



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ N.º de publicación: ES 2 055 661

⑫ Número de solicitud: 9300103

⑤① Int. Cl.⁵: C12Q 1/68

G01N 27/26

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **20.01.93**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.94**

⑫③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.08.94

⑦① Solicitante/es: **Universidad de Málaga**
Plaza del Ejido, S/N
Málaga, ES

⑦② Inventor/es: **Reyes Engel, Armando y**
Dieguez Lucena, José Luis

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Determinación de la expresión génica por captura específica de ARN y su cuantificación directa por electroforesis capilar en zona libre.**

⑤⑦ Resumen:

Determinación de la expresión génica por captura específica de ARN y su cuantificación directa por electroforesis capilar en zona libre. Método de determinación de la expresión génica por detección directa de transcritos mediante electroforesis capilar en zona libre para muestras biológicas. Muestras de ARN purificadas o semipurificadas se hibridan con un oligonucleótido o sonda específica previamente seleccionada, marcada con biotina y perteneciente a una secuencia codificante de un gen. A la solución de hibridación conteniendo el híbrido específico se le añaden esferas magnéticas cargadas con estreptavidina. Se aplica seguidamente un sistema magnético que selecciona en la pared del tubo el complejo estreptavidinabiotina-oligonucleótido-sonda ARN específico, se lava el complejo con soluciones astringentes y a continuación se eluye el ARN específico. El ARN obtenido se inyecta en un sistema de electroforesis capilar en zona libre y la señal obtenida por el detector permite la cuantificación directa de la muestra.

DESCRIPCION

Estado de la técnica.

En la actualidad la cuantificación de la expresión génica se realiza mediante un primer paso de purificación de ARN total o de poli(A) ARNm.

Existen varias alternativas para la cuantificación del ARN purificado:

Northern Blotting, donde el ARN purificado se separa mediante una electroforesis en gel, seguidamente es transferido a una membrana que se ubica en un medio de hibridación al que se añade la sonda específica del gen a cuantificar marcada radiactivamente. Después de sucesivos lavados se coloca la membrana contra una película fotográfica que una vez revelada ofrece una señal de intensidad variable dependiente de la cantidad de sonda unida. La señal de la banda obtenida se podrá cuantificar mediante la medida de la densidad óptica.

Ensayo de protección con la S1-nucleasa, en este caso se realiza una hibridación en solución (sin membrana), la muestra de ARNm se introduce en la mezcla de hibridación junto con la sonda específica y se digieren las hebras únicas con la enzima S1-nucleasa. La muestra digerida se separa mediante electroforesis de acrilamida, una vez finalizada, el gel obtenido se coloca contra una película fotográfica. La señal del híbrido ARN-ADN correspondiente a la cantidad de sonda marcada unida se puede cuantificar mediante medida de la densidad óptica o de la radiactividad recorriendo la banda del gel.

Una tercera alternativa para la cuantificación es la RTPCR, se basa en la amplificación de "las hebras del ADNc obtenidas por la retrotranscripción de los mensajeros". El ADNc presenta varias modalidades de construcción, dependiendo de los distintos cebadores empleados para la retrotranscripción (hexámeros randomizados, poli(A) o el cebador específico). En la actualidad es el ADNc el factor limitante y determinante de la cuantificación de la concentración inicial de mensajeros que se calcula utilizando ajustes matemáticos.

Otros métodos menos exactos en la cuantificación pero también usados, son las distintas variedades de la técnica de hibridación "in situ".

Respecto a la electroforesis capilar existen dos modalidades para la determinación de ácidos nucleicos, la de capilares rellenos en la que estos se cargan con geles de agarosa o acrilamida, sólidos o semisólidos, y la modalidad de electroforesis capilar en solución libre en la que las muestras son separadas en un tampón. Los trabajos prácticos realizados hasta la fecha se refieren sobre todo a la electroforesis capilar en geles para el análisis de fragmentos de restricción y para la cuantificación de nucleótidos. La electroforesis capilar en solución libre se encuentra en período de desarrollo técnico debido a su escasa capacidad de discriminación de moléculas por su tamaño. En la actualidad no existen referencias que indiquen el uso de este tipo de electroforesis en la determinación directa o cuantitativa de ARNm.

Breve descripción.

El método que se propone para este gen permite su uso en el estudio de cualquier otro gen debido a que está basado en las características

físico-químicas generales de los ácidos nucleicos.

No existe en la actualidad ningún método que permita la cuantificación directa del ARNm específico de un gen. Los métodos utilizados hasta la fecha requieren múltiples pasos para la cuantificación y esta se realiza de forma indirecta por medida de la densidad óptica o radiométrica tras complicados procesos de electroforesis. Este método no requiere del manejo de isótopos radiactivos ni la fijación del ARN a membranas o a otros soportes. La originalidad de este sistema de cuantificación consiste en aunar la caza específica del mensajero mediante un oligonucleótido biotinilado seleccionado de la secuencia del gen en estudio, con la optimización de un método cuantitativo de medida por electroforesis capilar. Se aporta un sistema original de detección, la electroforesis capilar, cuya versatilidad tanto en volúmenes de inyección como por la larga vida del capilar, permite un alto rendimiento en cuanto al número de pruebas a realizar para la optimización de cualquier medida.

El hecho de que la electroforesis capilar se realice en flujo libre, nos conduce a una técnica menos separativa pero más práctica y versátil cuando se intenta cuantificar purificados de analitos específicos.

1) Purificación de ARN total

2) Hibridación en solución con el oligonucleótido específico biotinilado

3) Captura del híbrido mediante esferas magnéticas cargadas con estreptavidina

4) Elución del ARNm específico del híbrido

5) Concentración del ARNm específico

6) Cuantificación directa mediante electroforesis capilar

Descripción completa.

El siguiente método se utilizó para la purificación y medida del ARNm específico del gen del receptor de la angiotensina II.

1) Se extrajo ARN total de sangre mediante el método de Chirgwin.

2) De 20 a 200 μ g de este ARN se utilizó para la purificación específica. Para esta purificación se seleccionó un oligonucleótido específico biotinilado del gen a purificar de un tamaño de 40 bases. En el caso del gen del receptor de la angiotensina II, 5'-GGCGGGACTTCATTGGGTGAACAA-TAGCCAGGTATCGATC-3'.

3) Se emplearon cantidades constantes del oligonucleótido específico biotinilado (50 pmoles) y de esferas magnéticas (100 pmoles) (Dyna, Norway).

4) El ARN total se calentó a 65°C en un baño de agua durante 10 minutos. Se le añadió el oligonucleótido específico biotinilado y 20X SSC (Cloruro sódico 3 M, citrato sódico 0.3 M, pH 7.0) en una concentración final de 0.5X SSC. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

5) Las esferas se lavaron tres veces con 0.5X SSC y se le añadió el ARN total. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, las esferas fueron capturadas mediante una gradilla magnética y se lavaron cinco veces con 0.1X SSC.

6) Se eluyó el ARNm específico con 50 μ l de agua libre de RNasas.

7) Las muestras se concentraron añadiendo acetato K (0.1 vol), Glucógeno (0.02 vol) y etanol al 95% (2 volúmenes). Los precipitados se resuspen-

den en 5 μ l de agua libre de RNasas.

8) Se desarrolló la electroforesis capilar en solución libre con un detector UV (Prime Vision, system IV, Europhor, Franco) usando un capilar de 100 μ m, de 60 cm de longitud (45 cm al detector) y un tampón TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido

bórico, 2 mM EDTA, pH 8.5). Las muestras fueron introducidas en el capilar usando alto vacío durante 0.5 segundos (2,7 nl). La separación en el capilar fue realizada bajo un voltaje constante de 400 V/cm.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de determinación directa de ARNM específico por electroforesis capilar, **caracterizado** por realizarse una purificación de ARN total, y una hibridación en solución con el

oligonucleótico específico biotinilado. Luego se captura el híbrido mediante esferas magnéticas cargadas con estreptavidina y se hace una elución del ARNM específico del híbrido que se concentra y se cuantifica directamente por electroforesis capilar.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 055 661
⑫ N.º solicitud: 9300103
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 20.01.93
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁵: C12Q1/68, G01N27/26

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO-A-9006042 (DYNAL AS) *Pág 6, líneas 30-33; Ejemplo 5*	1
Y	WO-A-9006045 (DYNAL AS) *Pág 5, lín 19-21; Pág 10, lín 6-16; Pág 22, Lín 8-12; Ej. 5; Reiv. 5 y 15*	1
Y	WO-A-9102244 (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.) *Pág 6, lín 21-32; Pág 25, lín 36-40; Pág 26 y 27, lín 34-2; Reiv 12 y 14*	1
Y	EP-A-304845 (PROFILE DIAGNOSTIC SCIENCES) *Pág 2, lín 37-45; Pág 3, lín 53-58; Pág 4, lín 1-9; Reiv. 1*	1
A	GB-A-2187283 (ORION-YHTYMA OY) *Todo el documento*	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
14.04.94

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
1/1