



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 123 542**

51 Int. Cl.<sup>6</sup>: C12Q 1/68

C12M 1/38

B01L 3/00

//C12Q 1/70

12

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **92306701.1**

86 Fecha de presentación : **22.07.92**

87 Número de publicación de la solicitud: **0 524 808**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.01.93**

54 Título: **Preparaciones PCR in situ, y su uso.**

30 Prioridad: **23.07.91 US 733419**

45 Fecha de la publicación de la mención BOPI:  
**16.01.99**

45 Fecha de la publicación del folleto de patente:  
**16.01.99**

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4002 Basel, CH**  
**The Research Foundation of State**  
**University of New York**

72 Inventor/es: **Bloch, Will y**  
**Nuovo, Gerard J.**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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 (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a nuevas composiciones, dispositivos y métodos para simplificar y perfeccionar la sensibilidad y especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa in situ, un método de amplificación y detección de secuencias específicas de ácido nucleico dentro de células individuales, y puede emplearse en los campos de la biología molecular, ciencia forense y patología clínica, veterinaria y vegetal.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método para aumentar en muchos órdenes de magnitud la concentración de la secuencia específica de un ácido nucleico en una muestra de ensayo. El proceso de la PCR está descrito en las patentes USA n<sup>os</sup> 4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188.

Los métodos designados con el nombre de métodos de hibridación in situ del ácido nucleico, han evolucionado para detectar secuencias diana en las células u orgánulos en donde se originan (para una revisión del tema, ver Nagai y col., 1987, Intl. J. Gyn. Path. 6, 366-379). Típicamente, la hibridación in situ requiere (1) la preparación de una sección histoquímica o un frotis citoquímico, fijada químicamente (p. ej. con formaldehído) para estabilizar las estructuras subcelulares proteínicas y sujeta a un portaobjetos de microscopio, (2) la desnaturalización química del ácido nucleico de la preparación celular, (3) la reasociación de un ácido nucleico señalizado, con una secuencia diana complementaria en el ADN celular desnaturalizado, y (4), detección localizada de la señal reasociada a la diana, habitualmente mediante examen microscópico de las señales no isotópicas (absorbancia o tinción fluorescente) o isotópica (autorradio-gráficamente) generadas directa o indirectamente por la señal de la sonda. Sin embargo, la hibridación convencional in situ no es muy sensible, y por lo general requiere decenas o centenares de copias del ácido nucleico diana por célula con el fin de tantear la presencia de la secuencia diana en dicha célula.

Recientemente, se ha combinado el aumento de la sensibilidad, asociado con la amplificación mediante la PCR de la secuencia diana, con la localización diana de la hibridación in situ, para crear la PCR in situ, de forma que la PCR se realiza dentro de las células fijadas químicamente, antes de que las células fijadas se sujeten al portaobjetivos de microscopio, y el ácido nucleico amplificado se localiza mediante el examen microscópico de la autorradiografía, seguido de un sondeo señalizado con isótopos (Haase y col., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4971-4975). Las células pueden suspenderse durante la amplificación in situ.

La PCR in situ requiere un delicado equilibrio entre dos necesidades contrapuestas de la PCR en una preparación celular: las membranas celulares y subcelulares (p. ej. la nuclear) deben estar lo suficientemente permeabilizadas para permitir que los reactivos de la PCR aplicados externamente alcancen el ácido nucleico diana, pero deben permanecer lo suficientemente intactas y no porosas para retrasar la difusión del ácido nucleico amplificado fuera de los compartimentos celulares o subcelulares donde tiene lugar dicha amplificación. Además, el ácido nucleico amplificado debe estar lo suficientemente concentrado dentro de su compartimento para dar una señal microscópicamente visible pero debe permanecer lo suficientemente diluido para que no se reasocie durante las etapas de desnaturalización y de reasociación de la sonda. Haase y col., (ver más arriba), confían en la fijación de las células con paraformaldehído para crear la suficiente pero no excesiva permeabilidad.

Haase y col., (ver más arriba) usaron unas series de pares de cebadores de la PCR para especificar unas series de secuencias diana solapadas dentro del genoma del organismo diana, para aumentar la retención del ácido nucleico diana amplificado dentro del compartimento celular en el que se realizó. El producto de la PCR resultante se esperaba que fuera tan grande (mayor de 1.000 pares de bases) que su difusión desde el lugar de origen debería ser fuertemente retardada. Sin embargo, el empleo de múltiples pares de cebadores reduce en gran manera la practicidad de la PCR in situ, no precisamente debido al gasto inherente a la producción de tantos oligonucleótidos sintéticos, sino incluso más seriamente por causa de que muchos organismos diana de la PCR, especialmente los virus patógenos, son tan genéticamente plásticos que es difícil encontrar incluso unas pocas secuencias cortas que sean lo suficientemente invariantes para formar buenos sitios para cebadores y sondas. Otras importantes secuencias diana, tales como los oncogenes activados, genes supresores de tumores inactivados y translocaciones cromosómicas oncogénicas, implican mutaciones de puntos somáticos y reagrupamientos cromosómicos que pueden distinguirse de la secuencia parental si los productos relativamente cortos de la PCR se amplifican a partir de pares únicos de cebadores. Los pares múltiples de cebadores y estructuras largas frustrarían la consecución de la especificidad a menudo necesaria para distinguir las células cancerosas de sus vecinas normales. Los pares múltiples de cebadores ponen también en peligro la PCR por un motivo distinto; promueven la dimerización del cebador y el cebado erróneo, reduciendo la sensibilidad y especificidad, y aumentando la probabilidad de resultados falsamente negativos debido a que la amplificación no específica reduce

radicalmente el campo de la secuencia diana amplificada.

5 Ehrlich *y col.* (1991) *Science* 252, 1643-1651, en un artículo científico de revisión discute los desarrollos de la instrumentación, metodología y aplicaciones de la PCR. Se hace referencia a un método de PCR en el cual un conjunto incompleto de reactivos se calienta antes de su adición al (a los) reactivo(s) complementario(s) de la PCR. Esto minimiza la actividad no específica de la polimerasa. Se hace también referencia a métodos de PCR que emplean una proteína de unión a una cadena simple. Sin embargo, la revisión no describe ningún método in situ de la PCR.

10 Koch *y col.*, (1989) en *Chromosoma* 98, 259-265, describe un método al que llama marcado cebado in situ (PRINS) para análisis de ADN, en el cual se hibrida un oligonucleótido sintético a los cromosomas. A continuación, el oligonucleótido se emplea como cebador para la incorporación in situ de los nucleótidos marcados con biotina. La biotina incorporada se visualiza a continuación con avidina marcada con fluoresceína isotiocianato (FITC-avidina).

15 La patente WO 91/06679 (Stratagene) describe un método perfeccionado para la hibridación de polinucleótidos con secuencias complementarias de ácido nucleico. Específicamente, se refiere a un método para aumentar la especificidad de una reacción de hibridación de polinucleótidos en presencia de una proteína de unión al ácido nucleico monocatenario.

20 La presente invención aumenta la comodidad, sensibilidad y especificidad de la PCR in situ, eliminando también toda necesidad de múltiples pares de cebadores para detectar una única secuencia diana. Con ello es posible también que la PCR in situ haga una distinción entre los alelos.

25 En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la amplificación por PCR in situ de la secuencia de un ácido nucleico en las células, el cual procedimiento comprende:

(a) aporte de una composición in situ, que comprende células químicamente tratadas con un fijador que reticula los constituyentes proteínicos de las estructuras celulares.

30 (b) adición de un primer subconjunto de reactivos de la PCR y opcionalmente una proteína de unión al ADN monocatenario, a la composición del paso (a) e incubación de las células y el subconjunto de reactivos de la PCR a una temperatura entre alrededor de 50° y alrededor de 80°C.

35 (c) adición a la composición del paso (b) de un subgrupo de reactivos de la PCR, el cual complementa el primer subgrupo de reactivos de la PCR, de forma que el grupo completo de reactivos de la PCR comprende un único par de cebadores para cada secuencia diana;

40 (d) sometiendo la composición del paso (c) a un ciclo térmico suficiente para amplificar la secuencia diana de un ácido nucleico, especificada mediante el grupo completo de reactivos de la PCR, y

(e) opcionalmente, detección de la secuencia de ácido nucleico amplificada de forma que la localiza en las células individuales que originalmente contienen la secuencia diana de ácido nucleico.

45 Las células tratadas químicamente pueden fijarse a un portaobjetos de microscopio entre los pasos (a) y (b) o entre los pasos (d) y (e), en cuyo caso, el procedimiento comprende preferentemente además, la colocación de una barrera de vapor encima de la composición antes de que la composición sea incubada en el paso (b).

50 Un segundo aspecto de la invención proporciona un procedimiento para la amplificación mediante la PCR in situ de una secuencia diana de ácido nucleico en células, el cual comprende:

(a) aporte de una composición in situ que comprende unas células químicamente tratadas con un fijador, el cual reticula los constituyentes proteínicos de las estructuras celulares;

55 (b) adición a la composición de un grupo completo de reactivos de la PCR, el cual comprende un único par de cebadores para cada secuencia diana, y una proteína de unión al ADN monocatenario;

60 (c) sometiendo la composición del paso (b) a un ciclado térmico suficiente para amplificar la secuencia diana del ácido nucleico, especificada mediante el grupo completo de reactivos de la PCR, y

(e) opcionalmente, detección de la secuencia de ácido nucleico amplificada de forma que la localiza en

las células individuales que originalmente contienen la secuencia diana de ácido nucleico.

Las células pueden fijarse a un portaobjetos de microscopio entre los pasos (a) y (b) ó entre los pasos (c) y (d), en cuyo caso, de preferencia (1) las células se fijan al portaobjetos del microscopio, (2) se coloca una barrera de vapor encima de la composición antes del paso (c), y (3), la barrera de vapor se elimina antes de efectuar el paso (d).

En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición para la PCR in situ, que comprende células químicamente tratadas con un fijador que reticula los constituyentes proteínicos de las estructuras celulares, un primer subgrupo de reactivos para PCR, en donde el subgrupo comprende un único par de cebadores para cada secuencia diana, y opcionalmente una proteína de unión al ADN monocatenario. Las células pueden fijarse a un portaobjetos de microscopio, en cuyo caso la composición contiene preferentemente además, una barrera de vapor encima de la composición.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una composición para la PCR in situ, la cual comprende unas células químicamente tratadas con un fijador que reticula los constituyentes proteínicos de las estructuras celulares, un grupo completo de reactivos para la PCR, el cual grupo de reactivos comprende un único par de cebadores para cada secuencia diana, y una proteína de unión al ADN monocatenario. Las células pueden estar fijadas a un portaobjetos del microscopio, en cuyo caso la composición comprende preferentemente además una barrera de vapor encima de la composición.

La invención permite un método perfeccionado de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) in situ, el cual aumenta la especificidad y sensibilidad de la amplificación. Mediante la retención de por lo menos un reactivo de la PCR, de una preparación que comprende las células fijadas, los reactivos de la PCR y opcionalmente una proteína de unión al ADN monocatenario, hasta que la preparación ha sido tratada a una temperatura aproximadamente del orden de 50° a 80°C, las reacciones no específicas de la polimerasa de ácido nucleico apenas tienen lugar. El método es aplicable tanto si la ampliación del ácido nucleico tiene lugar antes o después de que las células fijadas se hayan fijado a un portaobjetos de microscopio.

La invención permite también un método de PCR in situ perfeccionado, el cual proporciona una mejor especificidad y sensibilidad, lo cual da como resultado la inclusión en la mezcla de reacción de una proteína de unión (SSB) al ADN monocatenario, a una concentración que interfiere con las reacciones no específicas de la polimerasa sin bloquear la amplificación de la diana específica. Existe una gran variedad de polipéptidos, que se encuentran en la naturaleza, u obtenidos por ingeniería genética, o totalmente sintéticos, que poseen actividad SSB, y que pueden mejorar la PCR in situ. Este método es independiente del orden temporal de la amplificación del ácido nucleico y del fijado de las células a los portaobjetos.

En versiones preferidas de la invención, las células se han convertido en permeables a los reactivos de la PCR, de preferencia con un tratamiento con proteinasa.

La fijación puede seleccionarse entre el grupo formado por la formalina, formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído.

Las células pueden residir dentro de una sección histoquímica de un frotis citoquímico.

De preferencia, el primer subgrupo de reactivos de la PCR consta de todos los reactivos de la PCR, a excepción de una polimerasa de ácido nucleico. La proteína de unión al ADN monocatenario es de preferencia la proteína del gen 32 del bacteriófago T4.

Los procedimientos y composiciones de la invención pueden emplearse con cicladores térmicos modificados empleados para la amplificación PCR automatizada, en los que el compartimento para las muestras usado para transferir el calor rápidamente a y desde la reacción, contiene los portaobjetos de microscopio. El compartimento para muestras puede constar de un bloque de metal que tiene una superficie plana horizontal dimensionada para contener uno o varios portaobjetos de microscopio con sus dimensiones mayores orientadas horizontalmente. La superficie plana puede descansar en el fondo de un pozo adecuado para contener además una barrera poco profunda de vapor de aceite mineral que evita el secado de la preparación de PCR in situ durante el ciclado térmico. El compartimento puede constar alternativamente de un bloque de metal que contiene una o más ranuras que substancialmente y exactamente contienen los portaobjetos de microscopio con sus dimensiones mayores orientadas en un plano aproximadamente vertical. Dicha orientación aumenta substancialmente el número de portaobjetos que pueden analizarse a la vez. En otra versión, el compartimento contiene un fluido en movimiento de transferencia de calor y

contiene unos soportes para asegurar los portaobjetos de microscopio en el flujo de fluido, en cuyo caso se recomienda emplear unos envoltorios de plástico que encierran los portaobjetos de microscopio y los protegen para que no se sequen o para que el reactivo de la PCR no se elimine.

5 Los procedimientos y composiciones de la presente invención mejoran la especificidad y sensibilidad de la PCR in situ; reducen la posibilidad de falsos resultados negativos e incluso cuando las células contienen solamente una copia única de la secuencia de ácido nucleico, pueden ser detectadas con seguridad. La mayor especificidad simplifica la detección del ácido nucleico amplificado. Mientras que el análisis in situ del ácido nucleico ha necesitado tradicionalmente la reasociación del ácido nucleico marcado de la sonda, 10 que contiene una secuencia complementaria a la secuencia diana, la especificidad de la alta amplificación permite una detección segura de los cebadores marcados que han sido incorporados dentro de ácidos nucleicos largos, con un disminuido interés para los falsos resultados positivos que podrían producirse a partir de la incorporación de cebadores en ácidos nucleicos amplificados no específicamente. Por lo tanto ya no es necesario un paso de tratamiento adicional con sonda, aunque también puede ser empleado. 15 La mayor sensibilidad simplifica también la detección del ácido nucleico amplificado, una vez efectuada la PCR in situ, puesto que se generan tantos analitos que las señales no isotópicas pueden substituir las señales con isótopos registradas autorradiográficamente. Las señales producidas por la absorbancia, fluorescencia y quimioluminiscencia son más rápidas, simples y seguras de registrar que las de la degradación radioactiva. La adopción de la detección no isotópica ha de aumentar grandemente el interés de 20 los patólogos clínicos y aquellos que realizan análisis de rutina, por la PCR in situ (en contraste con la investigación biológica y médica).

Los procedimientos y composiciones de la invención aumentan también en gran manera la practicidad y generalización de la PCR in situ porque eliminan la necesidad de emplear múltiples pares de cebadores para la detección sensible de una única secuencia diana. Aparte del coste, los múltiples pares de cebadores son difíciles de aplicar a organismos diana altamente polimórficos, como muchos retrovirus, o a una amplificación específica de alelos, como se necesita para la detección PCR de muchas mutaciones oncogénicas somáticas. En la presente invención, en la que es suficiente un único par de cebadores para la PCR in situ, el método tendrá la misma amplitud de aplicación que la PCR convencional. Las 25 adaptaciones especiales como la PCR multiplex, cebadores degradados, cebadores alojados, amplificación específica de alelos, PCR de un lado, y la PCR de ARN, pueden ser ensayados in situ con una mayor seguridad en la transferencia del método. 30

El segundo y cuarto aspecto de la invención representan también un perfeccionamiento importante. 35 Los métodos Hot Start<sup>TM</sup> bloquean solamente las reacciones secundarias de preamplificación que proporcionan productos no específicos; las SSB parecen también reducir los cebados erróneos que tienen lugar durante el ciclado térmico. Por este motivo, las SSB disminuyen más eficazmente la ampliación no específica. También, la inclusión de una SSB en la mezcla de reactivos de la PCR elimina la necesidad de realizar un procedimiento manual Hot Start<sup>TM</sup>, el cual requiere un operador experto para efectuar una 40 adición en el tiempo preciso del reactivo de la PCR que falta, sin que la preparación de la PCR in situ se estropee o se seque. Un método en el cual están juntos todos los componentes del ensayo a temperatura ambiente y cubiertos con una barrera de vapor antes de empezar el calentamiento, es de mayor confianza que uno que requiere la manipulación de materiales calientes y la adición de una barrera de vapor al sistema caliente. 45

Al facilitar la aplicación rutinaria de la PCR in situ, los procesos y composiciones de la invención extienden la detección ultrasensible del ácido nucleico a nuevos mercados y problemas prácticos, tales como los que se presentan en la patología clínica, veterinaria y vegetal. Estos campos profesionales se 50 fían a menudo de la información concerniente a la localización del analito en muestras biológicas para emitir juicios críticos; la PCR convencional no facilita esta información fácilmente. Además, la PCR in situ es prácticamente inmune a la creación de resultados falsamente positivos por contaminación de las reacciones con la diana amplificada por previas reacciones, debido a que el analito presenta una localización subcelular, habitualmente en el núcleo. Además de esto, la tinción múltiple por ejemplo, para los antígenos de la superficie celular, permite el diagnóstico y el pronóstico de enfermedades basados en 55 ratas infectadas de subpoblaciones celulares. La PCR in situ aplicada a muestras de sangre o biopsias de pacientes de los cuales se sospecha que están infectados por un retrovirus linfotrófico, tal como el HIV-1, proporcionaría una valiosa información del pronóstico tal como la fracción del CD4 (antígeno de superficie) más las células conteniendo genomas víricos integrados o partículas víricas.

60 Los instrumentos con bloques de calefacción modificados aumentarán la velocidad y la seguridad de las PCR in situ sobre portaobjetos de microscopio, acelerando y haciendo más uniforme la transferencia de calor que tiene lugar durante el ciclado térmico.

Para facilitar la comprensión de la invención, se dan a continuación las definiciones de los siguientes términos:

5 “PCR” significa un procedimiento para la amplificación de uno o más secuencias de ácido nucleico, en el que (1) los cebadores oligonucleótidos que determinan los extremos de las secuencias que se quieren amplificar, se reasocian a ácidos nucleicos monocatenarios en una muestra de ensayo, (2) una polimerasa de ácido nucleico prolonga los extremos 3' de los cebadores reasociados para crear una cadena de ácido nucleico complementaria en la secuencia a un ácido nucleico al cual los cebadores se reasociaron,  
 10 (3) el ácido nucleico de doble cadena resultante, se desnaturaliza para proporcionar dos ácidos nucleicos monocatenarios, y (4) se repite el proceso de reasociación del cebador, prolongación del cebador y desnaturalización del producto, las veces necesarias para generar cantidades fácilmente identificadas y medidas de las secuencias definidas por los cebadores. El control práctico de los pasos de reasociación secuencial, extensión y desnaturalización se efectúa variando la temperatura del recipiente de reacción,  
 15 habitualmente en forma cíclica repetitiva. La reasociación y la extensión tienen lugar de forma óptima a una temperatura entre 40° y 80°C (el valor exacto depende de las concentraciones y secuencias del cebador, mientras que la desnaturalización requiere temperaturas entre 80° y 100°C (el valor exacto depende de la secuencia diana y la concentración).

20 El citado “ciclado térmico” es habitualmente automatizado mediante un “ciclador térmico”, un instrumento que rápidamente (en un período de tiempo de uno a varios minutos) calienta y enfría un “compartimento para muestras” un recipiente parcial o completamente encerrado, que contiene el vaso en el que tiene lugar la amplificación del ácido nucleico y el medio para la transferencia de calor en contacto directo con el vaso de la PCR. Lo más corriente es que el compartimento de muestras sea un  
 25 “bloque para muestras”, habitualmente construido de metal, de preferencia de aluminio. Los bloques convencionales para muestras contienen unos pozos diseñados para encajar herméticamente los tubos de plástico de microcentrífuga en los cuales tiene lugar normalmente la amplificación PCR. En el bloque de muestras, alguno o todos estos pozos cónicos pueden reemplazarse por superficies planas o ranuras diseñadas para optimizar el calentamiento y enfriamiento de los portaobjetos de microscopio. Menos  
 30 habitualmente, el compartimento es una cámara a través de la cual circula un fluido de transferencia caliente o frío, tal como aire o agua, que baña los tubos de reacción.

Los “reactivos de la PCR” se refieren a los productos químicos, aparte de la muestra de ensayo de ácido nucleico, necesarios para efectuar el trabajo de la amplificación del ácido nucleico. Estos reactivos  
 35 consisten en cinco clases de componentes: (1) un tampón acuoso, (2) una sal de magnesio soluble en agua, (3) por lo menos tres trifosfatos de desoxirribonucleósidos (dNTPs), (4) oligonucleótidos cebadores (normalmente dos por cada secuencia diana, con secuencias que definen los extremos 5' de las dos cadenas complementarias de la secuencia diana de dos cadenas), y (5) una polinucleótido polimerasa, de preferencia una ADN polimerasa, y con mayor preferencia una ADN polimerasa termoestable, la cual  
 40 puede tolerar temperaturas entre 90° y 100°C durante un tiempo total transcurrido de por lo menos 10 minutos sin perder más de aproximadamente la mitad de su actividad.

Los cuatro dNTPs convencionales son la timidina trifosfato (dTTP), la desoxiadenosina trifosfato (dATP), la desoxicitidina trifosfato (dCTP), y la desoxiguanosina trifosfato (dGTP). Pueden ser aumentados o algunas veces reemplazados por dNTPs que contienen bases análogas que son pares de bases  
 45 Watson-Crick como las cuatro bases convencionales. Ejemplos de dichos análogos incluyen la desoxiuridina trifosfato (dUTP) y dUTP con marcadores moleculares tales como la biotina y la digoxigenina, unidos covalentemente a la base uracilo mediante brazos distanciadores.

50 Mientras que un “grupo completo” de reactivos PCR se refiere a la combinación completa de los reactantes esenciales excepto la muestra de ensayo de ácido nucleico, un “subgrupo” de reactivos de PCR carece por lo menos de uno de los reactivos esenciales distinto del tampón acuoso. El “complemento” o “subgrupo complementario” de un primer subgrupo de reactivos de PCR, contiene todos los reactivos que faltan en el primer subgrupo. Los “reactantes” de la PCR se refieren a los reactivos de la PCR más  
 55 la muestra de ensayo de ácido nucleico.

La “PCR Hot Start<sup>TM</sup>” se refiere a la ampliación PCR en la cual un subgrupo de reactivos se conserva separadamente de su complemento y de la muestra de ensayo hasta que los últimos componentes han sido calentados a una temperatura entre alrededor de 50° y alrededor de 80°C, lo suficientemente elevada  
 60 para minimizar la actividad polimerasa no específica. Después de que todos los reactantes de la PCR han sido mezclados, da comienzo el ciclado térmico, controlando la temperatura de reacción de forma que no descienda nunca de aprox. 50°C hasta que la amplificación sea completa.

“Células fijadas” se refieren a una muestra de células biológicas que han sido tratadas químicamente para consolidar las estructuras celulares, en particular, las membranas, contra la disrupción por cambios de disolventes, cambios de temperatura, esfuerzos mecánicos y secado. Las células pueden fijarse bien en suspensión o bien contenidas en una muestra de tejido, tal como podrían obtenerse durante una autopsia, biopsia o intervención quirúrgica. Los fijadores de células son generalmente productos químicos que reticulan los constituyentes proteínicos de las estructuras celulares, lo más habitual, reaccionando con los grupos amino de las proteínas. Los fijadores más preferidos son la formalina tamponada, etanol 95 %, formaldehído, paraformaldehído o glutaraldehído. Las células fijadas pueden también ser tratadas con proteinasas, enzimas que digieren las proteínas, o con surfactantes o disolventes orgánicos que disuelven los lípidos de la membrana, con el fin de aumentar la permeabilidad de las membranas de las células fijadas, a los reactivos de la PCR. Estos tratamientos deben seguir a la fijación para asegurar que las estructuras de las membranas no se desharán completamente cuando se eliminen los lípidos o las proteínas se escindan parcialmente. El tratamiento con proteasa se prefiere después de una fijación de más de una hora, y es menos preferido cuando la fijación se ha efectuado en un intervalo de tiempo más corto. Por ejemplo, una fijación de diez minutos en formalina tamponada sin tratamiento con proteasa, es estándar después de que las células en suspensión (p. ej. de la sangre) han sido depositadas por centrifugación en un portaobjetos mediante procedimientos estándar con citospina de la técnica citoquímica.

Una “sección histoquímica” se refiere a una muestra sólida de un tejido biológico que ha sido congelado o fijado químicamente y endurecido por incrustación en una cera o plástico, cortado en una hoja fina, generalmente de varias micras de grueso, y fijada a un portaobjetos de microscopio.

Un “frotis citoquímico” se refiere a una suspensión de células, tales como células sanguíneas, que han sido fijadas químicamente y posteriormente fijadas a un portaobjetos de microscopio.

“PCR in situ” se refiere a la amplificación por PCR realizada en células fijadas, de forma que el ácido nucleico específico amplificado está substancialmente contenido dentro de la célula o estructura subcelular que originalmente contenía la secuencia diana de ácido nucleico sometida a la amplificación específica. Las células pueden estar en suspensión acuosa o pueden formar parte de una sección histoquímica o un frotis citoquímico. Preferiblemente, las células se harán permeables a los reactivos de la PCR mediante digestión con proteinasa o mediante la extracción de los lípidos con un surfactante o con un disolvente orgánico. Una “preparación de la PCR in situ” consiste en una combinación de células fijadas con un subgrupo o un grupo completo de reactivos de la PCR.

Una “barrera de vapor” se refiere a un material orgánico en el cual el agua es insoluble, que cubre una reacción o preparación de PCR, de forma que reduce substancialmente la pérdida de agua a la atmósfera durante el ciclado térmico. Los materiales para la barrera de vapor son hidrocarburos líquidos tales como un aceite mineral o aceite de parafina aunque algunos polímeros orgánicos sintéticos tales como los fluorocarbonos y el caucho de silicona pueden también utilizarse como eficaces barreras de vapor para la PCR. Las ceras que son sólidas a una temperatura por debajo de aprox. 50°C y líquidas a temperaturas más altas, forman también barreras de vapor adecuadas. La barrera de vapor puede ser una película delgada de plástico, fabricada como una cubierta que encierra completamente la preparación de la PCR in situ o está pegada a un portaobjetos de microscopio, la cual contiene una preparación de PCR in situ, de tal forma que aísla la reacción del contacto con la atmósfera.

Una “proteína de unión al ADN monocatenario” (SSB) se refiere a un polipéptido que se une a un ADN de una sola cadena, con más fuerza que a un ADN de cadena doble. Las SSB que se encuentran en la naturaleza incluyen la proteína del gen 32 del bacteriófago T4, la proteína del gen 5 del bacteriófago filamentoso, la SSB de la E. coli con una subunidad de peso molecular 19 kilodaltons, las proteínas de movimiento de 30 kilodaltons de los tobamovirus y la proteína de la región vir E2 del *Agrobacterium tumefaciens*.

La “detección” del ácido nucleico amplificado por la PCR se refiere al proceso de observación, localización o cuantificación de una señal analítica que se supone está específicamente asociada con el producto de la amplificación por PCR, distinguida por los reactantes de la PCR. La señal analítica puede resultar de la absorbancia o fluorescencia visible o ultravioleta, quimioluminiscencia o la imagen fotográfica o autorradiográfica de la absorbancia, fluorescencia, quimioluminiscencia o radiación ionizante. La detección de los productos de la PCR in situ comprende la observación microscópica o el registro de dichas señales. La señal deriva directamente o indirectamente de una “marca” molecular unida al cebador de la PCR o dNTP ó a una sonda de ácido nucleico, la cual marca o señalización puede ser un átomo radioactivo, un cromóforo, un fluoróforo, un reactivo quimioluminiscente, una enzima capaz de generar un producto

coloreado, fluorescente o quimioluminiscente o un grupo de unión capaz de reaccionar con otra molécula o partícula que conduce directamente o genera catalíticamente la señal analítica. Los grupos de unión más corrientes son la biotina, que se une estrechamente con la estreptavidina o avidina, la digoxigenina que se une estrechamente a los anticuerpos anti-digoxigenina, y la fluoresceína que se une estrechamente a los anticuerpos anti-fluoresceína. La avidina, estreptavidina y los anticuerpos se unen fácilmente a los cromóforos, fluoróforos, átomos radioactivos y enzimas capaces de generar señales coloreadas, fluorescentes o quimioluminiscentes.

Una “sonda de ácido nucleico” se refiere a un oligonucleótido o polinucleótido que contiene una secuencia complementaria de toda o de una parte de la secuencia diana de la PCR, y también una marca o señal que puede emplearse para localizar células en una preparación de PCR in situ, la cual retiene la marca o señal después de mezclar con la sonda de ácido nucleico en el disolvente y las condiciones de temperatura que promueven la reasociación de la sonda al ácido nucleico específicamente amplificado.

Una modalidad preferida de fijación de muestras de células para una PCR in situ de acuerdo con la presente invención, es la de incubar dichas células en formalina 10 %, fosfato Na 0,1 M, pH 7,0, durante un tiempo de 10 minutos a 24 horas a temperatura ambiente. Las células pueden estar en forma de una suspensión como la obtenida a partir de la sangre, o de una fracción de la sangre como un “buffy coat” (“leucocitos de sangre centrifugada”), o puede ser un tejido sólido como el obtenido a partir de una biopsia, autopsia o procesos quirúrgicos bien conocidos en la técnica de la patología clínica. Si la PCR se efectúa en una suspensión de células, las células en suspensión se centrifugan de preferencia después de la fijación con formalina, se resuspenden en solución salina tamponada con fosfato, y se recentrifugan para eliminar el fijador. Las células sedimentadas en forma de una bolita, lavadas, pueden ser resuspendidas en tampón de PCR y añadidas directamente a un tubo de PCR. Si la PCR se efectúa sobre un portaobjetos de microscopio, las células suspendidas se depositan preferentemente sobre el portaobjetos con citospina, se fijan 10 minutos en formalina tamponada, se lavan 1 minuto en agua y se lavan 1 minuto en etanol 95 %. Alternativamente, las células suspendidas pueden ser centrifugadas en un tubo de centrifuga y la bolita de células formada puede incrustarse en parafina y ser tratada como una muestra de tejido. Las muestras de tejido pueden ser procesadas y a continuación incrustadas en parafina y reducidas a una serie de secciones de 4-5  $\mu\text{m}$  mediante procedimientos con el microtomo que son estándar en la técnica de la patología clínica. Las secciones histoquímicas se colocan directamente sobre un portaobjetos de microscopio. En cualquier caso, el portaobjetos habrá sido tratado con 3-aminopropiltriethoxisilano 2 % en acetona y secado al aire. Después de que los frotis o secciones han sido aplicados sobre los portaobjetos, éstos se calientan alrededor de 60°C aprox. 1 hora. Las secciones incrustadas en parafina pueden ser desparafinadas mediante 2 series de lavados de 5 minutos con xileno y 2 series de lavados de 5 minutos con etanol 100 %, efectuándose todos los lavados a temperatura ambiente agitando suavemente.

La selección de las secuencias del cebador de la PCR, la preparación de los reactivos de la PCR y las mezclas de reacción y el diseño y ejecución de las reacciones de la PCR, son procedimientos bien conocidos en la técnica de la PCR. En el caso de que la amplificación del ácido nucleico se efectúe en células en suspensión en un tubo estándar de PCR, las células se tratan como cualquier muestra del ensayo PCR convencional, se diluyen en la mezcla de reacción poco antes de que la amplificación se ponga en marcha, hasta alcanzar un número total de células que va de aproximadamente 100 a aproximadamente  $10^6$ . Para la ejecución del primer aspecto de la invención en un tubo de reacción, el único cambio de la práctica de la PCR convencional es que se omite por lo menos un reactivo, de preferencia una enzima, pero muy posiblemente los cebadores, los dNTPs o el  $\text{MgCl}_2$ , de la mezcla de reacción. Después de añadir 50 a 100  $\mu\text{l}$  de aceite mineral al tubo de reacción, se coloca éste en un ciclador térmico, muchas versiones del cual pueden adquirirse comercialmente, y se calienta a una temperatura entre aprox. 50°C y aprox. 80°C, de preferencia entre 70° y 80°C. Mientras el tubo se mantiene a esta temperatura, se añade el reactivo que falta, debajo de la barrera de vapor con un muestreador manual estándar, de preferencia en un volumen de 5 a 15  $\mu\text{l}$  de tampón de PCR. Si se amplifican simultáneamente varias muestras en diferentes tubos, se utiliza una punta nueva del muestreador para añadir el (los) reactivo(s) que falta(n) a cada tubo, para evitar la contaminación cruzada. Después de que todos los tubos han sido preparados y tapados, tiene lugar el programa del ciclo térmico de tres temperaturas de desnaturalización, reasociación y extensión durante aproximadamente 10 a 40 ciclos, con un control por microprocesador del ciclador térmico. Alternativamente, y a veces preferiblemente, pueden efectuarse unas series de ciclos de dos temperaturas, en los cuales la reasociación y la extensión tienen lugar a una temperatura única, normalmente optimizada para una reasociación restrictiva del cebador al molde. Debido a que las velocidades de reacción, pueden ir algo retrasadas con las preparaciones celulares si se las compara con los ácidos nucleicos liberados de la célula, puede ser necesario aumentar las duraciones de la desnaturalización, reasociación, extensión, o los segmentos del ciclo reasociación-extensión, varios múltiplos los valores estándar cuando la muestra de ensayo contiene ácido nucleico liberado de la célula. Este ajuste se efectúa fácilmente por tanteo

buscando las condiciones que maximicen la intensidad de la señal observada durante la detección del ácido nucleico amplificado, o que minimice el número de ciclos necesarios para alcanzar una intensidad dada de la señal. Un procedimiento similar de optimización puede utilizarse para las concentraciones de  $MgCl_2$ , dNTP, cebador y enzima, de la mezcla de reacción; estos parámetros presentan a menudo diferentes valores óptimos para distintas dianas.

Para llevar a cabo el segundo aspecto de la invención en un tubo de reacción, es necesario efectuar varios cambios en la modalidad preferida que se acaba de describir. No hay ninguna necesidad de efectuar el procedimiento manual Hot Start<sup>TM</sup> descrito más arriba; todos los reactantes pueden mezclarse y la barrera de vapor puede añadirse a temperatura ambiente antes de que empiece el ciclado térmico.

Sin embargo, es importante que los reactivos se mezclen en un orden tal, que la SSB no se añada en último lugar. De preferencia la SSB debe mezclarse previamente con los cebadores y los dos reactivos pueden añadirse juntamente con los demás reactantes. La cantidad óptima de SSB variará con la identidad de la SSB y con la cantidad de ADN monocatenario de cada reacción, y puede determinarse por tanteo de acuerdo con los criterios descritos más arriba para la optimización de los parámetros del ciclo térmico. Debido a que las preparaciones celulares contienen normalmente poco ADN monocatenario, la cantidad de cebadores en una reacción permite la aproximación de la cantidad óptima de SSB, siguiendo el siguiente camino: (1) calcular el total de moles de todos los cebadores a partir del número de cebadores utilizados, sus concentraciones, y el volumen de la reacción; (2) dividir la media de la longitud del cebador por el valor conocido de la huella de la SSB particular utilizada y redondear al número entero más próximo; (3) multiplicar este número entero por el total de moles del cebador para tener el número total de moles de SSB necesarios para reaccionar con todos los cebadores, y (4) añadir una cantidad de SSB igual a 0,5 a 2 veces la cantidad mínima calculada de SSB. Un ajuste posterior puede hacerse por tanteo. La huella de la SSB es el número de nucleótidos que ocupa el sitio de unión de la SSB. En la literatura de investigación, se ha informado de las siguientes huellas de SSB aproximadas: 8 nucleótidos para la proteína del gen 32 del bacteriófago T4; entre 33 y 65 nucleótidos para el tetrámero de la SSB del *E. coli*; 5 nucleótidos para el monómero de la proteína del gen 5 del fago filamentoso; 4 a 7 nucleótidos para el monómero de la proteína del movimiento del tobamovirus de 30 kilodaltons; 30 nucleótidos por el monómero de la proteína de la región vir E2 de 64 kilodaltons del *Agrobacterium tumefaciens*.

Tanto si el primero o el segundo aspecto de la invención se aplica a las células suspendidas en un tubo PCR estándar, el tratamiento post-PCR preferido requerido para el análisis microscópico es el mismo. Las células se centrifugan formando una bolita como sedimento y se lavan una vez en solución salina tamponada con fosfato antes de colocarlas sobre portaobjetos tratados con organosilano como se ha descrito más arriba, tanto si se trata de un frotis o de una sección con el microtomo a través de la bolita centrifugada incrustada en parafina. Calentando a 60°C durante una hora, aumenta la adherencia de las células al portaobjetos.

En el caso de que el primer o segundo aspecto de la invención se aplique a secciones histoquímicas o frotis citoquímicos sujetos a un portaobjetos del microscopio, los procedimientos de amplificación difieren algo de los descritos más arriba en tubos de PCR. Una modalidad preferida de efectuar el primer aspecto de la invención sobre portaobjetos de microscopio es la de cubrir la sección o el frotis con aproximadamente 5 a 10  $\mu l$  de la mezcla de reactivos de PCR a la que falta por lo menos un reactivo tal como una enzima. A continuación, se coloca un cubreobjetos de plástico sobre esta preparación, se coloca el portaobjetos dentro de una cápsula de lámina de aluminio de 5 a 10 mm aproximadamente de profundidad, cuyo fondo es ligeramente mayor que el portaobjetos, y la cápsula se coloca sobre el bloque metálico para muestras del ciclador térmico. Después de que el bloque para muestras se ha calentado a aprox. 80°C y se mantiene a esta temperatura, se levanta el cubreobjetos y se distribuye por la superficie de la mezcla de reactivos, de 2 a 10  $\mu l$  de tampón de PCR conteniendo el (los) reactivo(s) que faltaba(n). Se vuelve a colocar el cubreobjetos antes de que la preparación de la PCR in situ se seque, se añade una gota de esmalte de uñas a una punta del cubreobjetos para fijarlo al portaobjetos, y éste se cubre con el suficiente aceite mineral para asegurar que todos los cubreobjetos incluidos sus extremos están protegidos de la atmósfera. De preferencia el aceite debe haberse calentado previamente de forma que su adición no deduzca transitoriamente la temperatura de la preparación de la PCR in situ. A continuación se efectúa un ciclado térmico estándar de dos temperaturas o de tres temperatura de aproximadamente 40 ciclos. Como se ha mencionado más arriba, los parámetros del ciclo, el número de ciclos y las concentraciones del reactivo de la PCR pueden necesitar una optimización para compensar la cinética anormal del calentamiento y enfriamiento del portaobjetos de microscopio cubierto de aceite y los posibles cambios de la velocidad de reacción causados por la naturaleza celular de la muestra de ensayo. Después de la amplificación se elimina el aceite mineral del portaobjetos con un disolvente orgánico tal como el xileno y los portaobjetos se secan con etanol 100% o una serie creciente de concentraciones de alcohol. La

preparación exenta de aceite se incubaba aproximadamente durante 15 minutos alrededor de 50°C en 0,15 M de NaCl, 0,015 M de citrato de Na, pH 7,0, para eliminar los reactivos PCR sin reaccionar. Este paso es de mayor utilidad si los cebadores o los DNTP han sido marcados.

5 Una modalidad preferida de efectuar el segundo aspecto de la invención sobre portaobjetos de microscopio, es seguir el procedimiento recomendado más arriba para el primer aspecto, con unos pocos cambios. El método manual Hot Start<sup>TM</sup> no es necesario, aunque puede usarse todavía. Se añade una cantidad de SSB a la mezcla de reactivos, que se estime sea suficiente para unirse con todo el ADN monocatenario de la preparación PCR in situ. Esta estimación se efectúa como se ha descrito más arriba  
10 para la PCR efectuada en tubos de reacción. Como entonces, es importante que la SSB no sea el último reactivo añadido; de preferencia se mezcla previamente con los cebadores, la forma más importante de ADN monocatenario. Si no se utiliza el método manual Hot Start<sup>TM</sup>, se junta la preparación completa, se cubre con un cubreobjetos de plástico (sujeto al portaobjetos de microscopio con una gota de barniz de uñas, se coloca en la cápsula de lámina de aluminio, y se cubre con aceite mineral a temperatura  
15 ambiente; se emplea una serie normal de ciclos térmicos, sin mantener inicialmente de 70° a 80°C. La eliminación posterior del aceite de la PCR y el secado de la preparación, se efectúan como se ha indicado más arriba.

La fase de detección de la PCR in situ se efectúa de la misma forma, tanto si se sigue el primero  
20 como el segundo aspecto de la invención y tanto si la PCR se efectúa en un tubo de reacción como en un portaobjetos de microscopio. Hay dos estrategias básicas para la detección. La primera estrategia implica el marcaje bien del cebador de la PCR o bien por lo menos de uno de los DNTPS, con un radioisótopo o con un grupo de unión tal como la biotina, digoxigenina o fluoresceína o con otro fluoróforo. En este caso, la marca incorporada en el ácido nucleico amplificado puede ser analizada directamente,  
25 con la condición de que el reactivo marcado sin reaccionar haya sido eliminado por lavado después de la PCR, y con la condición de que el procedimiento de lavado y secado no haya movilizado el ácido nucleico amplificado de su punto de síntesis. La validez analítica de la simple estrategia de detección de la muestra requiere que la invención haya aumentado suficientemente la especificidad de la PCR in situ para que los productos no específicos despreciables formados, sean lo bastante grande para resistir el lavado de  
30 la preparación ???. Para ensayar y validar esta consecuencia del primero de los dos aspectos de la invención pueden realizarse las apropiadas reacciones de control. La reacción de control lógicamente más convincente es realizar el procedimiento sobre células conocidas por carecer de la secuencia diana; la validación de la estrategia de detección simplificada requiere que ninguna señal sea generada en las células de control. A menudo, dichas células de control están presentes en una preparación histoquímica  
35 o citoquímica, de forma que el análisis estándar contiene su propio control. Un control menos convincente es el de utilizar cebadores que difieren suficientemente de los cebadores óptimos para la secuencia diana que no amplificarán la secuencia diana en las condiciones específicas de reasociación y extensión.

La segunda estrategia implica la detección del ácido nucleico amplificado en la hibridación in situ a  
40 una sonda marcada de ácido nucleico: un oligonucleótido o polinucleótido con una secuencia complementaria a por lo menos parte de las secuencias amplificadas de ácido nucleico (de preferencia excluyendo las secuencias del cebador). La hibridación in situ, bien conocida por la técnica histoquímica y citoquímica, tiene cuatro pasos básicos: la desnaturalización del ADN de la muestra de ensayo, la reasociación de la sonda al ácido nucleico de la muestra de ensayo en condiciones restrictivas, lavado del portaobjetos de  
45 microscopio con un disolvente en condiciones restrictivas para eliminar la sonda que no ha hibridado, y la detección de la sonda que ha sido retenida en el portaobjetos.

Dejando aparte cual sea la estrategia de detección utilizada, los métodos para la observación y registro de la presencia y localización de la marca sobre el portaobjetos de microscopio, son los mismos.  
50 Si la marca es un radioisótopo (de preferencia un poderoso emisor de radiaciones beta, tales como el <sup>32</sup>P ó <sup>125</sup>I), el portaobjetos de microscopio se recubre con una emulsión de rastreo nuclear tal como la NTB-2 de Eastman Kodak Co (Rochester, NY), se incubaba a 4°C durante un intervalo determinado por tanteo y se revela mediante métodos estándar para dejar granos de plata microscópicamente detectables en la proximidad de las marcas inmovilizadas. Los procedimientos para el marcado con <sup>125</sup>I de la  
55 sonda o el producto de la PCR, están descritos por Haase y col., (ver más arriba). Si la marca es un fluoróforo, puede observarse directamente en un microscopio de fluorescencia con filtros de excitación y emisión optimizados para el fluoróforo particular. Este método de detección es particularmente adecuado para múltiples PCR in situ con diferentes pares de cebadores para diferentes secuencias diana de ácido nucleico. O bien diferentes fluoróforos de diferente especificidad pueden unirse a los cebadores, o  
60 bien diferentes fluoróforos pueden unirse a sondas de diferente especificidad. Los métodos para unir los fluoróforos a oligonucleótidos y polinucleótidos, de preferencia en los extremos 5', ya son bien conocidos en la química del ácido nucleico y las técnicas de la PCR. Si la marca es un grupo de unión tal como

la biotina o la digoxigenina, éste se incorpora directamente en el producto de la PCR (mediante los cebadores ó los dNTPs) ó en los cebadores mediante esencialmente los mismos métodos empleados para unir otras marcas. Sin embargo, en este caso, la generación de la señal requiere unos pasos de detección adicionales. De preferencia, el portaobjetos de microscopio se incuba en un disolvente acuoso tamponado que contiene un conjugado covalente de una enzima de detección y una proteína de unión específica para la marca (avidina o estreptovidina) para la biotina, un anticuerpo antidigoxigenina para la digoxigenina, un anticuerpo antifluoresceína para la fluoresceína). La enzima de detección preferida es la peroxidasa de rábano silvestre o la fosfatasa alcalina. Después de eliminar la enzima conjugada no unida, mediante lavado con un disolvente acuoso tamponado, el portaobjetos de microscopio se sumerge en una solución que contiene un sustrato cromogénico para la enzima empleada. Después de que se ha depositado un color insoluble producto de la reacción de la enzima, en los puntos del portaobjetos de microscopio en donde el conjugado de enzima ha sido unido, el sustrato que no ha reaccionado se elimina por lavado con agua o un disolvente acuoso tamponado para evitar la formación con el paso del tiempo de una coloración de fondo no específica. Los sustratos cromogénicos preferidos que generan productos insolubles ya son bien conocidos en la técnica histoquímica y citoquímica, como son p. ej. los métodos de tinción y de incubación para el conjugado de enzima y lavado. Los sustratos y conjugados de enzima pueden adquirirse comercialmente en multitud de proveedores bien conocidos por los histoquímicos y citoquímicos.

Un procedimiento compañero preferido en los pasos de detección de la presente invención es la tinción de contraste del portaobjetos de microscopio con colorantes fluorescentes (para marcas fluorescentes) o colorantes cromóforos (para la detección autorradiográfica o la generación enzimática de cromóforos insolubles) los cuales emiten o absorben con diferentes características espectrales que las señales específicas del analito y que destacan las estructuras celulares, especialmente en células que carecen de la secuencia diana de ácido nucleico. Especialmente preferida para el examen de depósitos de color azul insoluble mediante transmisión microscópica es la tinción de contraste mediante el “nuclear fast red” (“rojo rápido nuclear”), estándar en la técnica histoquímica y citoquímica. Los métodos para el examen de preparaciones de PCR in situ, tintadas, por microscopía de transmisión o fluorescencia son ya bien conocidos en la técnica histoquímica y citoquímica, como son p. ej. los métodos de registro permanente de las imágenes microscópicas fotográficamente o mediante imágenes de video digitalizadas.

Cuando el primer o segundo aspecto de la invención ha sido aplicado a células fijadas suspendidas en un tubo de PCR, una modalidad de detección alternativa a la sujeción a un portaobjetos para el examen microscópico es la citometría de flujo directa de las células en suspensión. La citometría de flujo se adapta mejor a las señales fluorescentes, tanto si están incorporadas al ácido nucleico amplificado durante la PCR in situ, como si están unidas al ácido nucleico amplificado mediante la hibridación de la sonda después de la PCR. En cualquier caso es importante que las células se laven mediante sedimentación y resuspensión en un disolvente acuoso tamponado exente de marca, para asegurar que la marca no asociada con el ácido nucleico amplificado está completamente eliminada. Los métodos de la citometría de flujo, bien conocidos por los biólogos celulares, son de utilidad principalmente para el conteo de las proporciones de células marcadas y de las no marcadas, aunque pueden también registrar la distribución cuantitativa de la marca entre las células.

En una modalidad preferida de efectuar los aspectos de la invención, los bloque para muestras del ciclador térmico convencional, pueden modificarse para cambiar justo la superficie superior de forma que se optimiza para el flujo caliente a y de los portaobjetos de microscopio. Se han descrito para ello dos diseños muy distintos. Uno, para las aplicaciones de la PCR in situ en el cual pueden operarse simultáneamente muy pocos portaobjetos, la superficie superior está diseñada para crear áreas horizontales planas lo bastante grandes para sostener los portaobjetos de forma que las dimensiones grandes (altura y anchura) estén horizontalmente. Estas áreas planas pueden rebajarse en pozos no muy profundos que mantienen una barrera de vapor de aceite mineral cubriendo los portaobjetos. Las áreas deben tener por lo menos 16 mm de ancho y 77 mm de largo para ajustarse a los portaobjetos de microscopio convencionales de vidrio. Los pozos deben ser por lo menos de 2 mm de profundidad para ajustarse al portaobjetos más el cubre-objetos más la barrera de vapor. Este diseño es compatible, bien con el primer aspecto o bien con el segundo aspecto de la invención.

Asimismo, para las aplicaciones in situ en las que se opera simultáneamente con muchos portaobjetos, el bloque puede diseñarse para contener muchas ranuras estrechas, profundas, verticales o aproximadamente verticales, del tamaño suficiente para insertar los portaobjetos por un extremo con un mínimo espacio de separación del portaobjetos de las superficies de metal que miran a las superficies superior e inferior. El espacio intermedio se llena normalmente con aceite mineral u otro líquido no volátil para proporcionar una barrera de vapor y una transferencia eficaz del calor durante el ciclo térmico. El plano de una ranura puede estar inclinado de la vertical hasta aprox. 45° con el fin de emplear la fuerza de la

gravidad para asegurar que una superficie del portaobjetos toca el metal del bloque para muestras. Las ranuras deben tener una profundidad de 15 mm, por lo menos 77 mm de largo y por lo menos 2 mm de ancho para que ajusten a un portaobjetos convencional más el cubreobjetos. Este diseño es compatible con el segundo aspecto de la invención pero no se prefiere al primero porque bloquea rápidamente el acceso a la preparación de la PCR in situ para la eliminación del cubreobjetos, adición manual del (de los) reactivo(s) de la PCR que falta(n), y reemplaza el cubreobjetos.

Pueden adquirirse en el comercio muchos diferentes cicladores térmicos, cada uno de ellos con un diseño distinto del bloque para muestras. Sin embargo, estos diseños de bloques para muestras pueden describirse en términos de varias características generales: (a) composición: prácticamente todos están contruidos de metal, de preferencia aluminio, para promover la durabilidad y la rápida transferencia de calor; la forma y todas las dimensiones de longitud, ancho y grueso; (c) las superficies inferior y ocasionalmente las superficies laterales, diseñadas para integrar los mecanismos de calefacción y refrigeración que determinan la temperatura del bloque mientras el ciclador térmico está funcionando; (d) una superficie superior que contiene varios pozos dimensionados para sujetar herméticamente los tubos de microcentrífuga, de preferencia alrededor de 0,5 ml de capacidad pero ocasionalmente sosteniendo de 1,5 ml, los cuales se usan habitualmente para contener reacciones de amplificación de ácido nucleico; (e) ocasionalmente uno o unos pocos pequeños pozos en una superficie diseñada para sujetar herméticamente una sonda termopar o termistor que retroalimenta la temperatura del bloque para muestras al circuito de control del ciclador térmico.

Cambiando solamente la superficie superior del bloque para muestras, quedan prácticamente invariables las demás características del diseño (excepto el grueso posible del bloque), con el fin de minimizar el impacto sobre la fabricación y rendimiento del ciclador térmico. Se prefiere también que el bloque para muestras modificado tenga la misma masa que el bloque para muestras convencional del ciclador térmico en cuestión para minimizar el impacto sobre la cinética de calentamiento y enfriamiento.

Los bloques para muestras del ciclador térmico más corrientes, están fabricados mecanizando un bloque de metal único, con una fresa rotativa, a las dimensiones exactas, los pozos y otros contornos necesarios para integrar con el resto del ciclador térmico. Los orificios para sujetar con tornillos el bloque al resto del ciclador térmico pueden practicarse con un taladro. Los mismos procedimientos de fabricación son adecuados para los bloques de muestras modificados que aquí se describen. Sin embargo la forma rectilínea de los pozos adaptados para ajustar herméticamente a los portaobjetos de microscopio se practican también fácilmente por estampación o mecanizado (incluyendo el chorro de láser o agua, para corte) de planchas de metal relativamente delgadas que se fijan juntas con tornillos para formar un conjunto de láminas. El bloque entero puede ser de láminas; o solamente puede ser de láminas la parte superior, conteniendo los pozos para los portaobjetos de microscopio y estar sujeto con tornillos a una sólida parte inferior la cual contiene las características del bloque que se integran con el resto del ciclador térmico.

Un diseño de bloque de muestras de un ciclador térmico puede incluir tanto pozos optimizados para portaobjetos de microscopio como pozos diseñados para contener los tubos convencionales para la amplificación del ácido nucleico. De preferencia, los pozos para los tubos de reacción ocupan una o varias hileras a lo largo de los bordes del bloque de muestras, reservando el área central del bloque de muestras para los pozos para portaobjetos de microscopio. Esta modalidad se efectúa mejor si se dejan sin modificar las otras características del bloque de muestras, incluyendo la masa de metal. La fabricación es más sencilla cuando se realiza mediante mecanización, debido a la simetría cilíndrica de los pozos para los tubos de reacción.

Unos pocos cicladores térmicos que pueden adquirirse comercialmente y diseños de cicladores térmicos publicados prescinden de los bloques de muestras de metal y sumergen los tubos convencionales de la PCR en una corriente que se mueve rápidamente de aire caliente o frío, agua u otro fluido de transferencia térmica. Dichos diseños se adaptan fácilmente a los portaobjetos de microscopio substituyendo los soportes de los tubos con un alambre de metal o látex de plástico que sostienen los portaobjetos firmemente en la corriente del fluido de transferencia térmica. De preferencia, los portaobjetos están orientados de forma que su dimensión más pequeña (grueso) está de cara al flujo de fluido y el vector dominante del flujo de fluido descansa en un plano paralelo al plano de sus dimensiones más grandes (ancho y largo). Un ligero biselado de los portaobjetos de microscopio pueden crear una suave turbulencia que ayuda a asegurar una uniforme transferencia del calor.

En el caso de que el ciclador térmico contacte directamente con los portaobjetos de microscopio con un fluido de transferencia térmica en movimiento, es necesario aislar los portaobjetos del fluido de transferen-

cia térmica mediante una delgada barrera que bloquea la transferencia de material entre la preparación de la PCR in situ y el fluido de transferencia térmica. De otra manera, la preparación puede desecarse o sufrir un lavado (blanqueado) de los reactivos de la PCR. Las barreras preferidas son las bolsas de plástico fino impermeable al agua con alta conductividad térmica, tales como el fluorocarbono, poliuretano, una poliolefina, una poliimida o una poliamida. Las bolsas deben sellarse de forma que eviten la pérdida de fluido o vapor de agua dentro o fuera de la misma. Tanto un adhesivo resistente al agua como una grapa hermética pueden servir adecuadamente para sellar la bolsa. Si el fluido de transferencia de calor es un líquido, un borde de la bolsa puede proyectar hacia arriba el líquido en el espacio de vapor encima del mismo. Como una alternativa a una bolsa, la barrera de vapor puede constar de un hoja fina de plástico con aproximadamente la longitud y ancho de un portaobjetos de microscopio con un adhesivo resistente al agua caliente aplicado en una tira estrecha alrededor de todos los bordes sobre una cara. La lámina se comprime firmemente a la cara superior del portaobjetos microscópico antes de poner en marcha el ciclaje térmico y pueda quitarse fácilmente después para el proceso de detección. Puede reemplazarse incluso el cubreobjetos.

De la anterior descripción y de los siguientes ejemplos, cualquier experto en la especialidad puede apreciar los muchos diversos aspectos de la presente invención, como se abarca en las siguientes reivindicaciones.

#### Ejemplo 1

##### *PCR in situ y detección de la hibridación del HPV integrado en el ADN genómico humano*

Se hicieron crecer células de la línea celular del cáncer cervical humano, SiHa (ATCC HTB 35), conteniendo una copia integrada del genoma del virus tipo 16 del papiloma humano (HPV) por genoma humano, hasta una densidad de alrededor de  $10^5$  células/ml en medio esencial mínimo de Eagle con aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, y 1 % de suero bovino fetal, lavado dos veces en solución salina tamponada con Tris, ajustado a una densidad aproximadamente de  $10^4$  células/ml, y se agitó durante la noche a temperatura ambiente en 10 % (vol/vol) de formaldehído en tampón de fosfato. Las células fijadas con formaldehído se centrifugaron a 2.000 rpm durante 3 minutos y el sedimento resultante en forma de bolita se incrustó en parafina. Las secciones con el microtomo (4  $\mu\text{m}$  de grueso) del bloque de parafina se fijaron a portaobjetos de microscopio de vidrio los cuales habían sido bañados en aminopropiltrióxido al 2-3 % (Aldrich Chemical Co) en acetona, sumergiendo las secciones en un baño de agua. Una vez fijadas, se desparafinaron las secciones y se digirieron proteolíticamente con reactivos de Viratype<sup>®</sup>, in situ Tissue Hybridization Kit ("kit de hibridación de tejidos in situ") (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) siguiendo las instrucciones del fabricante. (podrían haber sido empleados en su lugar, los reactivos equivalentes y métodos de Oncor S6800kit, Oncor, Inc., Gaithersburg, MD). Los portaobjetos se colocaron en cápsulas de lámina de aluminio hechas a mano, de unas dimensiones aproximadas de 8x3x1 mm; y cada conjunto de cuatro secciones (por portaobjetos) se recubrió con 5 a 10  $\mu\text{l}$  de solución de PCR (ver más adelante). A continuación se colocó un cubreobjetos de plástico sobre cada cuatro secciones en la preparación de PCR in situ. Para la PCR in situ convencional, el cubreobjetos se sujetó al portaobjetos con una gota de barniz de uñas, el portaobjetos se cubrió con 1 ml aproximadamente de aceite mineral, la cápsula de lámina de aluminio se colocó en la parte superior del bloque de aluminio para muestras de un ciclador térmico de PCR y se puso en marcha el ciclaje térmico. Para la PCR in situ del método Hot Start<sup>TM</sup> manual, la cápsula que contiene el portaobjetos (con el cubreobjetos) se calentó a 82°C y se mantuvo el ciclador térmico a esta temperatura mientras el cubreobjetos se levantó, se distribuyeron 2  $\mu\text{l}$  de los reactivos incompletos de la PCR (ver más adelante) sobre la superficie de la preparación, el cubreobjetos fué reemplazado y fijado al cubreobjetos con una gota de barniz de uñas y encima del porta y cubreobjetos se colocó aproximadamente 1 ml de aceite mineral calentado previamente a 82°C, en la cápsula. A continuación se reanudó el programa térmico normal.

La solución de PCR a pH 8,3 contenía 10 Mm TrisCl, 50 Mm KCl, 4,5 Mm MgCl<sub>2</sub>, 20 Mm de cada DNTP, 0,2 unidades/ $\mu\text{l}$ litro de AmpliTaq<sup>®</sup> ADN polimerasa y 6  $\mu\text{M}$  de cada cebador. Para los experimentos de "un par único de cebadores", los cebadores fueron el PV1 y el PV2, generando un producto de 449 bp del genoma de HPV tipo 16. Para los experimentos de "múltiples pares de cebadores", se emplearon los cebadores PV1 al PV7, que generaron unas series de productos de PCR solapándose aproximadamente 450 bp, cubriendo una secuencia de longitud de 1247 bp. Todas las secuencias de los cebadores están dadas en la tabla que sigue:

60

## ES 2 123 542 T3

### *Posición del primero*

Cebador	SEQ ID No	Nucleótido	Secuencia
PV1 (5')	1	110	5'-CAGGACCCACAGGAGCGACC
PV2 (3')	2	559	5'-TTACAGCTGGGTTTCTCTAC
PV3 (5')	3	501	5'-CCGGTCGATGTATGTCTTGT
PV4 (3')	4	956	5'-ATCCCCTGTTTTTTTTTCCA
PV5 (5')	5	898	5'-GGTACGGGATGTAATGGATG
PV6 (3')	6	1357	5'-CCACTTCCACCACTATACTG
PV7 (5')	7	1300	5'-AGGTAGAAGGGCGCCATGAG

Para la PCR convencional in situ, todos los componentes de la relación anterior estaban presentes en la solución de PCR inicialmente añadida a las secciones histoquímicas. Para la PCR in situ con el Hot Start<sup>TM</sup> manual, la solución inicialmente añadida a las secciones carecía de cebadores y de Taq polimerasa. Estos reactivos fueron añadidos separadamente en 2  $\mu$ l de 10 Mm TrisCl, 50 Mm Kcl, pH 8,3, después de que el portaobjetos se calentara a 82°C. Para el primer ciclo térmico, la desnaturalización se efectuó durante 3 minutos a 94°C y la reasociación/extensión se realizó durante 2 minutos a 55°C; los restantes 39 ciclos constaron de 1 minuto de desnaturalización a 94°C y 2 minutos de reasociación/extensión.

Después de la amplificación del ADN, se eliminó el aceite mineral bañando en xileno, el cubreobjetos se retiró y las secciones montadas se secaron en etanol 100%. Cada portaobjetos se incubó con 10  $\mu$ l de una solución de 500 ng/ml de una sonda de polinucleótidos biotinilada HPV tipo 16 específica (Viratype Kit, Life Technologies, Inc.) en 0,03 M citrato de Na, 0,30 M NaCl, pH 7,0, 5% de sulfato de dextrano, 50% de formamida a 100°C durante 5 minutos y a continuación 37°C durante 2 horas; a continuación el portaobjetos se trató con un conjugado de fosfatasa alcalina-estreptavidina y los substratos de la fosfatasa, fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil (BCIP) y el azul nitro de tetrazolio (NBT), de acuerdo con las instrucciones del suministrador del kit S6800 Staining Kit (Oncor, Gaithersburg, MD). Después de la detección enzimática de la sonda biotinilada capturada sobre las secciones, dichas secciones fueron sometidas a una tinción de contraste con rojo rápido nuclear durante 5 minutos. Se obtuvieron los siguientes resultados en este sistema experimental, cuando los portaobjetos tintados fueron examinados por microscopía de transmisión con un aumento de 40-400 X. En una PCR in situ convencional, no se detectaron HPV dianas de copia única en células SiHa, con un par único de cebadores, pero si se detectaron claramente en la mayoría de núcleos con pares múltiples de cebadores. En la PCR in situ con el Hot Start<sup>TM</sup> manual, un par único de cebadores tintaron alrededor del 80% de núcleos de células más fuertemente que lo hicieron pares múltiples de cebadores en el método convencional. El otro 20% pudo haber sido dañado durante la preparación de las secciones. La conclusión previamente publicada de que la PCR in situ requiere múltiples pares de cebadores especificando las dianas solapadas, queda por lo tanto invalidada. El rendimiento práctico, y de hecho perfeccionado, de un único par de cebadores, aumenta en gran manera la utilidad de la PCR in situ.

#### Ejemplo 2

##### *Detección de la hibridación PCR in situ del HIV-1 integrado en el ADN genómico humano*

La línea celular de linfocitos T humanos H9 (ATCC CRL 8543), se hizo crecer a una densidad alrededor de 10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI completo, se infectó con HIV-1 como se describe en Basic Virological Techniques ("Técnicas víricas básicas"), pp. 66-69, y se incubó durante 4 días a temperatura ambiente. Aproximadamente 10<sup>4</sup> células de esta incubación se fijaron con formaldehído, se incrustaron en parafina, se seccionaron (4  $\mu$ m de grueso), se montaron sobre portaobjetos de vidrio y se permeabilizaron proteolíticamente como en el ejemplo 1. La PCR in situ convencional y la Hot Start<sup>TM</sup> manual, se efectuaron como en el ejemplo 1, excepto que se utilizó un único par de cebadores, SK38 y SK39 (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT) especificando una diana de 115 bp de la región gag del HIV-1. El procesado después de la PCR fue como en el ejemplo 1, excepto que la sonda, SK19 (Perkin Elmer Cetus Instruments) se marcó con digoxigenina 11-DUTP empleando cebadores al azar, empleando los reactivos y siguiendo las instrucciones de Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN), fabricante del DNTP marcado y el kit de marcaje Genius<sup>TM</sup>. La tinción del portaobjetos de microscopio tratado con la sonda,

se efectuó con un conjugado fosfatasa alcalina-antidigoxigenina y los cromóferos BCIP/NBT, siguiendo igualmente las instrucciones del fabricante.

El examen microscópico del portaobjetos mostró que alrededor del 90 % de núcleos de células habían sido teñidas con BCIP/NBT después de la PCR in situ Hot Start<sup>TM</sup>; en cambio, la PCR in situ convencional no proporcionó núcleos teñidos. Incluso un producto de 115 bp pudo ser detectado sin el empleo de isótopos, mediante (y solo mediante) el método mejorado Hot Start<sup>TM</sup>.

### Ejemplo 3

#### Mejora de la especificidad de la PCR in situ resultante del método Hot Start

Se prepararon portaobjetos de microscopio llevando secciones histoquímicas de células SiHa fijadas e incrustadas. Las secciones se trataron con aproximadamente 50  $\mu$ l de leucocitos periféricos humanos (aproximadamente 5.000 células/ml) de un dador HPV negativo, preparados a partir de un buffy coat ("leucocitos resultantes de sangre centrifugada"), y depositados sobre el portaobjetos mediante citospina. Las células añadidas se fijaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en formaldehído 10 % en tampón de fosfato. Los portaobjetos se sometieron a la PCR in situ convencional o Hot Start<sup>TM</sup> manual, como se ha descrito en el ejemplo 1, con la diferencia de que los DNTPS se aumentaron con 5 Mm de digoxigenin-11-DUTP (Boehringer Mannheim). Se empleó el par de cebadores de HPV, PV1 y PV2.

Después de la amplificación del ADN, todo el ADN marcado con la digoxigenina, que no había sido eliminado durante el lavado y la deshidrogenación, se tiñó con un conjugado fosfatasa alcalina-antidigoxigenina y substratos de fosfatasa, BCIP y NBT, según recomendación de Boehringer Mannheim, proveedor de los reactivos de tinción, con la diferencia de que los volúmenes de reactivo se redujeron aproximadamente un 95 % para adaptar las secciones histoquímicas antes que las membranas de South blotting. Después de la tinción del ADN amplificado, los leucocitos se tiñeron inmunohistoquímicamente mediante un par de anticuerpos primarios monoclonales de ratón contra el antígeno común del leucocito (DAKO-LCA, conteniendo los anticuerpos pD7/26 y 2BN; DAKO-PATTS) y un kit Histostain-SP para la detección del anticuerpo primario de ratón (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA). Este kit emplea un anti anticuerpo secundario de ratón biotilado, peroxidasaestreptavidina de rábano silvestre y el substrato de peroxidasa cromogénico, aminoetilcarbazol. Tanto los anticuerpos primarios como el kit de tinción se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El examen microscópico mostró que la PCR in situ Hot Start<sup>TM</sup> tiñó alrededor del 80 % de núcleos de células SiHa, pero ningún núcleo de leucocito, demostrando la especificidad y sensibilidad del procedimiento Hot Start<sup>TM</sup>, incluso con un único par de cebadores. En contraste, la PCR in situ convencional fué tan inespecífica que todas las células, tanto las SiHa como los leucocitos, se tiñeron, lo cual indicó que tiene lugar una considerable amplificación no inducida por la diana, cuando no se emplea el procedimiento Hot Start<sup>TM</sup>. Aunque las sondas específicas para la diana pueden distinguir el ADN amplificado específicamente y no específicamente después de la hibridación in situ (ver ejemplo 1), el presente ejemplo demuestra que el método Hot Start<sup>TM</sup> puede hacer que no sea necesario utilizar las sondas, simplificando mucho la detección y con ello potenciando todavía más la practicidad de la PCR in situ.

#### Listado de secuencias

##### INFORMACION PARA SEQ ID NO: 1:

##### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA : simple
- (D) TOPOLOGIA: lineal

##### (ii) TIPO DE MOLECULA: distinta al ácido nucleico

##### (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

CAGGACCCAC AGGAGCGACC

## ES 2 123 542 T3

### INFORMACION PARA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
5 (A) LONGITUD: 20 bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA : simple  
(D) TOPOLOGIA: lineal  
(ii) TIPO DE MOLECULA: distinta al ácido nucleico  
10 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:  
TTACAGCTGG GTTTCTCTAC

### INFORMACION PARA SEQ ID NO: 3:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 20 bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
20 (C) CADENA : simple  
(D) TOPOLOGIA: lineal  
(ii) TIPO DE MOLECULA: distinta al ácido nucleico  
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:  
25 CCGGTCGATG TATGTCTTGT

### INFORMACION PARA SEQ ID NO: 4:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 20 bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA : simple  
(D) TOPOLOGIA: lineal  
35 (ii) TIPO DE MOLECULA: distinta al ácido nucleico  
(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:  
ATCCCCTGTT TTTTTTTCCA

### INFORMACION PARA SEQ ID NO: 5:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 20 bases  
45 (B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA : simple  
(D) TOPOLOGIA: lineal  
(ii) TIPO DE MOLECULA: distinta al ácido nucleico  
50 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:  
GGTACGGGAT GTAATGGATG

### INFORMACION PARA SEQ ID NO: 6:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 20 bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
60 (C) CADENA : simple  
(D) TOPOLOGIA: lineal  
(ii) TIPO DE MOLECULA: distinta al ácido nucleico

## ES 2 123 542 T3

(xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

CCACTTCCAC CACTATACTG

5 INFORMACION PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 bases

10 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA : simple

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: distinta al ácido nucleico

15 (xi) DESCRIPCION DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

AGGTAGAAGG GCGCCATGAG

20

25

30

35

40

45

50

55

60

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para la amplificación PCR in situ de una secuencia de ácido nucleico diana en las células, el cual procedimiento comprende:

5 (a) adición in situ de una composición que contiene células químicamente tratadas con un fijador que reticula los constituyentes proteínicos de las estructuras celulares;

10 (b) adición de un primer subgrupo de reactivos de la PCR y opcionalmente una proteína de unión al ADN monocatenario, a la composición del paso a), e incubación de las células y del subgrupo de reactivos de la PCR a una temperatura entre alrededor de 50° y alrededor de 80°C;

15 (c) adición a la composición del paso b) de un subgrupo de reactivos de la PCR, el cual complementa al primer subgrupo, de forma que el grupo completo de reactivos de la PCR contiene un único par de cebadores para cada secuencia diana;

(d) sometiendo la composición del paso (c) a un ciclaje térmico suficiente para amplificar la secuencia diana de ácido nucleico especificado por el grupo completo de reactivos de la PCR, y

20 (e) detectando opcionalmente la secuencia amplificada de ácido nucleico de manera que la localiza en las células individuales que originalmente contienen la secuencia diana de ácido nucleico.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células tratadas químicamente están sujetas a un portaobjetos de microscopio entre los pasos (a) y (b) ó entre los pasos (d) y (e).

25 3. El procedimiento de la reivindicación 2, comprendiendo además la colocación de una barrera de vapor encima de la composición antes de que la composición sea incubada en el paso (b).

30 4. Un procedimiento para la amplificación de la PCR in situ de una secuencia diana de ácido nucleico en células, el cual comprende:

(a) adición in situ de una composición que contiene células químicamente tratadas con un fijador que reticula los constituyentes proteínicos de las estructuras celulares;

35 (b) adición a la composición del grupo completo de reactivos de la PCR, en donde el grupo completo de reactivos de la PCR comprende un único par de cebadores para cada secuencia diana, y una proteína de unión al ADN monocatenario;

40 (c) sometiendo la composición del paso (b) a un ciclaje térmico suficiente para amplificar la secuencia diana de ácido nucleico especificado por el grupo completo de reactivos, y

(d) opcionalmente, detectando la secuencia amplificada de ácido nucleico de manera que la localiza en las células individuales que originalmente contienen la secuencia diana de ácido nucleico.

45 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que las células están sujetas a un portaobjetos de microscopio entre los pasos (a) y (b) o entre los pasos (c) y (d).

50 6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que (1) las células están sujetas a un portaobjetos de microscopio, (2) se coloca una barrera de vapor encima de la composición antes del paso (c), y (3) se elimina la barrera de vapor antes de efectuar el paso (d).

7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que las células se han convertido en permeables para los reactivos de la PCR.

55 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que las células se convierten en permeables por tratamiento de las mismas con una proteinasa.

9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el fijador se selecciona entre el grupo formado por formalina, formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído.

60 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que las células tratadas químicamente residen dentro de una sección histoquímica o un frotis citoquímico.

## ES 2 123 542 T3

11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la proteína de unión al ADN monocatenario, es la proteína del gen 32 del bacteriófago T4.

12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el primer subgrupo de reactivos de la PCR consta de todos los reactivos de la PCR a excepción de la polimerasa de ácido nucleico.

13. Una composición para la PCR in situ, que contiene células químicamente tratadas con un fijador que reticula los constituyentes proteínicos de las estructuras celulares, un primer subgrupo de reactivos de la PCR en el que dicho subgrupo comprende un único par de cebadores para cada secuencia diana, y opcionalmente una proteína de unión al ADN monocatenario.

14. Una composición para la PCR in situ, que comprende células químicamente tratadas con un fijador que reticula los constituyentes proteínicos de las estructuras celulares, un grupo completo de reactivos de la PCR, de forma que el grupo completo comprende un único par de cebadores para cada secuencia diana, y una proteína de unión al ADN monocatenario.

15. La composición de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en la que las células se han convertido en permeables para los reactivos de la PCR, de preferencia mediante un tratamiento con proteinasa.

16. La composición de acuerdo con la reivindicación 13 o reivindicación 14, en la cual el fijador se selecciona del grupo formado por la formalina, formaldehído, paraformaldehído y glutaraldehído.

17. La composición de acuerdo con la reivindicación 13 o reivindicación 14, en la cual las células están sujetas a un portaobjetos de microscopio.

18. La composición de acuerdo con la reivindicación 13 ó reivindicación 14, en la cual las células se encuentran dentro de una sección histoquímica o un frotis citoquímico.

19. La composición de acuerdo con la reivindicación 13 ó reivindicación 14, que comprende además, una barrera de vapor encima de la composición.

20. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el primer subgrupo de reactivos de la PCR consta de todos los reactivos de la PCR a excepción de la polimerasa de ácido nucleico.

---

**NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

---