



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 332 757**

② Número de solicitud: 200702783

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **18.10.2007**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **11.02.2010**

Fecha de la concesión: **28.09.2010**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **14.10.2010**

⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:
14.10.2010

⑦ Titular/es: **Universidade da Coruña
O.T.R.I.-Campus de Elviña, s/n
15071 A Coruña, ES**

⑦ Inventor/es: **Méndez Felpeto, Josefina;
Fernández Tajés, Juan y
García Gil, José Baldomero**

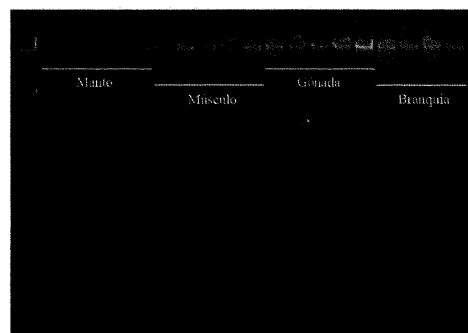
⑦ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

⑤ Título: **Método de extracción de ADN de alta calidad en tejidos de moluscos bivalvos.**

⑤ Resumen:

Método de extracción de ADN de alta calidad en tejidos de moluscos bivalvos. El aislamiento y purificación de ADN es el requisito previo para la realización de las técnicas moleculares. A pesar de los numerosos kits comerciales y protocolos existentes en la literatura, no existe un método de extracción de ADN específico para tejidos procedentes de moluscos. El presente método permite la purificación rápida y económica de ADN genómico a partir de distintos tejidos de moluscos bivalvos: manto, músculo, gónada y branquia. La presente metodología permite la extracción de ADN a partir de productos frescos, congelados, preservados en etanol y manufacturados (en el caso de productos en conserva, el ADN obtenido puede ser empleado para realizar PCR de una manera directa).

Figura 1



ES 2 332 757 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método de extracción de ADN de alta calidad en tejidos de moluscos bivalvos.

5 Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un único método de extracción universal de ADN de alta calidad en moluscos bivalvos a partir de cualquiera de estos tipos de tejido: manto, músculo, gónada y branquia.

10 Antecedentes de la invención

Los kits de extracción de ADN genómico de alta calidad, para la amplificación por PCR más utilizados y de mayor calidad entre los existentes en el mercado (DNA extraction kit (Fermentas), ChargeSwitch qDNA microtissue kit (Invitrogen), DNeasy blood & Tissue kit (Qiagen), etc) son específicos para la extracción de ADN de alta calidad a partir de tejidos procedentes de moluscos bivalvos y normalmente sólo pueden utilizarse a partir de un tipo de tejido. El método que se presenta puede utilizarse para extraer cualquier ADN genómico bicatenario a partir de los siguientes tipos de tejido procedentes de muestras de bivalvos: manto, músculo, gónada y branquia. La mayor parte de los métodos existentes en el mercado emplean matrices compuestas de resinas especiales que retienen el ADN y algunos emplean productos químicos para la obtención del ADN que son tóxicos. Si nos ceñimos a los métodos de extracción de ADN que son utilizados en la inmensa mayoría de los laboratorios de investigación de las Universidades españolas éstos requieren el uso de compuestos tóxicos como el beta mercaptoetanol para conformar el buffer de lisis y una sucesión de lavados con compuestos como el fenol y el cloroformo, que también son perjudiciales para la salud, para la eliminación de restos celulares y proteínas. Las ventajas del método descrito en esta patente respecto a los utilizados tradicionalmente se basan en que los tampones utilizados no contienen ningún componente tóxico y pueden ser manejados sin medidas de seguridad adicionales. Además, el tiempo necesario para realizar una extracción de ADN a partir de tejido de moluscos bivalvos requería dos días; en nuestro caso, el tiempo se reduce a 5 horas. En la literatura científica también existen métodos que no requieren compuestos tóxicos y que su tiempo de realización es bastante inferior a dos días, sin embargo estos métodos de extracción utilizan el compuesto Chelex que posee un elevado precio y requiere incubaciones a temperaturas elevadas.

El método descrito en esta patente es uno de los más rápidos existentes en la actualidad. No requiere de reactivos tóxicos ni de equipamiento especial por lo que resulta aplicable en cualquier laboratorio bajo cualquier condición, además el precio de la fabricación de los tampones necesarios es bastante bajo lo que se convierte en una ventaja en aquellos laboratorios que posean un presupuesto no muy elevado. A pesar de que el método que se describe en esta memoria presenta posibilidades de comercializarse como kit comercial, la elaboración de una manera rápida y sencilla de los tampones necesarios para aislar el ADN, hace posible que sea manufacturado totalmente por la persona encargada de realizar la extracción sin repercutir en la rapidez ni en la complejidad del proceso total. La presente metodología puede ser empleada por cualquier individuo, independientemente de sus conocimientos y experiencia, lo que la hace apta incluso para personal no cualificado.

En el caso de que el tejido para la obtención de ADN sea material congelado o preservado en alcohol, el rendimiento en la cantidad y la calidad del ADN obtenido no se ven afectados independientemente de la antigüedad del material, algo que sí afecta al rendimiento si aplicamos los otros métodos existentes.

El ADN obtenido es estable a 4°C por períodos largos de tiempo (hasta 2 años) y congelado a -20°C por más tiempo (más de 3 años).

El objeto de la metodología propuesta consiste en resolver el vacío que existía en los métodos de extracción de ADN específicos de moluscos bivalvos de una manera rápida y sencilla sin necesidad de emplear equipamiento especial ni productos tóxicos.

Descripción de la invención

La presente invención tiene como objeto la purificación rápida y económica de ADN genómico de alta calidad a partir de muestras de tejido procedentes de moluscos bivalvos (a partir de muestras de manto, músculo, gónada y branquia).

El método consiste en los siguientes pasos: lisis de la muestra (aproximadamente 20 mg de tejido) durante 1 hora y media mediante su incubación en el tampón de lisis a una temperatura de 65°C, adición del tampón de precipitación, incubación en hielo durante 15 minutos, y centrifugación durante 10 minutos. Precipitación del ADN con isopropanol, centrifugación 10 minutos, lavado del precipitado y resuspensión del ADN en agua. Es un método rápido y eficaz y es específico para la extracción de ADN a partir de distintos tejidos de moluscos bivalvos. No requiere de reactivos tóxicos ni de equipamiento especial por lo que resulta aplicable en cualquier laboratorio. El paso de desproteización (mediante el empleo de la proteinasa K) es opcional por lo que en el caso de no contar con esa enzima se puede obtener de igual forma un ADN de alta calidad.

El ADN obtenido es estable a 4°C por lo menos durante 1 año y congelado a -20°C por más de 3 años.

ES 2 332 757 B1

El método es aplicable en distintos tejidos de moluscos bivalvos y se puede obtener ADN de alta calidad a partir de material fresco, congelado o procesado lo que lo convierte en un método idóneo a la hora de obtener material genético en laboratorios que analizan productos alimenticios para cumplir con la normativa europea de etiquetado de productos procedentes de la pesca y la acuicultura.

5

También es aplicable a la hora de obtener ADN genómico de calidad en cantidad suficiente para análisis de PCR con fines de investigación básica.

Así pues, la presente invención se refiere a:

10

Un método de extracción de ADN genómico de moluscos bivalvos, que comprende la lisis de la muestra con lauril sarcosin sódico como principal compuesto activo del tampón de lisis y una etapa de precipitación con acetato amónico 5 molar como tampón de precipitación. En dicho método no se emplean resinas que retienen el ADN ni compuestos tóxicos como el beta-mercaptoetanol, fenol y cloroformo.

15

La muestra utilizada en dicho método es una muestra fresca, conservada en alcohol o congelada y es obtenida a partir del manto, músculo, gónada y/o branquia del molusco bivalvo.

El ADN genómico extraído y conservado en solución acuosa es de peso molecular elevado.

20

Descripción de la figura

Para contemplar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, se acompaña a la presente memoria descriptiva, como parte integral de la misma, una figura, en la que, con carácter ilustrativo y no limitativo, se representa una muestra de ADN genómico extraído a partir de los siguientes tejidos: manto, músculo, gónada y branquia.

25

Descripción detallada de una forma de realización preferida

Se toman aproximadamente 20 mg de tejido (en el caso material congelado hay que dejar que se descongele) y se introducen en un tubo con 400 μ L de tampón de lisis y se incuban entre 1 hora y 4 horas (en este paso opcionalmente se puede añadir proteinasa K si se desea aumentar el rendimiento de la extracción). A continuación se añaden 400 μ L de tampón de precipitación, se agita vigorosamente durante 20 segundos y se introducen los tubos en hielo durante 10 min. A continuación se centrifugan 10 a 13000 g. Una vez centrifugados se recupera el sobrenadante por decantación y se le añaden 400 μ L de isopropanol frío o etanol al 100%. Se mezclan los tubos por inmersión y se centrifugan a 13000 g durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante y el precipitado se lava con etanol de 70° invirtiendo el tubo varias veces para seguidamente centrifugar otros 5 minutos a 13000 g. Finalmente se retira el sobrenadante y se deja secar al aire.

30

35

Una vez que el precipitado está seco se resuspende en un volumen adecuado de agua bidestilada.

40

Podemos realizar la comprobación de la presencia de ADN en nuestra solución tomando 1 μ L de dicha disolución previamente mezclada con 4 μ L de agua y 1 μ L de tampón de carga y lo cargamos en un gel de agarosa al 1% y lo corremos en una electroforesis a 150 voltios.

45

Visualizaremos nuestro ADN genómico como una banda de más de 1500 pares de bases al exponer el gel teñido con bromuro de etidio a la luz ultravioleta en un transiluminador UV.

50

55

60

65

ES 2 332 757 B1

REIVINDICACIONES

5 1. Método de extracción de ADN genómico de moluscos bivalvos, que comprende la lisis de la muestra con lauril sarcosin sódico como principal compuesto activo del tampón de lisis y una etapa de precipitación con acetato amónico 5 molar como tampón de precipitación.

10 2. Método de extracción de ADN genómico según la reivindicación 1, en el que no se emplean resinas que retienen el ADN ni compuestos tóxicos como el beta-mercaptoetanol, fenol y cloroformo.

10 3. Método de extracción de ADN genómico según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la muestra es una muestra fresca, conservada en alcohol o congelada y es obtenida a partir del manto, músculo, gónada y/o branquia del molusco bivalvo.

15 4. Método de extracción de ADN genómico según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque el ADN genómico extraído y conservado en solución acuosa es de peso molecular elevado.

20

25

30

35

40

45

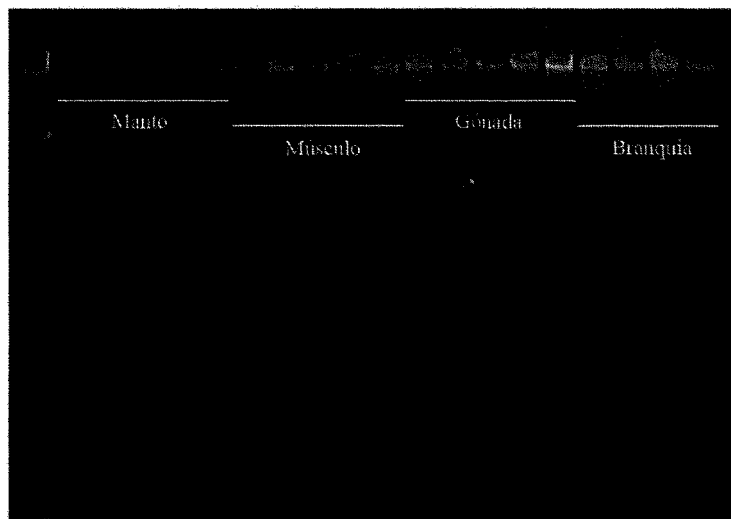
50

55

60

65

Figura 1





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 332 757

② Nº de solicitud: 200702783

③ Fecha de presentación de la solicitud: 18.10.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12N 15/10 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WINNEPENNINCKX, B. et al., "Extraction of high molecular weight DNA from molluscs.", TRENDS IN GENETICS, 1993, Vol. 9, No. 12, página 407, ISSN: 0168-952, todo el documento.	1-4
A	ARANISHI, F. et al., "A simple and reliable method for DNA extraction from bivalve mantle.", JOURNAL OF APPLIED GENETICS, 2006, Vol. 47, No. 3, páginas 251-254, ISSN: 1234-1983, todo el documento.	1-4
A	US 2007077573 A1 (FUKUSHIMA, H. et al.) 05.04.2007, todo el documento.	1-4
A	WO 2004033707 A2 (MARLIGEN BIOSCIENCES, INC.) 22.04.2004, todo el documento.	1-4
A	COOK, P.R., "A general method for preparing intact nuclear DNA" EMBO JOURNAL, 1984, Vol. 3, No. 8, paginas 1837-1842, ISSN: 0261-4189, todo el documento.	1-4
A	JACKSON, D.A. et al., "A general method for preparing chromatin containing intact DNA", EMBO JOURNAL, 1985, Vol. 4, No. 4, páginas 913-918, ISSN: 0261-4189, todo el documento.	1-4
A	WU, Q. et al., "A simple, rapid method for isolation of high quality genomic DNA from animal tissues.", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 1995, Vol. 23, No. 24, páginas 5087-5088, ISSN: 0305-1048, todo el documento.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.01.2010

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.01.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Winnepenninckx, B. et al., Trends Genet., (1993), 9(12): 407.	1993
D02	Aranishi, F. et al., J. Appl.Genet., (2006), 47(3): 251-4.	2006
D03	US 2007077573 A1	05.04.2007
D04	WO 2004033707 A2	22.04.2004
D05	Cook, P.R., EMBO J., (1984), 3(8): 1837-42.	1984
D06	Jackson, D.A. et al., EMBO J., (1985), 4(4): 913-8.	1985
D07	WU, Q. et al., Nucleic Acids Res., (1995), 23(24): 5087-8.	1995

Observaciones sobre documentos:

En D1-D2 se divulgan dos procedimientos de extracción del DNA genómico de moluscos.

En D3-D7 se difunden diferentes métodos de purificación de DNA genómico.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicación independiente 1.

El objeto de la reivindicación 1 consiste en un método de extracción del ADN genómico de moluscos bivalvos que comprende una primera etapa de lisis de la muestra, caracterizada porque el tampón de lisis empleado contiene lauril sarcosín sódico como principal compuesto activo, y una segunda etapa de precipitación del ADN con acetato amónico 5M. Además, en dicho método no se emplean ni resinas que retengan ácidos nucleicos ni compuestos tóxicos como el beta-mercaptoetanol, fenol o cloroformo. En el estado de la técnica no se ha divulgado ningún procedimiento de extracción de ADN genómico de moluscos bivalvos que comparta las mismas características técnicas del procedimiento de la solicitud (cf. D1-D6). Además, dicho procedimiento no se deduce de una manera obvia combinando diferentes procedimientos descritos previamente.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-4 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes, respectivamente.