



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 341**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00989419 .7**
96 Fecha de presentación : **21.12.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1240320**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.09.2002**

54 Título: **Equipo y método de aislamiento de ácido nucleico.**

30 Prioridad: **22.12.1999 US 470944**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2011

73 Titular/es: **ABBOTT LABORATORIES**
Chad 0377/Ap6D-2, 100 Abbott Park Road
Abbott Park, Illinois 60064-3500, US

72 Inventor/es: **Gundling, Gerard, J.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 366 341 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

Equipo y método de aislamiento de ácido nucleico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para aislar ácidos nucleicos y más particularmente se refiere a métodos para aislar ácidos nucleicos que no usan concentraciones importantes de componentes inflamables.

10 **Antecedentes de la invención**

Se conocen bien varios métodos para aislar ácidos nucleicos a partir de varias fuentes. Los primeros métodos empleaban disolventes orgánicos, tales como fenol y/o cloroformo, para precipitar de forma selectiva y posteriormente retirar las proteínas de una disolución que contiene ácidos nucleicos. Una vez que la proteína ha sido retirada, posteriormente se puede precipitar el ácido nucleico disuelto usando alcohol y se puede recoger sobre una superficie sólida. Su usó posteriormente un tampón apropiado para disolver el ácido nucleico y de este modo retirarlo de la superficie sólida.

Como se ha mencionado previamente, los primeros métodos para purificar secuencias de ácido nucleico típicamente empleaban disolventes orgánicos para precipitar de forma diferencial las secuencias de ácido nucleico a partir de las proteínas y otra materia no deseada presente en el material de fuente. Una vez precipitado, el ácido nucleico se recoge de forma sencilla sobre un substrato sólido, tal como un rodillo de agitación de vidrio, antes de que se disuelva en estado puro. Desde el punto de vista de purificación de ácidos nucleicos, también se ha explotado la afinidad que el ácido nucleico muestra por los substratos sólidos en presencia de un agente caotrópico. Estos métodos de preparación de muestra además de emplear agentes caotrópicos típicamente usan disolventes orgánicos, tales como un alcohol, con el fin de garantizar que el ácido nucleico se une al substrato sólido o permanece unido al substrato durante los procedimientos de lavado. Dichos procedimientos usan concentraciones relativamente bajas de disolventes orgánicos, en comparación con los primeros métodos de aislamiento de ácidos nucleicos en los que los disolventes orgánicos eran los únicos reactivos empleados, las concentraciones de alcohol usadas en estos procedimientos no obstante dan lugar a importantes problemas de eliminación y seguridad, especialmente cuando se procesan elevados volúmenes de muestras.

Con la llegada de las reacciones de multiplicación de ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, la reacción de cadena de polimerasa (PCR), la reacción de cadena de ligasa (LCR) y otros procedimientos similares designados para sintetizar copias múltiples de una secuencia objetivo de ácido nucleico, el aislamiento de secuencias de ácido nucleico a partir de materiales fuente (en ocasiones referidos como "preparación de muestra") se ha convertido en un área de investigación cada vez más importante. Varias consideraciones, fuera de la mera purificación de secuencias de ácido nucleico, hacen que el descubrimiento de métodos de preparación útiles constituya un reto. Por ejemplo, la contaminación de muestra a muestra con ácidos nucleicos extraños es una preocupación importante y bien documentada. De manera adicional, las muestras iniciales que contienen la secuencia deseada de ácido nucleico (o "secuencia objetivo de ácido nucleico"), con frecuencia también contiene concentraciones muy pequeñas de la secuencia objetivo, así como concentraciones comparativamente grandes de ácidos nucleicos extraños. Además, muchas veces la preparación de muestra se lleva a cabo en zonas altamente reguladas, en términos de reactivos que se pueden usar y desechar finalmente. Además, en los casos en los que se purifica el ácido nucleico con el fin de ser usado en una reacción de multiplicación, es importante para el ácido nucleico residir de forma final en un tampón que no comprenda componentes que inhiban las enzimas comúnmente usadas en las reacciones de multiplicación. Asimismo, es preciso tener en cuenta varias consideraciones, más allá de la mera purificación de las secuencias de ácido nucleico, por lo que respecta al diseño de un método útil de preparación de muestra.

50 En el documento de EE.UU. 5.973.138 se divulga un método para unir de forma reversible partículas paramagnéticas, en una disolución ácida, a moléculas de ácido nucleico. El método resulta útil para purificar y manipular ácidos nucleicos.

55 En el documento de EP-A-0818461 se divulga un método para aislar ARN que comprende las etapas de: mezclar la muestra que contiene ARN con un vehículo de unión a ácido nucleico, tal como un óxido de metal super-magnético y una disolución ácida que contiene una sal de litio y un agente caotrópico, para adsorber el ARN sobre el vehículo; separar el vehículo unido a ARN de la fase líquida; y eluir el ARN del vehículo unido a ácido nucleico.

60 El documento DE 19520398 A divulga una partícula magnética con una superficie externa vítrea que es no porosa o que presenta poros con un diámetro menor que 10 nm y una partículas ferro-magnética con una superficie vítrea. Las partículas son útiles para aislar materiales biológicos, tales como ácidos nucleicos.

65 En el documento WO 91/12079 se divulga un método para tratar una disolución de un polímero con bolitas susceptibles de atracción magnética que no se unen de forma específica al polímero. El método comprende suspender las bolitas en la disolución; precipitar el polímero de la disolución, donde se asocia de forma no específica con las bolitas; aplicar un campo magnético para dar lugar a un precipitado de bolitas y polímero asociado; y separar

el precipitado del líquido sobrenadante.

El documento WO 92/18514 divulga un método para la purificación de ácidos nucleicos a partir de una muestra que usa un soporte de óxido de metal capaz de forzar la sorción de al menos un tipo de ácido nucleico a partir de la disolución.

En el documento EP-A-0391608 se divulgan una composición que comprende un soporte con una cantidad de óxido de metal suficiente para provocar la sorción de ácido nucleicos y el ácido nucleico que ha experimentado sorción sobre parte de la superficie disponible del soporte. El ácido nucleico ha experimentado sorción de forma tal que se le permite mantener considerablemente su accesibilidad biológica y reactividad.

De esta forma, es necesario un método de preparación de muestra que proporcione un aislamiento cuantitativo de ácidos nucleicos, con una manipulación mínima y que no precise del uso de disolventes orgánicos inflamables.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método independiente del pH para separar ácidos nucleicos de una muestra de ensayo que comprende:

- (a) poner en contacto una muestra de ensayo con un material de soporte de óxido de metal con un tampón de enlace para formar complejos de material de soporte de óxido de metal/ácido nucleico, en los que el tampón de enlace comprende un agente caotrópico, un disolvente orgánico y un detergente y el punto de inflamación del tampón de enlace es mayor que 54,4 °C (130° F);
- (b) separar los complejos de la muestra de ensayo; y
- (c) eluir el ácido nucleico del material de soporte de óxido de metal,

en el que la etapa (a) permite que los ácidos nucleicos se empleen de manera directa en la reacción de multiplicación sin intercambiar un tampón de elución.

El método es suficientemente robusto como para poder purificar ácidos nucleicos a partir de distintas fuentes que contienen ácido nucleico tales como bacterias y virus como los que pueden detectarse últimamente.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 y la Figura 2 representan un análisis por ordenador de los datos obtenidos en el Ejemplo comparativo 5.

Descripción detallada de la invención

Los métodos que se proporcionan en el presente documento emplean un material de soporte de óxido de metal para separar ácidos nucleicos de otros, pero no necesariamente todos, componentes que se encuentran en la muestra de ensayo. De manera específica, se emplea el óxido de metal para purificar el ácido nucleico de otros componentes de la muestra de ensayo. Se ha descubierto que el uso de materiales de soporte de óxido de metal, como los que se muestran en el presente documento, proporciona importantes ventajas con respecto a los métodos de preparación de muestra disponibles comercialmente. Por ejemplo, los óxidos de metal presentan una elevada afinidad por las secuencias de ácido nucleico y por tanto la contaminación muestra a muestra queda minimizada, ya que el ácido nucleico se puede unir de forma controlada al soporte de óxido de metal sin escapar a zonas no deseadas. De manera adicional, los soportes de óxido de metal proporcionan una purificación más cuantitativa del ácido nucleico de la muestra de ensayo y por tanto se recogen incluso pequeñas cantidades del ácido nucleico deseado que puedan estar presentes en la muestra de ensayo. Además, se pueden emplear partículas de óxido de metal para separar el ácido nucleico de la muestra de ensayo con concentraciones bajas de disolvente orgánico (o, de manera significativa, sin el uso de disolventes orgánicos) tales como alcohol, fenol o cloroformo, que se emplean comúnmente de acuerdo con otros métodos de preparación de muestra, pero que poseen importantes problemas de eliminación. Además, el ácido nucleico se puede eluir de los soportes de óxido de metal usando tampones que son completamente compatibles con las reacciones de multiplicación. En otras palabras, el ácido nucleico separado de la muestra de ensayo de la forma que se proporciona en el presente documento se puede emplear directamente en una reacción de multiplicación, sin necesidad de intercambiar el tampón de elución por un tampón compatible con la reacción de multiplicación.

De manera adicional, el método que se proporciona en el presente documento se puede emplear para separar tanto ADN como varias formas de ARN de muestras de ensayo sencillas. Además, el método que se proporciona en el presente documento se puede emplear para separar el ácido nucleico de varias células diferentes y/o organismos en la misma muestra de ensayo que se pueden detectar más adelante.

De manera general, el método comprende poner en contacto una muestra de ensayo con un material de soporte de óxido de metal y un tampón de enlace como se ha definido anteriormente. En presencia del tampón de enlace, el ácido nucleicos de todos los tipos, tal como ADN y las distintas formas de ARN, presentes en la muestra de ensayo

se unen al material de soporte de óxido de metal. El material de soporte de óxido de metal y el ácido nucleico unido a él se pueden separar de la muestra de ensayo. Si se desea, el material de soporte, y cualquier ácido nucleico unido, se pueden lavar antes de que se produzca la elución del ácido nucleico usando un tampón de elución. Se puede detectar cualquier ácido nucleico eluido usando cualquiera de las diferentes técnicas de detección conocidas.

Según se emplea en el presente documento, la expresión "muestra de ensayo" significa cualquiera que se sospeche que contienen ácido nucleico. La muestra de ensayo es, o puede proceder de, cualquier fuente tal como, por ejemplo, fuentes biológicas incluyendo sangre, fluido de lente ocular, líquido cefalorraquídeo, leche, líquido ascítico, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico, tejidos, caldos de fermentación, cultivos celulares, productos de una reacción de multiplicación, productos de síntesis de ácido nucleico y similares. Las muestras de ensayo también pueden proceder de, por ejemplo, fuentes ambientales o forenses incluyendo aguas residuales o ropas. La muestra de ensayo se puede usar directamente según se obtiene de la fuente o después de un pre-tratamiento para modificar el carácter de la muestra. De este modo, la muestra de ensayo se puede pre-tratar antes de su uso por medio, por ejemplo, de preparación de plasma sanguíneo, aislamiento de células a partir de fluidos biológicos, homogeneización de tejidos, ruptura de células o de partículas virales, preparación de líquidos a partir de materiales sólidos, dilución de fluidos viscosos, filtración de líquidos, destilación de líquidos, concentración de líquidos, inactivación de componentes interferentes, adición de reactivos, purificación de ácidos nucleicos y similares.

Según se usa en el presente documento, "materiales de soporte de óxido de metal" significa óxidos de hidróxidos de elementos metálicos en cualquiera de sus distintos estados de valencia. De este modo, por ejemplo, materiales de soporte de óxido de metal son óxidos de aluminio, magnesio, titanio, circonio, hierro, silicio, níquel, cromo, cinc y combinaciones de los anteriores. Los óxidos de hierro son materiales preferidos de soporte de óxido de metal. Por tanto, el óxido ferroso (Fe_3O_4) y el óxido férrico (Fe_2O_3) son materiales preferidos de soporte de óxido de metal. Los materiales de soporte de óxido de metal pueden adoptar cualquier configuración tal como, por ejemplo, placas, partículas, revestimientos, fibras, estructuras porosas tales como filtros. Debido a su elevada área superficial, las partículas constituyen la configuración preferida del material de soporte de óxido de metal.

Los "tampones de enlace" facilitan la unión del ácido nucleico presente en la muestra de ensayo a los materiales de soporte de óxido de metal. Se ha encontrado que el ácido nucleico se une a los materiales de soporte de óxido de metal en una extensa variedad de tampones, sin que el pH del tampón tenga nada que ver. Además, el tampón de enlace puede tener un pH ácido (menor que 7), neutro (igual a 7) o básico (mayor que 7). De manera general, los tampones de enlace comprenden un sistema amortiguador. Los sistemas amortiguadores son bien conocidos y constituyen una cuestión de elección para los expertos en la técnica. Típicamente, los sistemas amortiguadores son una disolución acuosa de un ácido débil y su correspondiente base, tal como, por ejemplo, fosfato de sodio y ácido fosfórico. Preferentemente, los tampones de enlace presentan un pH de entre 3 y 12, más preferentemente entre 3 y 11 y del modo más preferido entre 4 y 10. De acuerdo con la presente invención, los tampones de enlace contienen un detergente. Por ejemplo, el detergente se puede escoger entre detergentes bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como los detergentes no iónicos, detergentes iónicos, detergentes zwitteriónicos y pueden estar presentes en una concentración total de entre 1 % y 25 % y preferentemente de entre 5 % y 20 %.

De acuerdo con la presente invención, el tampón de enlace comprende un agente caotrópico, por ejemplo a una concentración de entre 2M y 10M, preferentemente de 3M a 6M. Los agentes caotrópicos son bien conocidos en la técnica e incluyen sustancias que rompen o disuelven proteínas. Reactivos caotrópicos ejemplares incluyen, pero no se limita a, isotiocianato de guanidina (GITC), guanidina HCl, yoduro de potasio, urea y similares. También se pueden añadir agentes reactivos, tales como mercaptoetanol, ditiotretol y ácido 2-mercaptoetanosulfónico, al tampón de enlace, en concentraciones entre 25 mM y 150 mM, y preferentemente de 50 mM a 100 mM.

De acuerdo con la presente invención, el tampón de enlace incluye un alcohol, u otro disolvente orgánico, en concentraciones que no dan lugar a un tampón de enlace que tiene un punto de inflamación mayor que 54,4 °C (130 °F). Se puede determinar el punto de inflamación del tampón usando cualquiera de los métodos bien conocidos para determinar el punto de inflamación de un líquido. De manera general, los disolventes orgánicos empleados en concentraciones menores que 15 % dan como resultado un tampón de enlace que tiene un punto de inflamación mayor que 125 °F. Se prefiere la adición de alcoholes menores, tales como metanol, etanol, propanol e isopropanol, al tampón de enlace.

Como se ha mencionado anteriormente, en presencia del tampón de enlace, el ácido nucleico de la muestra de ensayo se une al material de soporte. Tras la formación de los complejos entre el ácido nucleico y el material de soporte, se puede separar el material de soporte del tampón de enlace y del resto de la muestra de ensayo. Dependiendo de la configuración del material de soporte, el método de separación constituye una cuestión de elección por parte del experto en la técnica. Por ejemplo, si el material de soporte se encuentra en forma de partículas, el material de soporte puede estar, por ejemplo, sedimentado y el resto de material líquido se puede retirar del soporte mediante aspiración o simplemente por medio de vertido del líquido que existe en el material de soporte. Dada la composición de los materiales de soporte de acuerdo con la presente invención, es preferible usar un campo magnético para facilitar la sedimentación o el aislamiento de los materiales de soporte en forma de partículas.

Las secuencias de ácido nucleico que han formado complejos con el material de soporte, si se desea, se pueden lavar con cualquier tampón que no disocie el ácido nucleico del material de soporte. Típicamente, los tampones de lavado se emplean para limpiar el material de soporte, y el ácido nucleico que ha formado el complejo sobre él, de cualquier componente residual o no deseado de la muestra de ensayo. Dichos tampones son bien conocidos en la técnica y típicamente contienen disoluciones de detergentes tales como las mencionadas anteriormente en concentraciones similares. Típicamente, dichos detergentes se diluyen en sistemas tampón, también definidos anteriormente.

Con o sin lavado, el ácido nucleico que ha formado el complejo sobre el material de soporte se puede retirar o disociar del material de soporte de óxido de metal usando agua o un tampón de elución. Un "tampón de elución" de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier reactivo o conjunto de reactivos que separen el ácido nucleico del material de soporte de óxido de metal. Preferentemente, dicho reactivo es compatible con el sistema de detección empleado para el ácido nucleico, y particularmente compatible con los reactivos empleados en los sistemas de multiplicación de ácido nucleico. El agua, que puede ser destilada, desionizada, o de purificada de otro modo, puede servir como tampón de elución para los fines de la presente invención. También se ha comprobado que los tampones de elución (típicamente comprenden un sistema amortiguador como se ha descrito anteriormente) que contienen fosfato o bicina son tampones de elución apropiados y otros que pueden encontrarse fácilmente de forma empírica usando el criterio experto en la técnica, tal como mediante la puesta en contacto de complejos de óxido de metal-ácido nucleico con un tampón y la determinación de si ha tenido lugar la separación (como se ha ejemplificado anteriormente). El tampón de elución puede contener un fosfato inorgánico u orgánico mediante la adición de fosfato de sodio o compuestos de organofosfato que son compuestos orgánicos que contienen al menos una funcionalidad de fosfato a concentraciones de entre 10 mM y 300 mM, preferentemente entre 10 mM y 100 mM. Ejemplos de compuestos de organofosfato son o-fosfoserina, fosfoetanolamina, fosfato de carbamilo, fosfocreatina, monofosfato de adenosina (AMP) y ácido fosfotungstico. Valores de pH apropiados para los tampones de elución pueden ser entre 6 y 10, y preferentemente entre 7 y 9.

Se puede detectar el ácido nucleico purificado usando ensayos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden emplear ensayos de hidridación de tipo sandwich, con o sin etapa de multiplicación, antes de la detección. Las reacciones de multiplicación bien conocidas tales como, por ejemplo, TMA, QB-replicasa, NASBA, SDA, LCR y PCR son ejemplos de reacciones de multiplicación que se pueden emplear para multiplicar el ácido nucleico purificado de acuerdo con la presente invención.

Típicamente, las reacciones de multiplicación anteriores emplean nombres de reactivos de multiplicación. La expresión "reactivos de reacción de multiplicación" según se usa en el presente documento significa reactivos que son bien conocidos para su uso en reacciones de multiplicación de ácido nucleico y pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores, sondas, un reactivo sencillo o múltiple, reactivos, enzimas, cofactores de enzima tales como magnesio o sales de magnesio; nicotinamida adenina dinucleotido (NAD) y tiofosfatos de desoxinucleósidos (dNTPs) tales como, por ejemplo, trifosfato de desoxiadenosina, trifosfato de desoxiguanosina, trifosfato de desoxicitodina y trifosfato de timidina. Los reactivos de multiplicación concretos empleados con una cuestión de elección por parte del experto en la técnica, basándose en la reacción de multiplicación particular empleada.

Se ha descubierto que la multiplicación de ácido nucleico; purificado como anteriormente, se puede llevar a cabo en el tampón de elución empleado para disociar el ácido nucleico del material de soporte de óxido de metal. En particular, los reactivos de multiplicación se pueden combinar con el ácido nucleico en el tampón de elución y se puede llevar a cabo de manera directa la multiplicación del ácido nucleico.

Los ejemplos que siguen ilustran realizaciones preferidas de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Enlace y elución de ARN radio-marcado usando materiales de soporte de óxido de metal

En este ejemplo, se unió ARN radio-marcado a varios materiales de soporte de óxido de metal, se lavó y posteriormente se eluyó de los materiales de soporte. Se registraron las cuentas por minuto (CPM) a lo largo de todo el curso del proceso para determinar la cantidad de ARN unido así como también la cantidad de ARN perdido durante el lavado, y finalmente, la cantidad de ARN eluido.

Se generó el ARN radio-marcado empleado en este experimento usando el sistema de transcripción de ARN polimerasa Riboprobe R7 y el patrón de control positivo pGEMEX-1 de Promega Corporation. En el experimento de unión y elución, se añadió aproximadamente 8.000.000 CPM de sonda radio-marcada a suspensiones de 5 mg de partículas de óxido de metal de Fe₃O₄ o Fe₂O₃ (obtenidas en ISK Magnetics; Valparaiso, IN) en 6 ml de disolución detergente de isotiocianato de guanidina (GITC 6M, Tween-20 10%, bromuro de cetilmetilamonio 16 mM, acetato de sodio 100 mM, ditiotreitól 100 mM, pH 4,2, etanol 7,5 %). Tras añadir el ARN a las respectivas suspensiones de

partículas se sometieron a agitación vorticial y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos.

Tras la incubación, se desplazaron las partículas de óxido de metal hacia los lados de los respectivos tubos de microfuga con un imán y se aspiraron los sobre-nadantes con una pipeta. Se determinó el CPM de los sobrenadantes y se registró en la Tabla 1, a continuación, como ARN "no ligado".

Posteriormente se lavaron las partículas añadiendo 0,5 ml de disolución de lavado y la suspensión formada de nuevo se sometió a agitación vorticial, habiendo desplazado antes las partículas a un lado del tubo de microfuga como se ha comentado anteriormente y habiendo aspirado la disolución de lavado del tubo de microfuga. Se lavaron dos veces las partículas con una disolución de detergente-isotiocianato de guanidina (GITC 2M, Tween-20 5%, KOAc 50 mM, pH 6) y dos veces con tampón Tris 50 mM, pH 8,0. Se juntaron los lavados, se determinó la cantidad de marcaje retirado de las partículas y se registró y en la Tabla 1 como "lavado".

Una vez que se había aspirado la disolución de lavado, se añadieron 200 microlitros de tampón de elución a los tubos que contenían las partículas de lavado. El tampón de elución era una disolución de o-fosfoserina 100 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y una base de Tris 300 mM con un pH final de 8,0. Tras la adición del tampón de elución, se sometieron las suspensiones de partículas nuevamente formadas a agitación vorticial de forma breve y se incubó la suspensión a 70 °C durante 30 minutos. Tras la incubación, se capturaron las partículas en los lados de los tubos usando un soporte magnético y se retiró el eluyente. Se determinaron CPM y se registró en la Tabla 1 como "Eluyente 1". Se añadió tampón de elución nuevo a las partículas, se repitió el proceso de elución y se registró el CPM de la segunda elución en la Tabla 1 como "Eluyente 2".

De re-suspendieron las partículas en una tercera alícuota de 200 microlitros de tampón de elución y se usó una muestra que contenía el tampón de elución y las partículas resuspendidas para determinar la cantidad de sonda que no había sido liberada de las partículas. Esto se registró en la Tabla 1 como "Ligado".

Todos los valores de la Tabla 1 se registran como porcentaje del CPM total.

Tabla1

% de CPM total					
Partículas	No ligado	Lavado	Eluyente 1	Eluyente 2	Ligado
Fe₃O₄	10	2	70	15	3
Fe₂O₃	7	2	63	10	18

Como se observa en la Tabla 1, las partículas de óxido férrico y óxido ferroso se unieron a ARN y el ARN se eluyó de las respectivas partículas con el tampón de fosfato.

Ejemplo 2 (comparativo)

Elución de ARN de Fe₃O₄ usando varias concentraciones de fosfato

En este ejemplo se unió el ARN radio-marcado preparado como en el Ejemplo 1 a partículas magnéticas de Fe₂O₃, se lavó y se eluyó con varias concentraciones de tampón de fosfato de sodio (Na₂HPO₄). Las concentraciones de tampón de elución variaron de 10 a 50 mM de Na₂HPO₄ (pH 9). Se añadió aproximadamente 23.000.000 CPM de ácido nucleico radio-marcado a la suspensión de 25 mg de partículas de óxido de metal de Fe₂O₃ (0,25 ml de una suspensión de 10 % en peso/volumen de partículas en agua) en 30 ml de disolución de detergente-isotiocianato de guanidina (GITC 4M, Tween-20 10%, bromuro de cetiltrimetilamonio 16 mM, ácido 2-mercaptoetanosulfónico 100 mM, acetato de potasio 100 mM, pH 6). Posteriormente, se añadieron 5 ml de agua a la suspensión para simular el efecto de dilución de cinco muestras de 1 ml. Se sometió la suspensión a agitación vorticial de forma breve y se dividió en 5 alícuotas iguales de 7 ml cada una y se incubaron todas las suspensiones a 37 °C durante 20 minutos.

Tras la incubación, se desplazaron las partículas de óxido de metal hacia los lados de los respectivos tubos de microfuga con un imán y se aspiraron los sobrenadantes con una pipeta. Se registró la cantidad de sonda no ligada con un contador de Geiger y se observó que cantidades muy pequeñas de ácido nucleico radio-marcado no fueron capturadas, en comparación con la cantidad de radioactividad ligada a las partículas registradas de forma idéntica. No se determinó el CPM exacto del material no ligado.

Posteriormente, se lavaron las partículas mediante la adición de 0,5 ml de una disolución de lavado y se sometió la suspensión formada de nuevo a agitación vorticial antes de desplazar las partículas al lado del tubo de microfuga como se ha mencionado anteriormente y aspirar la disolución de lavado desde el tubo de microfuga. Se lavaron las partículas dos veces con (GITC 2M, Tween-20 al 5 %, KOAc 50 mM, pH 6) y dos veces con (tampón Tris 50 mM, pH 8,0). Se registraron los lavados con un contador de Geiger y se encontró que la cantidad de radioactividad liberada durante el procedimiento de lavado fue despreciable. Se eluyeron las muestras con 0,2 ml de cada una de las disoluciones tampón a 73 °C durante 10 minutos. Se recogió el eluyente tras captura magnética de las partículas y se guardó. Se repitió el protocolo de elución y también se guardó el segundo eluyente. Se añadió también una tercera alícuota del tampón de elución a las partículas y se usaron las partículas en suspensión para determinar la cantidad

de sonda ligada. Se mezclaron alícuotas de 20 μ l de cada uno de los eluyentes y suspensiones de partículas con 5 ml de flúor de centelleo y se contó. La Tabla 2 informa sobre las concentraciones de fosfato de sodio de los tampones de elución empleados en este experimento (columna 1), el porcentaje de las cuentas totales recuperadas tras la primera y la segunda elución (columnas 2 y 3) y el porcentaje de las cuentas restantes de las partículas magnéticas tras ambas eluciones ("ligado").

Tabla 2

Tampón de elución	Elución 1	Elución 2	Ligado
Na ₂ HPO ₄ 10 mM	45	20	35
Na ₂ HPO ₄ 20 mM	68	18	14
Na ₂ HPO ₄ 30 mM	75	16	9
Na ₂ HPO ₄ 40 mM	76	16	8
Na ₂ HPO ₄ 50 mM	79	14	7

Como se muestra en la Tabla 2, varias concentraciones de tampón de fosfato eluyeron el ARN de las partículas de óxido de metal.

Ejemplo 3

Uso de tampones de elución de organofosfato

En este ejemplo, se sometió a ensayo la capacidad de varios tampones de organofosfato para eluir el ácido nucleico de un material de óxido de metal, en comparación con tampones de fosfato inorgánicos. Todos los compuestos de organofosfato empleados en los tampones de elución se obtuvieron en Sigma Chemical Co.. Excepto cuando se indica en la Tabla 3, todos los tampones se hicieron a 50 mM y se reguló el pH con base de tris 1M hasta un valor final de pH de entre 6,5 y 9. Como en el caso de los ejemplos anteriores, se preparó el ARN radio-marcado como en el Ejemplo 1. Aproximadamente, se añadieron 1.000.000 CPM de ARN radio-marcado a una suspensión de 10 mg de partículas de óxido de metal de Fe₂O₃ en 12 ml de una disolución de detergente de isocianato de guanidina (GITC 6M, Tween-20 10 %, bromuro de cetiltrimetilamonio 6 mM, acetato de sodio 100 mM, ditiotreitól 100 mM, pH 4,2, etanol 7,5 %). Se añadieron 2 ml de agua a la suspensión para simular la adición de muestra. Se sometió la suspensión a agitación vorticial brevemente y se incubó a 37 °C durante 25 minutos. Se recogieron las partículas magnéticamente y se retiró el sobrenadante. No se observó pérdida de señal importante en el sobrenadante cuando se sometió a comprobación por medio de un contador de Geiger. Se lavaron las partículas mediante re-suspensión de las mismas en 6 ml de acetato de potasio 50 mM, pH 6,0. Se recogieron las partículas magnéticamente y se retiró el fluido de lavado. No se observó pérdida importante de señal en el sobrenadante cuando se sometió a comprobación por medio de un contador de Geiger. Se repitió el procedimiento de lavado. Posteriormente, se re-suspendieron las partículas en 6 ml de fluido de lavado de acetato de potasio, se mezcló bien y se introdujeron alícuotas de 0,5 ml en el interior de 10 tubos de microfuga de 1,5 ml por separado. Se transfirieron los tubos a un soporte magnético, se recogieron las partículas en los lados de los tubos y se retiró el fluido de lavado. Posteriormente, se añadieron 100 microlitros de varios tampones de elución a las micropartículas y se incubó a 70 °C durante 10 minutos. A continuación, se sometieron a conteo 50 microlitros de la muestra eluidas en un contador de centelleo para determinar la cantidad de sonda liberada. Las cuentas totales del material de partida (ácido nucleico) fueron de 40.000 CPM/muestra. La Tabla 3 aporta los resultados de este experimento e informa sobre el tampón de elución y las cuentas liberadas con el tampón de elución.

Tabla 3

Tampón de elución	Cuentas liberadas
Adenosin monofosfato (pH 6,5)	17.229
Fosfocreatina (pH 7)	9172
O-fosforietanolamina (pH 7)	3379
Fosfato de carbamilo (pH 7)	27.717
Ácido fosfonoacético (pH 8)	29.367
Fosforilcolina (pH 7)	404
Ácido fosfotungstico (pH 8)	34.825
O-fosfo-dl-serina (pH 7)	18.807
Na ₂ HPO ₄ 30 mM (pH 8)	29.277
Na ₂ HPO ₄ 30 mM (pH 9)	20.468

Como se muestra en la Tabla 3, los tampones de organofosfato son tampones apropiados para eluir ácido nucleico normal de materiales de soporte de óxido de metal.

Ejemplo 4 (comparativo)

Extracción de ARN de viriones de VIH en plasma

5 En este ejemplo, se sometió a extracción ácido nucleico de VIH a partir de cuatro paneles de ensayo que contenían distintos niveles de viriones HN usando las partículas de óxido de metal descritas anteriormente. Se usó plasma negativo como control negativo. También se sometió a extracción ácido nucleico de muestras de plasma usando el equipo de extracción de ácido nucleico vírico Qiagen disponible comercialmente (Qiagen Inc.; Valencia CA). Se analizó el ácido nucleico VIH de las muestras usando el ensayo VIH cuantitativo Abbott LCx® (disponible en Abbott Laboratories: Abbott Park, IL).

15 Se llevaron a cabo los respectivos procedimientos de preparación de muestra en muestras de plasma de 1 ml a partir de cada uno de los cuatro paneles de ensayo y el control negativo. Se llevó a cabo el procedimiento Qiagen en los paneles de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cuantificaron las muestras usando el ensayo Abbott LCx® HIV. Los paneles de ensayo 1-4 contenían 28 viriones/ml, 110 viriones/ml, 800 viriones/ml y 10.000 viriones/ml, respectivamente. Se llevó a cabo el procedimiento de óxido de metal mezclando 1 ml de muestra de plasma de ensayo con 6 ml de tampón de enlace (isotiocianato de guanidinio 5 M, Tween-20 10 %, bromuro de cetiltrimetilamonio 16 mM, ditiotreititol 100 mM, acetato de Na 100 mM, pH 4,1) y 5 mg de partículas de Fe₂O₃. Se incubó el lisato a 37 °C durante 20 minutos. Posteriormente, se lavaron las partículas mediante la adición de 0,5 ml de una disolución de lavado y se sometió a agitación vorticial la suspensión nuevamente formada antes de desplazar las partículas hacia el lado del tubo de microfuga como se ha mencionado anteriormente y de aspirar la disolución de lavado del tubo de microfuga. Se lavaron dos veces las partículas con GITC 2M, Tween-20 5 %, KOAc 50 mM, pH 6, y dos veces con tampón Tris 50 mM, pH 8,0. Tras aspirar la disolución de lavado, se añadieron 200 microlitos de tampón de elución a los tubos que contenían las partículas lavadas. El tampón de elución era una disolución de o-fososerina 50 mM y base de Tris 150 mM con un pH final de 8,0. Tras la adición del tampón de elución, se sometieron a agitación vorticial brevemente las suspensiones nuevamente formadas y se incubó la suspensión a 70 °C durante 30 minutos. Tras la incubación, se capturaron las partículas a ambos lados de los tubos usando un soporte magnético y se retiró el eluyente. Posteriormente, se sometieron a multiplicación y detección 50 µl de las disoluciones recuperadas de acuerdo con los respectivos procedimientos de preparación de muestra.

30 Se sometieron a transcripción inversa y a multiplicación, usando PCR, alícuotas de 50 µl de los respetivos métodos de preparación de muestra. Se llevó a cabo RT-PCR usando tampón EZ 1X, cloruro de manganeso 2,5 mM, dNTPs (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), presentes cada uno en una concentración final de 0,15 mM y *Thermus thermophilus* polimerasa recombinante a una concentración de 5 unidades/reacción. Se usó el cebador marcado a una concentración de 40 nM y el cebador no marcado se usó a una concentración de 40 nM. Se usó la sonda, que se marcó como se ha especificado anteriormente y que últimamente hibrida con el producto del cebador marcado antes de la detección del complejo híbrido resultante, a una concentración de 10 nM.

40 Se sometieron a transcripción inversa y se multiplicaron mezclas de reacción en un dispositivo de ciclado térmico Perkin-Elmer 480. En primer lugar, se incubaron las mezclas de reacción a 62 °C durante 30 minutos para producir la transcripción inversa del ARN, seguido de 2 minutos a 94 °C. Posteriormente, se inició la multiplicación a través de un protocolo de toque o reductor para facilitar la austeridad de la reacción en las etapas tempranas de la multiplicación. Esto utiliza 8 ciclos como se muestra: 1 ciclo a 94 °C durante 30 segundos, posteriormente a 70 °C durante 80 segundos, seguido de 1 ciclo de 94 °C durante 30 segundos posteriormente a 69 °C durante 80 segundos, seguido de 1 ciclo de 94 °C durante 30 segundos, posteriormente 68 °C durante 80 segundos, seguido de 1 ciclo de 94° C durante 30 segundos, posteriormente a 67 °C durante 80 segundos, seguido de 1 ciclo de 94 °C durante 30 segundos, posteriormente a 66 °C durante 80 segundos, seguido de 1 ciclo de 94 °C durante 30 segundos, posteriormente 65 °C durante 80 segundos, seguido de 1 ciclo de 94 °C durante 30 segundos, posteriormente 64 °C durante 80 segundos, seguido de 1 ciclo de 94 °C durante 30 segundos, posteriormente 63 °C durante 80 segundos. A continuación, se consigue la multiplicación con 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, posteriormente a 62 °C durante 80 segundos. Tras someter a ciclado térmico las mezclas de reacción, todos los duplicados se juntaron y se mezclaron haciendo uso de pipeta para eliminar cualquier variación debida al ciclado. Posteriormente, se separaron las mezclas y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 97 °C. A continuación de esto, se consiguió la oligo-hibridación de la sonda rebajando la temperatura hasta 15 °C durante 5 minutos. Posteriormente se rebajó la temperatura hasta 4 °C y se mantuvieron las muestras a 4 °C hasta que se detectaron los productos de reacción.

60 A continuación, la Tabla 4 muestra, en copias/ml, los resultados obtenidos para los cuatro paneles de ensayo y el control negativo.

Tabla 4

Método de preparación de muestra	Control negativo	Panel 1	Panel 2	Panel 3	Panel 4
Qiagen	5	75	90	900	9000
Óxido de metal	9	80	100	850	10.000

Como se muestra en la Tabla 4, el procedimiento de preparación de muestra de óxido de metal dio lugar a la extracción satisfactoria del ácido nucleico del plasma, en cantidades suficientes para la multiplicación y la detección.

Ejemplo 5

Extracción de ácidos nucleicos de viriones de VIH y HBV en plasma

En este ejemplo, se sometieron a extracción ácido nucleico VIH (ARN) y ácido nucleico HBV (ADN) a partir de un ml de plasma que contenía viriones tanto de VIH como de HBV, cada uno a una concentración de 1000 viriones/ml usando las partículas de óxido de metal descritas anteriormente. Se usó plasma negativo como control negativo. Se variaron las condiciones de lisis para cubrir el intervalo de concentraciones de GITC (de 3,33 a 4,66 M), DTT (de 0 a 100 mM), Tween-20 (de 13,3 a 24 %) y CTAB (de 0 a 24 mM), así como también se usaron distintas combinaciones de pH (de 4 a 10) y temperatura (de 35 °C a 55 °C) de los reactivos en la etapa de lisis, extrayéndose todas las muestras con 3 ml de tampón de lisis. Se usaron 5 mg de partículas de Fe₂O₃ en cada extracción. Se usó cada condición al menos tres veces, usándose 30 veces las condiciones de punto central. Se lavaron las partículas dos veces con GITC 2M, Tween-20 5 %, KOAc 50 mM, pH 6 y dos veces con tampón Tris 50 mM, pH 8,0. Tras aspirar la disolución de lavado, se añadieron 200 microlitros de tampón de elución a los tubos que contenían las partículas lavadas. El tampón de lavado era una disolución de o-fosfoserina 50 mM y base Tris 150 mM con un pH final de 8,0. Tras la adición del tampón de elución, se sometieron brevemente a agitación vorticial las suspensiones de partículas nuevamente formadas y se incubó la suspensión a 70 °C durante 30 minutos. Tras la incubación, se capturaron las partículas sobre los lados de los tubos usando un soporte magnético y se retiró el eluyente. Posteriormente, se sometieron 50 µl de las disoluciones recuperadas de acuerdo con los respectivos procedimientos de preparación de muestra a multiplicación y detección. Se dividió el material eluido y se analizó usando dos ensayos basados en PCR, uno para VIH y uno para HBV. Los ensayos son ensayos "guía" y utilizan una sonda de hibridación que presenta un incremento de la fluorescencia tras el enlace la sonda con el material objetivo multiplicado.

Para los ensayos de VIH, se sometieron a transcripción inversa alícuotas de 50 µl de los respectivos métodos de preparación de muestra y se multiplicaron usando PCR. Se llevó a cabo RT-PCR usando un tampón EZ 1X, cloruro de manganeso 3 mM, dNTPs (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) presente en una concentración final de 0,100 mM cada uno y *Thermus thermophilus* polimerasa recombinante a una concentración de 14,4 unidades/reacción. Se usó el cebador de avance (SEQ ID No 1) en una concentración de 188 nM y el cebador inverso (SEQ ID No 2) a una concentración de 469 nM. Se usó la sonda guía VIH (SEQ ID No 3) a una concentración de 100 nM. Se sometieron a transcripción inversa y multiplicación las mezclas de reacción en un dispositivo de ciclado térmico Perkin-Elmer 9700 usando bandejas de multiplicación de 96 pocillos. En primer lugar, se incubaron las mezclas de reacción a 59 °C durante 30 minutos para provocar la transcripción inversa del ARN. Posteriormente, se consiguió la multiplicación PCR con 5 ciclos a 92 °C durante 15 segundos, posteriormente a 59 °C durante 30 segundos y a continuación a 72 °C durante 15 segundos. Esto se siguió con 55 ciclos a 92 °C durante 4 segundos, posteriormente a 64 °C durante 8 segundos y a continuación a 72 °C durante 4 segundos. A continuación, se calentaron las reacciones hasta 92 °C durante 30 segundos y posteriormente se mantuvieron a 45 °C durante 15 minutos y a continuación se rebajó hasta 25 °C. Se determinó la cantidad de señal mediante lectura de la placa en un lector de placas Cytofluor Serie 4000.

Para los ensayos de HBV, se sometieron a multiplicación alícuotas de 50 µl de los respectivos métodos de preparación de muestra usando PCR. El PCR se llevó a cabo usando un tampón PCR 1X, cloruro de magnesio 3,5 mM, dNTPs (dATP, Dgtp, dTTP y dCTP) presentes en una concentración final de 0,100 mM cada uno, y AmpliTaQ Gold a una concentración de 7 unidades/reacción. Se usó el cebador de avance (SEQ ID No 4) a una concentración de 200 nM y el cebador inverso (SEQ ID No 5) a una concentración de 300 nM. Se usó la sonda guía HBV (SEQ ID No 6) a una concentración de 50 nM. Se sometieron las mezclas a multiplicación en un dispositivo de ciclado térmico Perkin-Elmer 9700 usando bandejas de multiplicación de 96 pocillos. En primer lugar, se incubaron las muestras de reacción a 94 °C durante 10 minutos para activar la enzima. Posteriormente, se consiguió la multiplicación PCR con 45 ciclos a 94 °C durante 60 segundos, posteriormente a 58 °C durante 30 segundos. A continuación, se mantuvieron las reacciones a 58 °C durante 10 minutos, se elevó la temperatura hasta 94 °C durante 5 minutos y posteriormente se mantuvo a 55 °C durante 15 minutos y a continuación se rebajó hasta 25 °C. Se determinó la cantidad de señal por medio de lectura de placa en un lector de placa Cytofluor Series 4000.

La Tabla 5 representa las señales generadas para las distintas muestras de VIH durante el estudio y la Tabla 6 para las muestras de HBV. Las tablas muestran las condiciones de lisis usadas para las muestras y las señales generadas para el control interno que se procesó con las muestras, así como tanto las señales de las muestras HIV y HBV. Se representaron las proporciones de las señales de las muestras positivas con respecto a las señales de las muestras negativas y se analizaron usando un soporte informático JMP de SAS Institute Inc. Los resultados de ambas extracciones VIH y HBV, Figuras 1 y 2 respectivamente, muestran que se puede usar un amplio intervalo de condiciones en el proceso, tanto para VIH como para HBV, y que muchas de las condiciones permiten la extracción simultánea de HIV y HBV.

Tabla 5

Patrón	CTAB mM	DTT mM	pH	% de Tween-20	GITC M	Temp	Neg Fam (VIH)	Neg TR (Ctrl int)	Pos Fam (VIH)	Pos TR (Ctrl int)
-----	0	0	4	13,3	3,33	35	5486,333	3692	11262	8526,333
----++	0	0	4	13,3	4,66	55	4424,667	9302	11482	7854,333
---++	0	0	4	24	3,33	55	5666	4089,333	7072,333	5088,333
---+-	0	0	4	24	4,66	35	5015,667	12252,33	19858,67	11733
---+	0	0	10	13,3	3,33	55	4879,333	13952	21567	12767
---+	0	0	10	13,3	4,66	35	4479,333	14033,33	23514,67	12948
---+	0	0	10	24	3,33	35	4977	9272	14768	7690
---++	0	0	10	24	4,66	55	4806,333	10057,33	15730,33	8273,667
---++	0	100	4	13,3	3,33	55	5393	6056,333	9859,333	6102,333
---++	0	100	4	13,3	4,66	35	5483,667	11603,67	14634,67	9215
---++	0	100	4	24	3,33	35	5834	6525,667	8937	5768,667
---++	0	100	4	24	4,66	55	5011,333	8967,333	11264	8388
---++	0	100	10	13,3	3,33	35	4099	8307,333	11902,33	7301,333
---++	0	100	10	13,3	4,66	55	4374,667	3469,333	5251,333	3742,667
---++	0	100	10	24	3,33	55	42,73,667	5029	7707	4766
---++	0	100	10	24	4,66	35	4448,333	10494	19596,33	10200,67
++---	24	0	4	13,3	3,33	55	5432	8296	14120	9926,333
++---	24	0	4	13,3	4,66	35	4669,333	13721,67	15696	12326
++---	24	0	4	24	3,33	35	5425,667	5036	12432,67	7527
++---	24	0	4	24	4,66	55	4964,667	10306,33	14561	9487
++---	24	0	10	13,3	3,33	35	4827,333	15834	15675,33	12000
++---	24	0	10	13,3	4,66	55	4698,333	9623,667	15484,6	7829
++---	24	0	10	24	3,33	55	4667	10944,33	12604	6841
++---	24	0	10	24	4,66	35	4761,333	11392,33	18971,67	9964,333
++---	24	100	4	13,3	3,33	35	5615	5676,333	12048,67	8041,667
++---	24	100	4	13,3	4,66	55	4729,333	6406	10190,67	6842
++---	24	100	4	24	3,33	55	4918	4094	5869,667	4057,333
++---	24	100	4	24	4,66	35	5823	12712,33	17049,67	9150
++---	24	100	10	13,3	3,33	55	4287	4109	6732,333	4039
++---	24	100	10	13,3	4,66	35	4724,667	6374	11157,33	5757
++---	24	100	10	24	3,33	35	4672,333	9511,333	15455	7734
++---	24	100	10	24	4,66	55	3979,333	3732	5256,667	3812
00000	12	50	7	18,65	3,995	45	4850,833	13233,87	21264,6	11335,3
-0000	0	50	7	18,65	3,995	45	4921	14609,67	27291,67	11625,67
+0000	24	50	7	18,65	3,995	45	4405,667	14558,33	25260	11686
0-000	12	0	7	18,65	3,995	45	4490,333	13230,33	24602,33	11658
0+000	12	100	7	18,65	3,995	45	4585,667	10166	19681,33	8925,333
00-00	12	50	4	18,65	3,995	45	5469,667	9663,333	15432,33	7177,667
00+00	12	50	10	18,65	3,995	45	4450,667	8384,333	16545,67	5780,667
000-00	12	50	7	13,3	3,995	45	4665	10743	21749	10346,33
000+00	12	50	7	24	3,995	45	4551	10010,33	21181,33	8998,667
0000-0	12	50	7	18,65	3,33	45	4614,667	10809,67	23293,33	11219
0000+0	12	50	7	18,65	4,66	45	4811,333	13213	22731,67	10757,33
00000-	12	50	7	18,65	3,995	35	5195	12653	21010,33	8770,667
00000+	12	50	7	18,65	3,995	55	4798,667	11609	20922	8777,333

Tabla 6

Patrón	CTAB mM	DTT mM	pH	% de Tween-20	GITC M	Temp	Neg Fam (VIH)	Neg TR (Ctrl int)	Pos Fam (VIH)	Pos TR (Ctrl int)
-----	0	0	4	13,3	3,33	35	13763	15857	19806	18835
----++	0	0	4	13,3	4,66	55	12691	16123	24121	16359
---+++	0	0	4	24	3,33	55	16384	20296	20057	18493
---++-	0	0	4	24	4,66	35	13143	19288	17052	21522
---+	0	0	10	13,3	3,33	55	16249	20133	22242	22616
---+-	0	0	10	13,3	4,66	35	13593	24713	19682	26061
---+	0	0	10	24	3,33	35	14912	19756	19189	22207
----++	0	0	10	24	4,66	55	15950	27230	18497	24681
----++	0	100	4	13,3	3,33	55	15319	23021	27155	19706
----+-	0	100	4	13,3	4,66	35	16135	24778	26854	20820
----+-	0	100	4	24	3,33	35	17592	21386	27391	20735
----++	0	100	4	24	4,66	55	14416	22597	27652	17980
----++	0	100	10	13,3	3,33	35	12321	17029	27663	18062
----++	0	100	10	13,3	4,66	55	12397	24453	32857	19601
----++	0	100	10	24	3,33	55	13406	23679	28120	19813
----++	0	100	10	24	4,66	35	14247	23632	29093	19725
----++	24	0	4	13,3	3,33	55	14825	22245	27359	21866
----+-	24	0	4	13,3	4,66	35	14557	20537	19770	19482
----+-	24	0	4	24	3,33	35	16013	19770	18575	14349
----++	24	0	4	24	4,66	55	14816	21794	24068	18830
----++	24	0	10	13,3	3,33	35	14828	13285	16079	9985
----++	24	0	10	13,3	4,66	55	14470	19531	16739	21070
----++	24	0	10	24	3,33	55	15201	23681	14966	18047
----++	24	0	10	24	4,66	35	15645	18663	17825	21305
----++	24	100	4	13,3	3,33	35	14931	21110	27690	20362
----++	24	100	4	13,3	4,66	55	13502	17549	29140	16016
----++	24	100	4	24	3,33	55	13904	20313	24367	14119
----++	24	100	4	24	4,66	35	15840	26220	29686	21216
----++	24	100	10	13,3	3,33	55	14098	20319	26624	16095
----++	24	100	10	13,3	4,66	35	15464	27136	34458	17911
----++	24	100	10	24	3,33	35	15052	24848	29940	20050
----++	24	100	10	24	4,66	55	13094	19608	25388	14897
000000	12	50	7	18,65	3,995	45	14548	23128	24077	19954
-00000	0	50	7	18,65	3,995	45	13771	24107	18997	24754
+00000	24	50	7	18,65	3,995	45	12406	23835	17921	21838
0-0000	12	0	7	18,65	3,995	45	12699	23712	19340	24507
0+0000	12	100	7	18,65	3,995	45	13936	25988	26736	19736
00-000	12	50	4	18,65	3,995	45	14715	26245	27755	18442
00+000	12	50	10	18,65	3,995	45	13446	25754	26293	18507
000-00	12	50	7	13,3	3,995	45	12827	23411	23485	18005
000+00	12	50	7	24	3,995	45	13103	23340	25270	20891
0000-0	12	50	7	18,65	3,33	45	13992	24536	24898	21251
0000+0	12	50	7	18,65	4,66	45	14545	25227	25865	21429
00000-	12	50	7	18,65	3,995	35	15186	25297	23463	19417
00000+	12	50	7	18,65	3,995	55	15190	27421	23149	20780

Ejemplo 6 (comparativo)

5 Extracción de ácidos nucleicos de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* en orina

En este ejemplo, se sometieron a extracción ácidos nucleicos de un ml de orina que contenía tanto *Chlamydia trachomatis* como *Neisseria gonorrhoeae* usando el método de óxido de metal descrito anteriormente. También se sometieron a extracción los ácidos nucleicos de muestras de orina usando un equipo de preparación de muestras de orina LCx®. Se sometió a ensayo tanto *Chlamydia trachomatis* como *Neisseria gonorrhoeae* en las muestras sometidas a extracción usando ensayos LCx® de Abbott Laboratories.

Se prepararon las muestras usando orina combinada que se sometió a ensayo de manera que fuera negativa con respecto tanto a *Chlamydia trachomatis* como a *Neisseria gonorrhoeae* usando ensayos ® de Abbott Laboratories. Los paneles de orina positiva se prepararon mediante la adición de provisiones positivas de *C. trachomatis* y *N.*

gonorrhoeae a la orina negativa. El panel de "leve positivo" contenía 0,5 cuerpos elementales (EB) de *C. trachomatis* y 0,5 unidades formadoras de colonia (cfu) de *N. gonorrhoeae* por ml de orina. El panel "positivo intenso" contenía 10 EB de *C. trachomatis* y 10 cfu de *N. gonorrhoeae* por ml de orina.

5 Los respectivos procedimientos de preparación de muestra se llevaron a cabo en muestras de orina de 1 ml a partir de cada uno de los dos paneles de ensayo y del control negativo. El procedimiento de óxido de metal se llevó a cabo mezclando 1 ml de muestra de ensayo de orina con 3 ml de tampón de lisis (isotiocianato de guanidinio 4,3M, Tween-20 18 %, bromuro de cetiltrimetilamonio 12 mM, ditiotreititol 50 mM, Tris 100 mM, pH 7,6) y 5 mg de partículas de Fe₂O₃ (M-2038, ISK Corporation). La mezcla de extracción también contenía 7,5 microgramos de ARN poliA como vehículo. El lisato se incubó a 45 °C durante 20 minutos. Las partículas se capturaron magnéticamente y se retiró el lisato por aspiración. Se lavaron las partículas dos veces con GITC 2M, Tween-20 5 %, acetato de K 50 mM pH 6,0, y dos veces con tampón Tris 50 mM, pH 8,0, azida de Na 0,45 %. Tras aspirar la disolución de lavado, se añadieron 100 microlitros de tampón de elución a los tubos que contenían las partículas lavadas. El tampón de elución fue agua con 0,045 % de azida de Na como conservante. Tras la adición del tampón de elución, se re-suspendieron las partículas mediante pipeteo y se incubó la suspensión a 70 °C durante 20 minutos. Tras la incubación, se capturaron las partículas sobre los lados de los tubos usando un soporte magnético y se retiró el eluyente. A continuación, se diluyeron los 100 microlitros recuperados a partir de la muestra con 900 microlitros de tampón de re-suspensión de muestra de orina LCx® (MgCl₂ 50 mM y detergente). El tampón de re-suspensión se debe añadir a las muestras extraídas para añadir el MgCl₂ necesario para el ensayo. Posteriormente, se usaron 50 microlitros de muestra en los ensayos de LCx® de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* de Abbott Laboratories.

También se prepararon muestras usando un equipo de preparación de muestras de orina LCx®. Se centrifugaron muestras de orina de 1 ml a 9.000 x g durante 15 minutos y se retiró el sobrenadante. Se añadieron 900 microlitros de tampón de re-suspensión de muestra de orina LCx® a la pella y se sometió la muestra a agitación vorticial con el fin de provocar la re-suspensión. Posteriormente, se calentó la muestra a 97 °C durante 15 minutos para liberar el ADN. Tras enfriar, se añadieron 100 microlitros del tampón de elución (agua y azida de Na 0,045 %) usado para el proceso de óxido de metal a las muestras sometidas a extracción con el fin de equilibrar la concentración de componentes de muestras sometidas a extracción de óxido de metal. A continuación, se usaron 50 microlitros de la muestra en los ensayos de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* de Abbott Laboratories. También se sometieron al ensayo los controles positivo y negativo. Los resultados para los ensayos de *Chlamydia trachomatis* incluyeron un control negativo que presentó una señal de 0 y un control positivo que presentó una señal de 1600. La Tabla 7 muestra el resto de resultados para los ensayos de *Chlamydia trachomatis*. Los resultados de los ensayos de *Neisseria gonorrhoeae* incluyeron un control positivo que presentó una señal de 0 y un control positivo que presentó una señal de 950. La Tabla 8 muestra el resto de los resultados para los ensayos de *Neisseria gonorrhoeae*. Se llevó a cabo el proceso de óxido de metal así como el método estándar de extracción para los ensayos de LCx® para ambos tipos celulares.

Tabla 7

Tipo de ensayo & concentración de muestra	Valor
Orina negativa LCx®	0
Orina positiva leve LCx®	1000
Orina positiva intensa LCx®	1900
Orina negativa Fe ₂ O ₃	0
Orina positiva leve Fe ₂ O ₃	1400
Orina positiva intensa Fe ₂ O ₃	1900

40

Tabla 8

Tipo de ensayo & concentración de muestra	Valor
Orina negativa LCx®	0
Orina positiva leve LCx®	450
Orina positiva intensa LCx®	1000
Orina negativa Fe ₂ O ₃	0
Orina positiva leve Fe ₂ O ₃	500
Orina positiva intensa Fe ₂ O ₃	1000

Listado de secuencias

45

<110> Gundling, Gerard

<120> Método y equipo de aislamiento de ácido nucleico

50

<130> 6653 US.O1

<160> 6
 <170> FastSEQ para Windows versión 3,0
 5 <210> 1
 <211> 29
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de avance VIH
 15 <400> 1
 attccctaca atcccaaag tcaaggagt 29
 20 <210> 2
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador inverso de VIH
 <400> 2
 cctgcactgt acccccctaat cc 22
 35 <210> 3
 <211> 28
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Sonda guía de VIH
 <400> 3
 gcgagacagc agtacaaatg gcactcgc 28
 50 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de avance HBV
 60 <400> 4
 tcttcggag tgtggattcg cac 23
 <210> 5
 65 <211> 27

- <212> ADN
- 5 <223> Cebador inversor de HBV
- <400> 5
ctaacattga gattcccgag attgaga 27
- 10 <210> 6
- <211> 34
- <212> ADN
- 15 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Sonda guía de HBV
- 20 <400> 6
ctcgctccc tagaagaaga actcctcgg cgag 34

REIVINDICACIONES

1. Un método independiente de pH para separar ácido nucleico de una muestra de ensayo que comprende:

- 5 (a) poner en contacto una muestra de ensayo con un material de soporte de óxido de metal con un tampón de enlace para formar complejos de ácido nucleico/material de soporte de óxido de metal, en el que el tampón de enlace comprende un agente caotrópico, un disolvente orgánico y un detergente y el punto de inflamación del tampón de enlace es mayor que 54,4 °C (130 °F);
- 10 (b) separar los complejos de la muestra de ensayo; y
(c) eluir el ácido nucleico del material de soporte de óxido de metal,

en el que la etapa (a) permite que los ácidos nucleicos se empleen directamente en una reacción de multiplicación sin cambiar el tampón de elución.

15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el tampón de enlace comprende además un agente reductor.

3. El método de la reivindicación 1, que además comprende una etapa de lavado después de la separación de los complejos de la muestra de ensayo y antes de eluir el ácido nucleico del material de soporte de óxido de metal.

20 4. El método de la reivindicación 1, en el que la elución del ácido nucleico del material de soporte de óxido de metal comprende poner en contacto los complejos con un reactivo que se escoge entre agua o un tampón que contiene fosfato.

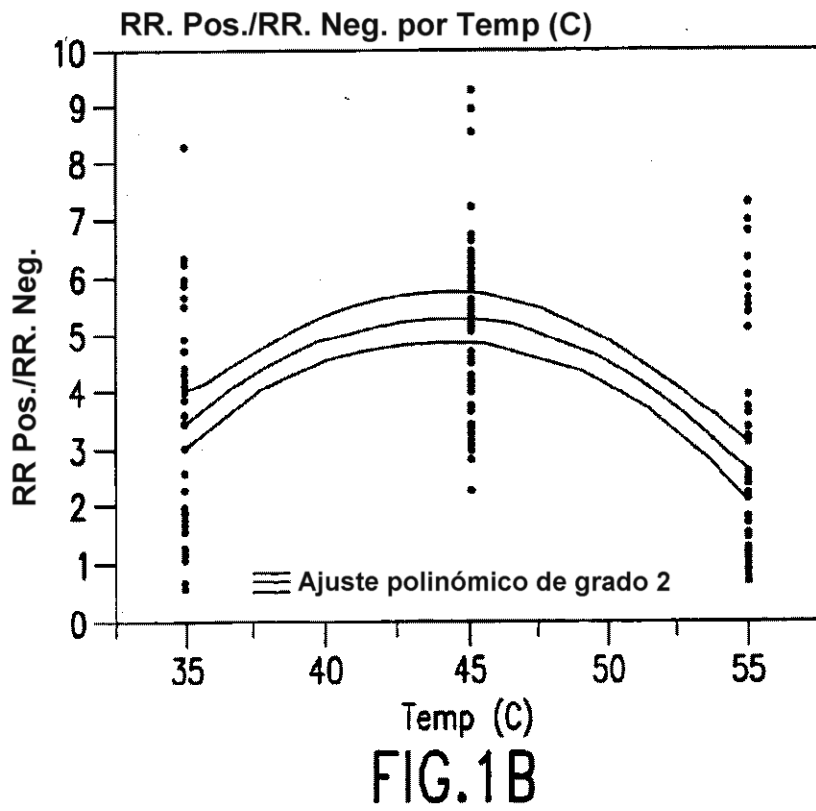
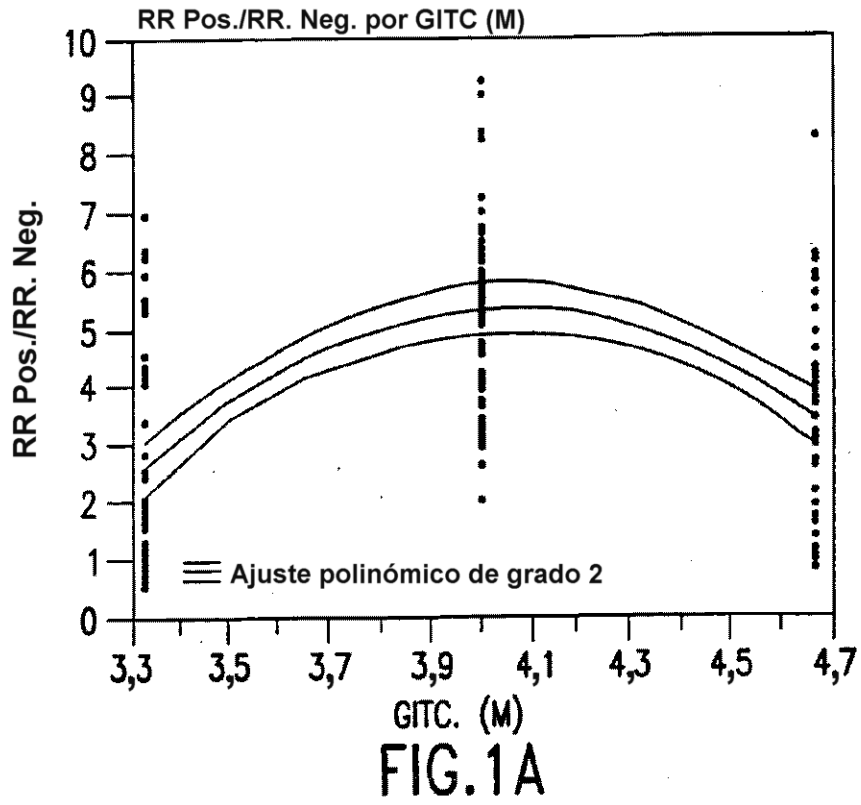
25 5. El método de la reivindicación 4, que además comprende la etapa de detectar el ácido nucleico después de eluir el ácido nucleico del material de soporte de óxido de metal.

6. El método de la reivindicación 5 que además comprende la etapa de multiplicar el ácido nucleico después de eluir el ácido nucleico del material de soporte de óxido de metal y antes de detectar el ácido nucleico.

30 7. El método de la reivindicación 5, en el que el ácido nucleico comprende un ácido nucleico procedente de distintas fuentes.

8. El método de la reivindicación 7, en el que el ácido nucleico es ARN y ADN.

35



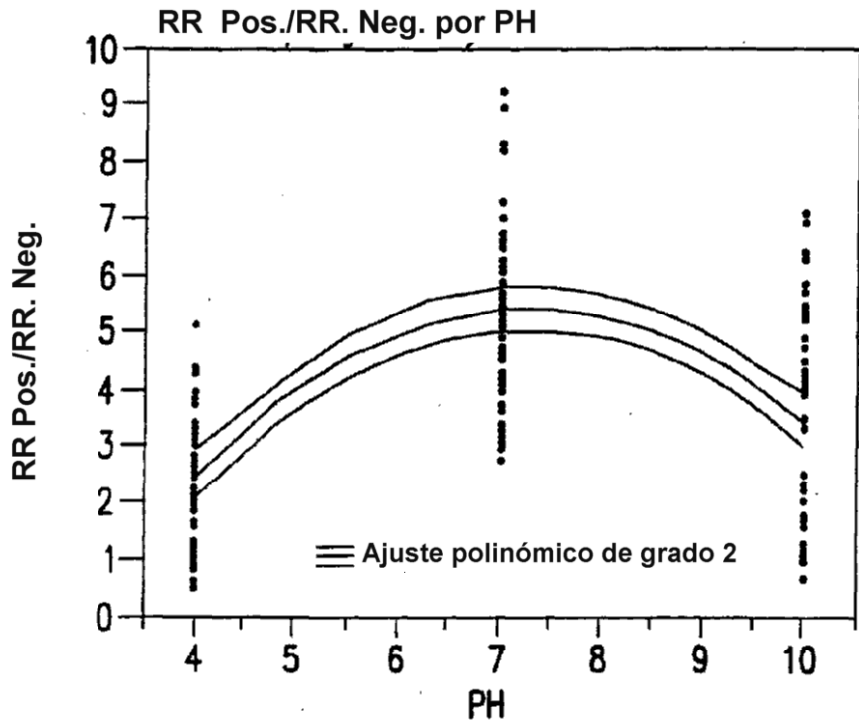


FIG.1C

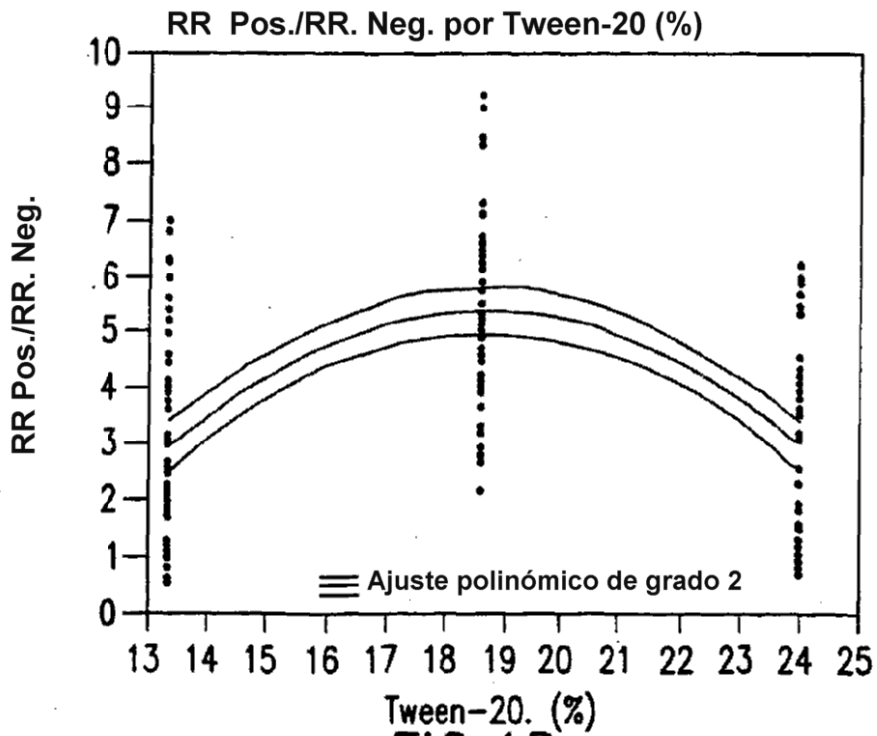


FIG.1D

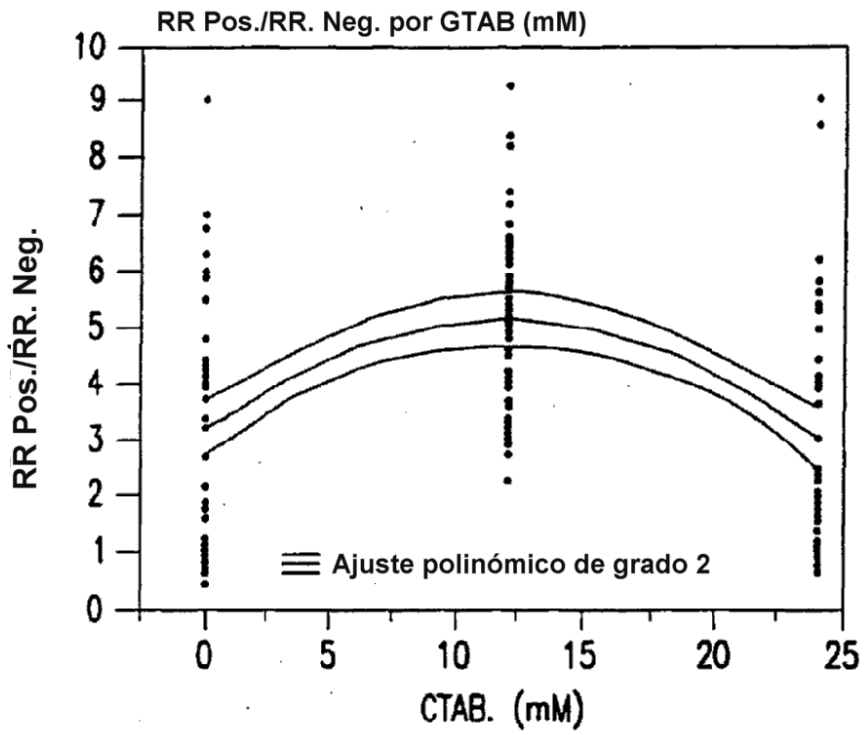


FIG.1E

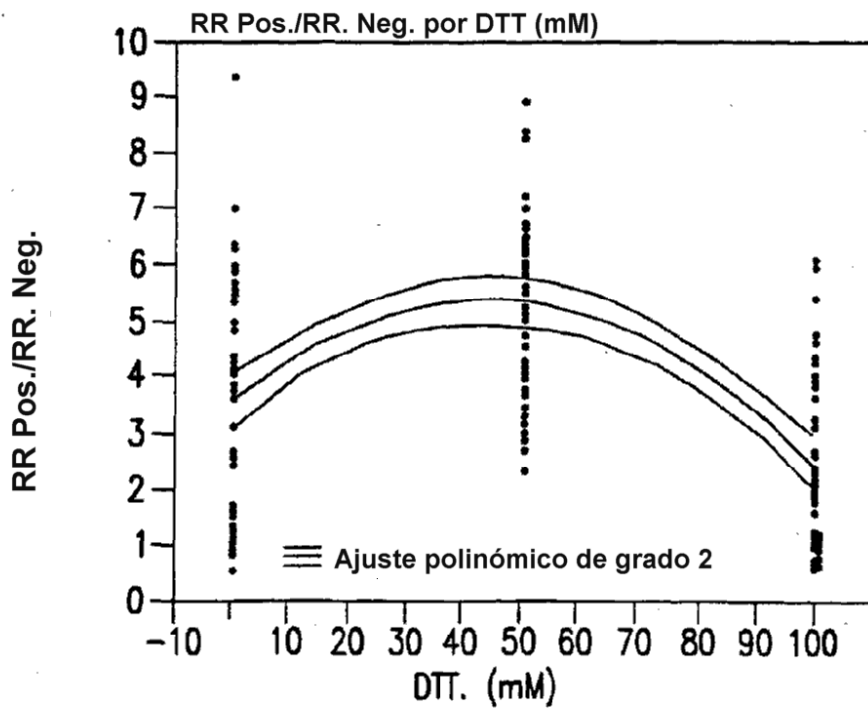


FIG.1F

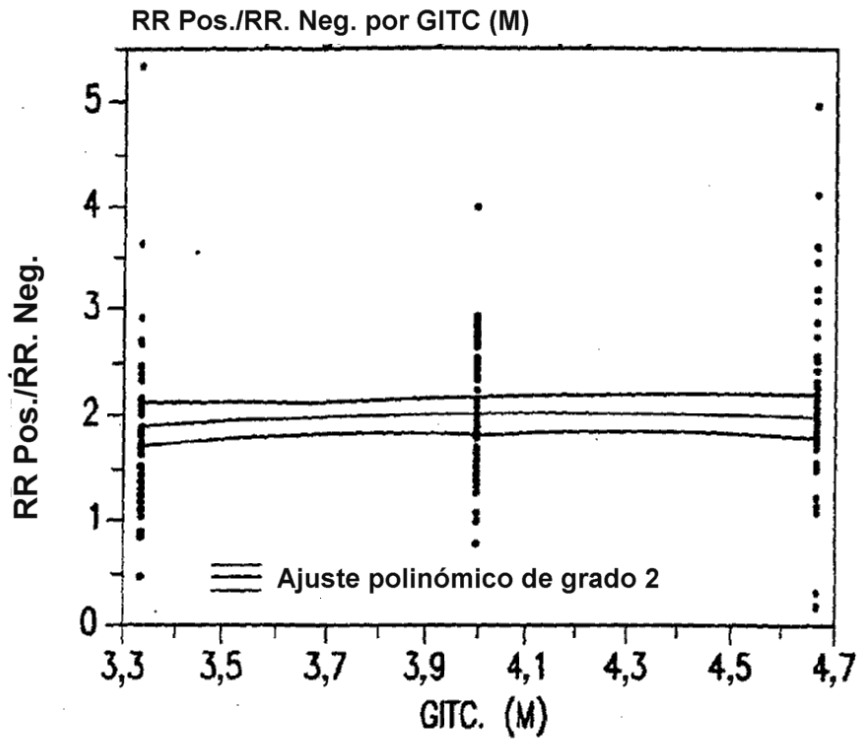


FIG.2A

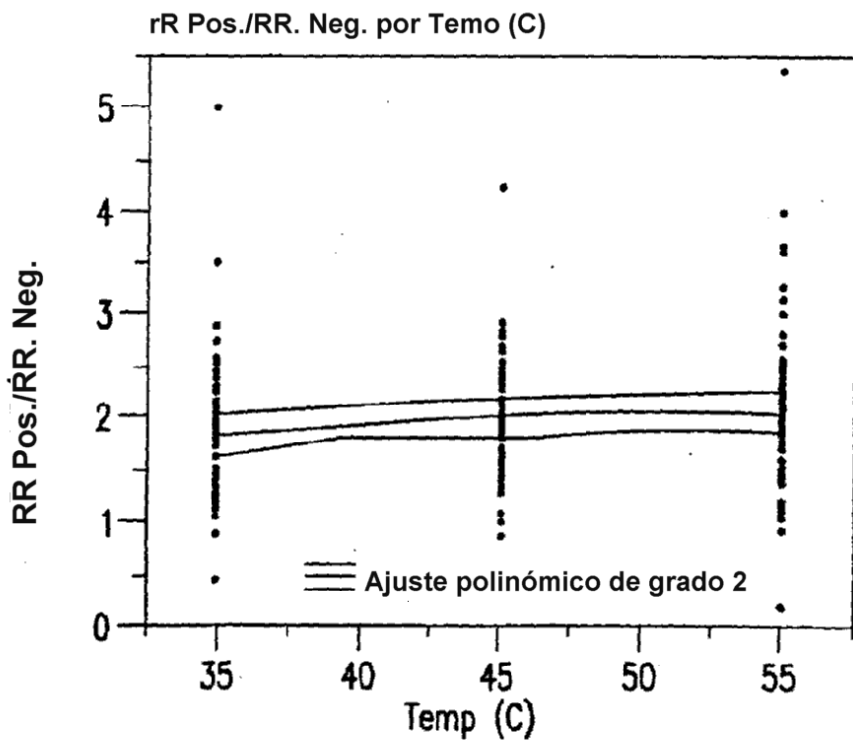


FIG.2B

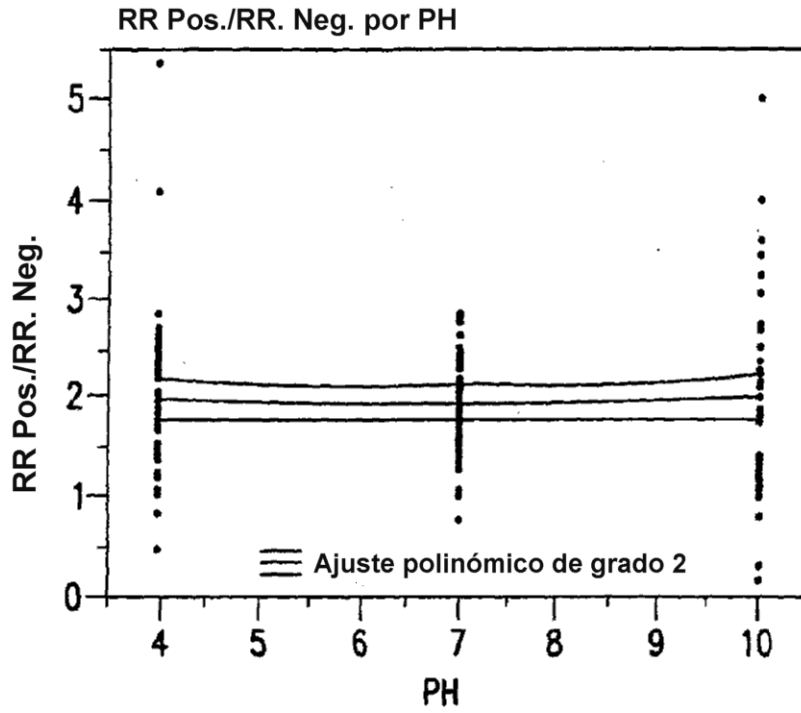


FIG.2C

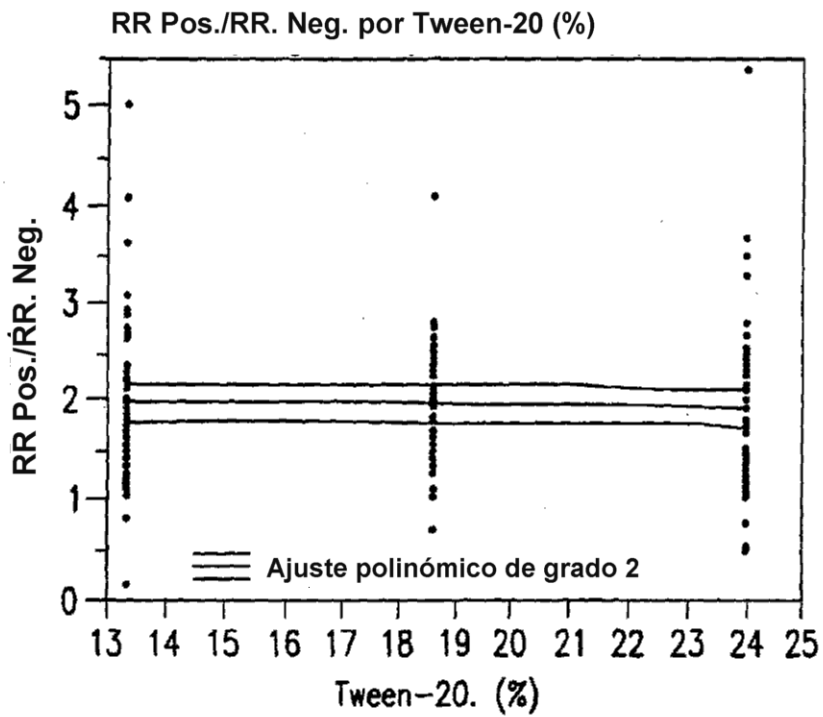


FIG.2D

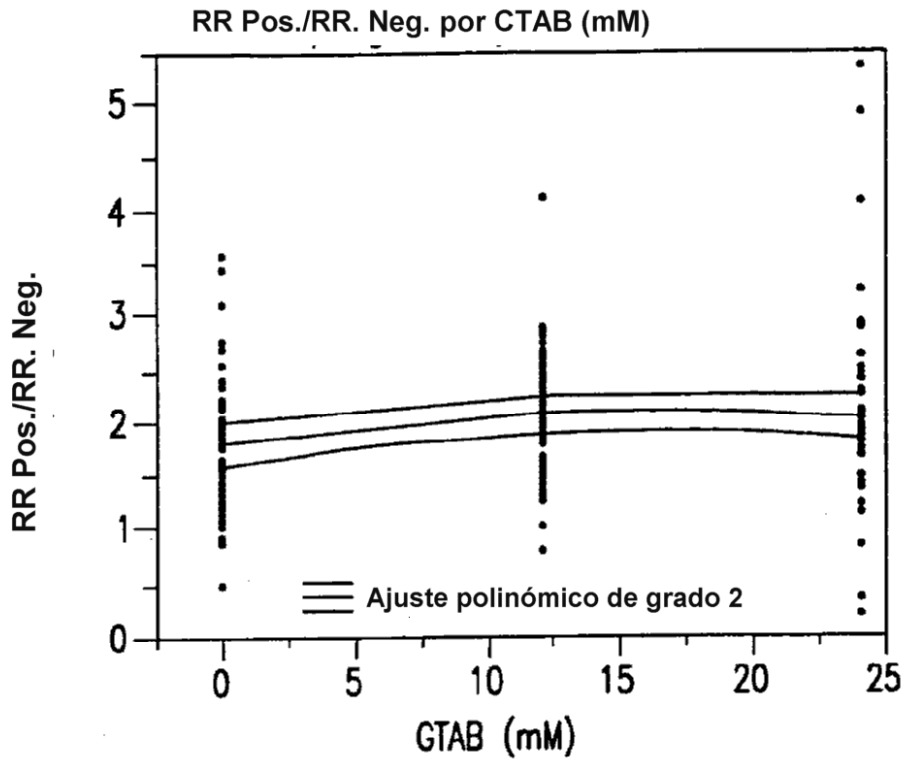


FIG. 2E

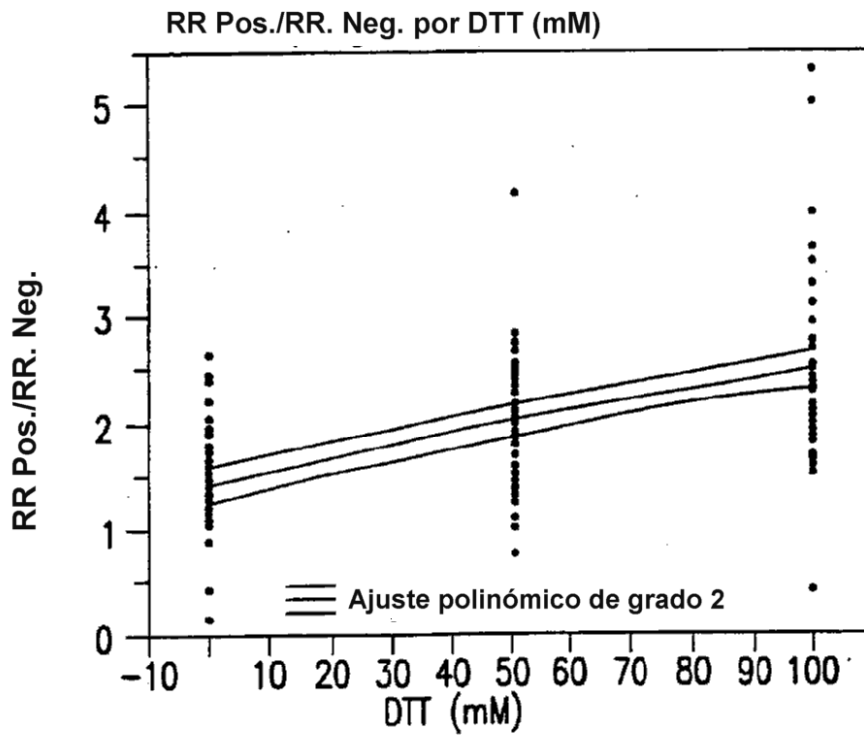


FIG. 2F