



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 135**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G02B 21/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97910799 .2**

96 Fecha de presentación : **03.10.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0935672**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.08.1999**

54

Título: **Métodos de hibridación *in situ* sobre láminas portaobjetos.**

30

Prioridad: **09.10.1996 US 727951**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**04.05.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**04.05.2009**

73

Titular/es: **STC.UNM**  
**801 University Blvd. SE, Suite 101**  
**Albuquerque, New Mexico 87106, US**

72

Inventor/es: **Sarto, Gloria, E. y**  
**Thompson, Donald, M.**

74

Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 319 135 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos de hibridación *in situ* sobre láminas portaobjetos.

5 **Antecedentes de la invención****Sector de la invención**

La presente invención se refiere a la hibridación *in situ*.

10

**Técnica anterior**

La hibridación *in situ* (ISH) es una herramienta poderosa y versátil para la detección y localización de ácidos nucleicos (ADN y ARN) en preparaciones de células o de tejidos. Mediante la utilización de sondas de ADN marcado o ARN antisentido, la técnica aporta un alto grado de información espacial en la localización de secuencias específicas de ADN o ARN en células o cromosomas individuales. La ISH se utiliza ampliamente en investigación y potencialmente en el diagnóstico en las áreas de los trastornos genéticos prenatales y la citogenética molecular. En el área general de la biología molecular, la ISH se utiliza para la detección de la expresión y sobreexpresión de genes, para el mapeo de genes, para la identificación de sitios de expresión de genes, para la localización de genes diana, y para la identificación y localización de diversas infecciones virales y microbianas. Actualmente, la aplicación de la investigación en la tecnología ISH se está expandiendo hacia el diagnóstico tumoral, el diagnóstico genético de preimplantación en la fertilización *in vitro*, la evaluación del trasplante de médula ósea, y el análisis de aneuploidía cromosómica en el núcleo en interfase y en metafase.

En la ISH, los ácidos nucleicos marcados (ADN o ARN antisentido) se hibridan a cromosomas o ARNm en células que están inmovilizadas sobre láminas portaobjetos de vidrio para microscopio (“Hibridación *in Situ*: Aplicaciones Médicas” (“*in Situ* Hybridization: Medical Applications”) (editores G.R. Coulton y J. de Bellerche), Kluwer Academic Publishers, Boston (1992); “Hibridación *in Situ*: En Neurobiología; Avances en Metodología” (“*in Situ* Hybridization: In Neurobiology; Advances in Methodology”) (editores J.H. Eberwine, K.L. Valentino, y J.D. Barchas), Oxford University Press Inc., Inglaterra (1994); e “Hibridación *in Situ*: Un Enfoque Práctico” (“*In Situ* Hybridization: A Practical Approach (editores D.G. Wilkinson), Oxford University Press Inc., Inglaterra (1992)). Se han desarrollado muchos sistemas no isotópicos para visualizar sondas de ADN marcadas, entre los que se incluyen: a) métodos de detección directos basados en fluorescencia, b) la utilización de sondas de ADN marcadas con digoxigenina y biotina acoplada a métodos de detección por fluorescencia y c) la utilización de sondas de ADN marcadas con digoxigenina y biotina acoplada a métodos de detección anticuerpo-enzima. Cuando las sondas de ácidos nucleicos (ADN o ARN) marcadas con fluorescencia se hibridan a ADN o ARN celular, las sondas hibridadas se pueden visualizar directamente mediante un microscopio de fluorescencia. Mediante la utilización de sondas múltiples de ácidos nucleicos con diferentes colores de fluorescencia, se puede llevar a cabo un análisis multicolor simultáneo (es decir, para genes múltiples o ARN) en una única etapa en una célula diana única. Las sondas de ácidos nucleicos marcadas directamente con fluorocromos eliminan la necesidad de procedimientos de detección en multicapa (por ejemplo, sistemas basados en anticuerpos), lo que permite el procesamiento rápido y también reduce las señales de fondo no específicas. Por lo tanto, la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se ha convertido en una herramienta cada vez más popular y valiosa tanto en ciencias básicas como clínicas.

Debido a la importancia de la tecnología FISH en biología y citogenética molecular, es deseable la optimización de la tecnología FISH actual para mejorar la sensibilidad de las señales de hibridación (fluorescencia), para simplificar y, por lo tanto, reducir el tiempo de procesamiento, y para sustituir los reactivos tóxicos por productos químicos no perjudiciales para la salud utilizados en el proceso FISH. La tecnología FISH para cromosomas de ADN (o ARN) depende de cuatro factores principales: (a) la temperatura óptima para la desnaturalización eficaz de los ADN de doble cadena (separación de dos cadenas de ADN); (b) la temperatura óptima para el apareamiento o hibridación entre el ADN (o ARN) diana y las sondas de ADN o ARN marcadas (es decir, fragmentos de ADN o ARN antisentido con los cuales se han conjugado enzimas, fluorocromos, cromóforos, elementos quimioluminiscentes, elementos bioluminiscentes, radioisótopos, biotina o avidina); (c) la selección de soluciones adecuadas para potenciar tanto los procesos de desnaturalización como de hibridación; y (d) las condiciones eficaces de lavado post-hibridación. Durante el procedimiento FISH, es fundamental que no se comprometa la integridad estructural del núcleo, de cromosomas, de secciones de células y de tejidos y la resolución espacial de las señales de fluorescencia. Por lo tanto, la optimización de la tecnología FISH debería incluir una eficacia de hibridación aumentada, una sensibilidad de detección aumentada y una conservación de la morfología celular, tisular, nuclear y cromosómica.

Actualmente, los procedimientos FISH que llevan a cabo diversos laboratorios por todo el mundo son generalmente muy similares a los de Kuo y otros, (“Detección de la Aneuploidía que implica los Cromosomas 13, 18 ó 21, mediante Hibridación *in Situ* Fluorescente a Amniocitos en Interfase y Metafase” (“Detection of Aneuploidy Involving Chromosomes 13, 18 or 21, by Fluorescence *in Situ* Hybridization to Interphase and Metaphase Amniocytes”) Am. J. Hum. Genet. 99:112-119 (1991)); Klinger y otros, (“Detección Rápida de Aneuploidías Cromosómicas en Amniocitos Sin Cultivar Mediante Hibridación *in Situ* Fluorescente (FISH)” (“Rapid Detection of Chromosome Aneuploidies in Uncultured Amniocytes by Using Fluorescence *in Situ* Hybridization (FISH)”), Am J. Hum. Genet. 51:55-65 (1992)); y Ward, B.E. y otros (“Diagnóstico Prenatal Rápido de Aneuploidías Cromosómicas mediante la Hibridación *in Situ* Fluorescente; Experiencia Clínica con 4.500 Individuos” (“Rapid Prenatal Diagnosis of Chromosomal Aneuploidies

by Fluorescence *in Situ* Hybridization; Clinical Experience with 4,500 Specimens”) Am. J. Hum. Genet. 52:854-865 (1993)). Sin embargo, a la mayor parte de los laboratorios les resulta conveniente confiar en equipos disponibles de dos fuentes comerciales principales: Oncor, Inc., “Sistema Rápido de Hibridación *in Situ* Cromosómica” (“Rapid Chromosome *in Situ* Hybridization System”), Edición 1, Octubre de 1993; y Vysis Inc. Los “Sistemas de Detección Biológica” (“Biological Detection Systems”)/Amersham, Inc., sólo aportan sondas de ADN marcadas con un protocolo FISH recomendado (“Sistemas de Detección Biológica” (“Biological Detection Systems”), Inc., 955 William Pitt Way, Pittsburgh, PA 15238). Todos estos procedimientos FISH conllevan mucho tiempo y trabajo, son extremadamente pesados y tienen una sensibilidad de detección muy limitada. La Patente de U.S.A. No. 5.225.326, a Bresser y otros, da a conocer la “hibridación *in Situ* en una etapa” (“one step *in situ* hybridization”), en la que supuestamente, tanto la fijación como la FISH se pueden llevar a cabo en un tiempo de 5 minutos hasta 4 horas. Haar y otros, “Una Técnica FISH Rápida para Microscopia Cuantitativa” (“A Rapid FISH Technique for Quantitative Microscopy”), Bio Techniques, Vol. 17, No. 2, págs. 346-353 (Agosto de 1994), da a conocer una técnica que “en principio” puede reducir el tiempo necesario para la FISH a treinta minutos.

La anotación de señales de fluorescencia utilizando los procedimientos FISH descritos anteriormente requiere, generalmente, una lente objetivo 100X con inmersión en aceite con un filtro de paso de banda triple, debido a la sensibilidad de señal más baja. La utilización de una elevada concentración de formamida durante el procedimiento FISH parece que provoca la destrucción morfológica de la estructura celular, nuclear o cromosómica. Además, todos estos procedimientos implican la utilización de formamida durante el procedimiento de hibridación o de post-hibridación. La formamida es un disolvente caro, tóxico y también es un teratógeno. Por lo tanto, desde el punto de vista medioambiental e higiénico, es deseable un procedimiento FISH exento de formamida.

La Patente US-A-4.886.741 da a conocer métodos para la utilización de agentes de exclusión de volumen para potenciar la hibridación *in situ*.

La Patente US-A-5.527.510 se refiere a sistemas de amplificación por PCR *in situ*.

La Patente US-A-4.722.598 da a conocer una lámina portaobjetos para microscopio de diagnóstico que tiene múltiples pocillos para muestras y tapa.

La Patente WO-A-93/01311 se refiere a la potenciación de la hibridación de polinucleótidos.

Finalmente, la Patente US-A-5.491.224 se refiere a composiciones de sondas de ADN transaminado marcadas directamente para la identificación de cromosomas y métodos para su fabricación.

### Características de la invención

La presente invención mejora respecto a lo descrito en la Solicitud de Patente U.S.A. con No. de Serie 08/418.704, que corresponde a la Patente WO-A-9631626 y se define en las reivindicaciones anexas. Se desarrolló un procedimiento de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) rápido, simple y altamente sensible en base a una solución preferente de desnaturalización-hibridación: una solución exenta de formamida, con el 10% de sulfato de dextrano/20% de glicerol/0,9% de NaCl o KCl. Se disolvieron sondas de ácidos nucleicos (ADN o ARN antisentido) marcadas en esta solución de desnaturalización-hibridación. La solución que contenía las sondas marcadas se aplicó a núcleos o a secciones de células y de tejidos tratadas adecuadamente, las cuales se inmovilizaron sobre láminas portaobjetos de vidrio para microscopio y, a continuación, se colocaron con cuidado cubreobjetos de vidrio para permitir una correcta extensión de la solución de sonda.

Las sondas de ácidos nucleicos marcadas y los ácidos nucleicos en los cromosomas y en las secciones de células y de tejidos tratadas adecuadamente sobre las láminas portaobjetos se desnaturalizaron simultáneamente durante aproximadamente  $1,5 \pm 0,5$  minutos en un horno de aproximadamente  $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  con o sin un sellador entre el cubreobjetos y la lámina portaobjetos de vidrio y, a continuación, se hibridaron inmediatamente en un horno a una temperatura de aproximadamente  $55^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos.

Después de apartar los cubreobjetos de las láminas portaobjetos, las láminas portaobjetos hibridadas se lavaron en formamida al 50%, en NaCl al 0,45% durante 3 minutos a  $38^{\circ}\text{C}$  y, a continuación, durante 5 minutos en NaCl al 0,9% a  $38^{\circ}\text{C}$ . Alternativamente, las láminas portaobjetos hibridadas se lavaron en NaCl al 0,1-0,2% a  $60^{\circ}\text{C}$ , exento de formamida, durante 5 minutos y, a continuación, durante otros 3 minutos en una nueva solución de NaCl al 0,1-0,2% a  $60^{\circ}\text{C}$ .

Después del secado con aire, las láminas portaobjetos se contratiñeron con una solución de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) o de yoduro de propidio (PI). Se visualizaron las señales de fluorescencia con un microscopio de fluorescencia que estaba equipado con un filtro de paso de banda triple y una lente objetivo seco 20x o 40x. El procedimiento FISH completo tardó de 5 minutos a 15 minutos. Entre las ventajas de estos procedimientos que se basan en esta solución de desnaturalización-hibridación se encuentran: 1) la eliminación de la etapa de sellado del cubreobjetos al portaobjetos con cemento de goma durante el procedimiento FISH entero; 2) la simplificación de las etapas de procesamiento FISH mediante co-desnaturalización (una capacidad de variar las temperaturas  $\pm 10$  grados sin afectar negativamente el resultado); 3) un proceso FISH rápido en 15 minutos o menos; 4) una sensibilidad altamente aumentada de las señales de hibridación (fluorescencia); y 5) el desarrollo de un procedimiento de hibridación *in situ*

fluorescente totalmente exento de formamida. Además, este procedimiento se puede utilizar para otros procedimientos de hibridación *in situ* no fluorescentes.

### Descripción breve de los dibujos

Los dibujos que se adjuntan, los cuales se incluyen en la descripción y forman parte de la misma, ilustran diversas realizaciones de la presente invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la presente invención. Los dibujos sólo tienen el objetivo de ilustrar una realización preferente de la presente invención y no se han diseñado como limitación de la presente invención. En los dibujos:

La figura 1 ilustra una primera realización de la presente invención;

La figura 2A ilustra una segunda realización de la presente invención;

La figura 2B ilustra una tercera realización de la presente invención;

La figura 3 ilustra una cuarta realización de la presente invención; y

Las figuras 4-6 ilustran gráficamente el ciclo de temperatura según la presente invención.

### Descripción de la realización preferente

#### Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención permite la detección de una copia de genes o ARN diana en células cultivadas, secciones de tejidos, tumores y sobre papel de nitrocelulosa o nailon, para su utilización junto con la tecnología de transferencia. La presente invención permite la detección de una señal en núcleos en interfase, utilizando soluciones de la sonda más diluidas que las que se proponen en la técnica anterior (Oncor, Inc.; Vysis Inc.; BDS/ Amersham, Inc.), disminuyendo, por lo tanto, el coste del procedimiento y aumentando la probabilidad de que el cribado de grandes poblaciones sea eficaz en coste. La presente invención permite que se consiga el proceso completo a diferentes temperaturas y tiempos, sin afectar de forma negativa la detección de señal y hace que el proceso completo sea más tolerante con desviaciones menores y, por lo tanto, sea aplicable al procesamiento de un elevado número de muestras. La velocidad y fiabilidad con las que se puede conseguir la FISH con la presente invención hace que sea aplicable en esos casos en los que la velocidad es fundamental, por ejemplo, en genética de preimplantación.

Las tecnologías FISH de la técnica anterior, disponibles de fuentes comerciales, tardan, como mínimo dos horas hasta más de 12 horas. Además, esos procedimientos implican diversas etapas laboriosas, la desnaturalización separada de los ácidos nucleicos diana y las sondas marcadas, procedimientos de desnaturalización e hibridación separados y la deshidratación repetida de los ácidos nucleicos diana con alcoholes graduados, etc.

Por el contrario, la presente invención implica tres etapas y resultados con una elevada sensibilidad de detección: desnaturalización; hibridación; y lavado post-hibridación. Se tarda aproximadamente un total de dos minutos en llevarse a cabo el procedimiento FISH de la presente invención. Los procedimientos FISH convencionales requieren un tiempo y temperatura precisos para los procesos de desnaturalización e hibridación. La presente invención permite variaciones en el tiempo y la temperatura con un efecto pequeño sobre el elevado grado de sensibilidad.

Los procedimientos FISH convencionales requieren la utilización de una lente objetivo 100x con inmersión en aceite para la enumeración adecuada de las señales. En la presente invención, debido a la composición óptima de las soluciones de desnaturalización-hibridación y las condiciones óptimas de desnaturalización-hibridación (temperatura y tiempo), las señales de fluorescencia se vuelven muy intensas.

Habitualmente, durante el proceso FISH se utiliza SSC (citrato sódico salino). Con el SSC, el pH se debe ajustar a 7,0 aproximadamente. La preparación del SSC es un proceso que requiere mucho tiempo. Aunque con la presente invención se puede utilizar el SSC en lugar de la solución salina, en la presente invención el SSC se puede sustituir completamente por solución salina. No existe la necesidad de ajustar el pH de la solución salina para los lavados post-hibridación, reduciendo y simplificando, por lo tanto, el procedimiento FISH.

La solución según la presente invención se conoce como solución G, que comprende una mezcla exenta de formamida con el 10%  $\pm$  2% en peso de sulfato de dextrano y el 15%-25% (preferentemente el 20%) en peso de glicerol y el 0,9% en peso de NaCl, KCl u otra sal. Una solución sólo con el 10%-20% de sulfato de dextrano o el 20-50% de solución de glicerol, mezclada con las sondas marcadas de ácidos nucleicos, no dará como resultado una hibridación eficaz. Sin embargo, la combinación de glicerol y sulfato de dextrano potencia de forma remarcable la hibridación.

También se describe una solución conocida como solución F, que comprende el 10%  $\pm$  2% en peso de sulfato de dextrano, el 10-30% (preferentemente el 20%) en volumen de formamida y el 0,9% en peso de NaCl, KCl u otra sal. La formamida sólo es eficaz para la hibridación junto con el sulfato de dextrano. En la hibridación *in situ* fluorescente se pueden utilizar concentraciones de formamida inferiores al 15% o superiores al 25%, pero la utilización de estas concentraciones de formamida requiere diferentes ajustes de temperatura de desnaturalización, diferentes tiempos de

## ES 2 319 135 T3

desnaturalización. Por lo tanto, la concentración de formamida preferente es el  $20\% \pm 5\%$  en volumen. Además, una concentración superior de formamida (por encima del 35%) provoca la destrucción estructural de la morfología celular y nuclear.

### 5 *Método 1 de Lámina Portaobjetos-Lámina portaobjetos recubierta con ADN*

Con esta realización de la presente invención, se recubre un área delimitada de una lámina portaobjetos de vidrio con una sonda de ADN seleccionada. Se utilizan láminas portaobjetos con áreas delimitadas, por ejemplo, uno o varios anillos. Se recubre una o varias áreas delimitadas sobre la lámina portaobjetos con sondas específicas de ADN. Esto se puede conseguir diluyendo la sonda de ADN en un tampón TE (Tris-EDTA) u otros tampones durante la aplicación sobre la lámina portaobjetos y dejándola secar. La solución de la muestra de células (ADN diana) se coloca encima de la sonda de ADN en las localizaciones delimitadas anteriormente y se deja secar.

Se coloca una capa de la solución G descrita anteriormente sobre el área delimitada anteriormente con la sonda de ADN y la muestra de células (ADN diana) secas. Se coloca un cubreobjetos por encima del área delimitada y, a continuación, las capas de sonda/muestra secas/solución sobre la lámina portaobjetos se desnaturalizan e hibridan simultáneamente. La figura 1 ilustra esta realización de la presente invención.

### 20 *Métodos 2A y 2B de Lámina Portaobjetos*

Con estas realizaciones de la presente invención, las células (ADN diana) se recubren con una sonda de ADN.

### *Método 2A de Lámina Portaobjetos-Células recubiertas con ADN*

Se utilizan láminas portaobjetos de vidrio con una o varias áreas delimitadas, es decir, uno o varios anillos. La solución de muestra de células (ADN diana) se aplica a la lámina portaobjetos dentro del área delimitada y se deja secar. La sonda de ADN en TE u otro tampón se aplica en la misma área delimitada y se deja secar. Las células se recubren y, por lo tanto, el ADN se concentra sobre las células. Se coloca una capa de la solución G descrita anteriormente por encima de las células recubiertas con sonda de ADN. Se coloca un cubreobjetos por encima del área delimitada y la muestra se desnaturaliza e hibrida simultáneamente. Esta realización de la presente invención se muestra en la figura 2A.

### *Método 2B de Lámina Portaobjetos-Células recubiertas con ADN*

Un método alternativo al método 2A de lámina portaobjetos es el siguiente: La solución de la muestra de células se centrifuga para obtener un sedimento ("pellet") de células. El fluido se decanta. Se aplica la sonda de ADN en tampón TE u otro tampón sobre el sedimento, y las células se resuspenden. La solución de la sonda de ADN y las células se aplica al área delimitada sobre la lámina portaobjetos y se deja secar.

Se coloca una capa de la solución G por encima de las células recubiertas con la sonda de ADN. Se coloca un cubreobjetos y la muestra se desnaturaliza e hibrida simultáneamente. Esta realización de la presente invención se muestra en la figura 2B.

### *Método 3 de Lámina Portaobjetos-Sonda no desnaturalizada*

Con esta realización, la sonda de ADN no se desnaturaliza. Esto tiene una importancia especial cuando se trabaja con sondas (ADN) de secuencia única, de segmento corto, de oligonucleótidos, por ejemplo, sondas LSI de Vysis, Inc.

Se utilizan láminas portaobjetos de vidrio con una o varias áreas delimitadas, por ejemplo, uno o varios anillos. La solución de muestra de células se aplica a la lámina portaobjetos dentro de un área delimitada y se deja secar. Se aplica una capa de la solución G sobre la muestra de células. Se coloca un cubreobjetos. La lámina portaobjetos con la muestra cubierta con el cubreobjetos se desnaturaliza a temperaturas y tiempos adecuados. El cubreobjetos se empuja hacia el lado y se añade la sonda de ADN en tampón TE u otro tampón, se recoloca el cubreobjetos y la muestra se hibrida. La figura 3 ilustra esta realización de la presente invención.

Con los métodos de lámina portaobjetos descritos anteriormente, después de la hibridación, se aparta el cubreobjetos y se lleva a cabo un lavado post-hibridación en dos etapas. En primer lugar, la muestra se coloca en una solución de NP-40 (nonidet® P-40) del 0,1% al 1% en NaCl al 0,15% durante un tiempo de treinta segundos hasta dos minutos a 65°C y, en segundo lugar, la muestra se coloca en una solución de NaCl al 0,15% durante un tiempo de tres minutos hasta diez minutos a 65°C.

La descripción anterior de la presente invención define las condiciones óptimas bajo las cuales se puede completar el proceso FISH entero. Se pueden utilizar otras condiciones, por ejemplo, se puede utilizar cualquier temperatura de desnaturalización y de hibridación, siempre que la temperatura no supere 110°C aproximadamente.

### 65 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

## ES 2 319 135 T3

### Ejemplo 1

*FISH realizada con soluciones F y G sobre varias muestras de células y tejidos con desnaturalización/hibridación simultánea de la muestra y las sondas*

5

#### 1) *Materiales*

Se obtuvo una mezcla de sondas de ADN marcado con Rodamina específico del cromosoma X y de ADN marcado con FITC (isotiocianato fluorescente) específico del cromosoma Y (o sondas de ADN de cromosoma Y marcado con Rodamina y de cromosoma X marcado con FITC) a partir de una fuente comercial (Oncor, Inc., Vysis, Inc., BDS/Amersham, Inc.). Las sondas se diluyeron con la solución G de desnaturalización-hibridación.

10

#### 2) *Preparación de las muestras de células y tejidos*

15 a) Se obtuvieron leucocitos de sangre periférica de la siguiente manera: Se sometió sangre acabada de extraer a donantes a una centrifugación Histopaque de rutina. Se combinaron células mononucleares y granulocitos y se lavaron una vez con PBS (solución salina tamponada de fosfato). Los sedimentos de las células lavadas se trataron con una mezcla fría de metanol/ácido acético (3:1), y se mantuvieron a -20°C hasta su utilización en FISH.

20 b) Se inmovilizaron extensiones de metafase o células en interfase de linfocitos periféricos cultivados y no cultivados sobre las láminas portaobjetos de vidrio según procedimientos citogenéticos estándares; las células tratadas con metanol/ácido acético se colocaron sobre láminas portaobjetos de vidrio. Las láminas portaobjetos se secaron al aire.

25 c) Se trataron células tratadas con paraformaldehído al 5% con una mezcla fría de metanol/ácido acético (3:1) y se mantuvieron a -20°C durante, como mínimo, 30 minutos. A continuación, las células tratadas con metanol/ácido acético se aplicaron sobre láminas portaobjetos de vidrio. Cuando las láminas portaobjetos se secaron, se aplicó proteína K (50 µg/ml) a cada frotis de células y las láminas portaobjetos se incubaron durante 10 minutos a 38°C. A continuación, las láminas portaobjetos se lavaron con un tampón Tris 0,05 M, pH 7,4 y, a continuación, se secaron al aire.

30

d) Se desparafinaron secciones fijadas con paraformaldehído de tejido embebidas en parafina según los procedimientos estándares (con xileno y alcoholes graduados). Las secciones desparafinadas se trataron con proteína K, tal como se ha descrito anteriormente. Las láminas portaobjetos se secaron al aire.

#### 3) *Desnaturalización/hibridación simultánea de muestras y sondas*

35 En la presente invención "sondas marcadas" representan ADN o ARN antisentido al cual se conjugaron covalentemente enzimas y ligandos relativamente estables a la temperatura, fluorocromos, (por ejemplo, FITC, rodamina, Rojo Texas), cromóforos, elementos quimioluminiscentes, elementos bioluminiscentes o radioisótopos. Las sondas marcadas se diluyeron con solución G o tampón TE hasta una concentración adecuada. De este modo, la "solución de sonda" representa sondas marcadas.

40 En el método 1 de lámina portaobjetos (véase figura 1) (láminas portaobjetos recubiertas con ADN), se colocan de 5 a 30 µl de solución de sonda diluida sobre la lámina portaobjetos y se deja secar. La muestra de células se coloca por encima de la sonda de ADN y se deja secar. Se coloca una capa de solución G sobre el área de células/sonda de ADN y se cubre con un cubreobjetos.

50 En el método 2A de lámina portaobjetos (véase figura 2A) (células recubiertas con ADN), se salpicaron de 5 a 30 µl de la solución de sonda diluida sobre los núcleos, o secciones de células o tejidos tratadas adecuadamente, sobre las láminas portaobjetos de vidrio y se dejaron secar. Se colocó una capa de la solución G por encima y se aplicó con cuidado un cubreobjetos para cubrir la solución.

55 En el método 2B de lámina portaobjetos (véase figura 2B), la solución de sonda diluida se añade al sedimento de células en el cual se ha decantado el fijador del sobrenadante. Las células se resuspenden y se aplican a la lámina portaobjetos y se dejan secar. Se coloca una capa de solución G por encima de la lámina portaobjetos cubierta con ADN.

60 Las láminas portaobjetos se colocan en un termociclador en el que el ADN se desnaturaliza durante aproximadamente 1 ½ minutos a 100°C y, a continuación, se hibrida reduciendo rápidamente la temperatura y haciendo variar cíclicamente la temperatura durante un tiempo de aproximadamente 1 minuto hasta una hora. Las figuras 4-6 ilustran ciclos de ejemplo.

#### 5) *Lavados post-hibridación*

65 Después de la hibridación, los cubreobjetos se apartaron de las láminas portaobjetos de vidrio y las láminas portaobjetos se sumergieron en NP-40 del 0,1% al 1% durante un tiempo desde treinta segundos hasta dos minutos y una solución de NaCl al 0,1%-0,2% durante tres minutos.

## ES 2 319 135 T3

### 6) Visualización señales de hibridación *in situ* fluorescente

Después de los lavados post-hibridación, se salpicó una pequeña cantidad de contratinte (200 ng/ml de yoduro de propidio (PI) o 20 ng/ml de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) en solución antifade) para contrateñir los núcleos. Las señales de hibridación en los núcleos se visualizaron mediante un microscopio de fluorescencia invertido Olympus.

#### Ejemplo 2

##### *Tecnología 3 de lámina portaobjetos (Sonda no desnaturalizada)*

En este ejemplo, se utilizó una sonda (ADN) de secuencia única, segmento corto, de oligonucleótidos sobre leucocitos cultivados y no cultivados, de sangre periférica de varón. El objetivo era llevar a cabo procedimientos FISH.

1) Los materiales y la preparación de la muestra de células y tejidos y la preparación de la solución G de desnaturalización/hibridación se realizó tal como se explica en el Ejemplo 1.

2) La solución de muestra de células se aplica a la lámina portaobjetos y se deja secar. Se coloca una capa de la solución G por encima de la muestra de células y se cubre con un cubreobjetos.

La muestra se desnaturaliza a 100°C durante 1 ½ minutos en el termociclador. Se detiene el termociclador y se aparta la lámina portaobjetos. El cubreobjetos se empuja hacia el lado y se añade la sonda de ADN en tampón TE. El cubreobjetos se reaplica y la muestra se coloca en el termociclador y se hibrida con ciclos de temperatura.

3) Se lleva a cabo un lavado post-hibridación, tal como se explica en el Ejemplo 1.

#### Ejemplo 3

##### *FISH de ADN en secciones de tejido fijadas embebidas en parafina utilizando sondas de ADN marcadas directamente fluorescentes y marcadas indirectamente*

En este ejemplo, se desparafinaron y deshidrataron secciones de tejido embebidas en parafina.

Para la FISH, las secciones de tejido (ADN diana) se trataron tal como se explica en el Ejemplo 1, método de lámina portaobjetos 2A.

#### Ejemplo 4

##### *FISH de ADN en células mononucleares de sangre Periférica (PBMC) y células polimorfonucleares (PMN) utilizando diferentes fijadores y sondas de ADN marcadas directamente fluorescentes y marcadas indirectamente*

En este ejemplo se utilizaron diferentes fijadores con las sondas de ADN marcadas directamente fluorescentes y marcadas indirectamente. El objetivo era demostrar la versatilidad de la presente invención con diferentes fijadores. Se extrajo sangre periférica en un tubo anticoagulante y las PBMC y las PMN se separaron, tal como se escribe en la técnica anterior y se fijaron en diversos fijadores: 1) Fijador Metanol:Ácido acético glacial (MeOH:Hac) 3:1 durante un mínimo de 30 minutos a -20°C; 2) paraformaldehído al 4% durante un tiempo desde 30 minutos hasta 3 horas y, a continuación, se aplicó a láminas portaobjetos que se secaron al aire para el procesamiento; y 3) Metanol durante un mínimo de 30 minutos a -20°C.

Los métodos de fijación fueron los siguientes:

(1) El método de fijación MeOH:Hac 3:1 se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

(2) En el método de fijación con paraformaldehído, las células fijadas con paraformaldehído sobre láminas portaobjetos secadas al aire se trataron con proteinasa K a 2,5 µg/ml hasta 10 µg/ml y se digirieron durante 30 minutos hasta 1 1/2 horas a 37°C y se lavaron 3 veces en PBS.

(3) En el método de fijación con metanol, las células de la muestra se agitaron en un agitador vórtex a velocidad elevada y se añadió metanol a -20°C, varias gotas a la vez hasta un total de 8 ml; a continuación las muestras se colocaron en un congelador a -20°C durante un mínimo de 30 minutos.

Después de cada uno de los métodos de fijación descrito anteriormente, las muestras se procesaron mediante los métodos óptimos descritos anteriormente en la presente invención (véase Ejemplo 1). Las láminas portaobjetos se visualizaron con un filtro de paso de banda triple con rojo Texas en un microscopio fluorescente; las señales se observaron con un objetivo seco 40X en los núcleos en interfase.

## ES 2 319 135 T3

### Ejemplo 5

*FISH en células fetales a partir de la circulación de sangre periférica materna fijadas en MeOH:Hac 3:1 utilizando sondas de ADN marcadas directamente fluorescentes y marcadas indirectamente*

5

Se extrajo sangre periférica materna en un tubo anticoagulante y se separaron las células fetales, tal como se describe en la técnica anterior y se fijaron en fijador MeOH:Hac 3:1 durante un mínimo de 30 minutos a -20°C. Las muestras se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos y se aplicaron 10  $\mu$ l de muestra a cada lámina portaobjetos hasta que se alcanzó una densidad de células suficiente para el análisis.

10

Las muestras se procesaron mediante los métodos óptimos descritos anteriormente (Ejemplos 1,2 y 3) La lámina portaobjetos se visualizó con un filtro de paso de banda triple rojo Texas sobre un microscopio epifluorescente.

### Ejemplo 6

15

*FISH en esperma y Amniocitos no cultivados fijados en MeOH:Hac 3:1 utilizando sondas de ADN marcadas directamente fluorescentes y marcadas indirectamente*

La preparación del esperma y de los amniocitos no cultivados para FISH fue idéntica.

20

La preparación del esperma y de los amniocitos no cultivados para FISH fue idéntica. Se colocaron alícuotas de esperma o de amniocitos en tubos de centrifuga de 15 ml. Se añadió Ditiotreitól (DTT) 2 mM que contenía PBS al esperma o a los amniocitos en una concentración de 10 hasta 20 x 10<sup>6</sup> por ml durante 6,5 minutos a temperatura ambiente para descondensar la cromatina. A continuación, las muestras se centrifugaron a 160 g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 8 ml de MeOH:Hac 3:1 a -20°C y la muestra se agitó en un agitador vórtex. Las muestras se fijaron a -20°C con MeOH:Hac 3:1 durante un mínimo de 30 minutos. El tiempo preferente de fijación es durante la noche a -20°C. Después de esta fijación, las muestras de esperma o de amniocitos se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se eliminó. Las muestras se resuspendieron en un volumen adecuado de MeOH:Hac 3:1; y se colocaron 10  $\mu$ l de muestra suspendida en fijadores sobre cada lámina portaobjetos (círculo de 12 mm) asegurando una distribución igual. Las láminas portaobjetos se secaron al aire durante un mínimo de 5 minutos.

25

30

Las muestras se procesaron mediante el método preferente descrito anteriormente (véase Ejemplo 1). Las muestras se visualizaron y se contaron utilizando un microscopio de fluorescencia con un filtro de paso de banda triple rojo Texas con lente seca 60X.

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 319 135 T3

## REIVINDICACIONES

1. Método de hibridación *in situ* que comprende las etapas de:

- a) facilitar una lámina portaobjetos que comprende un anillo elevado sobre la misma;
- b) facilitar a la lámina portaobjetos una sonda de ácido nucleico;
- c) facilitar a la lámina portaobjetos un ácido nucleico diana;
- d) facilitar a la lámina portaobjetos una solución de hibridación que comprende: una mezcla exenta de formamida del 10%  $\pm$  2% en peso de sulfato de dextrano y el 15%-25% en peso de glicerol y el 0,9% en peso de sal;
- e) colocar un cubreobjetos sobre el anillo;
- f) poner la lámina portaobjetos bajo condiciones de desnaturalización;
- g) poner la lámina portaobjetos bajo condiciones de hibridación; y
- h) llevar a cabo un lavado post-hibridación de la lámina portaobjetos.

2. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de facilitar una sonda de ácido nucleico comprende adicionalmente recubrir la lámina portaobjetos con la sonda para formar una primera capa, la etapa de facilitar un ácido nucleico diana comprende adicionalmente colocar una capa del ácido nucleico diana por encima del recubrimiento de la sonda para formar una segunda capa, y la etapa de facilitar una solución comprende adicionalmente colocar una capa de la solución por encima de la primera capa del recubrimiento de la sonda y la segunda capa de ácido nucleico diana.

3. Método, según la reivindicación 2, en el que las etapas de desnaturalización e hibridación se llevan a cabo sobre la sonda y la muestra simultáneamente.

4. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa (c) se lleva a cabo antes de la etapa (b) y comprende adicionalmente aplicar el ácido nucleico diana a la lámina portaobjetos para formar una capa, la etapa (b) comprende adicionalmente recubrir la primera capa de ácido nucleico diana con la sonda para concentrar la sonda de ácido nucleico sobre el ácido nucleico diana, y la etapa de facilitar una solución comprende adicionalmente colocar una capa de la solución por encima del ácido nucleico diana recubierto con la sonda.

5. Método, según la reivindicación 4, en el que las etapas de desnaturalización e hibridación se llevan a cabo sobre la sonda y la muestra simultáneamente.

6. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa (c) se lleva a cabo antes de la etapa (b) y comprende adicionalmente facilitar un ácido nucleico diana en solución, centrifugar la solución que contiene el ácido nucleico diana para obtener un sedimento del ácido nucleico, y decantar la solución;

la etapa (b) comprende adicionalmente aplicar la sonda de ácido nucleico al ácido nucleico diana sedimentado para formar un recubrimiento, resuspender el ácido nucleico diana recubierto con la sonda en una primera solución, y aplicar la primera solución a la lámina portaobjetos para formar una primera capa; y

la etapa de facilitar una solución comprende adicionalmente facilitar una segunda solución y colocar una capa de la segunda solución por encima del ácido nucleico diana recubierto con la sonda para formar una segunda capa.

7. Método, según la reivindicación 6, en el que las etapas de desnaturalización e hibridación se llevan a cabo sobre la sonda y la muestra simultáneamente.

8. Método, según la reivindicación 1, en el que

la etapa (c) se lleva a cabo antes de la etapa (b) y comprende adicionalmente facilitar un ácido nucleico diana en solución a la lámina portaobjetos y dejar que el ácido nucleico diana aplicado se seque sobre la lámina portaobjetos,

la etapa (d) se lleva a cabo antes de la etapa (b) y comprende adicionalmente aplicar la solución como una capa por encima del ácido nucleico diana sobre la lámina portaobjetos,

las etapas (e) y (f) se llevan a cabo antes de la etapa (b), y la etapa de facilitar una sonda de ácido nucleico comprende adicionalmente empujar hacia un lado el cubreobjetos, aplicar la sonda de ácido nucleico al ácido nucleico diana desnaturalizado y a la solución, y volver a colocar el cubreobjetos.

## ES 2 319 135 T3

9. Método, según la reivindicación 1, en el que dicha solución comprende adicionalmente dietilpirocarbonato.

10. Método, según la reivindicación 1, en el que las etapas (a) hasta la (h) se llevan a cabo en dos minutos o menos.

5 11. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de facilitar una sonda comprende adicionalmente diluir la sonda antes de la aplicación.

12. Método, según la reivindicación 11, en el que la etapa de diluir la sonda comprende adicionalmente diluir la sonda con un tampón.

10 13. Método, según la reivindicación 12, en el que el tampón comprende tampón Tris-EDTA.

14. Método, según la reivindicación 1, en el que la sal se selecciona del grupo que comprende NaCl, KCl y citrato sódico salino.

15 15. Método, según la reivindicación 1, en el que las etapas de desnaturalización e hibridación se llevan a cabo sobre la sonda y la muestra simultáneamente.

20 16. Método, según la reivindicación 1, en el que las etapas de desnaturalización e hibridación se realizan en 5 minutos o menos.

17. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de desnaturalización se realiza en un tiempo de aproximadamente 1 minuto hasta 2 minutos.

25 18. Método, según la reivindicación 17, en el que la etapa de desnaturalización se realiza a una temperatura entre aproximadamente 95°C y 105°C.

19. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de llevar a cabo un lavado post-hibridación se realiza en un tiempo de aproximadamente 5 minutos hasta 10 minutos.

30 20. Método, según la reivindicación 19, en el que la etapa de llevar a cabo un lavado post-hibridación se realiza a una temperatura entre aproximadamente 55°C y 65°C.

35 21. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de llevar a cabo un lavado post-hibridación comprende adicionalmente las etapas de:

apartar el cubreobjetos

40 lavar la lámina portaobjetos en una primera solución que comprende una sal; y

lavar la lámina portaobjetos en una segunda solución que comprende una sal.

45 22. Método, según la reivindicación 21, en el que la primera solución comprende adicionalmente NaCl y noniodet® P-40.

23. Método, según la reivindicación 22, en el que la primera solución comprende adicionalmente NaCl al 0,15% y noniodet® P-40 al 0,1-1%.

50 24. Método, según la reivindicación 21, en el que la etapa de lavar en la primera solución se realiza durante un tiempo entre 30 segundos y 2 minutos.

25. Método, según la reivindicación 24, en el que la etapa de lavar en la primera solución se realiza a una temperatura de 65°C.

55 26. Método, según la reivindicación 21, en el que la segunda solución comprende adicionalmente NaCl.

27. Método, según la reivindicación 26, en el que la segunda solución comprende adicionalmente NaCl al 0,1-0,2%.

60 28. Método, según la reivindicación 21, en el que la etapa de lavar en una segunda solución se realiza durante 3-10 minutos.

29. Método, según la reivindicación 28, en el que la etapa de lavar la segunda solución se realiza a una temperatura de 65°C.

65 30. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de desnaturalización se realiza en un termociclador durante 1,5 minutos a 100°C.

## ES 2 319 135 T3

31. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de hibridación se realiza en un termociclador y comprende adicionalmente las etapas de reducir rápidamente la temperatura después de la etapa de desnaturalización y variar cíclicamente la temperatura hasta que la hibridación se completa.

5 32. Método, según la reivindicación 31, en el que la etapa de variar cíclicamente la temperatura se realiza durante un tiempo entre aproximadamente 1 minuto y 1 hora.

33. Método, según la reivindicación 1, en el que las etapas de desnaturalización e hibridación se realizan a una temperatura que no supera 110°C aproximadamente.

10 34. Método, según la reivindicación 1, en el que las etapas de desnaturalización e hibridación tienen lugar en ausencia de una etapa de facilitar un fijador a la lámina portaobjetos.

15 35. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de colocar un cubreobjetos sobre el anillo tiene lugar en ausencia de la etapa de facilitar un sellador para el cubreobjetos sobre la lámina portaobjetos.

36. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de llevar a cabo un lavado post-hibridación comprende lavar en ausencia de formamida.

20 37. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de hibridación se realiza bajo un descenso controlado de temperatura desde la temperatura de desnaturalización hasta temperatura ambiente.

38. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de hibridación se realiza bajo un descenso no controlado de temperatura desde la temperatura de desnaturalización hasta temperatura ambiente.

25 39. Método, según la reivindicación 1, en el que los ácidos nucleicos se detectan en los núcleos o citoplasma de tejido fijado embebido en parafina, secciones de tejido congeladas, células cultivadas o no cultivadas y sobre papel de nitrocelulosa o nailon.

30 40. Método de hibridación *in situ* que comprende las etapas de:

a) facilitar una lámina portaobjetos que comprende un anillo elevado sobre la misma;

35 b) facilitar a la lámina portaobjetos una sonda de ácido nucleico;

c) facilitar a la lámina portaobjetos un ácido nucleico diana;

40 d) facilitar a la lámina portaobjetos una solución de hibridación que comprende: una mezcla exenta de formamida del 10% ± 2% en peso de sulfato de dextrano y el 15%-25% en peso de glicerol y el 0,9% en peso de sal;

e) colocar un cubreobjetos sobre el anillo;

f) poner la lámina portaobjetos bajo condiciones de desnaturalización a una temperatura entre 95°C y 105°C;

45 g) poner la lámina portaobjetos bajo condiciones de hibridación a una temperatura entre 45°C y 60°C; y

h) llevar a cabo un lavado post-hibridación de la lámina portaobjetos.

en el que desnaturalización, hibridación y post-hibridación se completan en 15 minutos.

50 41. Método, según la reivindicación 40, en el que la solución comprende adicionalmente dietilpirocarbonato.

42. Método, según la reivindicación 40, en el que la sal se selecciona del grupo que comprende NaCl, KCl y citrato sódico salino.

55 43. Método, según la reivindicación 40, en el que las etapas de desnaturalización e hibridación tienen lugar en ausencia de una etapa de facilitar un fijador a la lámina portaobjetos.

60 44. Método, según la reivindicación 40, en el que la etapa de colocar un cubreobjetos sobre el anillo tiene lugar sin facilitar un sellador para el cubreobjetos sobre la lámina portaobjetos.

45. Método, según la reivindicación 40, en el que la etapa de post-hibridación comprende lavar en ausencia de formamida.

65 46. Método de hibridación *in situ* para detectar ARNm, comprendiendo el método las etapas de:

a) facilitar una lámina portaobjetos que comprende un anillo elevado sobre la misma;

## ES 2 319 135 T3

- b) facilitar a la lámina portaobjetos una sonda de ácido nucleico;
- c) facilitar a la lámina portaobjetos un ácido nucleico diana;
- 5 d) facilitar a la lámina portaobjetos una solución de hibridación que comprende: una mezcla exenta de formamida del 10% ± 2% en peso de sulfato de dextrano y el 15%-25% en peso de glicerol y el 0,9% en peso de sal;
- e) colocar un cubreobjetos sobre el anillo;
- 10 f) prehibridar la sonda y la muestra poniendo la lámina portaobjetos a una temperatura entre 37°C y 55°C;
- g) desnaturalizar la sonda y la muestra poniendo la lámina portaobjetos a una temperatura entre 95°C y 105°C;
- 15 h) hibridar la sonda y la muestra poniendo la lámina portaobjetos 5 minutos o menos a una temperatura entre 45°C y 85°C; y
- i) llevar a cabo un lavado post-hibridación de la lámina portaobjetos, en el que la desnaturalización, hibridación y post-hibridación se completan en 15 minutos.
- 20 47. Método de lámina portaobjetos para hibridación *in situ* para detectar ARNm, comprendiendo el método las etapas de:
- a) facilitar una lámina portaobjetos que comprende un anillo elevado sobre la misma;
- 25 b) facilitar a la lámina portaobjetos una sonda de ácido nucleico;
- c) facilitar a la lámina portaobjetos un ácido nucleico diana;
- 30 d) facilitar a la lámina portaobjetos una solución de hibridación que comprende: una mezcla exenta de formamida del 10%±2% en peso de sulfato de dextrano y el 15%-25% en peso de glicerol y el 0,9% en peso de sal;
- e) colocar un cubreobjetos sobre el anillo;
- 35 f) poner la lámina portaobjetos bajo condiciones de prehibridación durante 5 minutos o menos; y
- g) poner la lámina portaobjetos bajo condiciones de hibridación; y
- 40 h) poner la lámina portaobjetos bajo condiciones de post-hibridación;
- en el que las etapas de prehibridación, hibridación y post-hibridación se completan en 24 horas.
48. Método, según la reivindicación 47, para detectar ARNm en los núcleos o en tejido fijado embebido en parafina.
- 45 49. Método, según la reivindicación 47, en el que el ARNm proviene de los núcleos de células cultivadas o no cultivadas.
- 50 50. Método, según la reivindicación 47, de preparación de una hibridación *in situ* fluorescente para detectar ARNm, comprendiendo el método las etapas de:
- a) facilitar una lámina portaobjetos que comprende un anillo elevado sobre la misma;
- b) facilitar a la lámina portaobjetos una sonda de ácido nucleico;
- 55 c) facilitar a la lámina portaobjetos un ácido nucleico diana;
- d) facilitar a la lámina portaobjetos una solución de hibridación que comprende: una mezcla exenta de formamida del 10% ± 2% en peso de sulfato de dextrano y el 15%-25% en peso de glicerol y el 0,9% en peso de sal;
- 60 e) colocar un cubreobjetos sobre el anillo;
- f) prehibridación a una temperatura entre 37°C y 55°C;
- g) hibridación en 5 minutos o menos a una temperatura entre 45°C y 85°C; y
- 65 h) post-hibridación,
- en el que las etapas de prehibridación, hibridación y post-hibridación se completan en 24 horas.

## ES 2 319 135 T3

51. Método, según la reivindicación 50, en el que se detecta ARNm en los núcleos o citoplasma de, como mínimo, un elemento seleccionado del grupo que comprende tejido fijado embebido en parafina, secciones de tejido congelado, células cultivadas y células no cultivadas.

5 52. Método, según la reivindicación 50, en el que se detecta ARNm en, como mínimo, un medio seleccionado del grupo que comprende papel de nitrocelulosa y papel de nailon.

10 53. Método, según la reivindicación 50, en el que se detecta ARNm en los núcleos o citoplasma de, como mínimo, un elemento seleccionado del grupo que comprende tejido fijado embebido en parafina, secciones de tejido congelado, células cultivadas y células no cultivadas, y en, como mínimo, un medio seleccionado del grupo que comprende papel de nitrocelulosa y papel de nailon.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

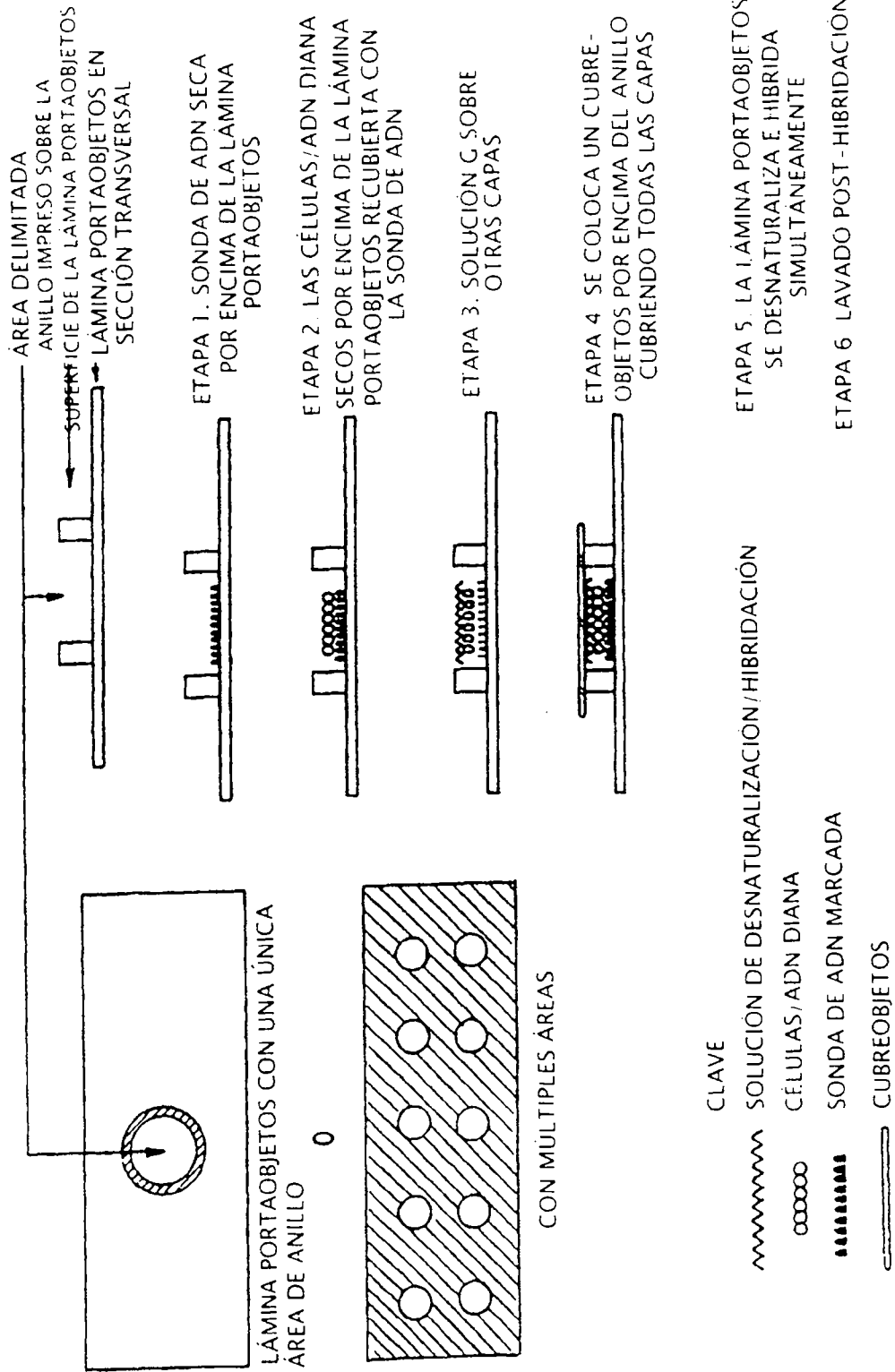
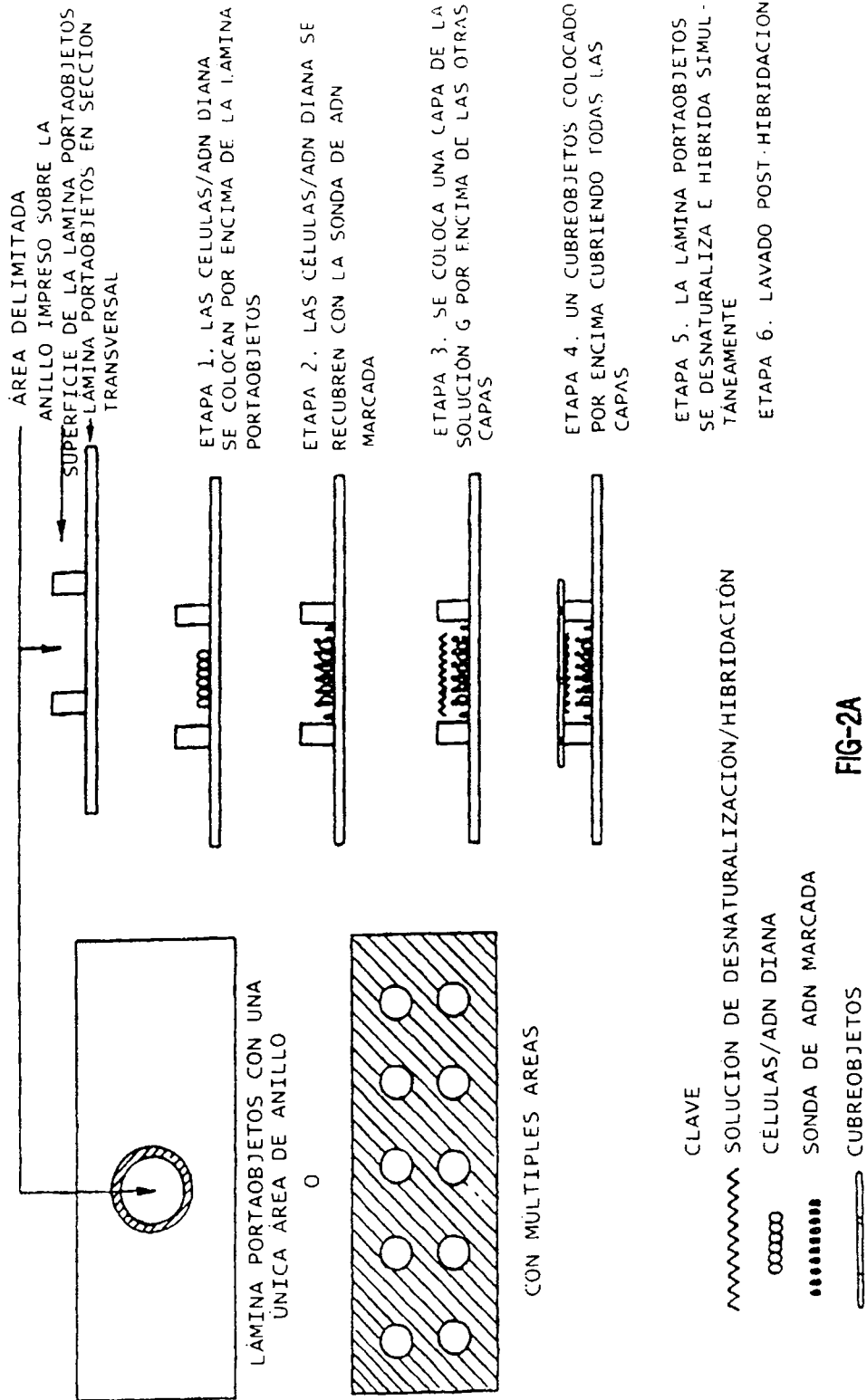


FIG-1



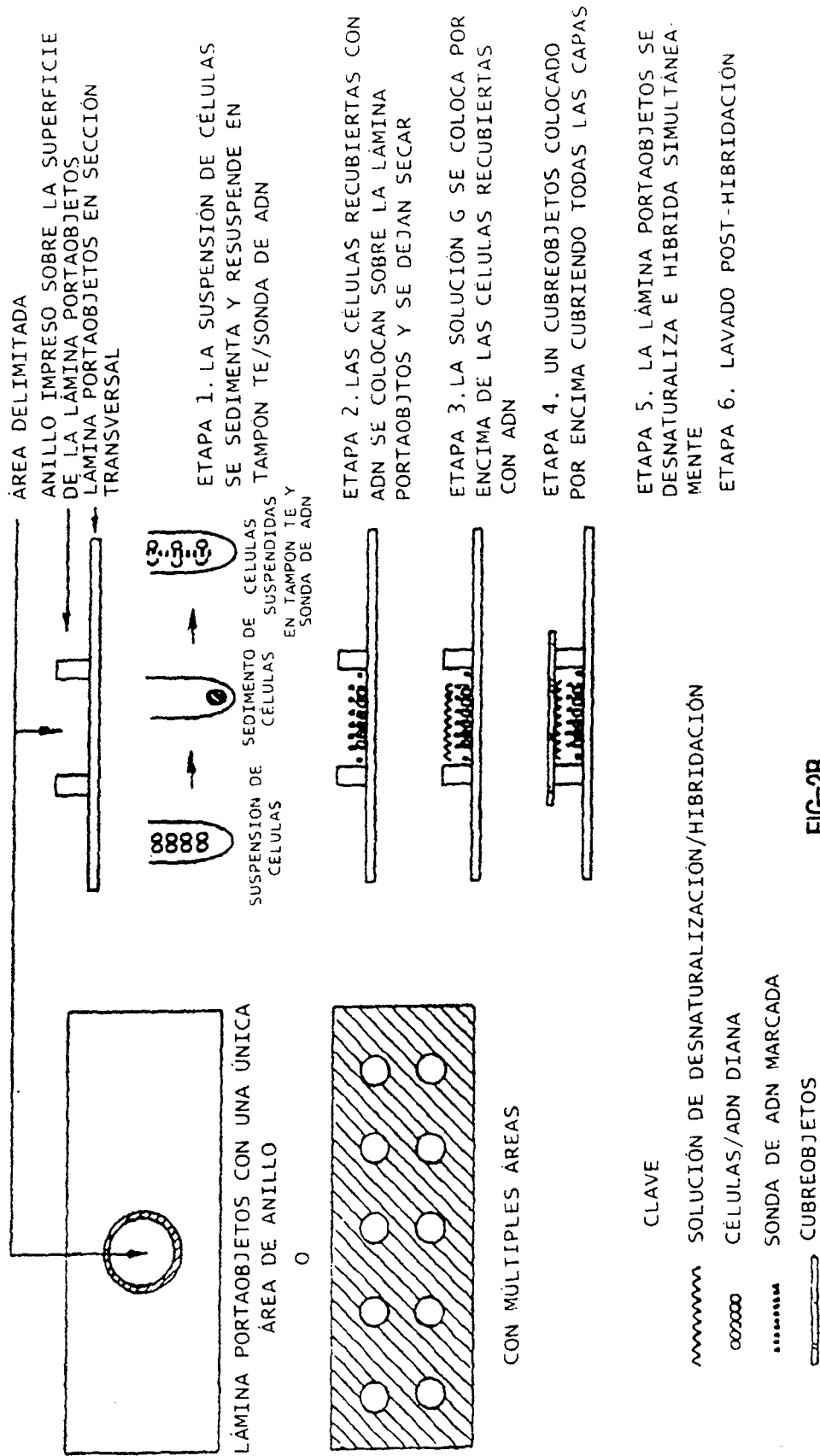


FIG-2B

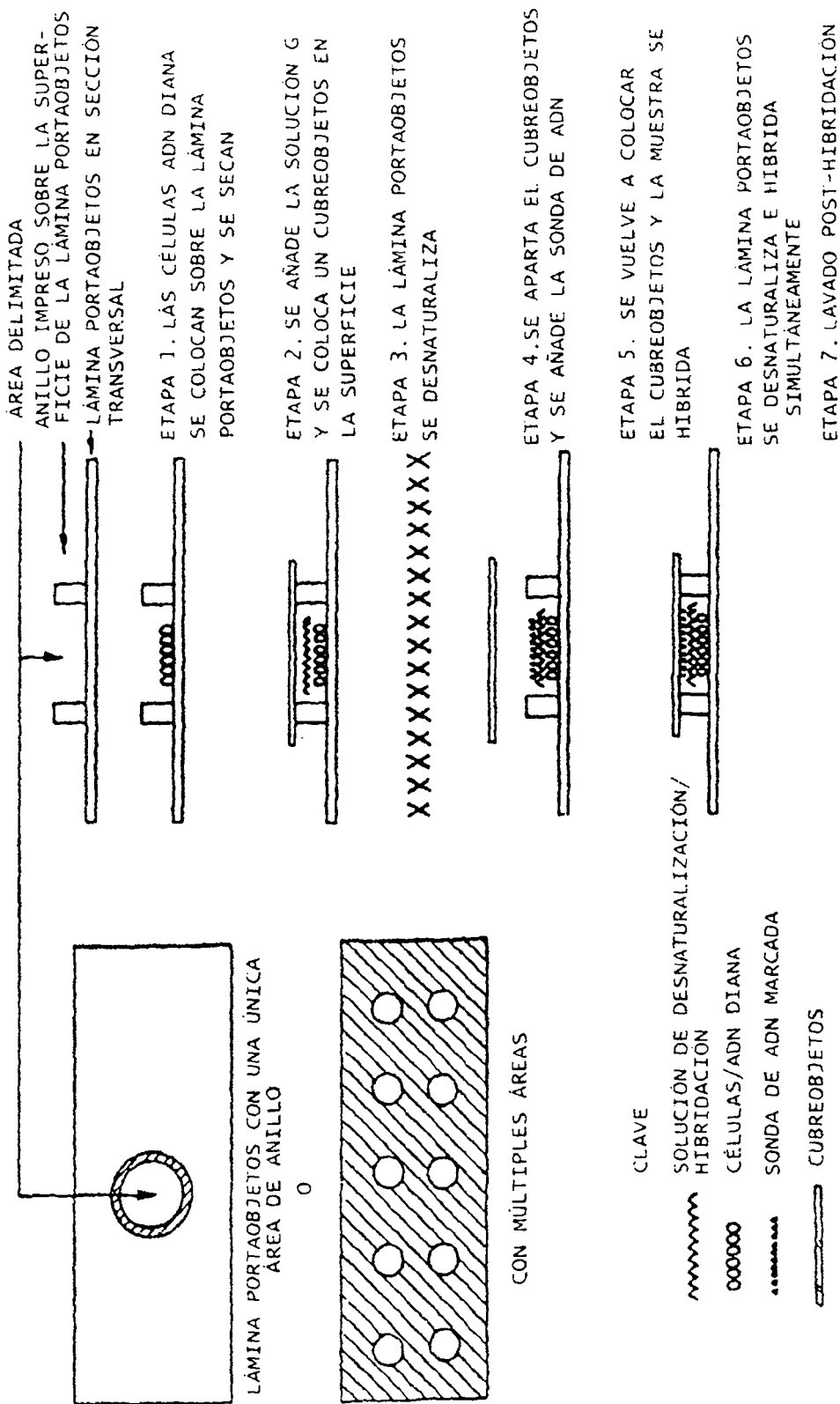


FIG-3

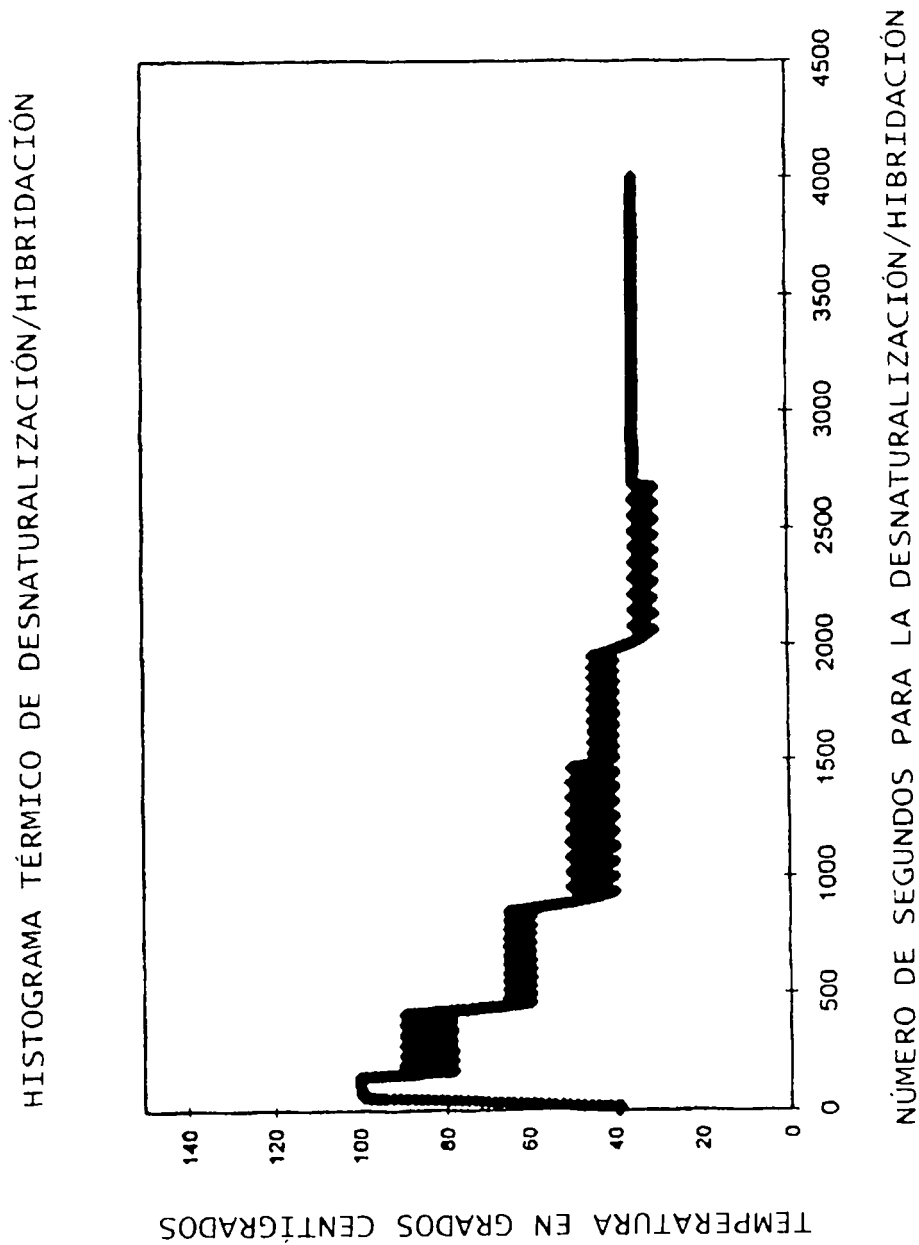


Fig. 4

HISTOGRAMA TÉRMICO DE DESNATURALIZACIÓN/HIBRIDACIÓN

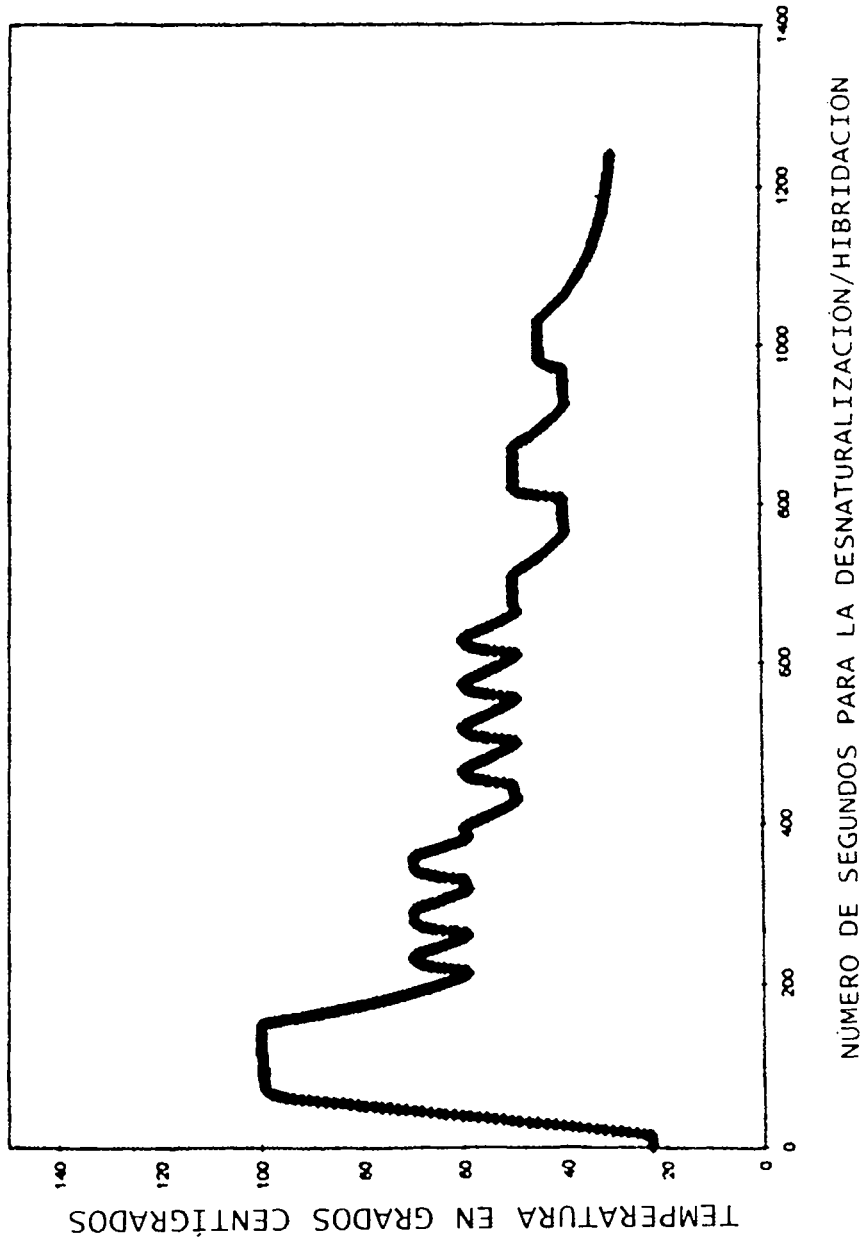
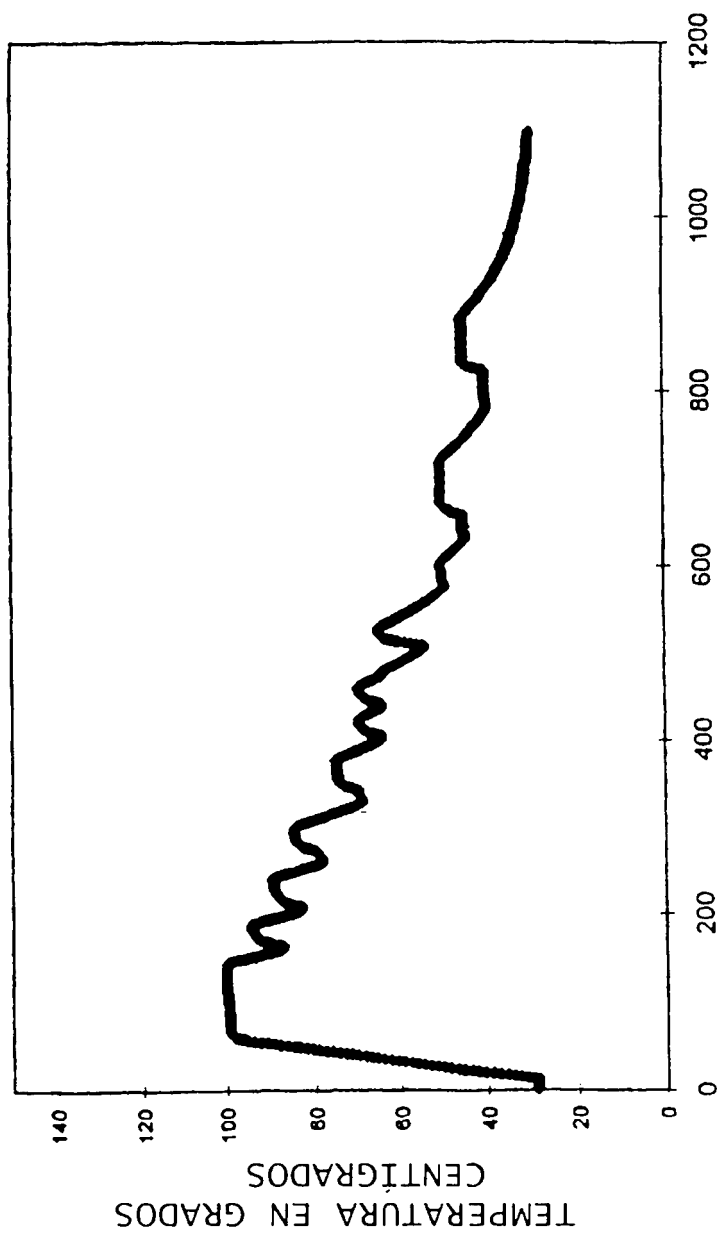


Fig. 5

HISTOGRAMA TÉRMICO DE DESNATURALIZACIÓN/HIBRIDACIÓN



NÚMERO DE SEGUNDOS PARA LA DESNATURALIZACIÓN E HIBRIDACIÓN

Fig 6