



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 367 478**

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

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02779144 .1**

(96) Fecha de presentación : **08.10.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1434864**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.07.2004**

(54) Título: **Procedimiento para el enriquecimiento inespecífico de células bacterianas.**

(30) Prioridad: **09.10.2001 DE 101 49 803**
04.07.2002 DE 102 30 147

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.11.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.11.2011

(73) Titular/es: **HYGLOS INVEST GmbH**
Am Neuland 1
82347 Bernried, DE

(72) Inventor/es: **Diller, Sabine;**
Grassl, Renate;
Miller, Stefan;
Robl, Ingrid;
Schütz, Michael y
Zander, Thomas

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 478 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

Procedimiento para el enriquecimiento inespecífico de células bacterianas

La presente invención se refiere a un procedimiento para el enriquecimiento inespecífico de células bacterianas mediante polímeros catiónicos o aniónicos y soportes magnéticos.

5 El punto de partida de casi cualquier procesamiento, análisis o aislamiento de componentes celulares es el enriquecimiento de las células, la "cosecha de células". Ésta se realiza normalmente mediante centrifugación. Esta etapa de centrifugación plantea el problema principal en la automatización completa del procedimiento como la purificación de plásmidos ya que, además del alto gasto técnico para la integración de una centrífuga en un robot de procesamiento correspondiente, se necesita una precisión extremadamente alta en la posición de inicio y parada del proceso de centrifugación. Por tanto, los procedimientos automáticos del procesamiento, análisis o aislamiento de componentes celulares empiezan generalmente con células enriquecidas, separadas por centrifugación o sedimentadas ya fuera del robot de procesamiento. Sin embargo, por ejemplo, para un análisis rápido de genomas completos, proteomas, pero también para la rápida resolución de estructuras y funciones en procedimientos de alto rendimiento, es esencial una automatización lo más completa posible de los procedimientos relevantes a este respecto. A este respecto, la automatización de etapas parciales, por ejemplo, en el análisis del genoma, ya está muy avanzada: tanto el cultivo de bacterias como también el aislamiento de plásmidos pueden realizarse automáticamente. Sin embargo, hasta la fecha no ha podido realizarse una automatización sencilla, rentable y completa del procedimiento, incluida la cosecha de células.

20 El procedimiento convencional de la cosecha de células es la separación por centrifugación de los cultivos bacterianos. Para esto se necesita una centrífuga de placas de microtitulación, especialmente en procedimientos que se diseñarán para un mayor rendimiento.

25 Un procedimiento alternativo hace uso del enriquecimiento de las células cultivadas mediante membranas de filtración, véase, por ejemplo, el documento WO01/51206, 3M Innovative Properties Co (US) y el documento US5.464.541, Diagen Inst. f. Molekularbiologie; sin embargo, en suspensiones celulares altamente enriquecidas y la alta viscosidad de las disoluciones asociada a ellas, el procedimiento es muy propenso a fallar en los referente a obstrucciones. Lo mismo rige para la unión similar a intercambiador iónico a una matriz porosa, combinada con técnicas de filtración o vacío (documento WO92/07863, Qiagen). Esto puede presentar grandes problemas, especialmente para procedimientos automáticos.

30 Un enriquecimiento de microorganismos mediante procedimientos basados en partículas magnéticas es en principio adecuado para la automatización. Hasta la fecha se describieron tres procedimientos de enriquecimiento para bacterias que, no obstante, presentan claras desventajas con respecto a la especificidad de cepas y a los costes de preparación.

35 El documento EP 1 113676 A2, Chemagen AG, y el documento WO 01/53525 A2, Genpoint AS, describen un procedimiento para el enriquecimiento de microorganismos sobre una fase sólida mediante un ligando no específico que está inmovilizado covalentemente o no covalentemente sobre esta fase sólida. Fases sólidas en el sentido de este procedimiento son perlas de poli(alcohol vinílico) que pueden ser magnéticas o no magnéticas. Como ligandos se consideran en el sentido de este procedimiento moléculas que pueden servir de sustancias nutritivas para los microorganismos. La desventaja de este procedimiento consiste en que determinados ligandos deben inmovilizarse sobre un soporte, lo que conduce a una clara elevación de los costes de preparación. Otra desventaja consiste en que para distintas cepas deben inmovilizarse eventualmente distintos ligandos, por tanto las perlas magnéticas y el procedimiento no pueden usarse universalmente.

45 En otra solicitud, concretamente en el documento WO98/51696, Genpoint, para el enriquecimiento de bacterias sobre partículas magnéticas se describen mezclas de sales, alcoholes y polímeros comparables a polietilenglicol o a polietilenglicol. El procedimiento descrito en el documento WO98/51693 necesita 5-20 minutos y adiciones de polímero del 2-50 % (peso/volumen). Estas altas concentraciones de sales o polímeros presentan problemas en el procesamiento de las bacterias ya que, por ejemplo, el polietilenglicol al 30 % es muy pastoso, o altas concentraciones de sales interfieren en la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

50 El documento WO00/29562, Merck Patent GmbH, describe un procedimiento para aislar ADN de plásmido de microorganismos mediante a) acidificación del cultivo de microorganismos, incubación y mezcla con los materiales en fase sólida (partículas magnéticas de sílice) y b) posterior purificación de plásmidos. Sin embargo, este procedimiento no puede realizarse para todas las cepas de *E. coli* sin pérdidas de rendimiento en parte drásticas. Otra desventaja de este procedimiento consiste en la cantidad de perlas necesarias, ya que los costes de perlas constituyen un aspecto clave de los costes de enriquecimiento de bacterias y especialmente las perlas de sílice son relativamente caras. Como las perlas de sílice también pueden unirse en principio al ADN, también pueden

observarse pérdidas de rendimiento en el aislamiento de plásmidos con perlas de sílice.

El documento WO91/12079, Amersham, describe un procedimiento para la precipitación de células sobre perlas magnéticas que se unen inespecíficamente a los polímeros (células). En este procedimiento debe mantenerse forzosamente el orden de adición de los agentes necesarios (alcohol y sal) y de las perlas magnéticas. No es posible una mezcla previa de los agentes y/o agentes y perlas y, por tanto, no pueden ahorrarse etapas de pipeteado, lo que puede ser necesario en una automatización para el aprovechamiento óptimo de un robot. Además, las partículas magnéticas que pueden usarse se limitan a partículas de celulosa/óxido de hierro.

El documento US 6.284.470 B1, Promega, describe la formación de complejos de células intactas con perlas magnéticas. El procedimiento está limitado a partículas de sílice en lo que respecta a las partículas magnéticas que pueden usarse. Pero como este procedimiento prescribe que un volumen de alcohol debe añadirse a un volumen de suspensión celular, este procedimiento apenas puede aplicarse sin claras pérdidas de rendimiento para la cosecha de células en placas de pocillos profundos. Además, altas concentraciones de alcohol pueden conducir a una precipitación de las proteínas.

Una serie de estudios ha mostrado que los polímeros catiónicos pueden interaccionar con bacterias. Los experimentos han dado como resultado, por ejemplo, que polímeros catiónicos como, por ejemplo, quitosano (quitosano es quitina desacetilada) son muy adecuados para encapsular o "sellar" células microbianas vivas para experimentos individuales (véase por ejemplo, *Methods Enzymol.* 1987, vol. 135, 259-268, o el documento US5.489.401). El quitosano también se usa para el encapsulamiento de biomateriales activos en polímeros de perlas (documentos US 4.647.536 y WO01/46266). El quitosano también se usa, dado el caso también en forma modificada, como recubrimiento de artículos o kits de ensayo para inmunoensayos (documento US5.208.166).

Sin embargo, las publicaciones referentes a la influencia de polímeros catiónicos sobre la hidrofobia de paredes celulares microbianas había mostrado que aunque la adhesión sobre superficies hidrófobas a valores de pH por encima de 3 aumentó claramente, a valores de pH inferiores a 3 disminuyó a casi el 0 % (Ref.: Goldberg, S., Doile, R. J. y Rosenberg, M., 1990, *J. Bacteriol.*, vol. 172, 5650-5654).

Además, el uso de un procedimiento soportado sobre partículas magnéticas todavía ofrece más ventajas, ya que se hace posible una cosecha separada de pocillos individuales, por ejemplo, de una placa de pocillos profundos y no debe cosecharse completamente toda la placa. Por tanto, por ejemplo, en el marco de estudios de expresión, pueden cosecharse en función del tiempo.

En resumen, puede constatare que no hay disponible un procedimiento sencillo para el enriquecimiento eficiente, rápido y rentable de células bacterianas que prescindan de una etapa de centrifugación y que al mismo tiempo pueda usarse para un amplio espectro de bacterias. Por tanto, el objetivo de la invención consiste en proporcionar un procedimiento para el enriquecimiento inespecífico de células bacterianas que prescindan de la etapa de centrifugación.

El objetivo se alcanza mediante el objeto definido en las reivindicaciones.

La invención se explica más detalladamente mediante las siguientes figuras:

La Figura 1 muestra gráficamente el resultado del rendimiento de la cosecha de células de LE392 de *E. coli* (barras claras) y TG2 (barras oscuras) usando distintas partículas magnéticas. Los valores especifican el rendimiento en % determinado a partir de la relación del enturbiamiento del sobrenadante y de la densidad óptica de la suspensión celular usada. Las abreviaturas significan: Sílice: perlas de sílice MagPrep (empresa MERCK, Darmstadt), NH₂: perlas de amino-poliéstereno (empresa Estapor, MERCK-Eurolab); COOH: perlas de carboxi-poliéstereno (empresa Estapor, MERCK-Eurolab); PS: perlas de poliestireno (Spherotech, Illinois, EE.UU.); FVA: perlas de poli(alcohol vinílico) (Chemagen, Baesweiler)

La Figura 2 muestra el resultado del rendimiento de la cosecha de células a valor de pH ácido con perlas de sílice (barras oscuras) y perlas de quitosano/amino-poliéstereno (barras claras). En la Figura 2 se compara el rendimiento de la cosecha de células del procedimiento según la invención (barras claras) con el procedimiento del documento WO00/29562 (barras oscuras). Los rendimientos celulares del procedimiento según la invención se fijan a este respecto al 100 %, los rendimientos según el documento WO00/29562 se determinaron en relación con éstos. Todos los valores son valores medios de varios experimentos con desviaciones estándar. La cosecha de células según el procedimiento según la invención se realizó como en el Ejemplo de aplicación 5. Para el documento WO00/29562/MERCK se siguió el protocolo del fabricante.

La Figura 3 representa gráficamente el resultado del rendimiento de la cosecha de células para las cepas de *E. coli* DH5a y HB101 usando quitosano que se encuentra libre en solución (barras claras) y quitosano inmovilizado sobre

perlas (perlas de quitosano, empresa Chemicell, Berlín) (barras oscuras). Los valores especifican el rendimiento en % determinado a partir de la relación de la densidad óptica del sobrenadante y de la suspensión celular usada.

La Figura 4 muestra en una representación gráfica el resultado de la eficiencia del rendimiento de la cosecha de células (realizada como en el Ejemplo de aplicación 5) mediante una selección de 15 cepas de clonación de *E. coli*. Se representa el rendimiento en % (valores medios de varios experimentos, n=27) determinado a partir de la relación de la densidad óptica del sobrenadante y de la suspensión celular usada.

La Figura 5 muestra el resultado de la cosecha de distintos tipos de bacterias. La Figura 5 muestra que el sistema de cosecha de células según la invención puede aplicarse para un amplio espectro de bacterias de varios grupos (tanto gram-negativas como también gram-positivas). Se representa respectivamente el rendimiento de la cosecha de células. Las células se cosecharon como en el Ejemplo de aplicación 7. *E. faecalis*: *Enterococcus faecalis*, *B. vallismortis*: *Bacillus vallismortis*, *P. mirabilis*: *Proteus mirabilis*, *M. luteus*: *Micrococcus luteus*, *S. haemolyticus*: *Staphylococcus haemolyticus*, *C. freundii*: *Citrobacter freundii*.

La Figura 6 muestra gráficamente el resultado del rendimiento de la cosecha de células para la cepa de *E. coli* JM83 usando polilisina en HCl 0,5 M o HCl 0,5 M sin polilisina. Los valores especifican el rendimiento en % determinado a partir de la relación de la densidad óptica del sobrenadante y de la suspensión celular usada. PL/HCl: polilisina en HCl 0,5 M; HCl: sólo HCl 0,5 M (control sin polilisina)

La Figura 7 muestra la formación de una red de células de *E. coli*, quitosano y perlas magnéticas. La formación de esta red se provoca mediante la adición de quitosano libre disuelto en ácido fórmico 0,5 M a una suspensión de *E. coli* (cepa HB101) (C y D). En el lote de control sin quitosano (sólo ácido fórmico 0,5 M) no se forma ninguna red (A y B), las bacterias están presentes al igual que antes como células individuales. A y C: Fotografías de campo claro, en A pueden observarse células individuales y pigmentos magnéticos, en C pueden observarse agregados. B y D: fotografías de fluorescencia después de la tinción de las células de *E. coli* con yoduro de propidio/Syto9 (BacLight™ Viability Kit, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.). En B pueden observarse células individuales fluorescentes, D muestra la fluorescencia de las células incorporadas en la estructura reticular.

La Figura 8 muestra gráficamente la actividad enzimática de la β -galactosidasa propia de *E. coli* después de la cosecha de células según la presente invención o después de la cosecha mediante centrifugación. Se representan los valores para la actividad enzimática en unidades relativas frente a la proporción usada en la prueba de 300 μ l de células cosechadas (en %). Los símbolos de rombos abiertos reproducen los valores para células centrifugadas. Los triángulos y los cuadrados muestran los valores para bacterias que se cosecharon durante el procedimiento según la invención. Triángulos: las células se incubaron después de la adición de 30 μ l de 125 μ g/ml de quitosano en ácido fórmico 0,5 M durante 3 minutos y se separaron durante otros 3 minutos mediante separación magnética. Cuadrados: Las bacterias se incubaron durante 5 minutos después de la adición de la solución y se separaron durante otros 5 minutos en el campo magnético.

La Figura 9 muestra el resultado del enriquecimiento de la proteína N-Strep-T4-p12 mediante perlas de Strep-Tactin (IBA GmbH, Göttingen) después de la cosecha de la cepa de *E. coli* que se expresa heterológicamente BL21(DE3) mediante el procedimiento según la invención. A: células no inducidas. B: células inducidas; 1: lisado bruto, 2: perlas de Strep-Tactin después de la unión de N-Strep-T4-p12; 3: proteína N-Strep-T4-p12 eluida en forma trímica nativa; 4: proteína N-Strep-T4-p12 eluida en forma monómera (después del calentamiento a 95 °C); 5: perlas de Strep-Tactin después de la elución; 6: patrón (proteína N-Strep-T4-p12 purificada)

La Figura 10 muestra el resultado del aislamiento de ADN de plásmido de XL1Blue de *E. coli* cosechado según el procedimiento según la invención (como se especifica más adelante en el Ejemplo de aplicación 4). 1: Cosecha de las bacterias mediante el procedimiento según la invención; 2: Cosecha de las bacterias mediante centrifugación; a: plásmido pUC19 digerido con PstI; b: plásmido sin digerir; M: patrón de ADN (ADN lambda/EcoRI/HindIII).

El término aquí usado “purificación” o “enriquecimiento” significa la separación de células bacterianas o componentes celulares de la solución acuosa, por ejemplo, del medio de cultivo en el que se encuentran las células bacterianas o componentes celulares. La purificación o el enriquecimiento se realizan a este respecto con ayuda de partículas magnéticas.

El término aquí usado “enriquecimiento inespecífico” significa que el enriquecimiento se realiza bajo las condiciones elegidas independientemente del tipo, cepa, género, etc., de las bacterias.

Se describe un procedimiento para la purificación inespecífica de células bacterianas que comprende las siguientes etapas:

- a) Poner en contacto una muestra que contiene células bacterianas con polímeros catiónicos a un valor de pH

ácido o polímeros aniónicos a un valor de pH básico,

b) Añadir un soporte magnético,

c) Separar de la muestra el soporte magnético con las células bacterianas unidas al mismo.

5 Un aspecto de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento para la purificación inespecífica de células bacterianas que comprende las siguientes etapas:

a) Poner en contacto una muestra que contiene células bacterianas con polímeros catiónicos a un valor de pH ácido, formándose una red de bacterias y polímeros,

b) Añadir partículas magnéticas, depositándose las partículas magnéticas en la red de bacterias y polímeros,

c) Separar las bacterias de la muestra mediante las partículas magnéticas depositadas en la red.

10 En particular, el procedimiento se caracteriza más detalladamente por las siguientes etapas:

El cultivo de bacterias se mezcla con polímeros catiónicos o aniónicos, especialmente con polímeros catiónicos sin ramificar, preferiblemente con quitosano (por ejemplo, artículo de FLUKA nº 22741, 22742 ó 22743, Sigma C-3646 o Roth 5375,1) o polilisina (por ejemplo, Sigma P2636). Los polímeros aniónicos preferidos son sulfato de dextrano, sulfato de condroitina, poliglutamato, polimalato, ácido poligalacturónico, polifosfatos y oligosacáridos sulfatados.

15 La mezcla de cultivo de bacterias/polímero debe tener un valor de pH determinado correspondientemente a los polímeros usados junto con los tampones correspondientes. El valor de pH es en el caso de polímeros catiónicos preferiblemente inferior o igual a 3 ó 4, en el caso de polímeros aniónicos preferiblemente superior o igual a 8. El valor de pH puede llevarse al valor de pH deseado o bien antes de la adición de los polímeros ajustando el cultivo de bacterias mediante la adición de disoluciones tampón o bien directamente de ácido o base. El valor de pH puede
20 además ajustarse de forma que los polímeros estén disueltos en una solución tampón correspondiente o directamente en ácido o base. El valor de pH puede además ajustarse de forma que después de la adición de los polímeros se lleven al valor de pH deseado ajustando la mezcla de cultivo de bacterias/polímero mediante la adición de disoluciones tampón o directamente de ácido o base.

25 Los polímeros catiónicos pueden estar disueltos en tampón ácido o directamente en ácido. La solución se ajusta de forma que la mezcla de cultivo de bacterias y polímeros catiónicos dé el valor de pH deseado para el procedimiento. Para el procedimiento según la invención se prefiere un valor de pH ácido de la mezcla de cultivo de bacterias/polímero. El valor de pH puede ajustarse con tampones o ácidos discrecionales, preferiblemente con HCl 0,5 M/25 % de ácido acético, HCl 0,5 M o ácido fórmico 0,5 M. El tampón que se usa depende especialmente del tipo de procesamiento de las bacterias o del posterior procedimiento. Si el procedimiento según la invención se usa para
30 la purificación de plásmidos, como tampón se prefiere HCl/HAC a un valor de pH en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 3, ya que a un valor de pH inferior a 1,8 se hidroliza el ADN. Si el procedimiento según la invención se usa para la purificación de proteínas, como tampón se prefiere ácido fórmico a un valor de pH en el intervalo de aproximadamente 4, ya que para el aislamiento de proteínas funcionales el valor de pH se encontrará en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 9.

35 Los polímeros catiónicos están presentes en un intervalo de concentración en el que se garantiza una purificación suficiente de las bacterias. La polilisina se usa para la precipitación con una concentración en el intervalo de 12,5 µg/ml de cultivo a 150 µg/ml de cultivo, preferiblemente con una concentración en el intervalo de 25 µg/ml a 150 µg/ml, especialmente con una concentración en el intervalo de 40 µg/ml a 75 µg/ml, con especial preferencia con una concentración de 50 µg/ml. Además, la concentración óptima también depende a este respecto, junto con el tipo de
40 bacterias o la cepa de bacterias, de la fuente de suministro o del peso molecular de la polilisina usada.

El quitosano se usa para la precipitación con una concentración en el intervalo de 0,05 µg/ml de cultivo a 100 µg/ml de cultivo, preferiblemente con una concentración en el intervalo de 0,25 µg/ml a 50 µg/ml, especialmente con una concentración en el intervalo de 0,5 µg/ml a 50 µg/ml, además especialmente con una concentración en el intervalo de 1 µg/ml a 50 µg/ml, con especial preferencia con una concentración de 2,5-50 µg/ml. Otras concentraciones
45 preferidas que pueden depender del tampón usado resultan de la siguiente tabla. Además, la concentración óptima también depende a este respecto, junto con el tipo de bacterias o la cepa de bacterias, de la fuente de suministro o del peso molecular del quitosano usado y el grado de desacetilación del quitosano. Una visión general de las concentraciones de quitosano preferidas se encuentra en la siguiente tabla.

Concentraciones de quitosano	Quitosano LMW (FLUKA, n° de artículo 22741)	Quitosano MMW (FLUKA, n° de artículo 22742)	Quitosano HMW (FLUKA, n° de artículo 22743)
HCl/HAc			
Intervalo de concentración para la precipitación	0,05 µg/ml a 1 µg/ml	0,05 µg/ml a 5 µg/ml	1 µg/ml a 20 µg/ml
Intervalo óptimo	0,5 µg/ml a 5 µg/ml	0,5 µg/ml a 5 µg/ml	1 µg/ml a 5 µg/ml
Óptimo	2,5 µg/ml		2,5 µg/ml
Ácido fórmico			
Intervalo de concentración para la precipitación	0,5 µg/ml a 50 µg/ml	0,5 µg/ml a 50 µg/ml	1 µg/ml a 100 µg/ml
Intervalo óptimo	0,5 µg/ml a 50 µg/ml	0,5 µg/ml a 50 µg/ml	1 µg/ml a 50 µg/ml
Óptimo	12,5 µg/ml a 50 µg/ml	12,5 µg/ml a 50 µg/ml	12,5 µg/ml a 50 µg/ml

Después de la adición de los polímeros, la solución de cultivo de bacterias/polímero se mezclará preferiblemente mediante pipeteado arriba y abajo o agitación. Mediante el mezclado se ponen rápida e inmediatamente en contacto entre sí todos los componentes implicados.

- 5 La mezcla de polímero/bacterias acidificada o básica puede procesarse inmediatamente. Sin embargo, la mezcla también puede incubarse durante un corto periodo de tiempo, preferiblemente 3-10 minutos, especialmente preferiblemente durante 5 minutos. La temperatura de incubación puede ascender de temperatura ambiente a 40 °C, se prefieren 37 °C, especialmente preferiblemente temperatura ambiente.
- 10 La mezcla de polímero/bacterias acidificada o básica se mezcla con un soporte magnético. Preferiblemente, los soportes magnéticos son partículas magnéticas (en lo sucesivo también llamadas perla magnética), por ejemplo, perlas de poliestireno o pigmentos magnéticos. En el marco del procedimiento según la invención pueden usarse perlas de poliestireno superficialmente funcionalizadas, especialmente con superficies de NH₂, COOH u OH, prefiriéndose la superficie de NH₂. Como partículas funcionalizadas se usan preferiblemente perlas que pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, perlas de amino (EM2 100/40, diámetro 1,43 µm) o perlas de carboxi (EM1 100/40, (23710) diámetro 1,3 µm) de la empresa Estapor. Como pigmentos magnéticos pueden usarse perlas que pueden obtenerse comercialmente como, por ejemplo, Bayferrox 318M, Bayoxid E 8706 o Bayoxid E8713H (Bayer AG). El diámetro preferido de las perlas se encuentra en el intervalo de 0,5 µm a 2 µm, se prefiere un diámetro en el intervalo de 1 µm a 5 µm, con especial preferencia de aproximadamente 1 µm.
- 15 El procedimiento según la invención contiene la formación de una red de bacterias y polímeros en la que se depositan partículas magnéticas de cualquier tipo, por ejemplo, perlas de poliestireno o pigmentos. Mediante esto, las bacterias pueden separarse mediante las partículas que se encuentran en la red por la aplicación de un campo magnético.
- 20 El procedimiento según la invención no se limita a este respecto a un tipo de partículas magnéticas superficialmente funcionalizadas determinadas, sino que puede usarse cualquier tipo de partícula magnética, es decir, por ejemplo, perla o pigmento, de superficie distinta. Una visión general sobre tipos de imanes comunes con distintas superficies se resume en las Tablas A y B. Si en el procedimiento según la invención se usan pigmentos magnéticos, entonces éstos pueden disolverse tanto en alcoholes como también en tampones acuosos.
- 25 La Tabla A representa en forma de tabla todas las partículas magnéticas hasta ahora probadas y que son funcionales en el procedimiento según la invención. Tabla A: pigmentos magnéticos, ordenados según fabricantes. Tabla B: perlas magnéticas de diferente matriz base con distintos grupos funcionalizados, ordenados según fabricantes. PS: poliestireno; Sílice: matriz de sílice; PVA: poli(alcohol vinílico).
- 30

A	
BASF	Polvo de hierro de carbonilo HQ
	Pigmento 345
Bayer	Bayferrox 318M
	Bayoxide E8706
	Bayoxide E8713 H
	Bayoxide E8710 H
	Bayoxide E8707 H
	Bayoxide E8706 H
EPCOS	Polvo de ferrita N27
MERCK	Iriodin 600
OMIKRON	Polvo de bataduras de hierro, negro
	Negro de óxido de hierro, fuertemente coloreado
Vogt	Polvo de ferrita Fi324

B		
estapor	NH ₂	PS
	COOH	PS
	hidrófobo	PS
	OH	PS
Spherotech	NH ₂	PS
	COOH	PS
	hidrófobo	PS
Polysciences	BioMagNH ₂	PS
	BioMagCOOH	PS
	PS, paramagnético	PS
	NH ₂ , paramagnético	PS
MERCK	Sílice MagPrep	Sílice
Micromod	Sicastar M-NH ₂	Sílice
	Sicastar M-plain	Sílice
	Nanomag C, plain	Ferrofluido
Chemagen	M-PVA 011, OH	PVA

B		
	M-PVA 012, OH	PVA
	M-PVA 013, OH	PVA

Las partículas magnéticas están presentes en un intervalo de concentración en el que se garantiza una purificación suficiente de las bacterias; sin embargo, los costes de la purificación se encuentran en un marco justificable. Preferiblemente se añaden perlas de poliestireno con una solución de perlas de poliestireno al 1 % en una concentración de aproximadamente 1/10 a 1/70 del volumen del cultivo de bacterias. Se prefiere especialmente una concentración de aproximadamente 1/20 a 1/50, especialmente de 1/20 ó 1/50. La concentración depende a este respecto del tamaño del volumen del cultivo de bacterias. Si el volumen del cultivo de bacterias asciende, por ejemplo, a 0,2 ó 1 ó 1,5 ml, entonces se prefiere una concentración de la solución de perlas de poliestireno al 1 % de 1/20, a un volumen del cultivo de bacterias de, por ejemplo, 10 ml se prefiere una concentración de la solución de perlas de poliestireno al 1 % de 1/50. Cuanto mayor sea el volumen del cultivo de bacterias, menor podrá ser la concentración de perlas de poliestireno. Los pigmentos magnéticos se usan preferiblemente como solución al 5 % con una concentración de 1/10 de volumen del cultivo de bacterias.

Después de la adición de las partículas magnéticas, la solución de cultivo de bacterias/polímero/partículas magnéticas se mezclará preferiblemente mediante pipeteado arriba y abajo, agitación o mediante el imán. Mediante el mezclado se ponen rápida e inmediatamente en contacto entre sí todos los componentes implicados.

La mezcla puede procesarse inmediatamente. Sin embargo, la mezcla también puede incubarse durante un corto periodo de tiempo, preferiblemente 3-10 minutos, especialmente preferiblemente durante 5 minutos. La temperatura de incubación puede ascender de temperatura ambiente a 40 °C, se prefieren 37 °C, especialmente preferiblemente temperatura ambiente.

A continuación, las bacterias unidas al soporte magnético se separan de la muestra. A La mezcla de bacterias/polímero/partículas magnéticas se lleva a un campo magnético y el complejo precipita.

Las partículas magnéticas unidas a las bacterias mediante la etapa de procedimiento precedente pueden separarse de las bacterias dependiendo del tipo de la siguiente etapa de procesamiento, por ejemplo, preparación de plásmidos, preparación de ARN o ADN genómico, por ejemplo, mediante agitación y desecharse o usarse más adelante en las etapas de procedimiento junto con las bacterias. Si las bacterias tienen que separarse de las partículas magnéticas, las bacterias/polímero/partículas magnéticas pueden resuspenderse de nuevo en el tampón correspondiente después de la separación de la muestra y eliminarse y, por ejemplo, transferirse a un nuevo recipiente de reacción con al mismo tiempo retención de las partículas magnéticas mediante el imán. Para disolver las bacterias de la red de bacterias/polímero/partículas magnéticas se usa preferiblemente un tampón Tris (200 mM, pH 8 - 9,5). Para la solución se realiza preferiblemente una etapa de agitación a revoluciones altas a, por ejemplo, 1200 rpm (agitador Eppendorf).

El procedimiento según la invención puede realizarse en todos los recipientes de reacción habituales, preferiblemente en recipientes de reacción Eppendorf de cualquier tipo o placas de microtitulación.

Las bacterias enriquecidas con el procedimiento según la invención pueden ser todos los tipos de bacterias, preferiblemente eubacterias y arqueobacterias, especialmente *E. coli*, especialmente BL21, JM109, *E. coli* B, DH1, LE392, *E. coli* K12, DH5α, NM522, *E. coli* C, DH10b, Sure, GM2163, TG2, HB101, Top10, InvaF', XL1Blue, JM83, pero también *Micrococcus spec.* especialmente *Micrococcus luteus*, *Proteus spec.* especialmente *Proteus mirabilis*, *Enterococcus spec.* especialmente *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter spec.* especialmente *Citrobacter freundii*, *Bacillus spec.* especialmente *Bacillus vallismortis*, *Staphylococcus spec.* especialmente *Staphylococcus haemolyticus*.

El procedimiento según la invención puede usarse como sustituto a la centrifugación, y así se hace posible la purificación automática de células bacterianas. Con el procedimiento descrito pueden enriquecerse inespecíficamente bacterias de un cultivo en el transcurso de aproximadamente 5-10 minutos. Como la concentración de los polímeros catiónicos usados con claramente inferior al 1 % es muy baja, los enriquecimientos pueden realizarse esencialmente de forma más rentable que en el procedimiento según el estado de la técnica. Además, en el procedimiento según la invención se usan cantidades de perlas esencialmente más bajas de 1-15 perlas por bacteria en lugar de 30-50 perlas por bacteria, por ejemplo, en el documento WO00/29562.

Los siguientes ejemplos sirven sólo para explicar y de ninguna forma limitan el alcance de la invención.

1. Preparación de la solución de quitosano

Se pesó quitosano, se resuspendió en HCl 0,5 N / 25 % de HAc y la solución se calentó hasta (aproximadamente 80-90 °C) que el quitosano se disolvió completamente. A continuación, la solución se diluyó y se ajustó a 25 µg/ml en HCl 0,5 N / 25 % de HAc (= solución de trabajo de "working solution" H) o a 125 µg/ml en ácido fórmico 0,5 N (= solución de trabajo de "working solution" A). La solución de trabajo ("working solution") (25 µg/ml) permaneció estable en solución a temperatura ambiente y así se almacenó.

2. Preparación de la solución de polilisina

Se pesó quitosano, se resuspendió en HCl 0,5 N, se ajustó a 0,5 mg/ml en HCl 0,5 N (= solución de trabajo de "working solution"). La solución de trabajo ("working solution") se almacenó a -20 °C hasta su uso.

3. Cosecha de bacterias a la escala de 0,2 ml de cultivo: Formación de la red

El cultivo de HB101 de *E. coli* se realizó durante la noche en una placa de microtitulación de polipropileno de 96 pocillos de 0,5 ml con 0,2 ml de cultivo por pocillo. Para el cultivo se añadieron 20 µl de solución de trabajo ("working solution") de quitosano A o 20 µl de ácido fórmico 0,5 M sin quitosano en el lote de control y 20 µl de una solución al 5 % del pigmento magnético Bayoxid E8706 en PBS y se mezclaron mediante pipeteado arriba y abajo. Después de una incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos, las muestras se examinaron al microscopio para comprobar la formación de una red (Figura 7).

4. Cosecha de bacterias a la escala de 1,5 ml de cultivo: Aislamiento de ADN

El cultivo de XL1Blue de *E. coli* transformada con el plásmido pUC19 se realizó en una placa de pocillos profundos de 96 pocillos durante la noche con cada uno 1,25 ml de volumen de cultivo por pocillo en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina. Entonces, al cultivo durante la noche se añadieron 125 µl de solución de trabajo ("working solution") de quitosano H y 125 µl de una solución de perlas de pigmento al 5 % (Bayferrox 318M en isopropanol) y se mezclaron bien mediante pipeteado arriba y abajo. Después de una incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos, los complejos de bacterias/perlas se separaron en un separador magnético (Bilatec AG, Mannheim). El sobrenadante se eliminó completamente y el ADN de plásmido se aisló del sedimento de células mediante el sistema de purificación de plásmido Wizard MagneSil™ del kit de aislamiento de ADN (Promega, Madison, EE.UU.) según el protocolo del fabricante (Fig. 10)

5. Cosecha de bacterias a la escala de 10 ml de cultivo

El cultivo de JM83 de *E. coli* se realizó en un tubo de polipropileno durante la noche con 10 ml de volumen de cultivo. Después del cultivo durante la noche se añadió 1 ml (1/10 volumen) de solución de trabajo ("working solution") de quitosano H y se mezcló pipeteando arriba y abajo dos veces. Después se añadieron 0,2 ml de una solución de perlas de amino-poliestireno al 1%. A continuación, la solución se mezcló mediante pipeteado arriba y abajo (2 veces). Siguió una incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. El tubo se insertó 10 minutos en el campo magnético de un imán permanente (Bilatec AG, Mannheim) para la sedimentación de los complejos de bacterias/perlas. El sobrenadante se desechó y las células bacterianas se procesaron directamente.

6. Cultivo de cultivos de *E. coli*

Los cultivos de *E. coli* se cultivaron en medios estándar como LB, 2xYT, SOB o SOC (Maniatis, 1987) durante la noche. A cada 200 µl de los cultivos durante la noche se añadieron a cada uno 20 µl de solución de trabajo ("working solution") de quitosano H y a cada uno 20 µl de perlas de amino-poliestireno y se mezclaron bien. Después de 5 minutos de incubación se realizó la separación de los complejos de bacterias/perlas en un separador magnético. En el uso de los medios mencionados puede ser necesario dado el caso una adaptación de las concentraciones de la solución de trabajo ("working solution") y de perlas.

7. Cosecha de bacterias a la escala de 0,2 ml de cultivo

El cultivo de 0,2 ml de cada uno de los cultivos de *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus haemolyticus* se realizó en una placa de 96 micropocillos durante la noche a 37 °C. El cultivo de 0,2 ml de cada uno de los cultivos de *Bacillus vallismortis*, *Micrococcus luteus*, *Citrobacter freundii* se realizó en una placa de 96 micropocillos durante la noche a 30 °C. Al cultivo durante la noche se añadieron 20 µl (1/10 volumen) de solución de trabajo ("working solution") de quitosano H. Después se añadieron 10 µl de una solución de perlas de amino-poliestireno al 1%. A continuación, la solución en el pocillo se mezcló mediante pipeteado arriba y abajo (1 ó 2 veces). Siguió una incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos. La placa de microtitulación se incubó 5 minutos en un separador magnético (Bilatec AG, Mannheim) para la sedimentación de los complejos de bacterias/perlas. El sobrenadante se desechó y las células bacterianas se procesaron directamente.

8. Cosecha de bacterias vivas

A 300 µl de cada uno de un cultivo durante la noche de BL21(DE3) de *E. coli* se añadieron en una placa de microtitulación de PP de 96 pocillos de 0,5 ml 30 µl de solución de trabajo ("working solution") de quitosano A y 30 µl de una solución de perlas de pigmento al 5 % (Bayferrox 318M en PBS) y se mezclaron bien mediante pipeteado arriba y abajo. Después siguió una etapa de incubación a temperatura ambiente durante 3 ó 5 minutos. A continuación, los complejos de bacterias/perlas sedimentaron mediante incubación durante 3 ó 5 minutos en un separador magnético adecuado (Bilatee AG, Mannheim). El sobrenadante se desechó y los sedimentos de bacterias/perlas se resuspendieron cada uno en 200 µl de Tris 200 mM a pH 8,0. Como control se separaron por centrifugación 300 µl de cultivo durante la noche y el sedimento también se resuspendió en 200 µl de Tris 200 mM a pH 8,0. La viabilidad de las células se comprobó mediante siembra en placa de las series de dilución en placas de agar y las colonias se contaron después de la incubación durante la noche. Como otra prueba para la actividad y la viabilidad de las células se midió la actividad enzimática de la β-galactosidasa propia de las células (Apte y col., 1995, Wat. Res. 29, 1803-1806) (Fig. 8).

9. Aislamiento de proteínas:

Para el aislamiento de proteínas de las bacterias cosechadas con el procedimiento según la invención se usó el sistema Strep-Tag. Para esto, p12 (Selivanov, N.A., y col., 1988 Nucleotide and deduced amino acid sequence of bacteriophage T4 gene 12, Nucleic acids Res.;16(5): 2334) se fusionó según procedimientos estándar de biología molecular con un Strep-Tag (marca Strep) del extremo N (documento US 5506121) y se expresó como lo describen Burda, M.R. & Miller S. (Europ. J. Biochem, 1999, 265: 771 - 778). El cultivo de la cepa de *E. coli* que expresa N-Strep-T4-p12 BL21(DE3) pNS-T4-p12p57 se realizó en una placa de 96 pocillos profundos con 1,25 ml de cultivo por pocillo. A una densidad celular DO600 de aproximadamente 0,5 se indujo con IPTG 1 mM durante 3 h. A continuación, por pocillo se añadieron 125 µl de solución de trabajo ("working solution") de quitosano A y 125 µl de una solución de perlas de pigmento al 5 % (Bayoxid E8706 en PBS), se mezclaron bien mediante pipeteado arriba y abajo y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, los complejos de bacterias/perlas se sedimentaron mediante incubación de 5 minutos en un separador magnético adecuado (Bilatec AG, Mannheim). El sobrenadante se eliminó completamente y el sedimento se resuspendió en 150 µl de tampón A (Tris 200 mM a pH 8,0, NaCl 200 mM, EDTA 10 mM, Tween 20 al 0,05 %). Las bacterias se desprendieron a continuación de la red de bacterias/perlas mediante una etapa de agitación (5 minutos a 1200 rpm, agitador de la empresa Eppendorf). Las perlas se separaron de las células que ahora se encontraban en el sobrenadante incubando varias veces en el separador magnético y el sobrenadante se transfirió a un nuevo pocillo de una placa de microtitulación de PP de 96 pocillos de 0,5 ml. Las células se lisaron a continuación mediante adición de lisozima (1,6 mg/ml), agitación de 2 minutos a 750 rpm y 15 minutos de incubación a temperatura ambiente y el ADN se digirió mediante la adición de 5 µg/ml de ADNasa. La N-Strep-T4-p12 heterológamente expresada se unió a las perlas de StrepTactin mediante la adición de 10 µl de perlas de StrepTactin al 5 % (empresa IBA, Göttingen) e incubación de 20 minutos bajo agitación suave y se enriqueció el lisado. La N-Strep-T4-p12 se eluyó de las perlas mediante la adición de biotina 5 mM (Fig. 9).

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la purificación inespecífica de bacterias que comprende las siguientes etapas:

a) Poner en contacto una muestra que contiene células bacterianas con un polímero catiónico a un valor de pH ácido, formándose una red de bacterias y polímeros

5 b) Añadir partículas magnéticas, depositándose las partículas magnéticas en la red de bacterias y polímeros

c) Separar las bacterias de la muestra mediante las partículas magnéticas depositadas en la red.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el que después de la etapa a) y/o la etapa b) se introduce una etapa de incubación.

10 3.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el polímero catiónico es quitosano o polilisina.

4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que se añade quitosano con una concentración en el intervalo de 0,05 a 100 µg/ml de cultivo y polilisina con una concentración en el intervalo de 12,5 a 150 µg/ml de cultivo.

15 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el valor de pH se ajusta con HCl/HAc a menos de o igual a 3 o con ácido fórmico a menos de o igual a 4.

6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que las partículas magnéticas tienen un diámetro de 0,5 a 5 µm.

7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que las partículas magnéticas son un pigmento magnético o una perla de poliestireno magnética, especialmente con una superficie de NH₂, COOH u OH.

20 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que las bacterias purificadas son *E. coli*, *Bacillus spec*, *Proteus spec*, *Micrococcus spec*, *Staphylococcus spec* o *Citrobacter spec*.

Fig. 1

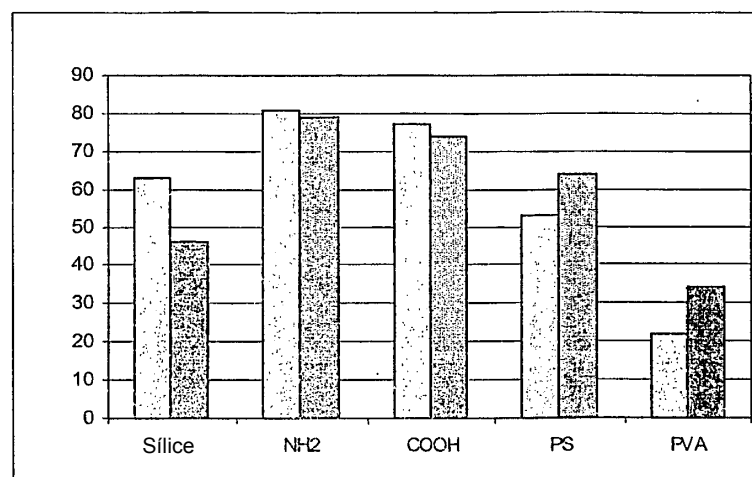


Fig. 3

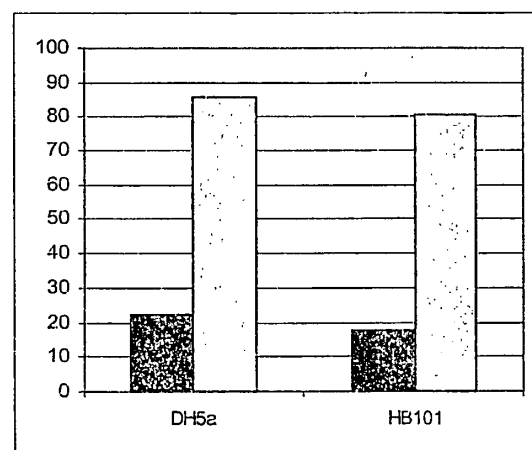


FIG. 2

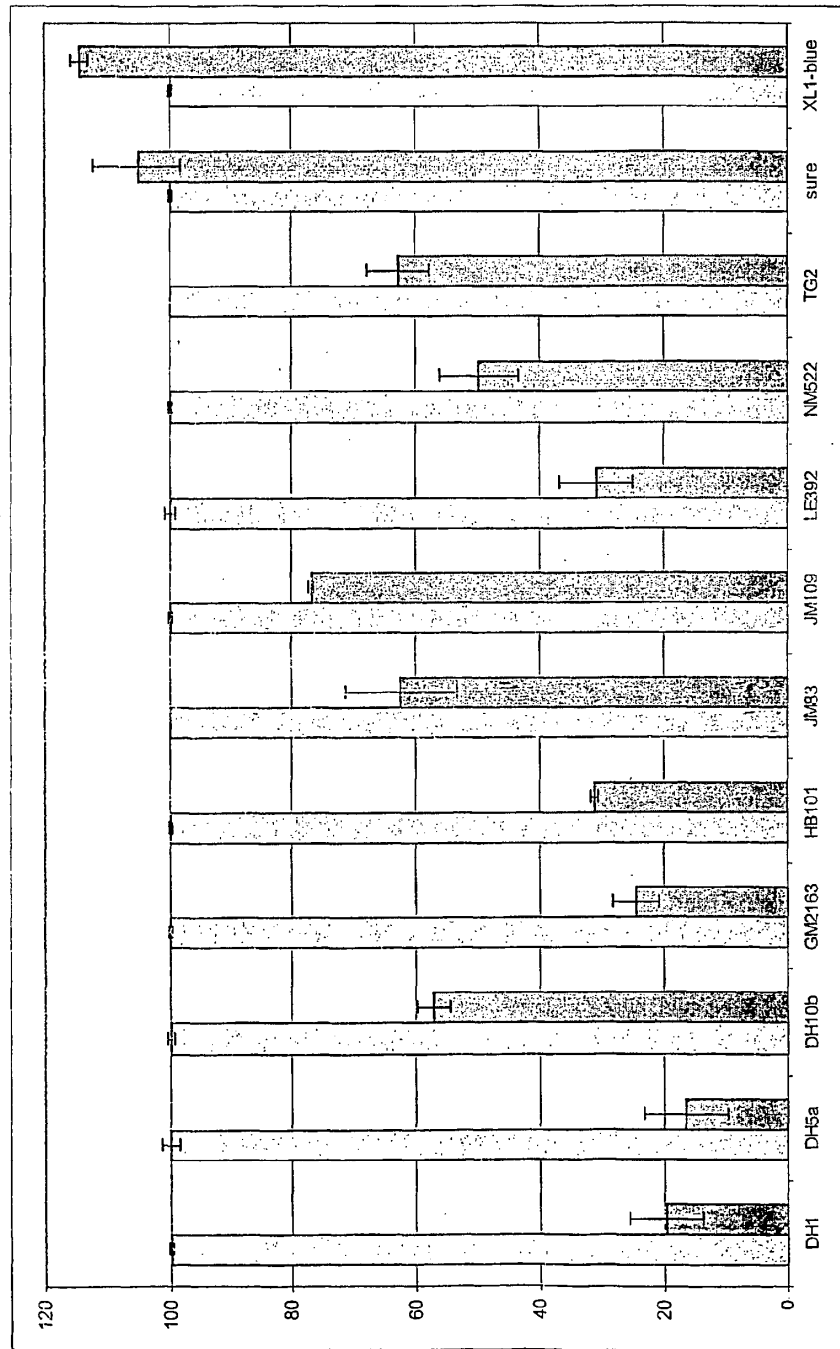


FIG. 4

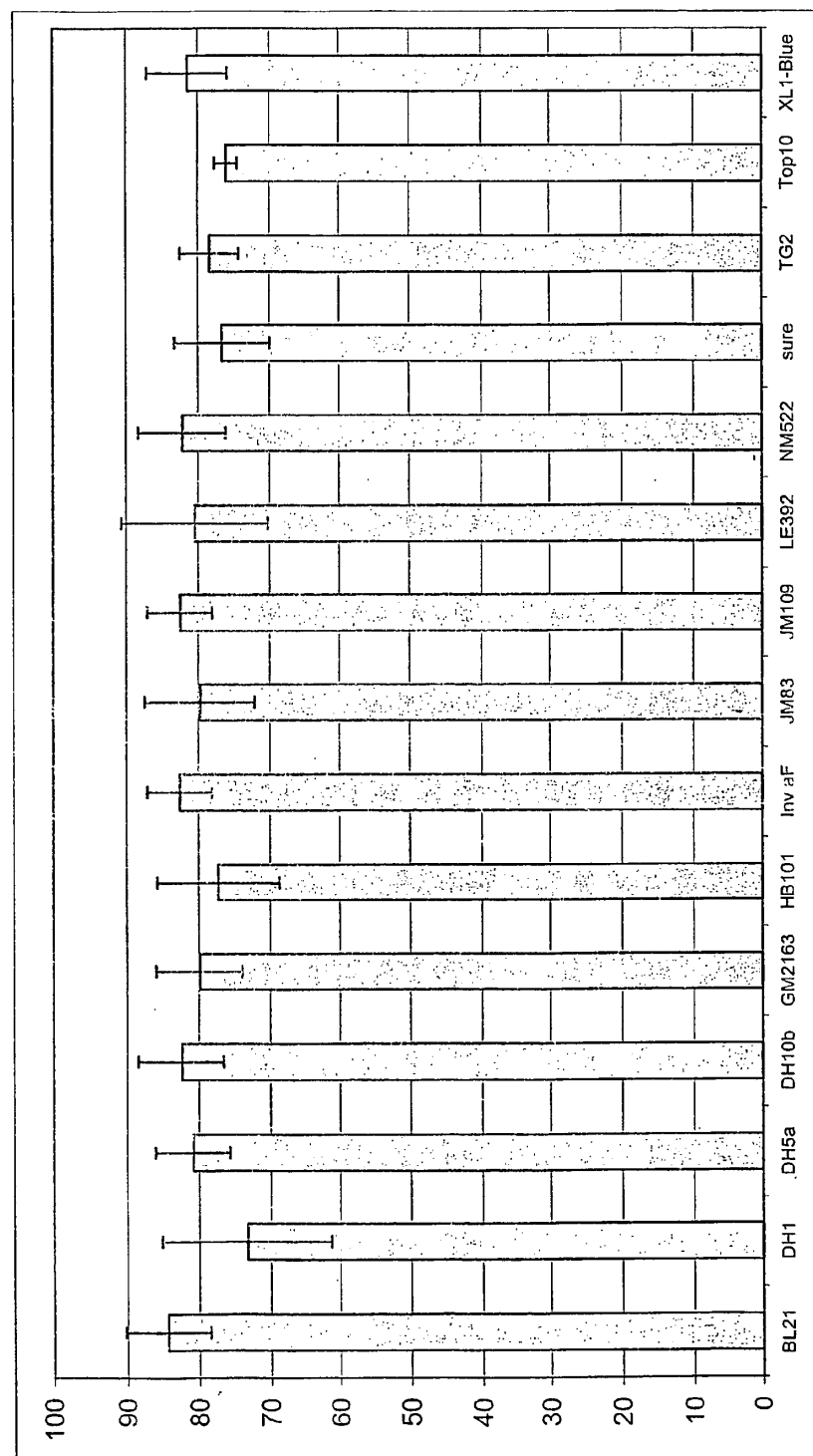


Fig. 5

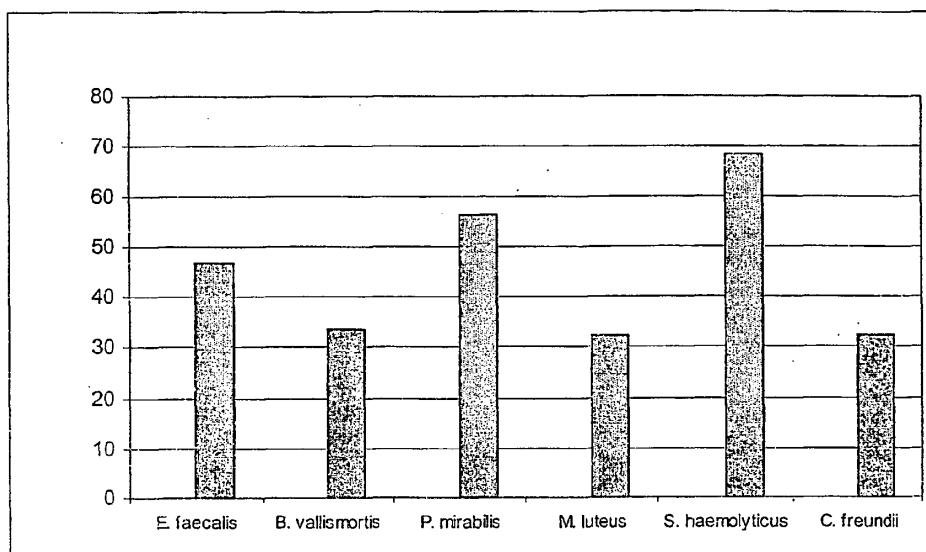


Fig. 6

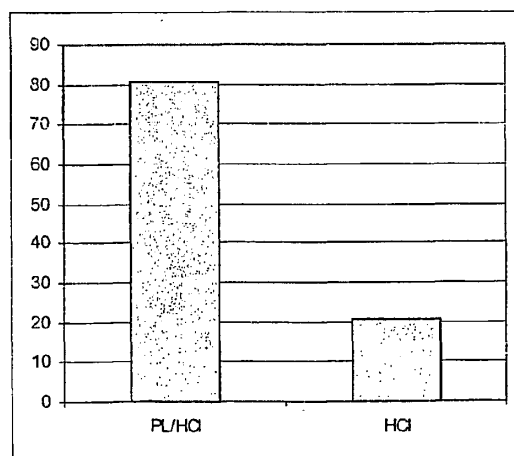


Fig. 7

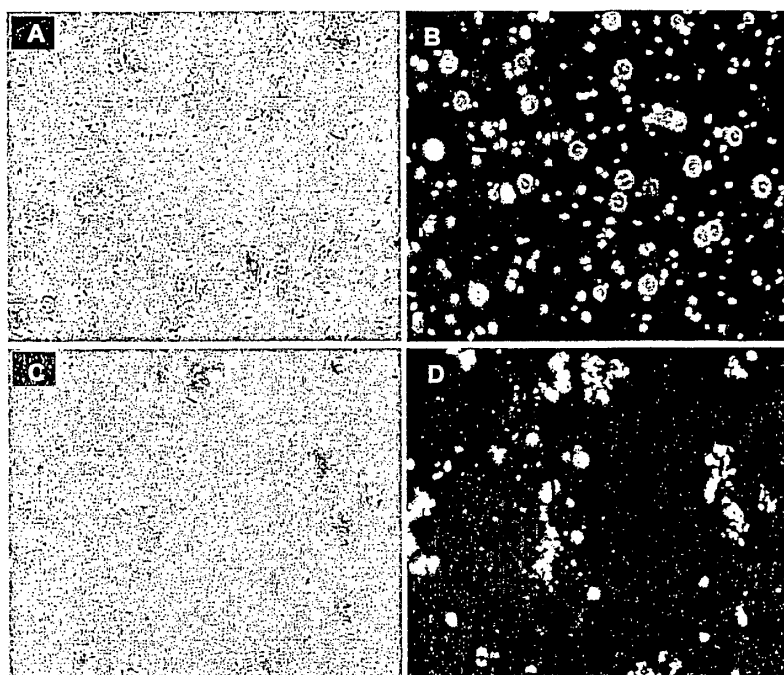


Fig. 8

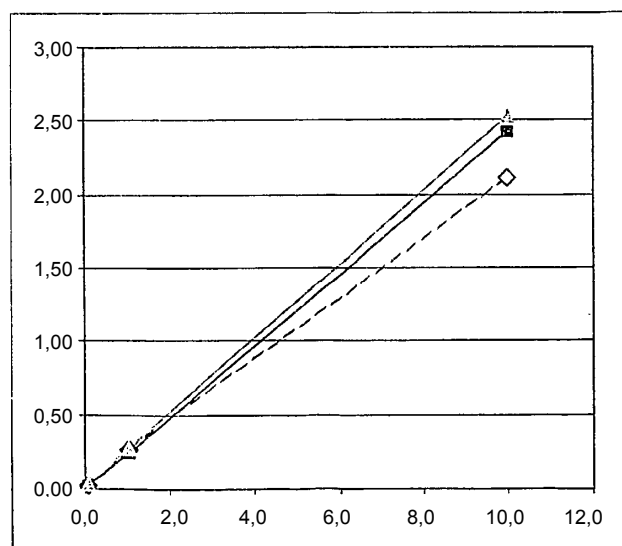


Fig. 9

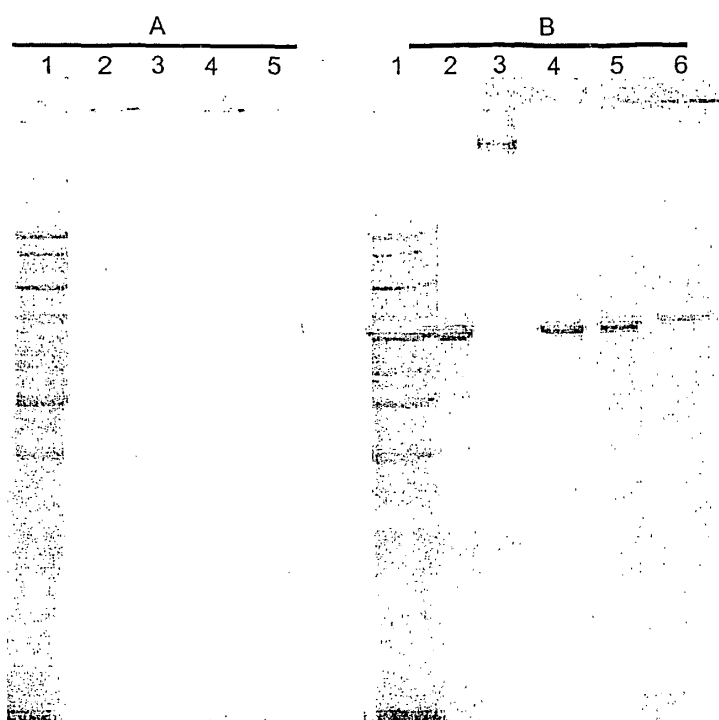


Fig. 10

