



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 502**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C07H 1/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06101611 .9**
96 Fecha de presentación : **13.05.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1679383**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2006**

54 Título: **Método y dispositivo para purificar ácidos nucleicos.**

30 Prioridad: **15.05.1998 GB 9810403**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.10.2011

73 Titular/es: **MILLIPORE CORPORATION**
290 Concord Road
Billerica, Massachusetts 01821, US

72 Inventor/es: **Hood, Robert Gordon**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 366 502 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

La presente invención se refiere a la separación de ácidos nucleicos a partir de células enteras en una muestra. En particular, se refiere a la recuperación de ADN genómico a partir de células provenientes de una muestra de sangre de un paciente.

5 Las técnicas actuales de separación de los ácidos nucleicos en una muestra pueden ser lentas y costosas, con pasos individuales de lisis celular, lisis nuclear, precipitación de proteínas, rehidratación del ADN y digestión del ARN. Uno de los muchos equipos disponibles para la purificación del ADN genómico a partir de, por ejemplo, muestras de sangre entera es el equipo de purificación de ADN genómico Wizard (RTM) vendido por Promega. Un equipo con la cantidad suficiente para purificar 50 muestras de 3 ml puede ser muy caro y el protocolo lleva unos 45 minutos. Existen
10 otras técnicas, pero normalmente llevan más tiempo y tienen que emplearse proteinasas o disolventes orgánicos, o bien emplear columnas o resinas para purificar fracciones de una muestra.

En WO 96/17673 se revela un equipo de microfiltración con el cual se pueden filtrar volúmenes pequeños, y que comprende una membrana de fibras huecas montada sobre un tapón sólido y capaz de comunicarse con los dos extremos del tapón.

15 En WO 95/02049 se revela un método de purificación usando células de un compuesto diana tal como un ácido nucleico, en donde el método comprende:

- 1) La lisis de una suspensión celular para formar un lisado celular que contiene el compuesto diana;
- 2) La aplicación del lisado celular a un filtro para eliminar las células no deseadas y los desechos celulares;
- 20 3) Poner en contacto el lisado filtrado con una matriz en fase sólida bajo condiciones tales que se enlace el ácido nucleico a la matriz;
- 4) La separación del lisado filtrado obtenido de la matriz; y
- 5) Elución del compuesto diana de la matriz.

25 A partir de un primer aspecto, la presente invención ofrece un método de filtración de una muestra líquida que contiene una o más células y la purificación de los ácidos nucleicos en la célula o células en la muestra que comprende el paso de la muestra a través de una superficie de al menos una membrana contenida dentro de un equipo de filtración de flujo cruzado que tiene una entrada de la muestra y una salida de la muestra, en donde la ruta de la entrada a la salida está ocluida parcialmente por al menos una membrana para generar una presión transmembrana, rompiendo las membranas celular y nuclear de la célula o células para liberar los ácidos nucleicos de la célula o células sobre la
30 membrana o membranas indicadas o en las mismas, recuperando y purificando los ácidos nucleicos.

La presente invención supone una mejora con respecto al estado anterior de la técnica, ofreciendo un método novedoso para purificar los ácidos nucleicos a partir de células enteras en una muestra. Según la presente invención, se ofrece un método para la purificación de ácidos nucleicos a partir de células enteras en una muestra que comprende el paso de la muestra a través de la superficie de al menos una membrana porosa contenida en un equipo de filtración que
35 posee una entrada y una salida de la muestra, y la ruta entre la entrada y la salida está ocluida parcialmente por la membrana o membranas, generando una presión transmembrana.

La técnica del flujo de filtración a través de la superficie de una membrana se conoce generalmente como "filtración de flujo cruzado" (véase por ejemplo, Hood, R., 1998, *New Frontiers in Screening for Microbial Biocatalysts*, 77-86; WO 96/04067; WO 96/04068; WO 96/17673; WO 96/20402). El presente inventor ha descubierto que,
40 sorprendentemente, esto puede usarse para romper las membranas celulares y nucleares con el fin de purificar los ácidos nucleicos. Mediante la oclusión sólo parcial de la ruta entre la entrada y la salida, esto es, permitiendo el flujo alrededor de la membrana o membranas, es posible que pedazos más grandes de desechos celulares pasen alrededor de la membrana en lugar de tapar los poros. No sólo se rompen las células, sino que se depositan los ácidos nucleicos contenidos en las mismas sobre la superficie e interior de la membrana. Los experimentos (más adelante) han demostrado que la membrana retiene una proporción muy alta de ácidos nucleicos celulares. Más aún, en pruebas
45 (véase más adelante) usando marcadores de peso molecular como estándares de comparación, se ha demostrado también que el peso molecular promedio del ADN recuperado es muy alto, lo que indica que aunque las fuerzas de corte ejercidas sobre las células son suficientes para romper las membranas celulares y nucleares, no son tan altas como para causar un corte extenso de los ácidos nucleicos.

50 Esto es especialmente importante durante las pruebas posteriores de los ácidos nucleicos recuperados, ya que las cadenas dañadas podrían no presentar un sitio de enlace apropiado (por ej., epítipo) o no presentar una secuencia suficiente para el enlace específico del cebador en RCP y la elongación con el fin de efectuar la amplificación.

Se requiere una presión transmembrana mínima de 0,25 bar para efectuar la ruptura celular. Al aumentar la presión transmembrana, la ruptura es más eficiente, se observa un aumento ligero en el corte de los ácidos nucleicos y,
55 a presiones más altas, puede ocurrir la deformación de la membrana. Al aumentarse la presión transmembrana, también se observa que una mayor cantidad de ácidos nucleicos se depositan en los poros/intersticios de la membrana de

filtración, y a presiones transmembrana altas es posible que los ácidos nucleicos, especialmente los tramos más cortos de los mismos, se forzasen completamente a través de la membrana y, por lo tanto, no fuesen retenidos sobre la misma. Debido a todo esto, parece que una presión transmembrana máxima de aproximadamente 1,25 bar es apropiada, aunque por supuesto la presión transmembrana máxima de un equipo particular podría determinarse fácilmente usando experimentos sencillos.

El examen de las membranas usando un microscopio óptico ha demostrado que su superficie está cubierta por ácidos nucleicos y no se observan otros componentes celulares.

La eliminación de otros componentes celulares puede mejorarse mediante el empleo de membranas que poseen un lumen (por ej., membranas de fibras huecas), ya que permiten la salida del filtrado a través del lumen. Por ejemplo, un extremo de una membrana de fibra hueca (o series de membranas de fibra hueca) puede sellarse y el otro extremo de la membrana o membranas conectarse a un estrangulador de lumen para permitir el escape del filtrado cuando la presión es lo suficientemente alta para abrir el estrangulador. Por ejemplo, podrá emplearse un equipo con un estrangulador de salida de 0,5 bar con una salida de lumen con un estrangulador de 0,25 bar. Alternativamente, la presión requerida para abrir el estrangulador de lumen podría ser mayor que la de la válvula de salida, en cuyo caso los ácidos nucleicos se depositarán predominantemente sobre la parte externa de la membrana en lugar de en los poros/intersticios. Una presión demasiado baja para abrir el estrangulador de lumen podría tener como resultado una presión transmembrana demasiado alta, lo que a su vez causaría un aumento en el corte de los ácidos nucleicos y la pérdida de los mismos a través de la salida de lumen. Una persona conocedora de las técnicas podría determinar fácilmente los valores apropiados para los estranguladores de salida y lumen usando experimentos sencillos.

En los experimentos (véase más adelante) también se ha demostrado que la amplificación RCP puede dar resultados al hacerse directamente sobre las membranas que contienen los ácidos nucleicos unidos; el ARN podría amplificarse usando un paso inicial de transcripción inversa. Las técnicas de RCP se conocen bien (PCR (Volumen 1): *A practical approach*. Eds. M.J. McPherson, P. Quirke y G.R. Taylor. Oxford University Press, 1991) y pueden usarse fácilmente.

La sencilla metodología de la presente invención implica que el equipo usado puede ser relativamente barato. Es importante que los ácidos nucleicos, especialmente el ADN genómico, pueden recuperarse a partir de una muestra, por ejemplo una muestra de sangre entera, en un tiempo muy corto; en los experimentos (véase más adelante) se demuestra que los ácidos nucleicos pueden separarse de 5 muestras de 1 ml en unos 2 minutos.

Naturalmente, es deseable recuperar la cantidad más alta posible de ácidos nucleicos en una muestra y por lo tanto, la membrana o membranas podrán ocluir la mayoría de la ruta entre la entrada y la salida. Por ejemplo, la membrana podría ocupar al menos 90% del área transversal del equipo de filtración entre la entrada y la salida. De esta manera, se obtiene el máximo contacto celular con la membrana (y, por lo tanto, la ruptura celular y recuperación de ácido nucleico), mientras que se permite el flujo de desechos celulares alrededor de la membrana, asegurando así que los ácidos nucleicos finales enlazados a la membrana estén casi libres de impurezas. También podría ser deseable llenar previamente el equipo de filtración con, por ejemplo, un amortiguador apropiado antes de introducir la muestra, con el fin de ejercer presión sobre la totalidad de la muestra mientras circula entre la entrada y la salida. Igualmente, podrá usarse un paso de enjuague después de la introducción de la muestra al equipo de filtración con el fin de asegurar que toda ella (excepto la retenida por la membrana) circula hasta la salida.

Los poros en la membrana actúan para permitir la creación de una diferencia de presión transmembrana y permitir la captura de los ácidos nucleicos. Los poros también pueden permitir que los pedazos más pequeños de desechos celulares circulen fácilmente hasta la salida. Los poros podrían tener un peso molecular límite (PML) de 10^5 – 10^7 Dalton, por ejemplo, unos 10^6 Dalton.

Entre los ejemplos de membranas que pueden emplearse se tienen una membrana de polipropileno con un diámetro de poro de 0,2 μm (por ejemplo, suministrada por AKZO NOBEL) y membranas de polisulfona modelos ULF 1 millón y ULF 750 suministradas por A/G Technologies Corp., EE.UU., así como los modelos 9002 y 9005 suministrados por Fresenius A.G. (St. Wendel, Alemania). Las membranas no deberán repeler los ácidos nucleicos y por esto podría ser necesario pretratarlas para asegurar que sean hidrófilas y/o tengan una carga positiva. En el caso de las membranas de polipropileno, podrán pre-remojarse en una solución al 20% de Tween. Podrían usarse membranas que tienen superficies gruesas con el fin de mejorar la ruptura de las membranas celulares y nucleares. Si fuese necesario esto podría hacerse mediante el pretratamiento de las membranas.

Pueden emplearse diversos tipos de membranas, por ejemplo membranas (hojas) planas y membranas de fibras huecas.

Las membranas pueden tratarse con agentes que detectan ácidos nucleicos particulares o secuencias de los mismos. Por ejemplo, podría pretratarse una membrana con un anticuerpo específico contra una secuencia del ARN. El enlace del ARN al anticuerpo podría detectarse posteriormente mediante un cambio en la absorción/fluorescencia por el anticuerpo. Se conocen ampliamente los anticuerpos, su fabricación y usos (Harlow, E. y Lane, D., "Antibodies – A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, Nueva York, 1988). Alternativamente, podría hacerse un análisis del tipo ELISA. También, podría aplicarse un primer anticuerpo a los ácidos nucleicos purificados sobre la membrana. Después del lavado para eliminar los anticuerpos enlazados no específicamente, podría aplicarse un segundo anticuerpo específico contra el primero, habiéndose conjugado el segundo anticuerpo a una

molécula de señalización como luciferasa, proporcionando así una señal de detección amplificada. Podría usarse una sonda de captura con ADN polimerasa, que sirve como sonda de captura para las secuencias de ADN diana o complementarias dentro del instrumento sobre el ADN inmovilizado sobre la superficie de la membrana (por ej., Mosaic Technologies Inc. Acrydite DNA Gel).

5 En el caso de las membranas de fibra hueca, es posible pasar un reactivo o series de reactivos a través del volumen de la fibra. Estos reactivos podrían detectar, por ejemplo, secuencias específicas de ADN o ARN. Pueden seleccionarse los reactivos en combinación con la membrana para evitar que escapen de ella durante su recorrido dentro de la misma, asegurando así que sólo los materiales (esto es, ácidos nucleicos) unidos a la membrana entran en contacto con los reactivos.

10 La presente invención emplea un equipo de filtración que tiene una entrada y una salida de la muestra, donde la ruta entre la entrada y la salida está ocluida parcialmente por al menos una membrana porosa, y durante su empleo, este equipo producirá una presión transmembrana de al menos 0,25 bar. El equipo de filtración podrá emplearse en un método de purificación de ácidos nucleicos. Este equipo de filtración podría usarse en un método de purificación de ácidos nucleicos según la presente invención.

15 Los equipos típicos de filtración usados según la presente invención comprenden una entrada y una salida (hechas de PVC) con un diámetro interno de 1,25 mm, la salida está equipada con un estrangulador de 0,5 bar. La entrada y la salida están en posición perpendicular al cuerpo principal del equipo de filtración y en los extremos opuestos a él. La longitud total del cuerpo principal (diámetro interno: 3,25 mm) es 60 mm y la entrada y la salida están separadas por 30 mm. A lo largo del cuerpo principal se encuentran distribuidas 14 fibras de membrana de polisulfona tipo ULF 750 ó 1 millón, o 9002 (Fresenius A.G., St. Wendel, Alemania), con una superficie total de 6,28 cm².

20 Un equipo alternativo tiene las mismas dimensiones físicas que el anterior, pero la longitud total del cuerpo principal contiene 6 fibras de una membrana de polisulfona tipo ULF 750 ó 1 millón, o 9005 (Fresenius A.G.), proporcionando una superficie total de la membrana de 6,28 cm².

25 Un equipo alternativo tiene las mismas dimensiones físicas que el anterior, pero la longitud total del cuerpo principal contiene 4 fibras de polipropileno con un tamaño de poro de 0,2 µm, proporcionando una superficie total de la membrana de 6,28 cm².

30 Las membranas que tienen un tamaño de poro más grande (por ej., ULF 1 millón) son útiles en la purificación de ácidos nucleicos que tienen una longitud promedio mayor en comparación con las membranas que tienen un tamaño de poro más pequeño (por ej., ULF 750). Parece que esto se debe a la turbidez de la muestra: las muestras turbidas (por ejemplo sangre que se ha coagulado parcialmente) requieren más fuerza para pasar a través del equipo de la presente invención que las muestras menos turbidas (por ej., sangre fresca). Cuanta más fuerza es necesaria, un mayor daño mecánico se ocasiona a los ácidos nucleicos que se están purificando, y por lo tanto, se obtiene una longitud promedio más corta de los ácidos nucleicos purificados. De forma similar, con una membrana con un tamaño de poro pequeño se requerirá más fuerza para eliminar de la membrana las partes que no son ácidos nucleicos de la muestra que se está purificando, de manera que se causa mayor daño mecánico y se purifican fragmentos más cortos de ácido nucleico.

35 Como se mencionó anteriormente, cuando se emplean fibras huecas, pueden ofrecerse salidas adicionales de lumen para eliminar el filtrado recogido en los lúmenes de las membranas de filtración.

40 También en la presente invención se proporciona el uso de un equipo de filtración según la presente invención en un método de purificación de ácidos nucleicos según la presente invención.

45 Una vez que se han capturado los ácidos nucleicos sobre una membrana usando el método de la presente invención, no sólo podrán ser analizados y, por ejemplo, su secuencia determinada como se indica anteriormente, sino que también podrán eluirse de la membrana. A tal fin podrá aplicarse una corriente eléctrica a una solución que rodea la membrana. Por ejemplo, podrá aplicarse una corriente CC de 0,2 amps a 1000 voltios, haciendo que los ácidos nucleicos capturados sobre la membrana se disocien de ella. Una vez en solución, podrán procesarse los ácidos nucleicos adicionalmente. Por supuesto que la naturaleza exacta de la corriente eléctrica aplicada a los ácidos nucleicos capturados podrá variarse del ejemplo dado anteriormente, y las condiciones apropiadas serán fácilmente aparentes para los expertos en este campo. Por ejemplo, se ha descubierto que existe una relación inversamente proporcional entre el tamaño promedio de las moléculas del ácido nucleico a eluirse y el voltaje que tiene que aplicarse con el fin de eluirlos; esto es, las moléculas de ácido nucleico más cortas requieren la aplicación de voltajes más altos que las moléculas de ácidos nucleicos más largas. Sin desear establecer restricciones debido a un razonamiento particular, parece que las moléculas de ácidos nucleicos más largas tienen menos puntos de contacto con la membrana por unidad de longitud que las moléculas más cortas de ácidos nucleicos, por lo que requieren una corriente eléctrica menor para separarse de la membrana.

55 La capacidad de eluir ácidos nucleicos de la membrana una vez que se han separado de las células enteras en una muestra implica que pueden purificarse los ácidos nucleicos en un gran volumen de fluido de, por ejemplo, sangre entera, y después eluirse en un volumen relativamente pequeño de fluido, lo que facilita y simplifica el análisis posterior.

5 Ya que las diferentes moléculas de ácidos nucleicos poseen diferentes características físicas, al eluir los ácidos nucleicos, diferentes ácidos nucleicos (por ej., ADN bacteriano y ADN genómico humano) pueden separarse entre sí usando una corriente eléctrica apropiada (esto es, haciendo una electroforesis), por ejemplo, usando una corriente CA, variando opcionalmente su frecuencia (véase "Shock Treatment", New Scientist, 6 de junio de 1998; "Devilish tricks with tiny chips", New Scientist, 1 de marzo de 1997, pág. 22; y la bibliografía incluida en esta obra).

La corriente CA puede tener una frecuencia entre 100 hercios y 10 megahercios. Por ejemplo, una corriente de 100 kilohercios aplicada a lo largo de la membrana hará que el ADN bacteriano se mueva en relación con el ADN genómico humano, y viceversa.

10 Los métodos e instrumentos de la presente invención pueden usarse conjuntamente con la tecnología de chip genético; una vez que se han purificado los ácidos nucleicos por recolección en la superficie de la membrana, puede ponerse en contacto con un chip genético, y éste podrá analizarse posteriormente para determinar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos específicos en los ácidos nucleicos purificados.

15 Alternativamente, puede ponerse un chip genético en la superficie de la membrana o membranas porosas. Después de hacerse la purificación, los ácidos nucleicos no hibridizados pueden eliminarse y analizarse el chip genético.

Este uso de la tecnología de chip genético puede ofrecer un análisis extremadamente rápido de una muestra que contiene células enteras, permitiendo la recolección, purificación y análisis de los ácidos nucleicos de las células en un equipo único y en un tiempo extremadamente corto.

20 Con el fin de mejorar la recolección de los ácidos nucleicos sobre las membranas porosas, dichas membranas pueden hacerse girar durante la purificación, asegurando así una distribución homogénea de los ácidos nucleicos purificados y previniendo la acumulación de un exceso de ácidos nucleicos en cualquier punto (y la pérdida de eficiencia que podría acompañar dicha acumulación).

25 La invención será más aparente a partir de la siguiente descripción, haciéndose referencia a las varias figuras de los dibujos adjuntos, donde se muestra, sólo como ejemplo, una forma de purificación de los ácidos nucleicos. De las figuras:

Figuras 1 y 2 muestran los equipos usados según la presente invención;

Figura 3 muestra una vista en planta a través de la sección I-I de la Figura 1; y

Figuras 4 y 5 muestran los ácidos nucleicos (10) recogidos en la superficie de una membrana (20);

30 Figura 6 muestra un equipo para el uso en la presente invención, que tiene los medios para hacer girar las membranas y para aplicar una corriente eléctrica a lo largo de ellas.

Experimentos

5 En los siguientes experimentos se detalla la purificación de ADN a partir de una muestra de sangre ovina entera con un tiempo total de procesamiento de unos 2 minutos. Mediante electroforesis en gel se demostró que el ADN recogido no había sufrido demasiado corte, y una proporción muy alta de dicho ADN tiene una longitud de al menos 23 kb. La espectroscopia de absorción demuestra que se recoge al menos 60% del ADN disponible en una muestra. Las pruebas por RCP demuestran que el ADN eluido es funcional, pudiendo ser amplificado por RCP. Mediante microscopia óptica se demostró que el ADN purificado por la membrana casi no contenía contaminantes como desechos celulares.

Por lo tanto, la técnica ejemplificada a continuación podrá usarse para purificar rápida y económicamente los ácidos nucleicos en células enteras contenidas en una muestra.

10 *Equipo de filtración*

El equipo de filtración (Figura 1) usado comprende un cuerpo principal 100, entrada 110, salida 120 con un estrangulador de 0,5 bar 121 que sólo se abre al ejercerse una presión de al menos 0,5 bar. Las membranas de filtración 130 comprenden 4 fibras huecas de polipropileno con un diámetro del poro de 0,2 μm y una superficie total de 6,28 cm^2 . El filtrado sale por la salida del filtro 120, entrando a una cámara de recolección 140.

15 Un equipo de filtración alternativo (Figura 2) comprende un cuerpo principal 100, entrada 110, salida 120 con un estrangulador de 0,5 bar 121, 4 membranas de fibra hueca de polipropileno 130 con un diámetro de poro de 0,2 μm , sellado en un extremo 131 y conectado a una salida de lumen 150 equipada con un estrangulador de 0,25 bar 151. Las partículas pequeñas que pasan al lumen de las membranas 130 pueden salir a través de la salida de lumen 150, por ej., para la recolección o análisis posterior.

20

Purificación del ácido nucleico

Se pasaron 5 muestras de 1 ml de sangre ovina entera a través de un equipo de filtración (arriba). El tiempo total transcurrido para el paso de la muestra de 5 ml a través del equipo fue de 2 minutos.

Electroforesis en gel

5 Se preparó un gel de agarosa al 0,8% usando agarosa al 0,8% y 1 alícuota de amortiguador TBE (0,8 g de agarosa/100 ml de amortiguador). Se cortó la membrana de filtración de la etapa de purificación en secciones y se colocó en la parte superior del gel y se llenó un canal con marcadores de peso molecular. Se aplicaron 125 V al gel durante 30 min. La tinción del ADN mostró una banda a 700 bp y se observó una tinción intensa en la parte superior del gel donde se habían colocado las secciones de la membrana. Esto indica que las cadenas de ADN pueden ser recolectadas por las membranas.

10 Se repitió el experimento, corriéndose el gel a 125 V durante 1,5 días y nuevamente se observó una tinción intensa del ADN en la parte superior del gel donde se encontraban las secciones de la membrana, lo que sugiere además la presencia de cadenas de ADN de peso molecular muy alto.

15 Se colocaron las membranas (que llevan el ADN purificado) en un eppendorf que contenía 300 μ l de agua, el que a su vez se colocó a baño María a 37 °C durante 30 minutos para eluir los ácidos nucleicos. Después, se eliminó la solución y se añadieron 30 μ l de acetato de sodio 3M a pH 5,4 y 900 μ l de etanol, manteniéndose a -80 °C durante 5 minutos para precipitar el ADN. Este ADN precipitado se granuló mediante rotación a 13.000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el granulado y se corrió la suspensión sobre gel de agarosa al 0,8% a 125 V durante 1 hora conjuntamente con los marcadores de peso molecular. La visualización del ADN mostró una mancha general a tamaños superiores a 23 kb.

Recuperación del ADN

Se eluyó el ADN de una membrana como la descrita anteriormente y la masa de ADN recuperado se calculó usando espectroscopia de absorción. Esto demostró la recuperación de más del 60% del ADN total disponible por ml de sangre de la membrana.

Análisis por RCP

25 Se hizo el RCP tanto con ADN genómico inmovilizado y eluido obtenido a partir de 5 ml de sangre ovina. El ADN se purificó a partir de sangre ovina entera como se indicó anteriormente y se hizo la elución usando agua o soluciones salinas, como se ha indicado anteriormente. Las condiciones del RCP fueron: 1 alícuota de amortiguador de Taq polimerasa, 100 pmol de CREb (proteína de enlace del elemento de respuesta del monofosfato de adenosina cíclica), 0,625 nM MgCl₂, 0,25 mM dNTPs, 2,5 U Taq polimerasa y plantilla de ADN genómico. Después, se colocó la mezcla de reacción a 94 °C durante 5 minutos para desnaturalizar el ADN, seguidos de 20 ciclos de 2 minutos a 94 °C, 2 minutos a 50 °C y 2 minutos a 72 °C. El tamaño esperado del producto de CREB es 490 bp. Al analizarse una muestra de la reacción completa de RCP en un gel de agarosa al 1,2%, se observó un fragmento de 490 bp tanto en las reacciones de RCP con ADN genómico inmovilizado como eluido. El control negativo bajo las mismas condiciones de reacción que las anteriores, pero sin la adición de la plantilla de ADN no mostró producto RCP, verificándose así la especificidad de los cebadores y la funcionalidad del ADN genómico.

Microscopía óptica

5 Se sacaron las membranas de los equipos de filtración después de la purificación del ácido nucleico como se indicó anteriormente, se cortaron en secciones y se pusieron bajo un microscopio óptico. En las Figuras 3 y 4 se muestran las secciones, y en cada figura se muestran unos 5 mm de membrana 200, en donde pueden observarse secciones largas de ADN 210.

10 En la Figura 6 se muestra un equipo de filtración que comprende un cuerpo principal 100, entrada 110, membranas 130 y salida 120, con un estrangulador 121 que lleva a una cámara de recolección 140. Las membranas de filtración 130 están unidas a montajes giratorios 180, 181 que se hacen girar mediante un motor eléctrico 170. Los montajes giratorios permiten la rotación de las membranas 130, manteniendo simultáneamente un sello impermeable y permitiendo el paso de una corriente eléctrica producida por un generador de señal 160, permitiendo la manipulación de los ácidos nucleicos sobre las membranas 130.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de filtración de una muestra líquida que contiene una o más células y de purificación de los ácidos nucleicos de la célula o células en la muestra que comprende el paso de la muestra a través de una superficie de al menos una membrana contenida dentro de un equipo de filtración de flujo cruzado, que tiene una entrada y una salida de la muestra, y la ruta de la entrada a la salida está parcialmente ocluida por al menos una membrana para generar una presión transmembrana, rompiendo las membranas celular y nuclear de la célula o células para liberar los ácidos nucleicos de la célula o células sobre la membrana o membranas indicadas o en las mismas, recuperando y purificando los ácidos nucleicos.
- 10 2. El método de la reivindicación 1 caracterizado porque los ácidos nucleicos purificados se analizan para identificarlos.
3. El método de las reivindicaciones 1 y 2 caracterizado porque se selecciona al menos una membrana entre las membranas de polietileno y polisulfona.
4. El método de las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado porque al menos una membrana es hidrófila o contiene una carga positiva.
- 15 5. El método de las reivindicaciones 2 a 4 caracterizado porque el análisis del ácido nucleico se realiza mientras dicho ácido nucleico está retenido sobre la membrana o membranas y/o en las mismas.
6. El método de las reivindicaciones 2 a 5 caracterizado porque el análisis incluye un paso de amplificación llevado a cabo por amplificación RCP.
- 20 7. El método de la reivindicación 6 caracterizado porque el ácido nucleico que va a analizarse es ARN y se amplifica mediante transcripción inversa.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la membrana o membranas han sido pretratadas para poner ásperas las superficies de la membrana o membranas con el fin de romper la célula o células.
- 25 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la membrana o membranas han sido pretratadas con agentes para detectar los ácidos nucleicos concretos o secuencias de ácidos nucleicos.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado porque el análisis se hace mediante un análisis de tipo ELISA.
- 30 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque los ácidos nucleicos se eluyen de al menos una de las membranas.
12. El método de la reivindicación 11 caracterizado porque la elución se hace mediante el empleo de una corriente eléctrica.
13. El método de la reivindicación 12 caracterizado porque se aplica la corriente eléctrica a la solución que rodea al menos una de las membranas.
- 35 14. El método de las reivindicaciones 11 a 13 caracterizado porque se separan diferentes moléculas de ácidos nucleicos entre sí usando una corriente eléctrica apropiada.
15. El método de la reivindicación 14 caracterizado porque la corriente es CA y se varía su frecuencia.
16. El método de la reivindicación 15 caracterizado porque la corriente CA tiene una frecuencia entre 100 hercios y 10 megahercios.
- 40 17. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el análisis se hace con un chip genético.
18. El método de la reivindicación 17 caracterizado porque el chip genético se encuentra en la superficie de al menos una de las membranas.
- 45 19. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque al menos una de las membranas se hace girar durante la purificación.