácido nucleico diana, habitualmente mediante PCR aunque puedan emplearse otros métodos, puede realizarse a lo largo de un número reducido de ciclos (por ejemplo, 15 ciclos) en lugar de los habituales 30 ciclos más o menos empleados para los estudios de expresión de genes, proporcionando así una cantidad suficiente de ácidos nucleicos diana para su uso en el ensayo de cuantificación y, al mismo tiempo, reduciendo significativamente el tiempo y el coste de los ensayos.

50 En la nueva estrategia descrita en la presente, se emplea un tinte en combinación de un oligonucleótido de referencia de una longitud predeterminada que, de modo ventajoso, puede no estar relacionado con el ácido nucleico diana de interés, pero que también puede ser similar o idéntico al gen de interés, para generar una curva patrón. La curva patrón se genera diluyendo en serie un oligonucleótido de referencia marcado con fluorescencia según la invención y representando gráficamente el nivel de intensidad del tinte fluorescente frente a la

concentración de oligonucleótido de referencia marcado. No es necesaria la amplificación del oligonucleótido de referencia para producir la curva patrón. Esto contrasta con las actuales metodologías para evaluar la expresión de genes, en las que la muestra de ensayo y el gen constitutivo/gen de referencia sintéticos son ambos amplificados en paralelo o combinados en una mezcla de reacción.

5 La misma curva patrón, una vez preparada, puede emplearse numerosas veces si es necesario para cuantificar más de un ácido nucleico diana de interés. Las disoluciones de oligonucleótidos de referencia diluidas empleadas para la preparación de la curva patrón son estables a lo largo del tiempo, por ejemplo, a lo largo de un periodo de aproximadamente un mes, y de la congelación y descongelación repetida de las disoluciones. Esto permite la preparación y la conservación de disoluciones de oligonucleótidos de referencia mucho antes de cualquier requisito experimental.

10 El oligonucleótido de referencia puede ser una secuencia totalmente sintética, una secuencia amplificada (por ejemplo, generada mediante PCR), o un fragmento de restricción con el tamaño adecuado procedentes de un ácido nucleico más grande aislado a partir de una fuente natural. El oligonucleótido de referencia empleado en los métodos de la presente invención no es lo que se describe como un "gen constitutivo" o un "gen de referencia sintético", es decir, no es necesario que se amplifique junto con el gen de interés.

15 Puede resultar deseable diseñar oligonucleótidos de referencia de diferentes longitudes para preparar curvas patrón para cuantificar ácidos nucleicos diana de diferentes longitudes, pero esto no es crucial para el método de la presente invención. Sin embargo, una ventaja concreta de la presente invención es que un único oligonucleótido de referencia de una longitud fijada concreta puede utilizarse en una curva patrón para cuantificar ácidos nucleicos diana que son más largos o más cortos que el oligonucleótido de referencia, así como tener diferentes secuencias de ácido nucleico.

20 El oligonucleótido de referencia tendrá, de modo deseable, una longitud mayor que 60 pb y generalmente estará en el intervalo de entre aproximadamente 60 pb y aproximadamente 170 pb (concretamente, aproximadamente 60, 70, 80, 90 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 o aproximadamente 170 pb), y puede emplearse para cuantificar ácidos nucleicos diana en el intervalo entre aproximadamente 80 a aproximadamente 210 pb de longitud, más generalmente en el intervalo entre aproximadamente 80 y aproximadamente 150 pb de longitud. Además, cualquier oligonucleótido de referencia que tenga una longitud en el intervalo indicado anteriormente puede emplearse para cuantificar uno o más productos de ácidos nucleicos diana con una longitud en el intervalo mencionado anteriormente. Se entenderá que la longitud de la secuencia diana es irrelevante para el método de la presente invención, puesto que es seleccionado como un ácido nucleico de interés (o múltiples ácidos nucleicos de interés) por aquellos que empleen el método.

25 El límite superior de longitud del oligonucleótido de referencia no es crucial y se decidirá tomando en cuenta consideraciones prácticas. Así, puede emplearse un oligonucleótido de referencia mayor que 170 pb, si se desea, en el método de la presente invención sin efectos perjudiciales sobre la cuantificación de un ácido nucleico diana (por ejemplo, unas longitudes entre aproximadamente 170-180, 180-200, 200-220, 220-240, 240-260, 260-280, 280-300, 300-320, 320-340, 340-360, 360-380, 380-400 pb etc.).

30 Resulta deseable que el contenido en GC de un oligonucleótido de referencia sea 45% o mayor. El límite superior del contenido en GC no es crucial. Así, los oligonucleótidos de referencia con 75% de contenido en GC producen resultados similares a los oligonucleótidos de referencia que tienen un contenido en GC menor. Generalmente, el contenido en GC del oligonucleótido de referencia puede seleccionarse en el intervalo de aproximadamente 45% a aproximadamente 75% (por ejemplo, de aproximadamente 45%, 50%, 55%, 55%, 60%, 65%, 70% o aproximadamente 75%).

35 No es necesario que la secuencia del oligonucleótido de referencia presente homología con el ácido nucleico diana ni con cualquier otra secuencia de gen constitutivo. Sin embargo, debido al modo concreto en que el oligonucleótido de referencia se emplea en el método de la presente invención (es decir, para preparar una curva patrón tras una dilución en serie del oligonucleótido de referencia), la secuencia del oligonucleótido de referencia puede presentar un grado de homología o incluso identidad con una secuencia de ácido nucleico diana o un gen constitutivo o una parte más pequeña de estos. Una ventaja de la presente invención es que el método puede emplear el mismo oligonucleótido de referencia para cuantificar diferentes ácidos nucleicos diana. En la práctica, el oligonucleótido de referencia será un oligonucleótido de referencia universal, con una longitud y contenido en GC fijados y concretos, generalmente un oligonucleótido de 100 pb y 50% de contenido en GC. Se contempla que al menos tres oligonucleótidos de referencia diferentes en los intervalos descritos anteriormente se incluyan en un kit para poder cuantificar la gama completa de tamaños de genes (ácidos nucleicos) que se mide habitualmente.

40 Si se obtiene un oligonucleótido de referencia a partir de una fuente biológica, natural u otra, empleando una enzima de restricción para obtener un fragmento de un tamaño adecuado, el contenido en GC puede determinarse empleando técnicas de biología molecular convencionales muy conocidas por los expertos en la técnica y no se requerirá más que unos procedimientos analíticos sencillos para seleccionar y determinar un fragmento de un tamaño adecuado (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). También pueden emplearse de modo conveniente oligonucleótidos de

referencia sintéticos y estos pueden prepararse de forma sencilla mediante técnicas conocidas, tales como las descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., y Roe *et al.*, DNA Isolation and Sequencing" (Essential Techniques Series) (1996), John Wiley & Sons, Inc., N.Y. La longitud y el contenido en GC deseados de un oligonucleótido de referencia sintético pueden seleccionarse con facilidad durante la síntesis.

El método de la invención es adecuado para su uso con tintes intercalantes, así como con sondas fluorescentes (tintes). Para los tintes intercalantes, la longitud del oligonucleótido de referencia no afecta a la intensidad de la fluorescencia para una concentración dada del oligonucleótido de referencia, con la condición de que la longitud del oligonucleótido de referencia sea de 60 pb o mayor. No parece que exista un límite superior de longitud del oligonucleótido de referencia que afecte a la intensidad de la fluorescencia. Como consecuencia, un oligonucleótido de referencia es adecuado para su uso como patrón de referencia para cualquier número de secuencias diana de ácidos nucleicos de interés que puedan tener longitudes, contenido en GC y/o secuencia de nucleótidos diferentes. Para sondas fluorescentes, el mismo oligonucleótido de referencia puede emplearse para numerosas dianas de ácidos nucleicos estudiadas en serie, siempre que se emplee el mismo fluoróforo. Como alternativa, pueden generarse múltiples curvas patrón empleando un oligonucleótido de referencia, pero distintos fluoróforos para proporcionar un marco cuantitativo para productos de la RT-PCR múltiplex.

Así, el método de la presente invención resulta ventajoso, puesto que elimina la necesidad de amplificar un gen constitutivo y realizar constantemente ensayos para genes constitutivos o genes de referencia sintéticos para normalizar los datos de expresión de los ácidos nucleicos dentro de cada experimento. Puede prepararse una curva patrón y emplearse a lo largo de un periodo de tiempo para cuantificar más de un ácido nucleico diana de interés que puede variar en tamaño y secuencia, disminuyendo con ello el coste y el tiempo cuando se compara con los ensayos de expresión de genes convencionales.

Los métodos de la presente invención se prestan a la automatización, así como al control de la amplificación y cuantificación de ácidos nucleicos diana a tiempo real almacenando la información de la curva patrón del oligonucleótido de referencia en un sistema informático antes de comenzar a amplificar el ácido nucleico diana de interés y tomando muestras de las reacciones de amplificación en ciertos periodos de tiempo o controlando el aumento en la fluorescencia a lo largo del tiempo (a tiempo real) y relacionando la información con la información de la curva patrón almacenada. Cuando se ejecutan los métodos de este modo puede generarse una curva patrón periódicamente, por ejemplo, cada semana o cada mes, y esta información se almacena y se emplea para cuantificar ácidos nucleicos diana de interés a lo largo de un periodo de tiempo sin que sea necesario preparar nuevas curvas patrón.

El método de la presente invención y el kit según se definen en la presente pueden emplearse de modo ventajoso para cuantificar genes (ácidos nucleicos) de interés que presentan productos génicos (ácidos nucleicos) que se encuentran habitualmente en laboratorios analíticos y de investigación y que normalmente tienen una longitud en el intervalo de 80 a 150 pb y presentan de 30% a 60% de contenido en GC, empleando un único oligonucleótido de referencia. Más en concreto, el método de la presente invención y el kit según se definen en la presente son útiles para cuantificar productos de ácidos nucleicos que tienen una longitud mayor que 60 pb y 35% de contenido en GC empleando un único oligonucleótido de referencia que preferiblemente tiene una longitud de 100 pb y 50% de contenido en GC. Por tanto, el formato del kit preferido consiste en dicho oligonucleótido de referencia o sus diluciones en serie y el tinte u otro marcador detectable adecuado empleado en la reacción para el ácido nucleico de interés. Como alternativa, el kit incluye un oligonucleótido de referencia marcado con un tinte u otro marcador adecuado, o diluciones en serie de dicho oligonucleótido de referencia marcado y el tinte o marcador que se va a utilizar para marcar el ácido nucleico de interés.

Como guía general para preparar una curva patrón que se va a emplear en el método de la presente invención, el oligonucleótido de referencia se diluye en serie por duplicado empleando el mismo tampón de reacción que se utiliza para el gen de interés para producir unas cantidades finales, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 pmol (puede ser un intervalo más estrecho o más amplio) del oligonucleótido de referencia por tubo de reacción, para permitir la construcción de una curva patrón (de referencia) según se describe en la presente. El intervalo de concentraciones del nucleótido de referencia se determina mediante simple ensayo y error, dependiendo de los requisitos. Después se añade un marcador detectable, tal como un tinte fluorescente (el mismo que se empleó para el gen de interés y en la misma cantidad que la empleada para la reacción del gen de interés) a cada tubo de reacción. Generalmente, los tubos de reacción se someten a 15 ciclos (pueden ser más ciclos si se desea) en una máquina de RT-PCR a tiempo real, y las condiciones de ciclado reflejan las empleadas para el gen de interés. Así, si las condiciones de desnaturalización iniciales para el gen de interés son, por ejemplo, de 94 °C y 2 minutos, los tubos que contienen las diluciones en serie del oligonucleótido de referencia (que se van a utilizar para construir la curva patrón) se someten a una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos. Los siguientes 15 ciclos serán análogos a los del gen de interés, de modo que si las condiciones de ciclado del gen de interés incluyen, por ejemplo, una desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, seguida de una reasociación a 60 °C durante 30 segundos, los tubos que contienen las diluciones en serie del oligonucleótido de referencia también se ciclan a 95 °C durante 30 segundos (desnaturalización) y a 60 °C durante 30 segundos (reasociación). Si se emplea un tinte fluorescente como marcador, la fluorescencia puede adquirirse durante cada fase de reasociación tal como se demuestra en las figuras 1 y 2. Después se construye una curva patrón (de referencia) de fluorescencia frente a

la cantidad de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) tal como se describe en la presente.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cálculos

5 En una RT-PCR, después de un número predeterminado de ciclos (c), la cantidad del gen de interés presente (R) se relaciona con la cantidad de ese gen presente al inicio de la amplificación con PCR (n) de un modo reproducible, si la eficacia de la replicación es del 100% y en cada ciclo se replica cada copia del gen.

$$R = n \times 2^c$$

n = replications presentes en el momento 0

c = número de ciclos a una fluorescencia predeterminada

10 R = replications presentes después de c ciclos

Cuando la eficacia es menor que 100% y no todas las copias de un gen son replicadas en cada ciclo y la ecuación se modifica para tomar en cuenta esta disminución en la eficacia de la replicación, entonces:

$$R = n \times e^c$$

e = eficacia de la replicación

15 c = número de ciclos a una fluorescencia predeterminada

R = replications presentes después de c ciclos

Ejemplo 2: Preparación de los oligonucleótidos de referencia

20 Aunque el ejemplo citado emplea ARN para el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) para generar los oligonucleótidos de referencia, debe apreciarse que los oligonucleótidos de referencia que se van a emplear como patrón pueden generarse a partir de cualquier ARN para cualquier gen o para ADN codificador o no codificador. Se prepararon oligonucleótidos de referencia con una longitud de 70, 90 y 170 pares de bases mediante la amplificación de segmentos del gen CTGF procedentes de tejido cardíaco de ratas hipertensas espontáneas (SHR) como sigue:

1) Extracción de ARN

25 Se recolectaron tejidos de animales SHR para la extracción de ARN total con fenol e isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987) con modificaciones. Corazones de SHR congelados en nitrógeno líquido se homogeneizaron mediante un mezclador de molino MM300 (Retsch GmbH, Alemania). Las muestras criogénicas, cada una de 100 mg, se añadieron a 1 ml de reactivo de trizol (Invitrogen) en un tubo de microensayo de 1,5 ml Safe-Lock (Eppendorf Biopur, Hamburgo, Alemania) con esferas de carburo de wolframio de 3 mm (Qiagen) y se trituraron a una frecuencia de 30 Hz. Después se realizó la extracción del ARN según las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). Después de que las muestras se disgregaran para obtener el ARN, se realizó la separación de las fases, por lo cual se añadieron 200 ml de cloroformo (Lab-Scan Analytical Sciences, Lomb Scientific, Taren Point, NSW, Australia) y la muestra se agitó vigorosamente a mano durante 15 segundos y después se incubó a la temperatura ambiente (23-30 °C) durante 5 minutos antes de una centrifugación a 12.000 rpm (13.201 g) durante 20 minutos a 4 °C (sin freno), empleando una centrífuga Sigma 1-15PK (John Morris Scientific, Chatswood, NSW, Australia). Se recogieron 300 ml de la fase acuosa superior y se trasladaron a un tubo Eppendorf de 1,5 ml nuevo y se añadieron 500 ml de propan-2-ol (isopropanol) preenfriado (Lab-Scan Analytical Sciences, Lomb Scientific, Taren Point, NSW, Australia), y la muestra se invirtió a mano unas pocas veces para mezclar. La mezcla se incubó a temperatura durante 10 minutos para que el ARN precipitase. Se formó un sedimento mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C (John Morris Scientific, Chatswood, NSW, Australia). El sobrenadante se rechazó y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol de calidad molecular absoluto al 75% (en v/v) (Lab-Scan Analytical Sciences, Lomb Scientific, Taren Point, NSW, Australia) diluido en pirocarbonato de dietilo (DEPC) (Sigma- Aldrich, Castle Hill, NSW, Australia) y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C (John Morris Scientific, Chatswood, NSW, Australia). El sedimento se recogió y se secó al aire durante unos pocos minutos en una campana extractora, después se disolvió en agua Milli-Q tratada con DEPC y se conservó a -80 °C. Se determinó la concentración del ARN total mediante la absorbancia en un espectrofotómetro empleado Nanodrop 1000 (Nd- 1000, Thermo Scientific) a 260 nm (A_{260}); la pureza del ARN se consideró satisfactoria si la proporción de $A_{260}:A_{280}$ era de aproximadamente 2,0.

2) Tratamiento con desoxirribonucleasa 1 (ADNasa-1)

50 Se trataron muestras de ARN con ADNasa-1 (Invitrogen) antes de la reacción en cadena con polimerasa-transcripción inversa (RT-PCR) para eliminar el ADN bicatenario y monocatenario. En tubos Eppendorf sin ADNasa ni ARNasa de 0,5 ml se digirió hasta 1 µg de ARN con ADNasa-1 1 unidad/µl y 1 µl de 10X tampón de reacción de

ADNasa-1 en un volumen total de 10 µl con agua tratada con DEPC. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de inactivar la ADNasa-1 quelando iones de calcio y magnesio con 1 µl de EDTA 25 mM en la mezcla de disolución y calentando a 65 °C durante 10 minutos. Las muestras se enfriaron sobre hielo y se conservaron a -80 °C. Todos los componentes de la mezcla fueron suministrados en el kit de ADNasa-1 (Invitrogen).

5 3) Evaluación de la calidad y la concentración del ARN

Las muestras de ARN tratadas con ADNasa-1 se analizaron en un instrumento de electroforesis automático con microchip MCE-202 MultiNA (Shimadzu Biotech, Rydalmere, NSW, Australia) para la pureza, el tamaño y la concentración de las subunidades 18S y 28S del ARN ribosómico (ARNr). Todas las etapas se realizaron según la recomendación del fabricante, con pequeñas modificaciones. Brevemente, 3 µl de cada mezcla se mezclaron con un volumen igual de marcador de ARN interno (Shimadzu Biotech, Rydalmere, NSW, Australia) en una placa de 96 pocillos y se sellaron con una lámina de aluminio de PCR adhesiva (Thermo Scientific, Integrated Sciences, NSW, Australia). El ARN, junto con los marcadores de patrones internos con una concentración y tamaño conocidos (marcadores de tamaño molecular superior e inferior), corrigen automáticamente los resultados de la electroforesis para la predicción del tamaño y la cuantificación automáticas de las muestras de ARN. Se diluyó una escalera de ARN-6000 (Applied Biosystems, Victoria, Australia) con agua tratada con DEPC a una proporción de 1:5 (en v/v); después la mezcla de disolución se mezcló con la disolución de marcador de ARN a 1:1 (en v/v). Las mezclas de las muestras y de la escalera se termodesnaturalizaron a 65 °C durante 5 minutos e inmediatamente se enfriaron en hielo durante 5 minutos. Estas separaciones por intervalos de tamaño se realizaron en microchips de MultiNA (Shimadzu Biotech, Rydalmere, NSW, Australia) en tampón de separación de ARN (Shimadzu Biotech, Rydalmere, NSW, Australia) que contenía 10.000X tinte fluorescente intercalante SYBR Green II (Invitrogen), diluido 1:99 con TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA disodio 1 mM, pH 8,0) (Sigma- Aldrich), y formamida al 20% (en v/v) (Invitrogen).

4) Transcripción inversa

Se sintetizó la primera hebra del ADN complementario (ADNc) a partir de un molde de ARN monocatenario empleando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV RT) del kit Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Todas las reacciones se realizaron en tubos Eppendorf de pared delgada de 0,2 ml y todas las etapas de incubación se realizaron en un Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia; Qiagen). Hasta 5 µg de ARN total se termodesnaturalizó a 65 °C durante 5 minutos con 1 µl de oligo (dT)₂₀ 50 µM y 1 µl de tampón de reasociación en un volumen total de 8 µl con agua tratada con DEPC. Las muestras se enfriaron en hielo durante al menos 1 minuto antes de añadirse a 10 µl de 2X mezcla de reacción de primera hebra y 2 µl de mezcla de enzimas Superscript III/ARNasaOUT. La muestra se agitó en vórtice brevemente para que se mezclase y después se recogió mediante centrifugación de pulsos y después se incubó a 50 °C durante 50 minutos para la síntesis de ADNc. La enzima RT se desnaturalizó para terminar la reacción a 85 °C durante 5 minutos, y la muestra se enfrió inmediatamente en hielo y se conservó a -20 °C. Se incluyeron muestras de control negativo sin enzima RT ni ARN para verificar la ausencia de contaminación del ADN.

5) Cebadores

Se diseñaron parejas de cebadores que generan unos productos de la PCR con una longitud de 70 pb, 90 pb y 170 pb basándose en secuencias publicadas por NCBI GenBank para ARNm de rata para el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) (n.º de registro AB023068). Las secuencias de los cebadores (las secuencias de los cebadores tienen en sí mismas una longitud de 21-24 bases) se enviaron para la síntesis (Invitrogen) como productos liofilizados desalados. Los cebadores se reconstituyeron hasta una concentración de 50 µM con TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) (Invitrogen) y se conservaron a -20 °C.

Tabla 1: Secuencias de cebadores para CTGF de rata

Secuencias sentido (5'-3')	Secuencias antisentido (5'-3')	Intervalo de ARNm	Tamaño del producto (pb)
AAAGATGGTGCACCCTGTGTCT TC (SEQ ID NO: 1)	TGCAACTGCTTTGGAAGGACTC (SEQ ID NO: 2)	499-568	70
AAAGATGGTGCACCCTGTGTCT T (SEQ ID NO: 3)	CAGGCAAGTGCCTGGTATTTG (SEQ ID NO: 4)	499-588	90
AATGCTGTGAGGAGTGGGTGT (SEQ ID NO: 5)	CATCCCACAGGTCTTAGAACAG G (SEQ ID NO: 6)	683-852	170

6) PCR

La PCR se realizó con corazones de SHR, y cada conjunto de cebadores determina una concentración diferente de ADNbc unido a una cantidad fijada de EvaGreen. Todos los reactivos empleados en esta PCR se obtuvieron en Invitrogen, suministrados en un kit o como artículos individuales. Se amplificó 1 microlitro de ADNc en un total de 50 µl de mezcla de reacción que contenía 5 µl de 10X tampón de PCR, 1 µl de mezcla de dNTP 10 mM, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 2 µl de cada mezcla de pareja de cebadores (10 µM cada uno), 0,2 µl de ADN polimerasa Taq Platinum y 39,3 µl de agua tratada con DEPC. La PCR se realizó en un Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia; Qiagen). Las condiciones para la amplificación fueron una desnaturalización inicial a 94 °C, 2 minutos; 30-35 ciclos de desnaturalización a 95 °C, 10 segundos; reasociación a 60 °C, 20 segundos; y síntesis a 72 °C durante 20 segundos. En todos los ensayos se incluyó un control negativo sin ADNc.

7) Concentración de los productos de la PCR

Se añadieron hasta 4 µl de los productos de la PCR reunidos a la unidad de filtro 30K Amicon Ultra-4 (Millipore, North Ryde, NSW, Australia), una membrana de celulosa para concentrar el ADN, y se centrifugaron en un rotor de cubo flotante Sigma 2-16PK (John Morris Scientific, Chatswood, NSW, Australia) a 22 °C, 5000 rpm (4025 g) durante 10 minutos. El soluto concentrado se recogió en el fondo de la unidad de filtró y se conservó a -20 °C para la posterior PCR.

8) Confirmación del tamaño del ADN y cuantificación

Los productos de la PCR concentrados se analizaron en un instrumento de electroforesis automático con microchip MCE-202 MultiNA (Shimadzu Biotech, Rydalmere, NSW, Australia) para la confirmación del tamaño de la banda y la concentración. Todas las etapas se realizaron según las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones. Brevemente, se añadieron 6 µl de una dilución 1/10 (en v/v) de los productos de la PCR concentrados (diluidos en agua tratada con DEPC) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se sellaron con una lámina de aluminio de PCR adhesiva (Thermo Scientific, Integrated Sciences, NSW, Australia). Después se empleó el tampón de separación DNA-500 (Shimadzu Biotech, Rydalmere, NSW, Australia) que consiste en 10.000X de SYBR Gold (Invitrogen), diluido a una dilución de 1/100 en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA disodio 1 mM, pH 8,0) (Sigma- Aldrich), para separar las muestras de ADN a través de los microchips (Shimadzu Biotech, Rydalmere, NSW, Australia). Se analizó el tamaño de las bandas de ADN y la concentración junto con una escalera de ADN de 25 pb (Invitrogen), diluida 1:49 en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA disodio 1 mM, pH 8,0) (Sigma-Aldrich), y el marcador interno DNA-500 (Shimadzu Biotech, Rydalmere, NSW, Australia), respectivamente.

Referencia bibliográfica: Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987), Anal. Biochem., 162, 156.

Ejemplo 3

i) Preparación de la curva patrón

Siete microlitros de muestras de ADN concentradas (concretamente, los productos de 70, 90 o 170 pb), por duplicado, se diluyeron en serie en 1:1 (en v/v) de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) (Invitrogen), que varía desde puro a una dilución 1/32, y 1,25 µM de tinte EvaGreen (Biotium Inc, Hayward, CA; Jomar Biosciences, SA, Australia) en tubos de PCR de 0,2 ml que contenían un volumen de reacción de 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) (Invitrogen). La titulación se realizó en un Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia; Qiagen). Las condiciones para el ciclado fueron una desnaturalización inicial a 94 °C, 2 minutos; 15 ciclos de

desnaturalización a 95 °C, 30 segundos; y las señales fluorescentes se adquirieron durante cada etapa de reasociación a 60 °C durante 30 segundos. Se incluyeron dos controles negativos en cada prueba de curva patrón: un control sin molde y con oligonucleótido a la mayor concentración sin tinte Evagreen. Las mezclas de ADN se conservaron a -20 °C para la posterior medición repetida de la fluorescencia.

- 5 Se obtuvo la fluorescencia para cada concentración de oligonucleótido de referencia (véase la figura 1). Después los datos se representaron gráficamente como la fluorescencia (eje Y) frente al oligonucleótido presente en picomoles (eje X) (véase la figura 2), se generó la curva del mejor ajuste mediante una regresión lineal de mínimos cuadrados y se generó una ecuación de la curva patrón.

ii) Cálculos

- 10 A partir de la ecuación de la curva patrón se calculan los picomoles equivalentes a 3 niveles de fluorescencia f_1, f_2, f_3 (es decir, se eligen 3 umbrales; véase la figura 3).

A partir de la RT-PCR de la muestra de ensayo/diana se obtiene:

- la eficacia para un gen de interés (e)

- los ciclos (c_1, c_2, c_3) para cada uno de los 3 niveles de fluorescencia (f_1, f_2, f_3)

- 15 - y se generan los pmoles del gen de interés presentes en la muestra [$ADN_i(\text{pmol})$] que se corresponden con f_1, f_2, f_3 empleando la ecuación de la curva patrón.

Se calcula n (pmoles del gen de interés presentes al inicio de la reacción) a partir de:

- $ADN_i(\text{pmol}) = n_i \times e^{c_i}$

- es decir, $n_i = ADN_i / e^{c_i}$

- 20 Se promedia n_i para obtener los moles del gen de interés presentes en la muestra.

Se corrige para el ARN total presente en cada reacción y se expresa n_i como pmoles/100 ng de ARN total. Se multiplica por el número de Avogadro para poder expresarlo alternativamente como replicaciones/100 ng de ARN (véase la figura 4).

Ejemplo 4

- 25 Así, la figura 1 muestra la fluorescencia para cada concentración de oligonucleótido de referencia ensayada por duplicado. Los datos representados como fluorescencia (eje Y) frente a oligonucleótido de referencia presente expresado en pmol (eje X) en la figura 2 permiten el cálculo, mediante regresión de mínimos cuadrados, de la ecuación que define esta relación. La sustitución de f_1, f_2, f_3 (obtenidos a partir de la gráfica de fluorescencia para cada gen de interés frente al número de ciclos, véase la figura 3) en la ecuación de la curva patrón produce los pmoles calculados del gen de interés (ADN_i) presentes en los ciclos c_1, c_2, c_3 . Después pueden calcularse los pmoles del gen de interés presentes en el momento cero como se indicó anteriormente y se corrigen para el ARN total y se expresan como replicaciones después de la multiplicación por el número de Avogadro.

La comparación de los oligonucleótidos de referencia de diferentes longitudes como patrones para el cálculo de n

- 35 Se emplearon tres oligonucleótidos que difieren en longitud en 20 y 100 pares de bases para generar tres curvas patrón según se describió en el punto del método i) Preparación de la curva patrón. Después cinco genes de interés se cuantificaron independientemente empleando cada curva patrón como se describe, a su vez, en ii) Cálculos. Los resultados obtenidos para cada gen por las tres curvas se compararon mediante ANOVA, y la diferencia significativa se ajustó al nivel 0,05 (véase la figura 4). La expresión de los genes de interés no difiere significativamente entre los tres grupos. Así, las variaciones en longitud de un oligonucleótido de referencia de hasta 100 pares de bases no afectan al cálculo del gen de interés.

Aplicación a la situación experimental (véase la figura 5)

Se midieron cinco genes de interés en los corazones de ratas WKY en 3 grupos experimentales: un control de tiempo cero (barras blancas), un control de vehículo (barras rayadas) y después de un tratamiento con VIP (barras negras) empleando el método descrito anteriormente.

- 45 *Estabilidad y reproducibilidad de las curvas patrón*

Se midió la fluorescencia de los tubos que contenían diversas concentraciones del oligonucleótido de referencia y el tinte EvaGreen después de repetidas congelaciones y descongelaciones a lo largo de un periodo de tres semanas. Los niveles de fluorescencia fueron estables para cada concentración. Así, puede emplearse un patrón como patrón de cuantificación para un gran número de pruebas de RT-PCR, con la condición de emplear el mismo lote de tinte y de que la concentración del tinte no varíe entre las pruebas (véase la figura 6).

50

Ejemplo 5

Se formularon oligonucleótidos de referencia que varían en longitud de 50 a 170 pares de base y en contenido en GC de 40 a 75% a partir de diversas secciones de CTGF, α -actina y β -actina.

5 Se prepararon los oligonucleótidos de referencia como se describió en el ejemplo 2 y se prepararon curvas patrón como se describió en el ejemplo 3. Se diseñaron cebadores que generan los oligonucleótidos de referencia (de 50 a 170 pb) basándose en secuencias publicadas por NCBI Genbank para ARNm de rata para CTGF (n.º de registro AB023068) y ARNm de rata para α -actina y β -actina (n.º de registro NM 019183 y BC063166, respectivamente; véase la tabla 2).

10 Seis genes de interés (AT1a, angiotensina, TGF β , TNF α , NONO y CTGF) se cuantificaron independientemente empleando cada curva patrón como se describe, a su vez, en ii) Cálculos. Los resultados obtenidos para cada gen por las tres curvas se compararon mediante ANOVA.

Tabla 2: Secuencias de cebadores empleados para la PCR y la construcción de curvas patrón

Cebador	Secuencia (5' a 3')	Referencia (n.º de NCBI GenBank)
144 pb α-actina (40%GC)	ATGCAAAAGGAAATAACTGCAC (directo) (SEQ ID NO: 7) TTGCTTGCTGATCCACATTT (inverso) (SEQ ID NO: 8)	NM_019183
90 pb β-actina (50%GC)	TTCCTGGGTATGGAATCCTG (directo) (SEQ ID NO: 9) GGCATAGAGGTCTTTACGGATG (inverso) (SEQ ID NO: 10)	BC063166
50 pb CTGF (50%GC)	AGAGTCGTCTCTGCATGGTC (directo) (SEQ ID NO: 11) GTTTTCTCTAGGTCAGCTTC (inverso) (SEQ ID NO: 12)	AB023068
70 pb CTGF (50%GC)	AAGATGGTGCACCCTGTGTCTTC (directo) (SEQ ID NO: 13) TGCAACTGCTTTGGAAGGACTC (inverso) (SEQ ID NO: 14)	AB023068
90 pb CTGF (50%GC)	AAAGATGGTGCACCCTGTGTCTT (directo) (SEQ ID NO: 15) CAGGCAAGTGCACCTGGTATTTG (inverso) (SEQ ID NO: 16)	AB023068
170 pb CTGF (52%GC)	AATGCTGTGAGGAGTGGGTGT (directo) (SEQ ID NO: 17) CATCCCACAGGTCTTAGAACAGG (inverso) (SEQ ID NO: 18)	AB023068
73 pb CTGF (74%GC)	TGCCTGGATGGGGCCGTGGGCTG (directo) (SEQ ID NO: 19) AGGGCAGTCAGGGCTGGGCAGG (inverso) (SEQ ID NO: 20)	AB023068
120 pb CTGF (70%GC)	TCGGTGGGTCCGTGTACCGCAGC (directo) (SEQ ID NO: 21) TGGGCAGGCGCACGTCCATGCTG (inverso) (SEQ ID NO: 22)	AB023068

15 Los resultados se muestran en las figuras 7A-F y las figuras 8A-F. En estos experimentos, la cuantificación de los genes de interés solo se vio afectada (produciendo unos valores significativamente mayores de replicaciones del gen de interés) por el oligonucleótido de referencia con una longitud de 50 pb y un contenido en GC de 40%. Los oligonucleótidos de referencia de mayor longitud y mayor contenido en GC, sin limitación aparente con respecto al

límite superior de cada parámetro, proporcionaron una cuantificación precisa del gen de interés. A partir de estos experimentos puede concluirse que el límite inferior de la longitud de un oligonucleótido de referencia, útil en el método de la presente invención, es de 60 pb y el contenido en GC de 45%. Estos valores pueden representar los límites inferiores del intervalo útil de estos valores. Los límites superiores pueden ajustarse dependiendo de los requisitos. Si se va a utilizar un único oligonucleótido de referencia universal, por conveniencia, la longitud puede ajustarse a 100 pb y el contenido en GC a 50%. A partir de los datos proporcionados en la presente también puede seleccionarse cualquier longitud y contenido en GC adecuados alternativos para el oligonucleótido de referencia.

Ejemplo 6

Cada uno de estos oligonucleótidos de referencia se empleó, a su vez, para cuantificar nueve genes de interés (angiotensinógeno, TNF α , TGF β , CTGF, NONO, MMP2, MMP9 y TIMP1), cuyos productos génicos varían de 80 a 120 pares de base (véase la tabla 3 para las secuencias de los amplicones).

Tabla 3: Secuencias de amplicones para los genes de interés

Gen de interés	Amplicón	Tamaño (pb)
Angiotensinógeno (AGT)	TCTTCCCTCGCTCTCTGGACTTATCCACTGACCCAGTT CTTGCTGCCAGAAAATCAACAGGTTTGTGCAGGCTG TGACAGG (SEQ ID NO: 23)	82
TNF-α	TGTCTGAGACCAACTCAACCCAGAAAAACAAAATGG CCCTTAACTCTTCTGCTGAAGATGGTATCAAAAAGAAT	82
	CCAAGATGACTGCCCA (SEQ ID NO: 24)	
TGF-β1	CTACTGCTTCAGCTCCACAGAGAAGAAGACTGCTGTGTA CGGCAGCTGTACATTGACTTTAGGAAGGACCTGGGTT GGAAGT (SEQ ID NO: 25)	80
CTGF	CTGTTGGCGAACAAATGGCCTTTATTAAGAAATGGCT TGCTCAGGGTAACTGGTCAGATTTCCACGAGGAAGTG TTTGCTGCTTCTTTGACTATGACT (SEQ ID NO: 26)	98
NFκB	TCTGATGAACATACACCAGTAGAGGATGAAGAACCA AAGAAAAGCACTACTTCAGCATCTAGTTCGGAAGAT GATAAGAAGAAGAAAAGGAAATCTAGTCGTTCAAAA GAAAGAGCCAAG (SEQ ID NO: 27)	120
AT1a	TGTCTGAGACCAACTCAACCCAGAAAAACAAAATGG CCCTTAACTCTTCTGCTGAAGATGGTATCAAAAAGAAT CCAAGATGACTGCCCA (SEQ ID NO: 28)	90
NONO	AAGCAGGCGAAGTTTTTCATTCATAAGGATAAAGGCTT TATTCGCTTGGAACACGAACCCTAGCGGAAATTGCC AAAGTGGAGCTGGAC (SEQ ID NO: 29)	95
MMP2	CTGGCACTTTTACTACTTTAGCTGTTTGCTTTGTTTGC CCTTTGCTGTTTGGTTCAACCTTTTCAGTTTTCCACCA CACTGCATTTTTCTCACCG (SEQ ID NO: 30)	95
MMP9	CCCCAACCTTTACCAGCTACTCGAACCAATCAGCTT GTCTGTAGTTGTATACACATCCAAGCCTGTGGTTGGT CAGAAGACAACCTTTGTAGG (SEQ ID NO: 31)	93
TIMP1	GGGTGTGCACAGTGTTTCCCTGTTTCAGCCATCCCTTG CAAACCTGGAGAGTGACAGTCATTGCTTGTGGACAGAT CAGATCCTCATGGGCT (SEQ ID NO: 32)	90

Lo s nueve genes de interés se midieron en corazones de ratas SHR (n = 6) en 4 grupos experimentales: un control de tiempo cero (barras blancas), un control de vehículo (barras rayadas) y después de un tratamiento con VIP (barras negras) y un tratamiento con enalapril (barras cuadrículadas), empleando el método descrito anteriormente.

Los resultados se muestran en las figuras 9A-C. Estos resultados demuestran la capacidad del método del oligonucleótido de referencia para cuantificar con precisión la cantidad de productos de ácidos nucleicos y así aclarar con precisión los cambios en la expresión de genes producidos por el tratamiento de ratas hipertensas con

5 compuestos, tales como VIP y enalapril. El método proporciona la sensibilidad para delinear las diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados y control, así como la eficacia de diferentes tratamientos con respecto a la regulación de la expresión de genes por diferentes tratamientos. Aunque se han empleado estudios con animales concretos como ejemplo conveniente de la forma en que funciona el método en una situación experimental concreta, los mismos principios de cuantificación y el mismo método pueden aplicarse a cualquier otra situación en que sea necesaria la cuantificación precisa de productos de ácidos nucleicos, que no se vean afectados de modo no deseable por cambios en los genes constitutivos y similares.

10 Experimentos similares realizados empleando los tintes SYBR Green I, SYBR Green II, CYBR Gold, Evagreen, amarillo de oxazol, naranja de tiazol, PicoGreen, TOTO y BEBO, y los protocolos descritos anteriormente, produjeron resultados similares.

Se apreciará que el método ilustrado proporciona un método mejorado para cuantificar productos de expresión de genes sin la normalización con respecto a un gen constitutivo o a un gen sintético ni la necesidad de coamplificar los genes constitutivos/de referencia sintéticos con la secuencia diana.

15 Aunque la invención se ha descrito haciendo referencia a ejemplos específicos, los expertos en la técnica apreciarán que la invención puede realizarse de muchas otras formas.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para cuantificar ácidos nucleicos a tiempo real que comprende:
- a) marcar un oligonucleótido de referencia que tiene una longitud predeterminada con un marcador detectable;
 - 5 b) generar una curva patrón empleando diluciones en serie del oligonucleótido de referencia marcado representando gráficamente la intensidad del marcador detectable frente a la concentración del oligonucleótido de referencia marcado;
 - c) amplificar un ácido nucleico diana en presencia de un marcador detectable que marca al ácido nucleico diana amplificado,
 - 10 d) comparar con la curva patrón a tiempo real la intensidad del marcador detectable asociado con el ácido nucleico diana amplificado marcado y determinar la cantidad del ácido nucleico diana amplificado, en el que dicha curva patrón no se amplifica o coamplifica con el ácido nucleico diana.
- 2.- El método según la reivindicación 1, en el que el marcador detectable es un tinte seleccionado de un tinte que se une a ADNbc, un tinte intercalante, o un tinte fluorescente seleccionado de uno cualquiera de SYBR Green I, SYBR Green II, CYBR Gold, Evagreen, amarillo de oxazol, naranja de tiazol, PicoGreen, TOTO, BEBO o Deep Purple.
- 15 3.- El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el oligonucleótido de referencia se selecciona de un oligonucleótido que tiene una longitud de aproximadamente 60 pb o mayor, un oligonucleótido que tiene un contenido en GC de 45% o mayor, un oligonucleótido que tiene una longitud de aproximadamente 60 pb a aproximadamente 170 pb, un oligonucleótido que tiene un contenido en GC de aproximadamente 45% a aproximadamente 75%, un oligonucleótido que tiene una longitud de aproximadamente 100 pb y un contenido en GC de aproximadamente 50%, o un oligonucleótido que es más largo o más corto que el ácido nucleico diana.
- 20 4.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la amplificación del ácido nucleico diana se realiza mediante un método de reacción en cadena con polimerasa (PCR).
- 5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se emplea una única curva patrón para múltiples amplificaciones y cuantificaciones de ácidos nucleicos diana.
- 25 6.- El método según la reivindicación 5, en el que las múltiples amplificaciones y cuantificaciones de ácidos nucleicos diana se realizan cada una en diferentes momentos.
- 7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el ácido nucleico diana se amplifica a lo largo de 15 ciclos.
- 30 8.- El uso de un kit en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho kit comprende uno o más oligonucleótidos de referencia y un tinte fluorescente.
- 9.- El uso según la reivindicación 8, en el que si está presente más de un oligonucleótido de referencia, cada uno tiene una longitud diferente.
- 10.- El uso de un kit en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho kit comprende uno o más oligonucleótidos de referencia marcados con un marcador detectable.
- 35 11.- El uso de un kit en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho kit comprende diluciones en serie de uno o más oligonucleótidos de referencia marcados con un marcador detectable.
- 12.- El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que al menos un oligonucleótido de referencia tiene una longitud de aproximadamente 60 pb a aproximadamente 170 pb con un contenido en GC de aproximadamente 45% a aproximadamente 75%.

40

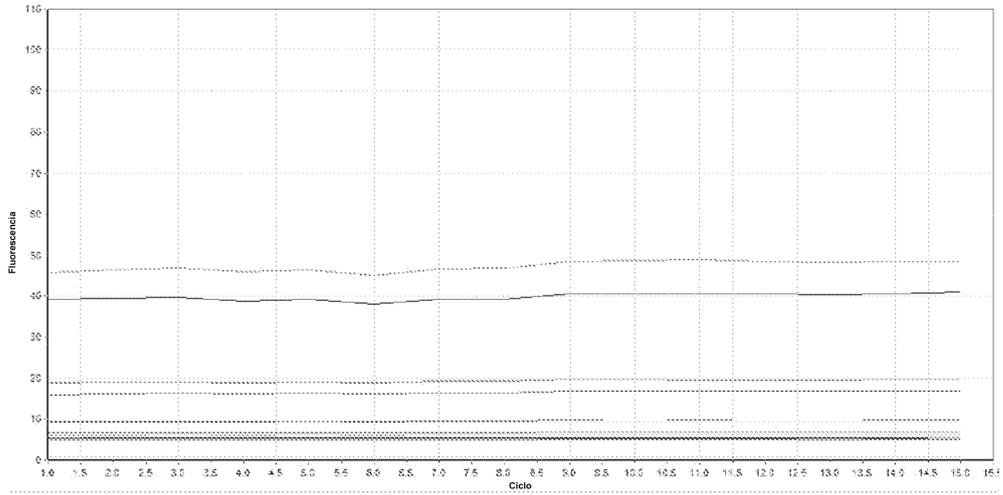


Figura 1

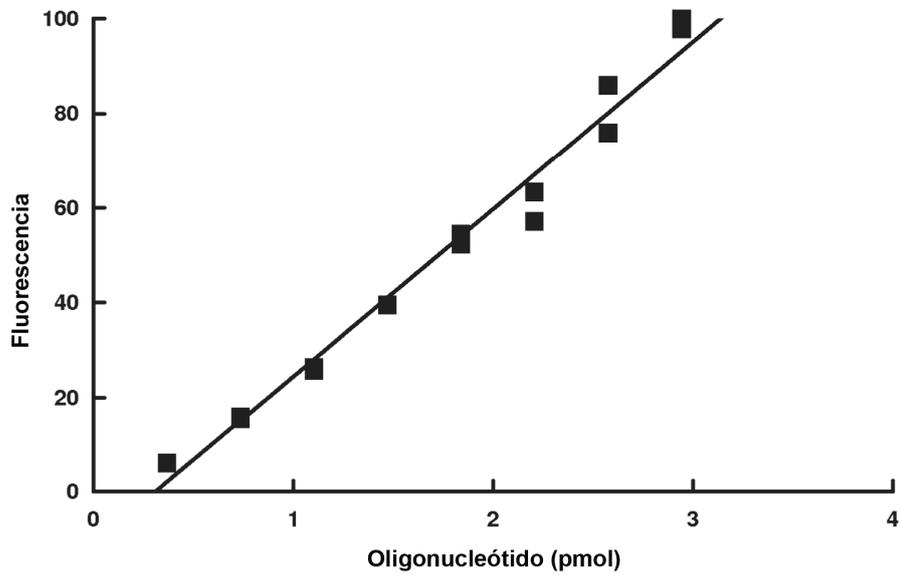


Figura 2

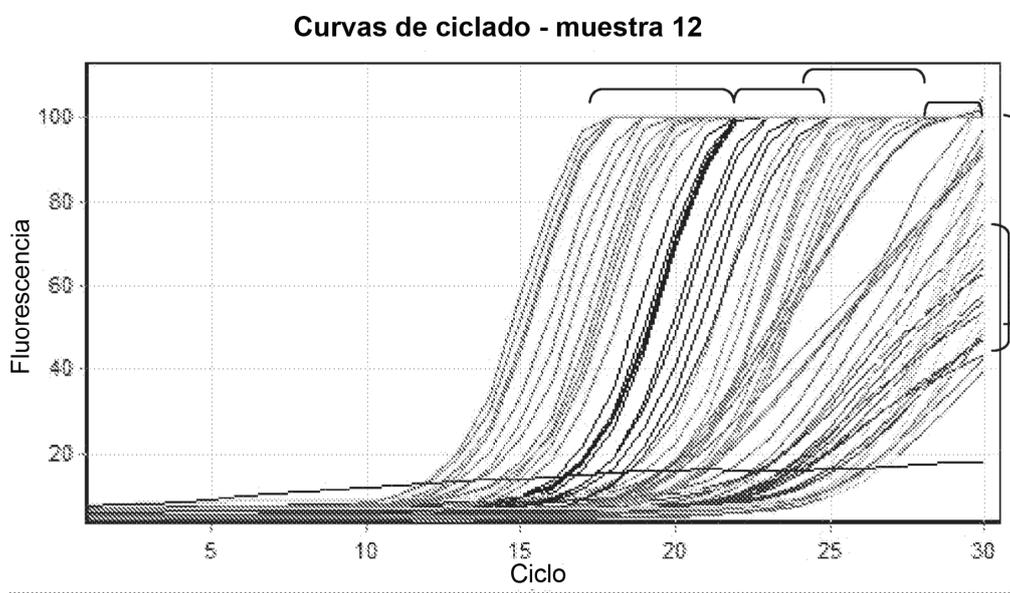


Figura 3

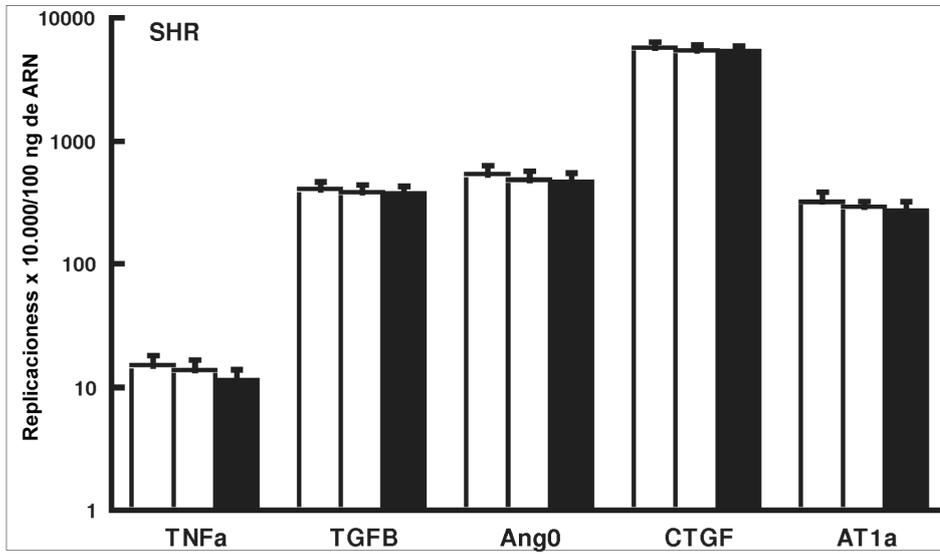


Figura 4

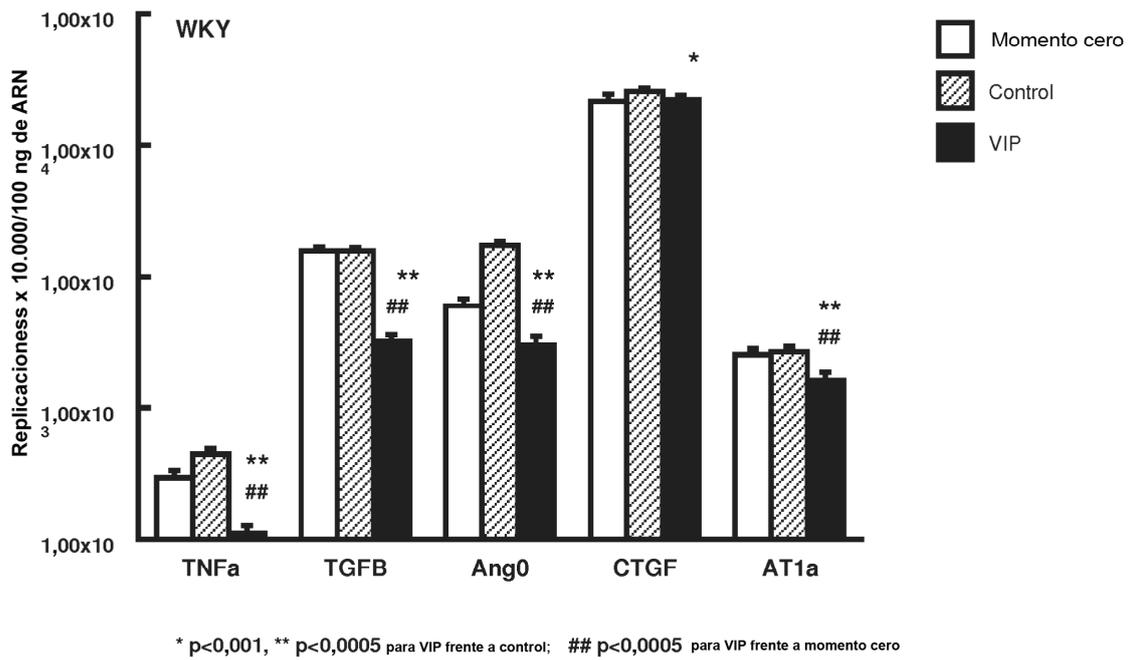


Figura 5

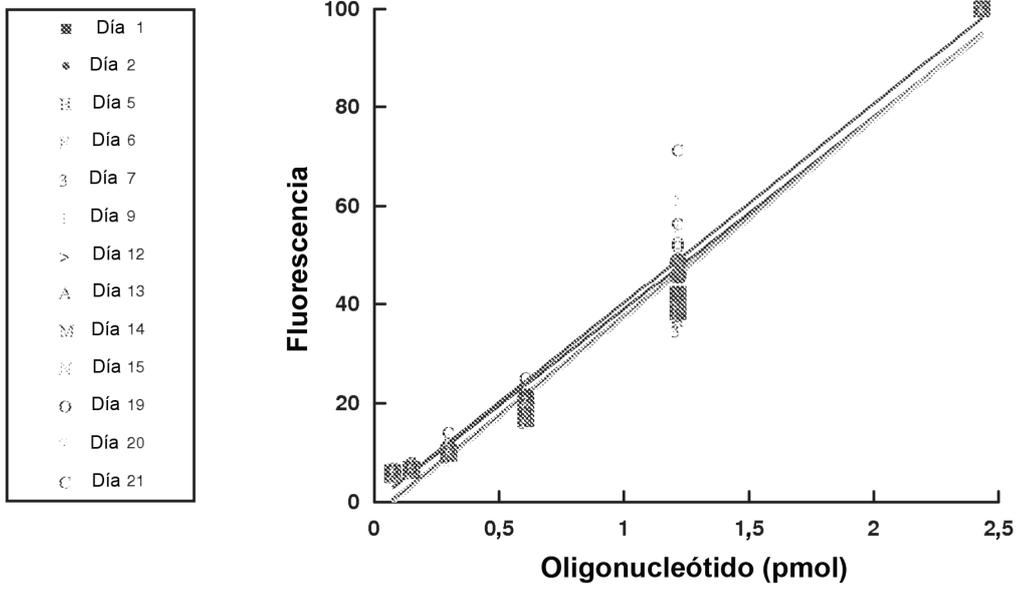


Figura 6

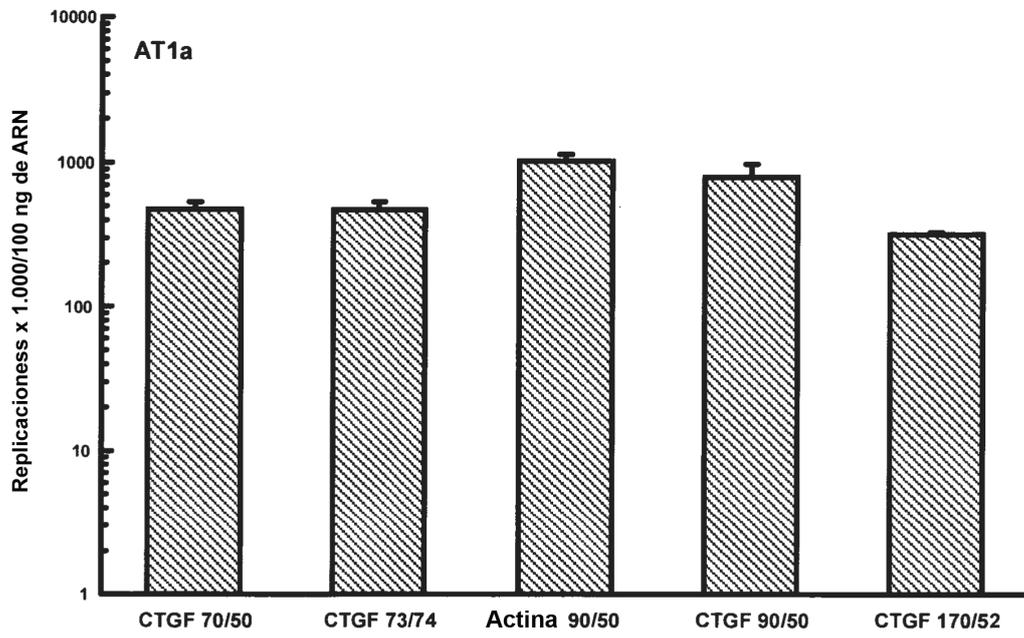


Figura 7A

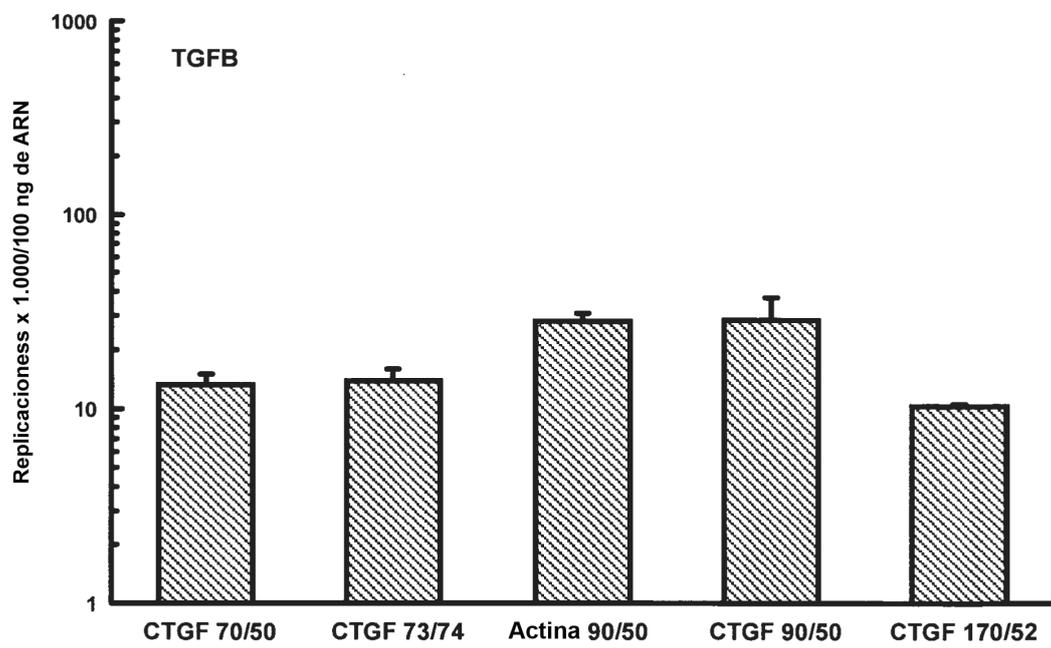


Figura 7B

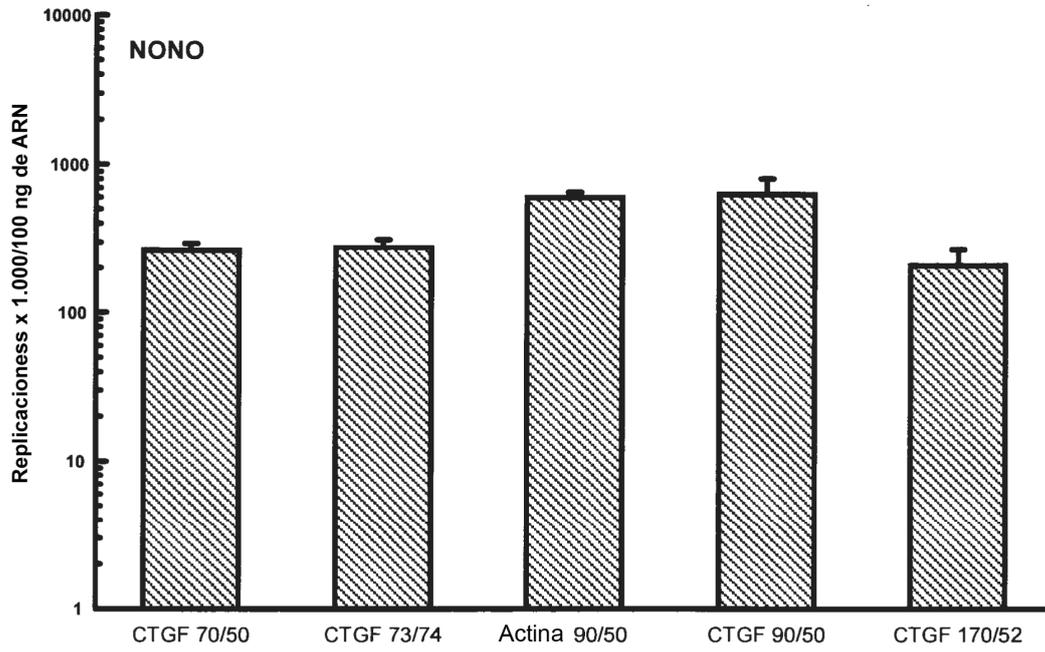


Figura 7C

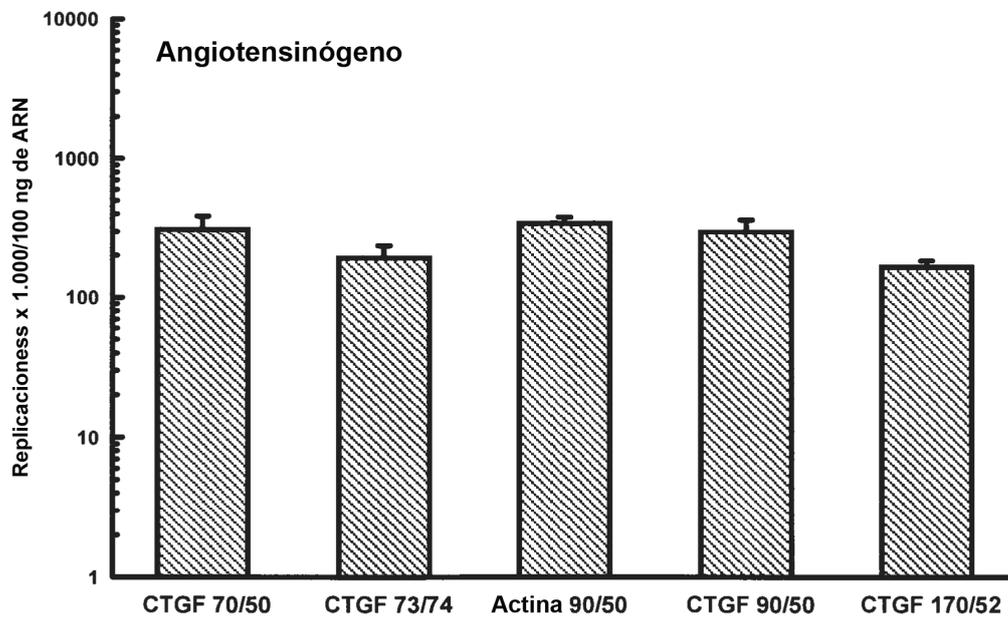


Figura 7D

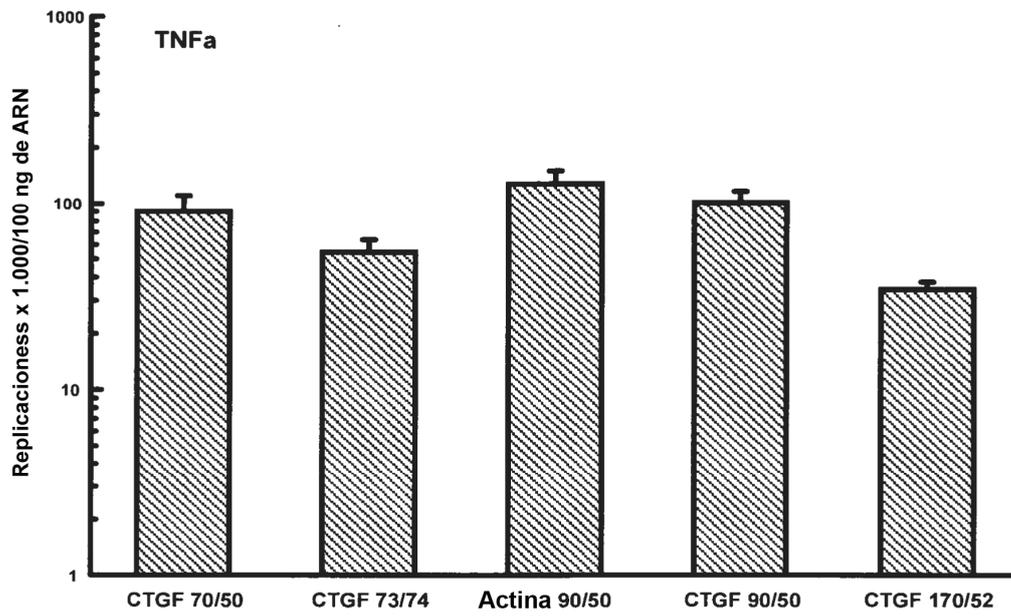


Figura 7E

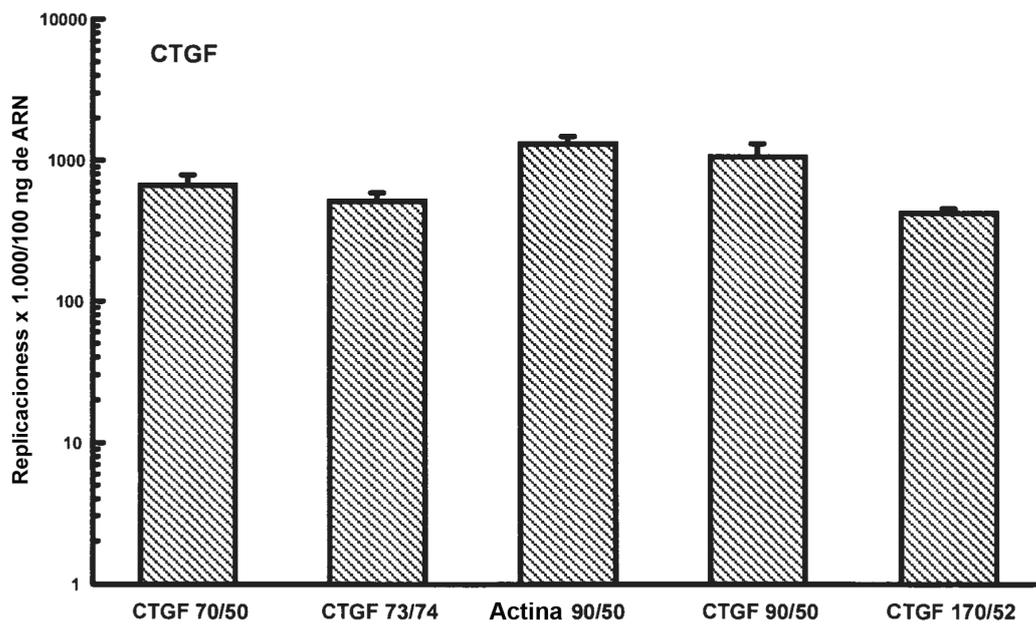


Figura 7F

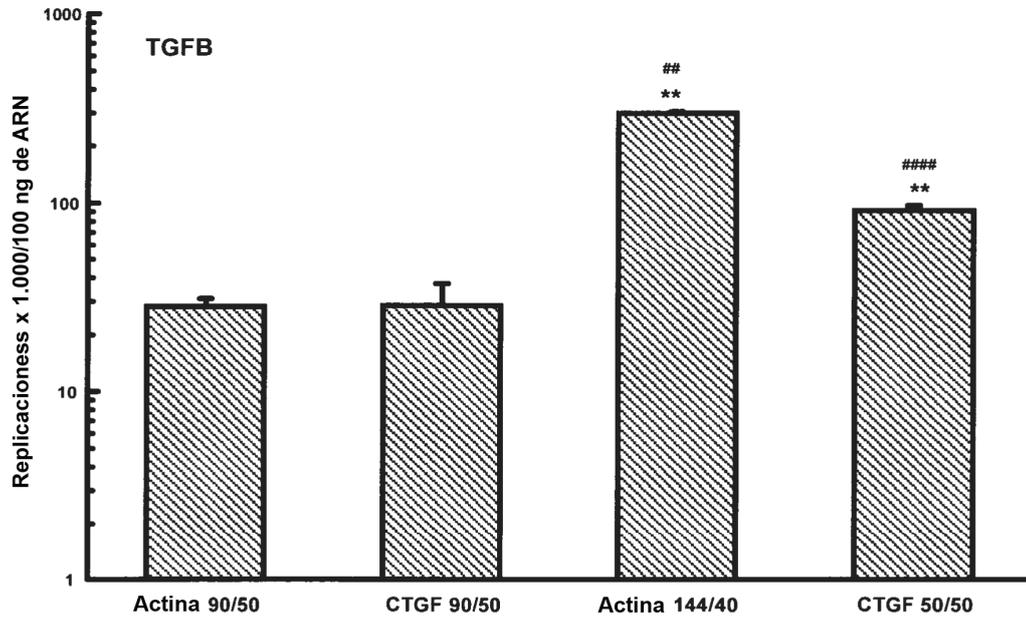


Figura 8A

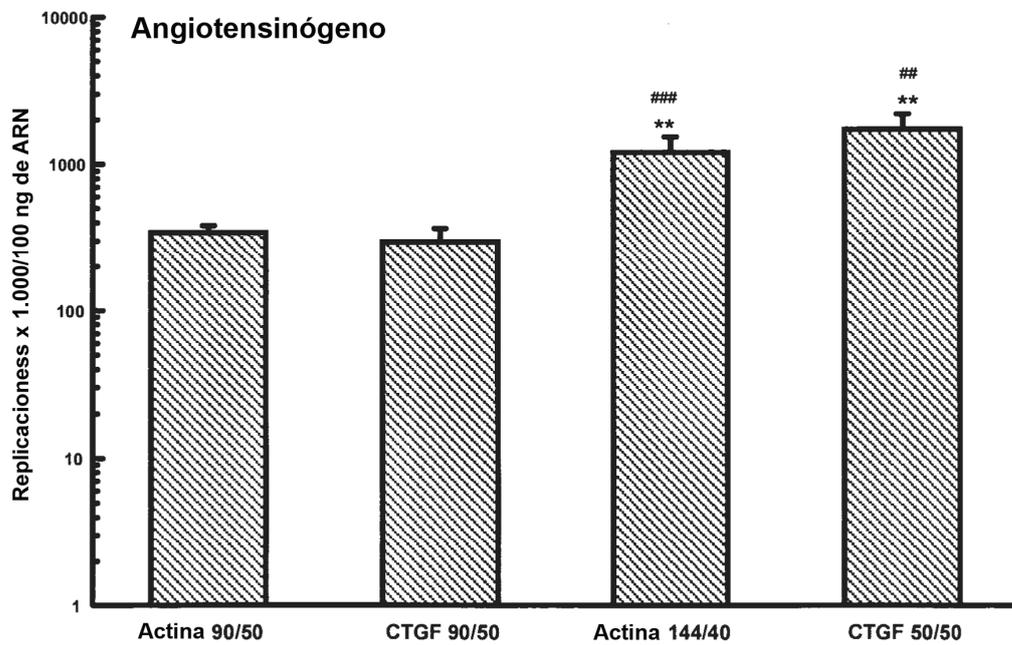


Figura 8B

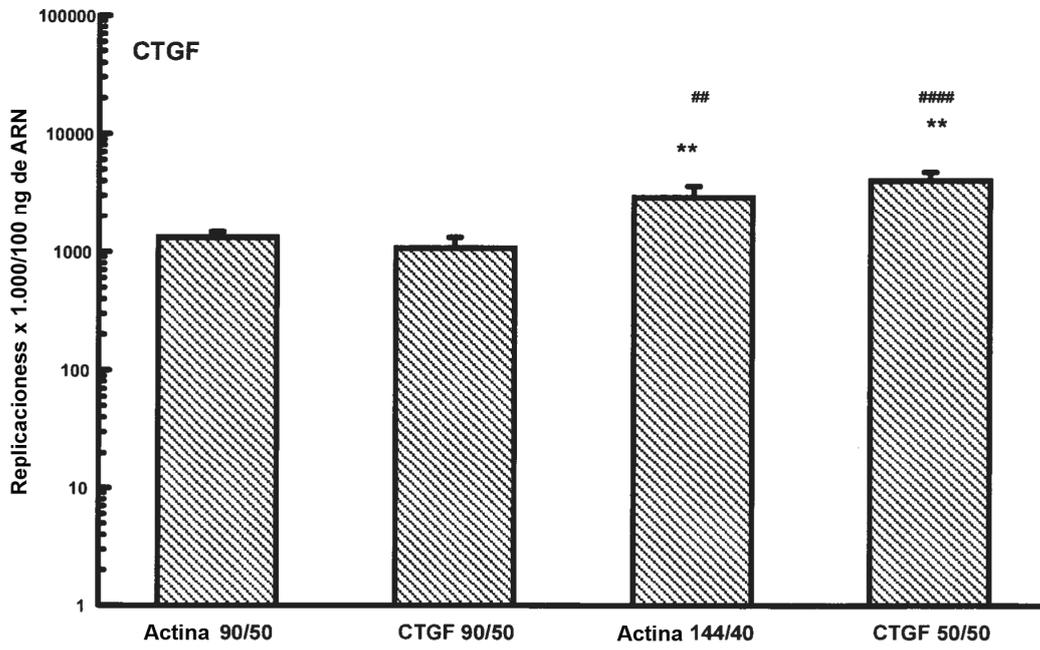


Figura 8C

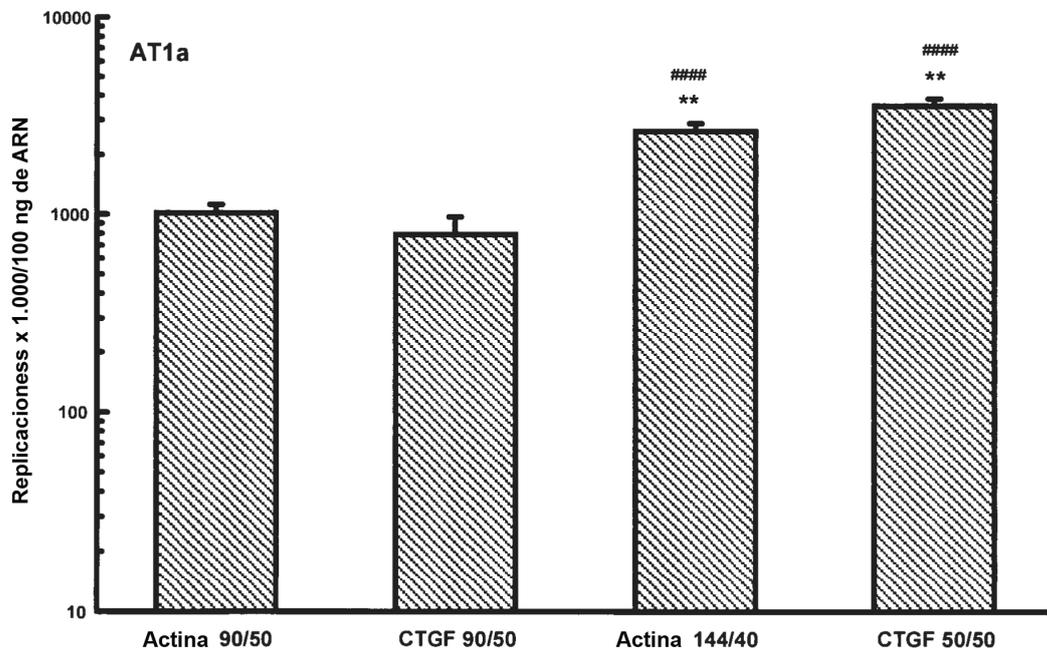


Figura 8D

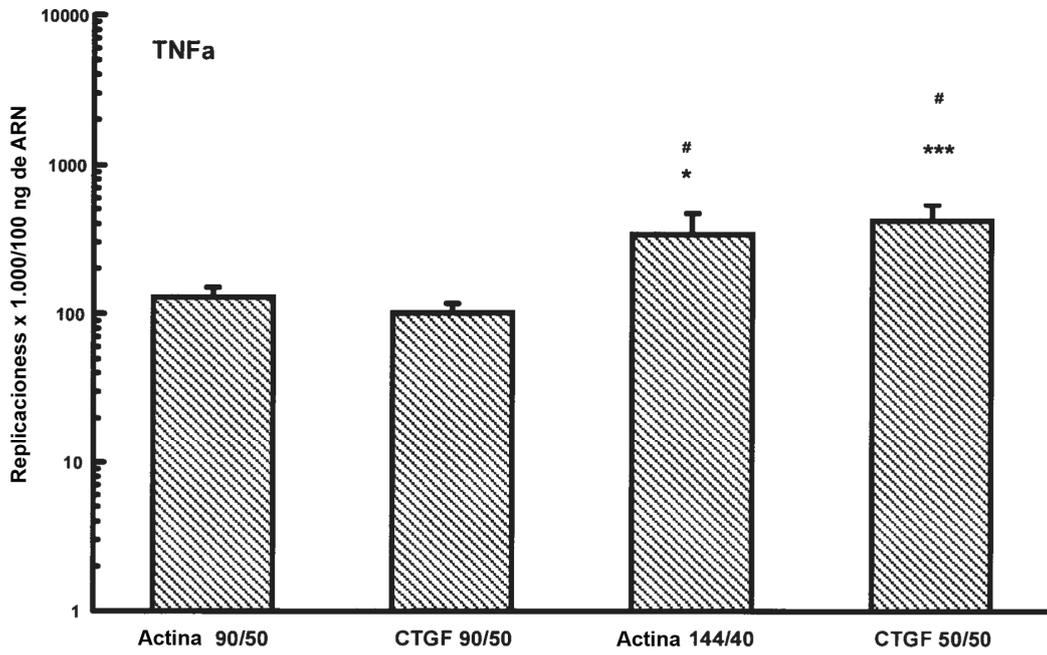


Figura 8E

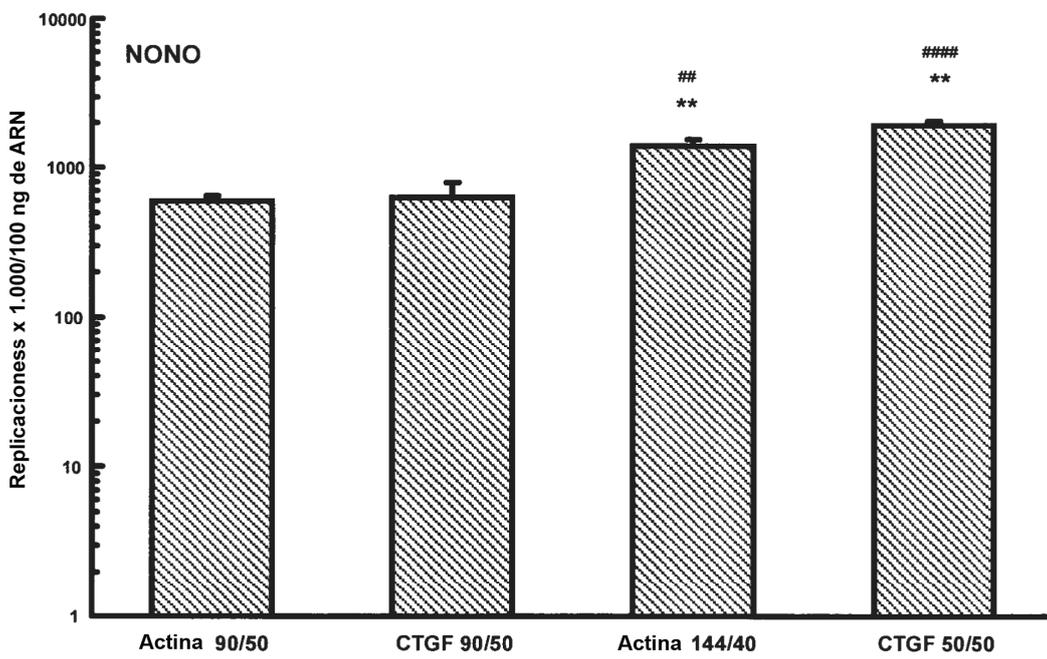


Figura 8F

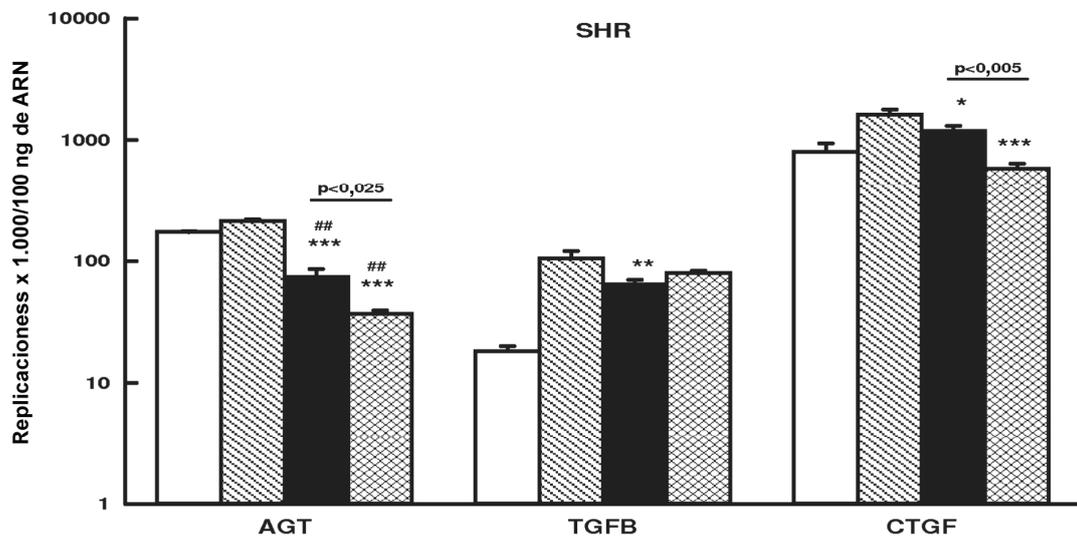


Figura 9A

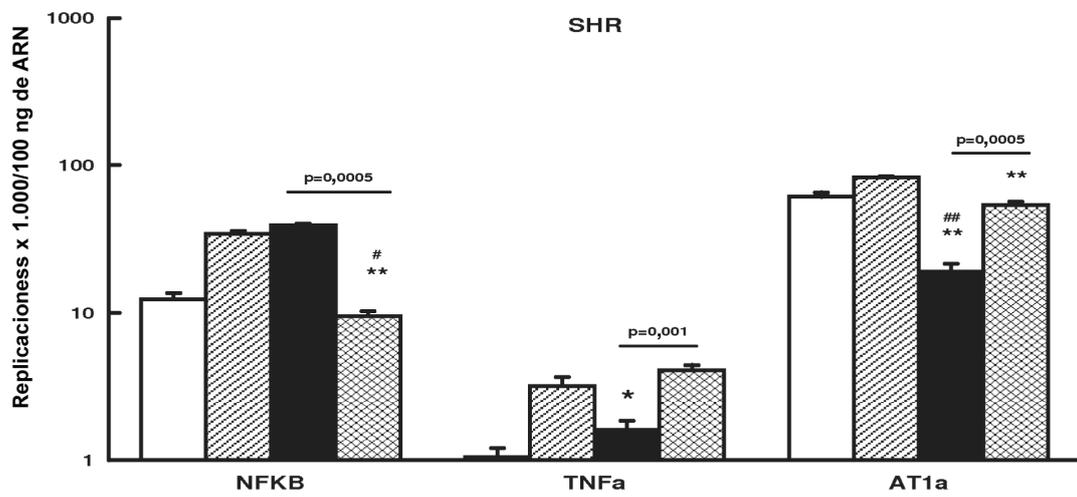


Figura 9B

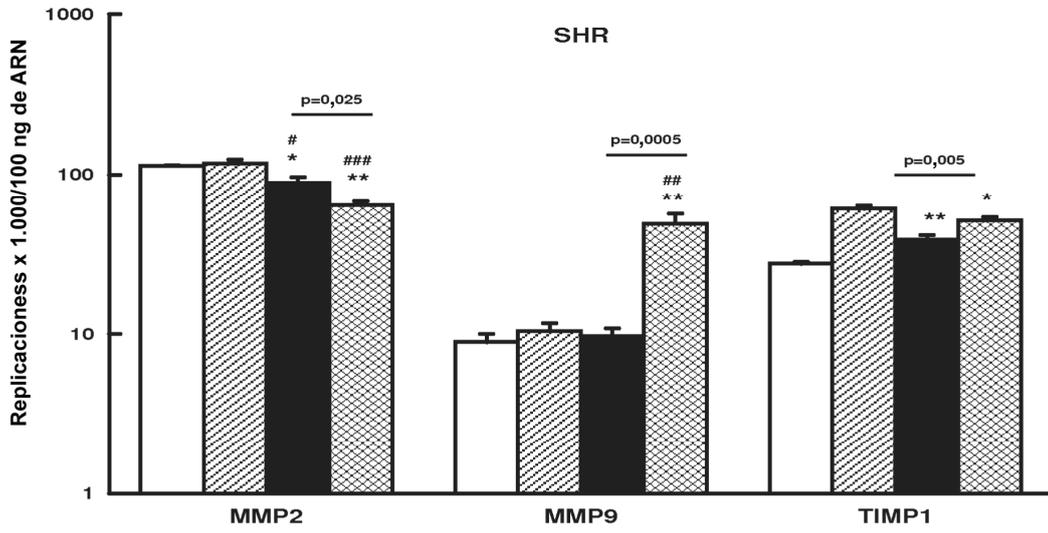


Figura 9C