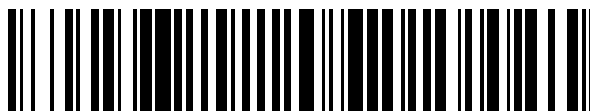


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 879**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2005 E 05774925 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 1795612**

54 Título: **Método de análisis de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

31.08.2004 JP 2004252767

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.04.2013

73 Titular/es:

**EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
4-19-9, TAITO, TAITO-KU
TOKYO 110-8408, JP**

72 Inventor/es:

**MORI, YASUYOSHI y
HIRANO, TAKASHI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 401 879 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

Método de análisis de ácidos nucleicos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de amplificación de ácidos nucleicos para la utilización sobre un soporte poroso, y se refiere además a un sistema total para la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos que utiliza dicho soporte.

10

Antecedentes de la técnica

Recientemente se ha incrementado la demanda general de ensayos del ADN. Con el fin de satisfacer esta demanda, se ha requerido el desarrollo de un sistema simple y compacto en el que pueda llevarse a cabo consistentemente la extracción de ácidos nucleicos a partir de un espécimen, seguido de la amplificación y detección de dicha amplificación.

En términos de análisis bioquímico para enzimas y componentes sanguíneos, se ha desarrollado un sistema de ensayo en fase sólida simple basado en química seca (ver, por ejemplo, el documento de patente nº 1). En dicho sistema, se proporcionan reactivos que resultan necesarios para una reacción, en una matriz en un estado seco, de manera que tenga lugar la reacción utilizando la humedad de un espécimen añadido, que sirve como solvente. En el caso de un sistema de ensayo basado en química seca, puede medirse fácilmente un componente diana únicamente mediante aplicación de un punto con una cantidad minúscula de un espécimen sobre una fase sólida. De esta manera, debido a que dicho sistema presenta un uso práctico, se aplica ampliamente en el campo de la bioquímica.

Sin embargo, existen varios obstáculos que deben superarse para aplicar el sistema de química seca anteriormente indicado a ensayos de ácidos nucleicos. En primer lugar, convencionalmente se ha llevado a cabo la extracción, la amplificación y la detección de los ácidos nucleicos mediante sistemas diferentes. De esta manera, resulta difícil integrar dichos sistemas en uno solo. En particular, resulta necesaria un complicado ciclo a alta temperatura para la amplificación de los ácidos nucleicos mediante PCR o similar. Además, los reactivos, tales como un ácido nucleico molde, un enzima, un sustrato y un cebador deben someterse a un sistema de reacción con un elevado número de grados de libertad. Por lo tanto, en general, un sistema de reacción de fase sólida no resulta apropiado para los ensayos de ácidos nucleicos.

El documento de patente nº 6 da a conocer microcápsulas que encapsulan una mezcla de reacción de amplificación de ácidos nucleicos.

Por otra parte, existen publicaciones sobre métodos en los que se permite que los ácidos nucleicos se adsorban a un filtro, fabricado en un tela no tejida, papel de filtro, hidroxipatito o similar, de manera que se amplifican mediante el método LAMP (ver los documentos de patente nº 2 y nº 3). De acuerdo con dichos métodos, la amplificación de los ácidos nucleicos se lleva a cabo permitiendo que los ácidos nucleicos se adsorban a un soporte sólido y añadiendo una solución de reacción de LAMP al mismo.

El método de LAMP es un método de amplificación de ácidos nucleicos desarrollado por los inventores de la presente invención y no requiere el complicado control de la temperatura que se considera esencial para la PCR. De esta manera, puede sintetizarse un producto de amplificación de cadena larga que presenta una estructura particular de repeticiones invertidas (que consiste de repeticiones alternativamente repetidas en la misma cadena) con una elevada eficiencia de amplificación (ver el documento no de patente nº 1 y el documento de patente nº 4). Los inventores de la presente invención informan de un método para detectar la amplificación de los ácidos nucleicos sobre un sustrato hidrofílico, que comprende permitir que un precipitante de ácidos nucleicos se una a un producto de amplificación de LAMP (ver el documento de patente nº 5). Sin embargo, el objetivo de dicho método es resolver problemas en términos de la separación de B/F en el ensayo de hibridación. De esta manera, dicho método no pretende establecer un sistema en el que la extracción, la amplificación y la detección de ácidos nucleicos se lleven a cabo consistentemente sobre una fase sólida.

[Documento de patente nº 1] publicación de patente JP (Kokai) nº 5-80049 A (1993)
 [Documento de patente nº 2] publicación de patente JP (Kokai) nº 2004-201607 A
 [Documento de patente nº 3] nº WO 03/6650
 [Documento de patente nº 4] nº WO 00/28082
 [Documento de patente nº 5] publicación de patente JP (Kokai) nº 2004-141.159 A
 [Documento de patente nº 6] nº WO 03/078659 A3
 [Documento no de patente nº 1] Tsugunori Notomi *et al.*, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, Nucleic

Acids Res.28(12): e63, 2000.

Exposición de la invención

5 En estudios anteriores, los inventores de la presente invención han establecido una técnica en la que se lleva a cabo la extracción de ácidos nucleicos a partir de un espécimen sobre una fase sólida, de manera que un ácido nucleico diana se aplica sobre una fase sólida y se utiliza un método en el que se proporciona un complejo de producto de LAMP-polietilenimina (PEI) en una fase sólida de manera que se lleva cabo una detección específica de secuencia. De esta manera, en el caso de que resulte posible que tenga lugar una reacción de LAMP sobre una fase sólida, todas las etapas de extracción, amplificación y detección pueden llevarse a cabo sobre una fase sólida, y de esta manera puede construirse un sistema total para el análisis de ácidos nucleicos.

10 Específicamente, es un objetivo de la presente invención construir un sistema total para el análisis de ácidos nucleicos en el que pueda llevarse a cabo sobre un soporte sólido la totalidad de las etapas de extracción, amplificación y detección de un ácido nucleico.

15 Los inventores de la presente invención han confirmado que la reacción de LAMP tiene lugar mediante calentamiento de un trozo pequeño de papel de filtro, al que se aplica una cantidad minúscula de una solución de reacción de LAMP, a una temperatura predeterminada. Además, han confirmado que la reacción de LAMP tiene lugar mediante separación de una solución de reacción de LAMP en varios componentes, suministrando los componentes a una pluralidad de trozos de papel de filtro y solapando entre sí los trozos. Basándose en estos resultados, han llevado a cabo experimentos modelo referentes a un sistema total que combina un método de extracción en fase sólida, una reacción de LAMP en fase sólida y la detección de PEI en fase sólida. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, han conseguido detectar un ácido nucleico diana. Lo anterior ha conducido a completar la presente invención.

20 Específicamente, la presente invención se refiere a un método de análisis de ácidos nucleicos según la reivindicación 1, que comprende añadir un espécimen que contiene ácidos nucleicos a un soporte sólido que preliminarmente contiene reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos y después llevar a cabo la amplificación de un ácido nucleico diana.

25 Según el método descrito anteriormente, resulta posible llevar a cabo consistentemente la extracción de ácidos nucleicos a partir de un espécimen que contiene ácidos nucleicos, una reacción de amplificación de ácidos nucleicos de un ácido nucleico diana y la detección de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos o el producto de la misma sobre el soporte poroso anteriormente indicado.

30 En dicho caso, en una etapa preliminar, el soporte poroso puede contener además un reactivo para la extracción de los ácidos nucleicos y/o un reactivo para la detección de los mismos.

35 En una realización, el método de la presente invención es un método de análisis de ácidos nucleicos según la reivindicación 3, que comprende las etapas siguientes, realizadas sobre un soporte poroso compuestos de dos o más capas:

- 40 1) extraer un ácido nucleico utilizando una capa de soporte poroso que contiene un reactivo para la extracción de ácidos nucleicos,
- 45 2) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos para un ácido nucleico diana utilizando una capa de soporte poroso que contiene un reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos, y
- 50 3) hibridar una sonda de ácidos nucleicos con el producto de una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, permitir que un precipitante de ácidos nucleicos actúe sobre el híbrido que ha sido producido, de manera que forma un agregado, y detectar el ácido nucleico diana en un espécimen utilizando el agregado obtenido.

Según el método descrito anteriormente, en una etapa preliminar, el soporte poroso puede contener un precipitante de ácidos nucleicos y/o una sonda de ácidos nucleicos.

55 Según el método de la presente invención, el soporte poroso está compuesto de dos o más soportes porosos que contienen, en una etapa preliminar, un reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos, un reactivo para la extracción de ácidos nucleicos y/o un reactivo para la detección de ácidos nucleicos.

60 Los reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos se retienen separadamente dentro de dos o más soportes porosos, seguidamente permitiendo que dichos soportes porosos entren en contacto entre sí al utilizarse en la amplificación. Por ejemplo, pueden retenerse separadamente un cebador y el otro reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos dentro de soportes porosos diferentes. Además, pueden retenerse separadamente una polimerasa y el otro reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos dentro de soportes porosos diferentes. Alternativamente,

pueden retenerse separadamente la polimerasa, el cebador y el otro reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos dentro de soportes porosos diferentes. En los métodos anteriormente indicados, la polimerasa en el estado seco preferentemente se retiene dentro de los soportes porosos.

5 Según el método de la presente invención, la reacción de amplificación de ácidos nucleicos preferentemente es una reacción de LAMP.

10 Según el método de la presente invención, el soporte poroso que puede utilizarse está realizado en por lo menos un material seleccionado de entre el grupo que consiste de papel de filtro, membrana de nilón, éster de celulosa, celulosa, tela no tejida, tela tejida, algodón, poliuretano y plásticos sinterizados.

Además, el precipitante de ácidos nucleicos que puede utilizarse es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste de hidroxapatito, polietilenimina, sulfato de protamina, poli-L-lisina y dietilaminoetil-dextrano.

15 Según la presente invención, se proporciona un sistema de análisis de ácidos nucleicos para llevar a cabo consistentemente la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos, comprendiendo dicho sistema por lo menos un soporte poroso que contiene, en una etapa preliminar, un reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos, un reactivo para la extracción de ácidos nucleicos y/o un reactivo para la detección de ácidos nucleicos.

20 Entre los ejemplos de reactivos contenidos en el soporte poroso se incluyen, aunque sin limitarse a ellos:

i) un cebador o un cebador marcado, ii) una sonda de ácidos nucleicos o una sonda marcada, iii) un precipitante de ácidos nucleicos, iv) una ADN polimerasa, y v) nucleótidos o nucleótidos marcados que sirvan como sustrato de una ADN polimerasa.

25 Según la presente invención, se proporciona un sistema de fase sólida capaz de llevar a cabo consistentemente la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos. El sistema de la presente invención puede llevar a cabo un análisis simple de ADN o ensayos de ADN en la práctica clínica o en laboratorios, a modo de ejemplos de aplicaciones del análisis de ácidos nucleicos a la química seca.

30 Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 muestra una vista esquemática de una reacción de LAMP sobre papel de filtro.

35 La fig. 2 muestra los resultados de una reacción de LAMP sobre papel de filtro (CK20: detección de fluorescencia de calceína).

Las figs. 3(A) y 3(B) muestran los resultados de una reacción de LAMP sobre papel de filtro (PSA: detección de fluorescencia de calceína).

40 La fig. 3(A) muestra los resultados de la detección visual de fluorescencia de calceína sobre papel de filtro (1 y 2: método de papel de filtro (negativo); 3 y 4: método de papel de filtro (positivo); 5: método de solución (negativo); y 6: método de solución (positivo)).

La fig. 3(B) muestra los resultados del análisis de electroforesis en agarosa al 3% de una solución de reacción de amplificación (1 y 2: método de papel de filtro (negativo); 3 y 4: método de papel de filtro (positivo); 5: método de solución (negativo); y 6: método de solución (positivo)).

45 Las figs. 4(A) y 4(B) muestran los resultados de una reacción de LAMP sobre papel de filtro basada en una combinación de un método de dos trozos y un método de papel de filtro Bst (detección de fluorescencia de calceína PSA).

50 La fig. 4(A) muestra los resultados de la detección visual de fluorescencia de calceína sobre papel de filtro (columna superior: método de papel de filtro; columna inferior: método de solución). En las columnas superior e inferior, las dos bandas en el extremo izquierdo se derivan de trozos de papel de filtro sin Bst, que se han solapado, y las dos bandas en el extremo derecho se derivan de trozos de papel de filtro que contienen Bst, que se han solapado.

55 La fig. 4(B) muestra los resultados del análisis de la electroforesis en agarosa al 3% utilizando una solución de reacción de amplificación (1 y 2: método de papel de filtro (negativo); 3 y 4: método de papel de filtro (positivo); 5: método de solución (negativo); y 6: método de solución (positivo)). Las figs. 5(A) y 5(B) muestran los resultados de una reacción de LAMP sobre papel de filtro basada en una combinación de un método de dos trozos y un método de papel de filtro con cebador (detección de fluorescencia de calceína PSA).

60 La fig. 5(A) muestra los resultados de la detección visual de fluorescencia de calceína sobre papel de filtro (columna superior: método de papel de filtro; columna inferior: método de solución). En las columnas superior e inferior, las dos bandas en el extremo izquierdo se derivan de trozos de papel de filtro sin cebador, que se han solapado (negativa), y las dos bandas en el extremo derecho se derivan de trozos de papel de filtro que contienen cebador, que se han solapado (positiva).

La fig. 5(B) muestra los resultados del análisis de la electroforesis en agarosa al 3% utilizando una solución de reacción de amplificación (1 y 2: método de papel de filtro (negativo); 3 y 4: método de papel de filtro (positivo); 5:

método de solución (negativo); y 6: método de solución (positivo)). Las figs. 6(A) y 6(B) muestran los resultados de una reacción de LAMP sobre papel de filtro basada en un método de tres trozos (detección con fluorescencia de calceína de ARN transcrito del VHC).

La fig. 6(A) muestra los resultados de la detección visual de fluorescencia de calceína sobre papel de filtro (1 y 2: método de papel de filtro de tres trozos (negativo); 3 y 4: método de papel de filtro de tres trozos (positivo); 5: método de papel de filtro de un trozo (negativo); 6: método de papel de filtro de un trozo (positivo); 7: método de solución (negativo); y 8: método de solución (positivo)).

La fig. 6(B) muestra los resultados del análisis de la electroforesis en agarosa al 3% utilizando una solución de reacción de amplificación (1 y 2: método de papel de filtro de tres piezas (negativo); 3 y 4: método de papel de filtro de tres piezas (positivo); 5: método de papel de filtro de un trozo (negativo); 6: método de papel de filtro de un trozo (positivo); 7: método de solución (negativo); y 8: método de solución (positivo)).

La fig. 7 muestra los resultados de la extracción, amplificación y detección llevados a cabo sobre papel de filtro (1: resultados de la amplificación de espécimen de VHB; 2: resultados de la amplificación de espécimen de VHC; 3: control negativo (que no contiene un ácido nucleico diana del VHB).

La fig. 8 muestra los resultados de la amplificación de un espécimen de VHB, basada en un método de papel de filtro en tres trozos, una reacción en solución de 5 ml y una reacción a escala general de 25 ml. En la figura, las tres líneas con el símbolo "Δ" (Papel_20) indican los resultados de medición de un método de papel de filtro de tres trozos; las tres líneas con el símbolo "O" indican los resultados de medición de una reacción en solución de 5 ml (5 ml_20) y las tres líneas con el símbolo "h" (25 ml_20) indican los resultados de medición de una reacción a escala general de 25 ml. Además, las dos líneas sin símbolos (para Papel_N, 5 ml_N y 25 ml_N) indican los resultados de medición de los controles.

La fig. 9 muestra los resultados del análisis de electroforesis basados en una reacción de PCR sobre papel de filtro (PSA) sin utilización de un método de un trozo (M: escalera de 100 pb; 1: método de papel de filtro (negativo); 2: ADN molde 10^6 copias/tubo (método de papel de filtro (positivo)); 3: ADN molde 10^8 copias/tubo (método de papel de filtro (positivo)); 4: método de solución (negativo); 5: ADN molde 10^6 copias/tubo (método de solución (positivo)); y 6: ADN molde 10^8 copias/tubo (método de solución (positivo)).

La presente descripción incluye parte o la totalidad del contenido dado a conocer en la descripción de la solicitud de patente japonesa nº 2004-252767, que es un documento de prioridad de la presente solicitud.

Mejor modo para poner en práctica la invención

1. Definición de términos

Ácido nucleico diana: la expresión "ácido nucleico diana" en la presente descripción indica una secuencia de nucleótidos o una molécula de ácidos nucleicos que debe detectarse.

Soporte poroso: la expresión "soporte poroso" en la presente descripción indica un soporte sólido hidrofílico poroso. Dicho soporte está realizado en papel de filtro, membrana de nilón, éster de celulosa o similar.

Especimen: el término "especimen" en la presente descripción incluye cualquier tipo de muestra que contiene ácidos nucleicos, tal como una muestra de sangre o glóbulos blancos periféricos, o ácidos nucleicos extraídos de dicha muestra.

Reacción de amplificación de ácidos nucleicos: la expresión "reacción de amplificación de ácidos nucleicos" en la presente descripción incluye cualquier reacción de amplificación de ácidos nucleicos conocida relacionada con un método de PCR, un método de ICAN, un método de SDA, un método de NASBA o un método de LAMP.

Reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos: la expresión "reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos" en la presente descripción incluye cualquier tipo de reactivo que resulta necesario para las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos y que contiene ADN polimerasas, sustratos nucleótidos, cebadores, sondas o similares.

Reactivo para la extracción de ácidos nucleicos: la expresión "reactivo para la extracción de ácidos nucleicos" en la presente descripción incluye cualquier tipo de reactivo que resulta necesario para la extracción de ácidos nucleicos.

Reactivo para la detección de ácidos nucleicos: la expresión "reactivo para la detección de ácidos nucleicos" en la presente descripción incluye cualquier tipo de reactivo que resulta necesario para las reacciones de extracción de ácidos nucleicos, tal como reactivo luminiscente, reactivo fluorescente, intercalante o precipitante de ácidos nucleicos.

Cebador: el término "cebador" en la presente descripción indica un oligonucleótido o un oligonucleótido marcado que se hibrida específicamente con un ácido nucleico diana para la amplificación.

Sonda de ácidos nucleicos: la expresión "sonda de ácidos nucleicos" en la presente descripción indica un fragmento de ácidos nucleicos que se hibrida específicamente con un ácido nucleico diana para la detección de la secuencia del ácido nucleico diana. Además, tal como se indica posteriormente, una sonda de ácidos nucleicos puede ser un ácido péptido-nucleico o un ácido nucleico bloqueado.

Precipitante de ácidos nucleicos: la expresión "precipitante de ácidos nucleicos" en la presente descripción indica un agente que se adsorbe a un ácido nucleico, tal como polietilenimina, de manera que forma un agregado.

Además, se describen ejemplos específicos de la utilización de cada una de las expresiones anteriores, posteriormente y en los Ejemplos en mayor detalle.

2. Extracción de ácidos nucleicos sobre un soporte poroso

La extracción de ácidos nucleicos sobre un soporte poroso puede llevarse a cabo según un método descrito en el Ejemplo 3, posteriormente. Por ejemplo, se añaden alcoholes (por ejemplo etanol e isopropanol) a un espécimen en coexistencia con un desnaturizante de proteínas, resultando en la precipitación de los ácidos nucleicos, de manera que resulta posible incluir el precipitante sobre un soporte poroso.

3. Amplificación de ácidos nucleicos sobre un soporte poroso

Los ácidos nucleicos extraídos sobre un soporte poroso se someten directamente a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos. La reacción de amplificación de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo según cualquier método conocido de amplificación de ácidos nucleicos, tal como un método de PCR, un método de ICAN, un método de SDA, un método de NASBA o un método de LAMP.

Particularmente, una reacción de amplificación de ácidos nucleicos utilizada en la presente invención preferentemente es una reacción de LAMP. El método de LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucles) es un método de amplificación de ácidos nucleicos que ha sido desarrollado por los inventores de la presente invención. Según el método, el ADN o ARN puede amplificarse rápidamente a bajo coste bajo condiciones isotérmicas (aproximadamente a 65°C) utilizando dos, cuatro o seis tipos de cebadores específicos (una pareja interna de cebadores, una pareja interna de cebadores con una pareja externa de cebadores, o una pareja interna de cebadores con una pareja externa de cebadores y una pareja de cebadores de bucle), una polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena y nucleótidos que sirvan de sustrato. La descripción general del método de LAMP se proporciona en detalle en la referencia: Notomi T *et al.*, Nucleic Acids Res. 28(12): e63, 2000; en la publicación de patente: nº WO 00/28082, y en el sitio de Internet de Eiken Chemical Co., Ltd. (<http://www.eiken.co.jp/>).

Según el método de LAMP, una reacción de alargamiento y una reacción de amplificación avanzan simultáneamente en una pluralidad de sitios en la misma cadena de un producto de amplificación. De esta manera, la amplificación del ADN se consigue super-exponencialmente bajo condiciones isotérmicas, de manera que puede sintetizarse un producto de amplificación que presenta una estructura particular de repeticiones invertidas (estructura que consiste de repeticiones alternativamente invertidas en la misma cadena) con una elevada eficiencia de amplificación.

En el método de LAMP, se utilizan cebadores específicos que se denominan cebador interno, cebador externo y cebador de bucle.

Un cebador interno resulta esencial para el método de LAMP. En el caso de que se seleccione de una cadena de cada ADNc de molde una secuencia arbitraria X2c presente en el lado 3' y una secuencia arbitraria X1c en el lado 5' respecto a X2c, una pareja interna de cebadores comprende una secuencia X2 (complementaria a X2c, anteriormente) y una secuencia X1c (idéntica a X1c, anteriormente) del lado 3' al lado 5' en ese orden. (El cebador presenta una estructura de X1c+X2).

La expresión "cebador externo" indica dos tipos de cebadores (cada uno complementario a un elemento diferente de una doble cadena), presentando cada uno una secuencia complementaria a una secuencia arbitraria X3c situada en el exterior respecto a una cebador interno (es decir, en el lado 3' de un molde) y capaz de hibridarse con X3c.

En el caso de que secuencias alternativamente invertidas, generadas en la misma cadena de un producto de amplificación que se ha obtenido mediante el método de LAMP, se hibriden entre sí formando un bucle, un cebador al que se denomina "cebador de bucle" comprende una secuencia de bases en el extremo 3' que es complementaria a una secuencia del bucle. El cebador externo y el cebador de bucle indicados anteriormente no resultan esenciales para el método de LAMP. Sin embargo, con la utilización de dichos cebadores, una reacción de amplificación puede avanzar con una eficiencia mejorada.

Una reacción de LAMP se lleva a cabo a temperaturas de entre, por ejemplo, 50°C y 75°C, y preferentemente de entre 55°C y 70°C durante 1 minuto a 10 horas, y preferentemente durante 5 minutos a 4 horas. A dichas temperaturas, un cebador interno puede formar una unión estable de apareamiento de bases con una secuencia complementaria al mismo en el ácido nucleico molde, y una polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena puede mantener la actividad enzimática.

Además, la reacción de LAMP preferentemente se lleva a cabo en coexistencia de un agente tampón que consigue un pH preferible para la reacción enzimática, sales que resultan necesarias para el mantenimiento de la actividad catalítica enzimática y el apareamiento, y un protector enzimático. Además, la reacción se lleva a cabo utilizando un regulador de la temperatura de fusión (T_m) y similar según necesidad. Entre los ejemplos de dicho agente tampón utilizado se incluyen Tris-HCl, que presenta una acción tamponadora neutra-alcalina débil. El pH puede ajustarse según la ADN polimerasa que deba utilizarse. Entre los ejemplos de sales que pueden añadirse adecuadamente para el mantenimiento de la actividad enzimática y el ajuste de la temperatura de fusión (T_m) del ADN se incluyen KCl, NaCl y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Entre los ejemplos de protectores enzimáticos utilizados se incluyen albúmina de suero bovino y sacáridos. Además, entre los ejemplos de un regulador de la temperatura de fusión (T_m) que pueden utilizarse generalmente se incluyen betaína, prolina, dimetilsulfóxido y formamida.

Un cebador interno o un sustrato nucleótido puede marcarse con una sustancia marcadora adecuada. Entre los ejemplos de sustancias marcadoras se incluyen pigmentos fluorescentes (por ejemplo FITC y ROC), enzimas, proteínas, isótopos radioactivos, sustancias quimioluminiscentes (por ejemplo DNP), biotina y DIG (digoxigenina).

4. Detección de ácidos nucleicos diana sobre un soporte poroso

Un ácido nucleico diana amplificado puede detectarse fácilmente sobre un soporte poroso según un método conocido utilizando una sonda de ácidos nucleicos marcada, un reactivo fluorescente o similar. Un método que utilice una sonda de ácidos nucleicos y un precipitante de ácidos nucleicos resulta particularmente preferente debido a que se confirma visualmente un producto de amplificación de una manera conveniente.

(1) Sonda de ácidos nucleicos

Una sonda de ácidos nucleicos utilizada para la detección es una sonda de oligonucleótidos que presenta una secuencia complementaria a por lo menos una parte de un ácido nucleico diana. La longitud de cadena del mismo generalmente es de aproximadamente 5 a 50 bases y preferentemente de aproximadamente 10 a 30 bases.

En particular, en el caso de que se utilice un precipitante de ácidos nucleicos, resulta particularmente preferente que dicha sonda presente una cadena relativamente corta. Un precipitante de ácidos nucleicos presenta la propiedad de adsorberse fácilmente a un ácido nucleico de cadena larga. De esta manera, con el fin de conseguir una buena separación B/F, evitando simultáneamente que un precipitante se adsorba a una sonda liberada, generalmente resulta necesario que una sonda de ácidos nucleicos presente una cadena relativamente corta. Sin embargo, con independencia de la longitud de la sonda, puede conseguirse una buena separación B/F ajustando las condiciones de la reacción, tal como mediante ajuste de la temperatura de una reacción de precipitante de ácidos nucleicos para que se aproxime a la T_m de una sonda.

La sonda de ácidos nucleicos indicada anteriormente puede marcarse con una sustancia marcadora adecuada. Entre los ejemplos de sustancias marcadoras se incluyen pigmentos fluorescentes (por ejemplo FITC y ROC), enzimas, proteínas, isótopos radioactivos, sustancias quimioluminiscentes (por ejemplo DNP), biotina y DIG (digoxigenina). Además, dicha sonda de ácidos nucleicos puede ser un ácido péptido-nucleico (Nielsen P.E. *et al.*, Science 254:1497-1500, 1991) o un ácido nucleico bloqueado (solicitud de patente WO n° 99/14226 y publicación de patente JP (Kohyo) n° 2002-521310 A).

(2) Precipitante de ácidos nucleicos

Un precipitante de ácidos nucleicos utilizado en la presente invención no se encuentra particularmente limitado con la condición de que se adsorba a un ácido nucleico de manera que forme un agregado. Sin embargo, un precipitante que se una selectivamente a un ácido nucleico de cadena larga con preferencia a un ácido nucleico de cadena corta resulta preferible. Específicamente, entre los ejemplos de precipitantes conocidos de ácidos nucleicos se incluyen surfactantes, dihidroxibenceno, dodecilsulfato sódico, sulfosuccinato de diisobutil-sodio, sulfato de tetradecil-sodio, dihidroxibenceno, sarcosilo, sales de metal alcalino que contienen SO_4 , PO_4 , Cl o HCOO y sales amónicas. Según la presente invención, son ejemplos preferentes de los mismos, hidroxipatito, polietilenimina, sulfato de protamina, poli-L-lisina y dietilaminoetil-dextrano (DEAE-dextrano). Un ejemplo particularmente preferente de polietilenimina presenta un grado de polimerización de aproximadamente 40 ó inferior.

La concentración y la cantidad de un precipitante de ácidos nucleicos que debe utilizarse se determinan según las

propiedades de dicho precipitante. Por ejemplo, en el caso de polietilenimina con un grado de polimerización de 14, una concentración preferente es de entre aproximadamente 0,1 y 2 M y la cantidad añadida preferente es de entre aproximadamente 4 y 200 mg por cada 25 ml de solución de reacción.

El pH de una solución de reacción que resulta apropiada para un precipitante de ácidos nucleicos se determina según las propiedades de dicho precipitante. Sin embargo, en general el pH es preferentemente de entre 6 y 10. Eso se debe a que es improbable que la sonda se hibride con un ácido nucleico en el caso de que el pH de la solución de reacción sea excesivamente elevado. Por otra parte, la protonación del ácido nucleico resulta en el deterioro de la separación B/F en el caso de que el pH de la solución de reacción sea excesivamente bajo.

Además, la fuerza iónica de una solución de reacción tras la adición de un precipitante de ácidos nucleicos también se determina según las propiedades de dicho precipitante. Sin embargo, en general, la fuerza iónica preferentemente es de 0,15 moles/l o inferior. En el caso de que la fuerza iónica sea excesivamente baja, la interacción electrostática entre precipitando y ácido nucleico resulta inhibida, resultando en una formación insuficiente de agregado.

Adicionalmente, la temperatura tras la adición de un precipitante de ácidos nucleicos preferentemente es de entre aproximadamente 20°C y 70°C. Además, la temperatura puede ser igual a la temperatura constante durante la amplificación de los ácidos nucleicos.

(3) Detección utilizando un precipitante de ácidos nucleicos

La sonda de ácidos nucleicos y el precipitante de ácidos nucleicos indicados anteriormente pueden añadirse a un soporte poroso sometido a amplificación, o pueden aplicarse como puntos sobre un sitio adecuado de un soporte poroso en una etapa preliminar. Al añadir una sonda de ácidos nucleicos a un soporte poroso en una etapa preliminar, seguido de una reacción de amplificación, las etapas de amplificación e hibridación indicadas anteriormente tienen lugar de manera prácticamente simultánea. Las condiciones para la hibridación de un producto de amplificación con una sonda de ácidos nucleicos no se encuentran particularmente limitadas. Sin embargo, en general, la hibridación puede llevarse a cabo a una temperatura de entre 50°C y 70°C durante 5 minutos.

Un agregado compuesto de un ácido nucleico de amplificación, una sonda de ácidos nucleicos y un precipitante de ácidos nucleicos difiere claramente de una sonda de ácidos nucleicos liberada en términos de movilidad sobre una fase sólida. De esta manera, pueden separarse fácilmente unos de otros.

Un agregado puede detectarse fácilmente mediante marcaje de una sonda de ácidos nucleicos o de un producto de amplificación. La detección implica la detección cualitativa y la detección cuantitativa. Por ejemplo, la detección cualitativa de la presencia o ausencia de una secuencia diana o similar puede llevarse a cabo fácilmente mediante confirmación visual de la presencia de agregado. Simultáneamente, la detección cuantitativa puede llevarse a cabo basándose en la medición de la intensidad de la señal utilizando un aparato disponible comercialmente, tal como el lector de placas de fluorescencia "Polarion" (TECAN).

5. Sistema de análisis de ácidos nucleicos

Según la presente invención, se proporciona un sistema de análisis de ácidos nucleicos para llevar a cabo consistentemente la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos, comprendiendo por lo menos un soporte poroso que contiene, en una etapa preliminar, un reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos, un reactivo para la extracción de ácidos nucleicos y/o un reactivo para la detección de ácidos nucleicos.

Entre los ejemplos de reactivos contenidos en el soporte poroso se incluyen, aunque sin limitarse particularmente a ellos:

- i) un cebador o un cebador marcado,
- ii) una sonda de ácidos nucleicos o una sonda de ácidos nucleicos marcada,
- iii) un precipitante de ácidos nucleicos,
- iv) una ADN polimerasa, y
- v) nucleótidos o nucleótidos marcados que sirvan como sustrato de una ADN polimerasa.

En el caso de la amplificación de LAMP, se desea que el cebador anteriormente indicado contenga además un cebador externo y/o un cebador de bucle o un cebador de bucle marcado, así como un cebador interno.

Además, tal como se ha indicado anteriormente, el precipitante de ácidos nucleicos preferentemente es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste de hidroxiapatito, polietilenimina, sulfato de protamina, poli-L-lisina y dietilaminoetil-dextrano.

Además, el sistema de la presente invención puede proporcionarse en forma de kit que comprende un regulador de la temperatura de fusión (por ejemplo betaína y N-óxido de trimetilamina), un tampón con el que se obtienen las condiciones preferentes para la reacción enzimática y/o otros reactivos que resultan necesarios para la detección de un producto de reacción sintética según necesidad.

El sistema de la presente invención se estructura de manera que un reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos se retenga separadamente dentro de dos o más soportes porosos que se permite que entren en contacto al utilizarlos (o durante la amplificación). Entre los ejemplos de dicho sistema se incluyen un sistema en el que un cebador y los demás reactivos de amplificación de ácidos nucleicos resultan separadamente retenidos dentro de soportes porosos diferentes, un sistema en el que la polimerasa y los demás reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos resultan separadamente retenidos dentro de diferentes soportes porosos, y un sistema en el que una polimerasa, un cebador y los demás reactivos de amplificación de ácidos nucleicos resultan separadamente retenidos dentro de soportes porosos diferentes. En dichos sistemas, la polimerasa en estado seco resulta preferentemente retenida dentro de un soporte poroso, en vista del mantenimiento de la estabilidad.

Ejemplos

A continuación se describe en mayor detalle la presente invención, haciendo referencia a los Ejemplos siguientes, aunque el alcance técnico de la presente invención no se encuentra limitado a los mismos.

Además, en los Ejemplos se utilizó una solución de reacción LAMP y los materiales de ensayo indicados posteriormente, a menos que se indique lo contrario.

(1) Solución de reacción LAMP

[Tabla 1] Composición básica de la solución de reacción LAMP	
Tris-HCl (pH 8,8)	20 mM
KCl	10 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM
MgSO ₄	8 mM
Tween20	0,1%
Betaína	0,8 M [0,6 M]
dNTP	5,6 mM [7,6 mM]
Cebador interno	3,2 mM
Cebador externo	0,8 mM
Cebador de bucle	1,6 mM
Polimerasa Bst	8 U/tubo
BSA	2%
(mezcla enzimática 1 ml/tubo)	
[]: para un sistema de amplificación de VHC	
(): para un sistema de amplificación de CK20 ó de VHC	

(2) Ácido nucleicos diana, cebadores y sondas marcadas

a) PSA (ADNc de PSA GenBank ID: M26663 (clonado en pBR322))
 FIP TGTTCCCTGATGCAGTGGGCAGCTTTAGTCTGCGGCGGTGTTCTG (SEC ID nº 1)
 RIP TGCTGGGTCGGCACAGCCTGAAGCTGACCTGAAATACCTGGCCTG (SEC ID nº 2)
 F3 TGCTTGTGGCCTCTCGTG (SEC ID nº 3)
 R3 GGGTGTGTGAAGCTGTG (SEC ID nº 4)

b) CK20 (GenBank ID: BC031559)
 FIP: CAATTTGCAGGACACACCGAGATTGAAGAGCTGCGAAGTC (SEC ID nº 5)
 BIP: CTGCTGAGGACTTCAGACTGACTTGGAGATCAGCTTCCAC (SEC ID nº 6)
 F3: CGA CTACAGTGCATATTACAGAC (SEC ID nº 7)
 B3: GTAGGGTTAGGTCATCAAAGAC (SEC ID nº 8)
 LpF: GCAGTTGAGCATCCTTAATCT (SEC ID nº 9)
 LpB: GACTGAGAGAGGAATACGTC (SEC ID nº 10)

c) Espécimen de VHC (espécimen paquete de plasma "Nisseki" (Akita): ABC nº 62: aproximadamente 2.300 KIU/ml; 1,15x10⁴ copias/ml)
 FIP: GGTTKATCCAAGAAAGGACCCAGTCGCCATAGTGGTCTGCGGA (SEC ID nº 11)

BIP: CCGCAAGACTGCTAGCCGAGGCAAGCACCTATCAGGC (SEC ID nº 12)
 F3: GCGGTTAGTATGAGTGTCTGAC (SEC ID nº 13)
 B3: CATGGTGCACGGTCTACG (SEC ID nº 14)
 Loop R: TTGGGTTGCGAAAGG (SEC ID nº 15)

d) Espécimen de VHB (espécimen paquete de plasma "Nisseki" nº 79: 63.100 copias/ml)
 FIP: GATAAAACGCCGACACATCCTTCCAACCTCTTGCTCTCAA (SEC ID nº 16)
 BIP: CCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTTGACAAACGGGCAACATACCTT (SEC ID nº 17)
 F3: CAAAATTCGCAGTCCCAAC (SEC ID nº 18)
 B3: GGTGGTTGATGTTCTGGA (SEC ID nº 19)
 R bucle: GTTGGTTCTTCTGGACTACC (SEC ID nº 20)
 Sonda marcada de VHB (marcado con 3'ROX): CAGCGATAGCCAGGACAAAG (SEC ID nº 21)

(3) Papel de filtro

Como material de papel de filtro, se utilizó papel de filtro cualitativo nº 1 (producido por ToyoRoshi Kaisha, Ltd.) cortado en trozos de 3 mm de lado o círculos de 4 mm de diámetro (en lo sucesivo denominados "trozo(s) de papel de filtro").

[Ejemplo 1] Experimento de adición de papel de filtro a una solución de reacción de LAMP

En primer lugar, se examinaron los efectos de la adición de papel de filtro (celulosa) en el marco general de la reacción de LAMP en un sistema que utilizaba CK20 según el método siguiente.

1. Método experimental

Se añadieron 50 ml de una solución de reacción de LAMP (Tabla 1) a un tubo de PCR de 0,2 ml. Se añadió al mismo un número predeterminado de trozos de papel de filtro. Se utilizó CK20 como ácido nucleico diana. Se llevó a cabo la amplificación LAMP mediante calentamiento a 63°C durante 60 minutos utilizando un ciclador térmico. Se midió la fluorescencia de calceína (capa de pigmento FAM) utilizando ABI7700 (Applied Biosystems) de manera que se confirmase la presencia o ausencia de amplificación.

2. Resultados experimentales

La fig. 2 muestra los resultados. Tal como se muestra en la fig. 2, incluso tras la adición de 20 trozos de papel de filtro, se confirmó que tenía lugar la reacción de amplificación. Debido a que cada trozo de papel de filtro (3 mm cuadrados) era capaz de retener hasta 3 ml de líquido, 20 trozos de papel de filtro fueron capaces de retener no menos de 50 ml de líquido. Es decir, se confirmó que tenía lugar la reacción LAMP no sólo al añadir papel de filtro a una solución de reacción (con una cantidad en exceso de una solución de reacción), sino también al suministrar una solución de reacción a papel de filtro (con una cantidad en exceso de papel de filtro).

[Ejemplo 2] Reacción LAMP sobre papel de filtro

1. Método experimental

Se llevó a cabo una reacción con la adición de 0 a 20 trozos de papel de filtro (3 mm cuadrados). Se llevó a cabo la reacción LAMP mediante calentamiento de un tubo de PCR hasta una temperatura dada utilizando un ciclador térmico. Se confirmó la presencia o ausencia de amplificación mediante la adición de calceína (Dojindo Laboratories) al mismo, de manera que se detectase la fluorescencia (ABI-7700 (con la utilización de capa de pigmento FAM), Applied Biosystems). A continuación, se añadieron 10 ml de pigmento de carga (6x) (producido por Promega) a los trozos de papel de filtro. Los trozos de papel de filtro se dejaron en reposo durante 5 minutos, seguido de la electroforesis en agarosa al 3%. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se confirmó la amplificación LAMP del ácido nucleico diana. Se llevó a cabo la reacción LAMP en papel de filtro de acuerdo con los diferentes métodos descritos posteriormente.

1.1 Método de un trozo

Se suministraron 3 ml de una solución de reacción LAMP que contenía todos los componentes listados en la Tabla 1 a un único trozo de papel de filtro, seguido de la reacción LAMP.

1.2 Método de dos trozos

En el caso de la presencia de cebadores, enzimas, sustratos e iones magnesio en una única solución, un periodo

prolongado de conservación podría provocar una reacción no específica que podría resultar en la formación de un dímero de cebadores o similar. De esta manera, se examinó en un sistema que utiliza PSA si resultaría posible o no inducir una reacción LAMP suministrando cebadores o enzimas a un trozo de papel de filtro, el cual difería de otros trozos utilizados para los demás reactivos, y solapando dichos trozos entre sí en caso necesario.

(1) Método de cebador en papel de filtro

Se suministraron 3 ml de una solución de reacción LAMP que no contenía cebadores solos (RM: concentración de 1,67 veces) y 2 ml de una solución de cebador concentrado 2,5 veces a trozos separados de papel de filtro. Se llevó a cabo una reacción LAMP mediante solapamiento de los trozos. Además, se ajustó la concentración de cada componente de manera que se alcanzase una concentración dada al solapar los dos trozos, resultando en un volumen total de líquido de 5 ml.

(2) Método de papel de filtro con Bst

Se suministró una solución de reacción LAMP que no retenía Bst solo (RM: concentración de 1,67 veces) (3 ml) y solución madre de Bst diluido 4 veces (o Mezcla Enzimática) (2 ml) a trozos separados de papel de filtro. Se llevó a cabo la reacción mediante solapamiento de los trozos. Además, se ajustó la concentración de cada componente de manera que se alcanzase una concentración predeterminada al solapar los dos trozos, resultando en un volumen total de líquido de 5 ml.

1.3 Método de tres trozos

Con el fin de combinar un método de reacción en papel de filtro con un método de extracción en papel de filtro, debe llevarse a cabo una reacción LAMP en un papel de filtro portador de un ácido nucleico diana. Lo anterior implica que resulta necesario una reacción en papel de filtro que implica 3 trozos de papel de filtro (papel de filtro que contiene un ácido nucleico diana, papel de filtro RM y papel de filtro con Bst (o papel de filtro con Mezcla Enzimática)). De esta manera, se llevó a cabo un método de tres trozos en un sistema que utiliza el VHC según el método siguiente.

Se suministraron separadamente a 3 trozos de papel de filtro 3 ml de una solución de reacción LAMP (RM: concentración de 1,67 veces) que no contenía Bst y un ácido nucleico diana, 1 ml de una solución de Bst (o Mezcla Enzimática) diluida 2 veces y 1 ml de una solución de ácido nucleico diana a una concentración arbitraria. Los trozos se solaparon entre sí de manera que se llevase a cabo una reacción LAMP. Además, se ajustó la concentración de cada componente de manera que se alcanzase una concentración dada al solapar los tres trozos, resultando en un volumen total de líquido de 5 ml.

2. Resultados experimentales y comentario

2.1 Método de un trozo

La fig. 3 muestra los resultados de la reacción LAMP realizada sobre papel de filtro a 65°C durante 60 minutos utilizando PSA (6×10^{-20} M) como ácido nucleico diana. Tal como se muestra en la fig. 3, se observó fluorescencia de calceína exclusivamente en el caso de que estuviese contenido el ácido nucleico diana. De esta manera se confirmó la amplificación LAMP. Además, basándose en el análisis de electroforesis en agarosa al 3%, se obtuvo un patrón en escalera en un tamaño dado. Por lo tanto, se confirmó que resultaba posible llevar a cabo una reacción LAMP sobre papel de filtro.

2.2 Método de dos trozos

La fig. 4 muestra los resultados de la reacción LAMP realizada sobre papel de filtro a 65°C durante 60 minutos utilizando PSA (6×10^{-20} M) como ácido nucleico diana según el método del papel de filtro con cebador. Además, la fig. 5 muestra los resultados de la reacción LAMP realizada sobre papel de filtro a 65°C durante 60 minutos utilizando PSA (6×10^{-20} M) como ácido nucleico diana según el método del papel de filtro con Bst.

Basándose en las figs. 4 y 5, incluso en el caso de que se suministrasen cebadores y enzimas a diferentes trozos de papel de filtro, se confirmó que tuvo lugar una reacción LAMP dada mediante solapamiento de los trozos de papel de filtro entre sí. Es decir, se confirmó que los cebadores y Bst eran suficientemente menores que los poros del papel de filtro y que de esta manera podían migrar libremente entre los trozos de papel de filtro.

El objetivo del presente experimento era confirmar la posibilidad de migración de una sustancia (cebador o enzima) entre dos trozos de papel de filtro. De esta manera, una condición de reacción para un control negativo era la ausencia de cebadores o enzimas, pero no la ausencia de un ácido nucleico diana. (Uno de los dos trozos se denominó papel de filtro con punto de agua).

Es conocido que Bst puede formularse establemente sobre papel de filtro. De esta manera, se considera que un reactivo LAMP puede formularse según el método del papel de filtro con Bst. Simultáneamente, el papel de filtro RM puede estandarizarse ventajosamente para cualquier sistema mediante el suministro de cebadores a un trozo separado de papel de filtro. De esta manera, dicho caso puede aplicarse a la detección simultánea de una pluralidad de elementos o dianas.

2.3 Método de tres trozos

La fig. 6 muestra los resultados de la reacción LAMP realizada sobre papel de filtro a 65°C durante 60 minutos utilizando ARN transcrito del VHC (6×10^{-18} M) como ácido nucleico diana según el método de tres trozos. Además, según el método de tres trozos, se confirmó un nivel dado de amplificación LAMP. De esta manera, se confirmó que resultaba posible construir un sistema en el que el papel de filtro que porta los ácidos nucleicos diana que se han extraído mediante papel de filtro se encuentra solapado por dos trozos separados de papel de filtro sobre los que se ha formulado un reactivo de LAMP.

Los inventores han confirmado que los ácidos nucleicos diana pasan a través del papel de filtro, de manera que no resultan transportados sobre el papel de filtro al llevar a cabo el método de extracción de ácidos nucleicos con papel de filtro, en el que las operaciones de filtración se llevan a cabo sin utilizar los efectos del isopropanol. Lo anterior ha revelado que los tamaños de los ácidos nucleicos diana que han precipitado (o agregado) con el isopropanol son mayores que los tamaños de poro del papel de filtro; sin embargo, los tamaños de los ácidos nucleicos diana disueltos son suficientemente menores a los tamaños de poro del papel de filtro. Además, se ha revelado que no se produce ninguna interacción específica, tal como adsorción, entre los ácidos nucleicos diana disueltos y el papel de filtro (celulosa). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se ha estimado que los ácidos nucleicos diana disueltos pueden migrar libremente entre trozos de papel de filtro en cierto grado, de manera que las soluciones contenidas en los tres trozos solapados de papel de filtro funcionan colectivamente como una solución de reacción LAMP dada (es decir, la misma solución utilizada en un método de un trozo) que contiene los ácidos nucleicos diana.

[Ejemplo 3] Experimento modelo de un sistema total utilizando papel de filtro

Se llevó a cabo un experimento modelo de un sistema total con papel de filtro siguiendo los protocolos siguientes.

1. Método experimental

(1) Un espécimen utilizado fue una solución de un espécimen de VHC (espécimen paquete de plasma "Nisseki" (Akita), ABC nº 62, aproximadamente 2.300 KIU/ml; $1,15 \times 10^4$ copias/ml) que había sido diluido 1.000 veces con tampón fosfato o una solución de un espécimen de VHB (espécimen paquete de plasma "Nisseki" nº 79, 63.100 copias/ml) que había sido diluido 10 veces con plasma normal (nº 39). Se mezclaron 100 ml del espécimen con 300 ml de tampón de lisis (que contenía tiocianato de guanidina al 68%, DTT al 3% y Tris 10 mM (pH 8,0)) y lo resultante se dejó en reposo durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 400 ml de isopropanol al 100% a lo anterior, seguido de la filtración a través de un trozo de papel de filtro (diámetro: 4 mm, nº 1) utilizando una jeringa.

(2) El trozo de papel de filtro que portaba ácidos nucleicos diana se lavó con 500 ml de etanol al 70% dejando que el etanol pasase a través del mismo mediante la utilización de una jeringa.

(3) El trozo de papel de filtro se dejó en reposo durante 5 minutos, de manera que el etanol se eliminase del mismo.

(4) El papel de filtro obtenido se seleccionó para servir como papel de filtro con ácidos nucleicos diana y se solapó con papel de filtro que contenía RM o papel de filtro con Bst (o Mezcla Enzimática). Se solaparon entre sí y se introdujeron en un tubo para PCR, seguido de calentamiento a 63°C durante 1 hora.

(5) Los papeles de filtro sometidos a la reacción se solaparon con un trozo de papel de filtro sobre el que aplicaron 1,2 ml de una solución de polietilénimina (PEI: grado de polimerización de 14) que contenía KCl 0,75 M a una concentración de monómero de 0,25 M. A continuación, se dejaron en reposo durante 1 minuto. Se añadió a dichos papeles de filtro una solución que contenía sonda de VHB marcada con ROX 100 nM (100 ml), seguido de la hibridación de la sonda con un complejo de producto de LAMP-PEI. A continuación, un papel de filtro al que se había suministrado el complejo de producto de LAMP-PEI se observó visualmente en un iluminador fluorescente (302 nm). Además, se utilizó un producto de amplificación de VHC a modo de control negativo (producto de LAMP irrelevante) tras la detección de la sonda. Además, se utilizó un sistema de amplificación de VHB que no contenía ácidos nucleicos diana a modo de control negativo tras la reacción de LAMP.

2. Resultados experimentales y comentario

Se llevaron a cabo secuencialmente en el orden indicado, una reacción de amplificación basada en el método de tres trozos y la detección de PEI utilizando papel de filtro, utilizando VHB extraído sobre papel de filtro como ácido

nucleico diana (fig. 7). Como resultado, se llevó a cabo con éxito sobre papel de filtro una serie de ensayos genéticos (incluyendo la detección específica de secuencia) utilizando un espécimen sustancial de VHB. Específicamente, una muestra de un espécimen de VHB amplificado (fig. 7-1) mostraba exclusivamente la fluorescencia roja de ROX. En el caso del producto de LAMP irrelevante (especimen de VHC: fig. 7-2) y el control negativo (fig. 7-3), se observó ligeramente fluorescencia derivada del papel de filtro.

Basándose en los resultados anteriores, se ha revelado que resulta posible inducir una reacción de LAMP sobre un portador sólido poroso, tal como papel de filtro, tal como en el caso de una reacción de LAMP inducida en una fase líquida. Además, también se ha confirmado que tiene lugar una reacción de LAMP en un caso en el que los componentes de un sistema de reacción se suministran en trozos separados de papel de filtro que seguidamente se solapan entre sí. Lo anterior indica que resulta posible llevar a cabo consistentemente todas las etapas de extracción, amplificación y detección sobre papel de filtro. En el caso de que las etapas puedan combinarse sobre un único dispositivo, dicho método puede aplicarse en un sistema total simple y económico para la detección (análisis) de ácidos nucleicos.

Basándose en este estudio, se ha confirmado que, utilizando un sistema total que comprende papel de filtro como portador base, puede evitarse la incorporación de incluso una cantidad minúscula de reactivo, puede sustituirse un sistema de alimentación en solución por sistema de migración en un portador simple y puede estabilizarse un reactivo.

[Ejemplo 4] Sensibilidad del método de tres trozos

1. Método experimental

Con el fin de evaluar la sensibilidad del método de tres trozos, se llevó a cabo la amplificación y la detección de un espécimen de VHB (20 copias/tubo) mediante los tres métodos siguientes basados en los Ejemplos 1 a 3.

- (1) Método de tres trozos de papel de filtro: 5 ml (RM 3 ml + 1/2 Bst 1 ml + molde 1 ml)
- (2) solución de reacción: 5 ml (RM 3 ml + 1/2 Bst 1 ml + molde 1 ml)
- (3) reacción a escala general: 25 ml

La detección se llevó a cabo para las muestras (3 tubos) utilizando un lector de placas de fluorescencia "FluoDia T70" (Exc.: 486 nm y Em.: 530 nm, Otsuka Electronics Co., Ltd.). Además, las muestras que no contenían un espécimen (2 tubos), que servían de controles, se sometieron a amplificación y detección de una manera similar.

2. Resultados experimentales y comentario

La fig. 8 muestra los resultados. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en el caso de la reacción en solución, la amplificación se observó en 2 de 3 tubos. De esta manera, se consideró que el límite de sensibilidad eran 20 copias/tubo bajo las condiciones del Ejemplo 4. Simultáneamente, de acuerdo con el método de tres trozos de papel de filtro, la amplificación se observó en 3 de 3 tubos. De esta manera, se ha confirmado que la sensibilidad del papel de filtro de la presente invención es equivalente o superior a la sensibilidad del método en solución.

[Ejemplo 5] Reacción de PCR sobre papel de filtro

Según el método de un trozo del Ejemplo 2, se llevó a cabo la reacción de PCR sobre papel de filtro utilizando PSA (6×10^{-20} M) como ácido nucleico diana con la adición de 3 ml de una solución de reacción de PCR por cada trozo individual de papel de filtro. (La región de amplificación presentaba un tamaño de 178 pb). Basándose en la composición de la solución de reacción de PCR proporcionada en la Tabla 2, se llevó a cabo la reacción de PCR a 95°C durante 30 segundos, a 58°C durante 30 segundos y a 70°C durante 30 segundos durante 35 ciclos utilizando los cebadores externos (SEC ID n° 3 y n° 4) de cebador LAMP de PSA como cebador de PCR basado en los protocolos estándares de Taq de TAKARA LA.

[Tabla 2]
Composición de solución de reacción de PCR

Cebador	0,5 µM cada uno
Taq de LA	2,5 U
10 X tampón II de PCR de LA	1 µl
MnCl ₂ 25 mM	2,5 mM
2,5 mM de cada dNTP	0,4 mM cada uno
Betaína	0,5 M
BSA	0.9%
Total	10 ml

Se impregnaron tres trozos de papel de filtro a la reacción con 10 ml de un pigmento de carga, seguido de electroforesis. De esta manera, se confirmó la amplificación. A título de comparación, se llevó a cabo una PCR en solución estándar bajo condiciones de PCR similares. La PCR en solución se llevó a cabo a una escala de 10 ml. Todos los productos de PCR se sometieron a electroforesis.

5 Tal como se muestra en la fig. 9, también en el caso de una PCR realizada sobre papel de filtro, se confirmó una banda correspondiente al tamaño de una región de amplificación, tal como en el caso de PCR en solución. De esta manera, se ha confirmado que la amplificación de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo sobre papel de filtro, tal como es el caso del método de LAMP, incluso aplicando una PCR.

10 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad.

Aplicabilidad industrial

15 La presente invención se refiere a un dispositivo simple de detección de ácidos nucleicos para llevar a cabo consistentemente la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos. Dichos dispositivo puede utilizarse para el análisis simple de ADN o el ensayo de ADN en clínicas o laboratorios.

20 Texto libre de listado de secuencias

- SEC ID nº 1-descripción de una secuencia artificial: cebador FIP para PSA
- SEC ID nº 2-descripción de una secuencia artificial: cebador RIP para PSA
- SEC ID nº 3-descripción de una secuencia artificial: cebador F3 para PSA
- 25 SEC ID nº 4-descripción de una secuencia artificial: R3 primer for PSA
- SEC ID nº 5-descripción de una secuencia artificial: cebador FIP para CK20
- SEC ID nº 6-descripción de una secuencia artificial: cebador RIP para CK20
- SEC ID nº 7-descripción de una secuencia artificial: cebador F3 para CK20
- SEC ID nº 8-descripción de una secuencia artificial: cebador R3 para CK20
- 30 SEC ID nº 9-descripción de una secuencia artificial: cebador LpF para CK20
- SEC ID nº 10-descripción de una secuencia artificial: cebador LpR para CK20
- SEC ID nº 11-descripción de una secuencia artificial: cebador FIP para VHC
- SEC ID nº 12-descripción de una secuencia artificial: cebador RIP para VHC
- SEC ID nº 13-descripción de una secuencia artificial: cebador F3 para VHC
- 35 SEC ID nº 14-descripción de una secuencia artificial: cebador R3 para VHC
- SEC ID nº 15-descripción de una secuencia artificial: cebador de bucle para VHC
- SEC ID nº 16-descripción de una secuencia artificial: cebador FIP para VHB
- SEC ID nº 17-descripción de una secuencia artificial: cebador RIP para VHB
- SEC ID nº 18-descripción de una secuencia artificial: cebador F3 para VHB
- 40 SEC ID nº 19-descripción de una secuencia artificial: cebador R3 para VHB
- SEC ID nº 20-descripción de una secuencia artificial: cebador de bucle para VHB
- SEC ID nº 21-descripción de una secuencia artificial: sonda de VHB

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA

5 <120> Método para el análisis de ácidos nucleicos

<130> PH-2548-PCT

<150> JP 2004-252767

10 <151> 2004-08-31

<160> 21

<170> PatentIn versión 3.1

15 <210> 1

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> cebador FIP de PSA

<400> 1

25 tgttctgat gcagtgggca gcttagtct gcggcgggtg tctg 44

<210> 2

<211> 45

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> cebador RIP de PSA

35 <400> 2

tgctgggtcg gcacagcctg aagctgacct gaaatacctg gcctg 45

<210> 3

<211> 18

40 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador F3 de PSA

45 <400> 3

tgcttggtgc ctctcgtg 18

<210> 4

<211> 17

50 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

55 <223> cebador R3 de PSA

<400> 4

gggtgtgtga agctgtg 17

60 <210> 5

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

<220>
<223> cebador RIP de CK20

5 <400> 6
ctgctgagga cttcagactg acttgagat cagctccac 40

<210> 7
<211> 23
10 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador F3 de CK20

15 <400> 7
cgactacagt gcatattaca gac 23

<210> 8
<211> 22
20 <212> ADN
<213> Artificial

<220><223> cebador R3 de CK20

25 <400> 8
gtagggtag gtcacaaag ac 22

<210> 9
30 <211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
35 <223> cebador LpF de CK20

<400> 9
gcagttgagc atccttaac t 21

40 <210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> cebador LpF de CK20

<400> 10
gactgagaga ggaatacgtc 20

50 <210> 11
<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

55 <220>
<223> cebador FIP de VHC

<400> 11
60 ggthkatcca agaaaggacc cagtcgcat agtggctgc gga 43

<210> 12
<211> 38

<212> ADN
 <213> Artificial

 5 <220>
 <223> cebador RIP de VHC

 <400> 12
 ccgcaagact gctagccgag gcaagcacc tatcaggc 38

 10 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> cebador F3 de VHC

 <400> 13
 ggcgtagta tgagtgcgt ac 22
 20
 <210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador R3 de VHC

 <400> 14
 30 catggtgcac ggtctacg 18

 <210> 15
 <211> 15
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador de bucle R de VHC

 40 <400> 15
 ttgggtgcg aaagg 15

 <210> 16
 <211> 44
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador FIP de VHB
 50
 <400> 16
 gataaaacgc cgcagacaca tcctccaac ctctgtcct ccaa 44

 55 <210> 17
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> cebador RIP de VHB

 <400> 17
 cctgctgcta tgccatct tcttgacaa acgggcaaca tacctt 46

5 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador F3 de VHB

 10 <400> 18
 caaaattcgc agtccccaac 20

 <210> 19
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador R3 de VHB
 20 <400> 19
 ggtggtgat gttcctgga 19

 <210> 20
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> cebador de bucle R de VHB

 <400> 20
 gttggttctt ctggactacc 20

 35 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> sonda de VHB

 <400> 21
 45 cagcgatagc caggacaaag 20

REIVINDICACIONES

1. Método de análisis de ácidos nucleicos, que comprende añadir un espécimen que contiene ácidos nucleicos a un soporte poroso que contiene un reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos y someter un ácido nucleico diana a una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, en el que: a) un cebador y los demás reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos resultan separadamente retenidos dentro de soportes porosos diferentes, o b) una polimerasa y los demás reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos resultan separadamente retenidos dentro de soportes porosos diferentes, o c) la polimerasa, el cebador y los demás reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos resultan separadamente retenidos dentro de soportes porosos diferentes, y se permite que los soportes porosos entre en contacto mutuo al utilizarlos en la amplificación.
2. Método de análisis de ácidos nucleicos según la reivindicación 1, que comprende llevar a cabo consistentemente una extracción de ácidos nucleicos del espécimen, una reacción de amplificación para el ácido nucleico diana y la detección de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos o del producto de la misma sobre el soporte poroso.
3. Método de análisis de ácidos nucleicos, que comprende las etapas siguientes realizadas sobre un soporte poroso compuesto de dos o más capas: a) extraer un ácido nucleico utilizando una capa de soporte porosa, b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácidos nucleicos para un ácido nucleico diana utilizando una capa de soporte porosa que contiene un reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos, y c) hibridar una sonda de ácidos nucleicos con el producto de la reacción de amplificación de ácidos nucleicos, permitir que un precipitante de ácidos nucleicos actúe sobre el híbrido que ha sido producido de manera que se forme un agregado, y detectar el ácido nucleico diana en un espécimen utilizando el agregado obtenido en el que: i) un cebador y los demás reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos resultan separadamente retenidos dentro de soportes porosos diferentes, o ii) una polimerasa y los demás reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos resultan separadamente retenidos dentro de soportes porosos diferentes, o iii) la polimerasa, el cebador y los demás reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos resultan separadamente retenidos dentro de soportes porosos diferentes, y se permite que los soportes porosos entre en contacto mutuo al utilizarlos en la amplificación.
4. Método de análisis de ácidos nucleicos según la reivindicación 3, en el que el soporte poroso contiene un precipitante de ácidos nucleicos y/o una sonda de ácidos nucleicos.
5. Método de análisis de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la polimerasa en estado seco resulta retenida dentro de los soportes porosos.
6. Método de análisis de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la reacción de amplificación de ácidos nucleicos es una reacción LAMP.
7. Método de análisis de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el soporte poroso está realizado en por lo menos un material seleccionado de entre el grupo que consiste de papel de filtro, membrana de nilón, éster de celulosa, celulosa, tela no tejida, tela tejida, algodón, poliuretano y plásticos sinterizados.
8. Método de análisis de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que el precipitante de ácidos nucleicos es por lo menos un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste de hidroxiapatito, polietilenimina, sulfato de protamina, poli-L-lisina y dietilaminoetil-dextrano.
9. Sistema de análisis de ácidos nucleicos para llevar a cabo consistentemente la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos, comprendiendo dicho sistema dos o más soportes porosos que contienen un reactivo para la amplificación de ácidos nucleicos, en el que: i) un cebador y los demás reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos resultan separadamente retenidos dentro de soportes porosos diferentes, o ii) una polimerasa y los demás reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos resultan separadamente retenidos dentro de soportes porosos diferentes, o iii) la polimerasa, el cebador y los demás reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos resultan separadamente retenidos dentro de soportes porosos diferentes.

Fig. 1

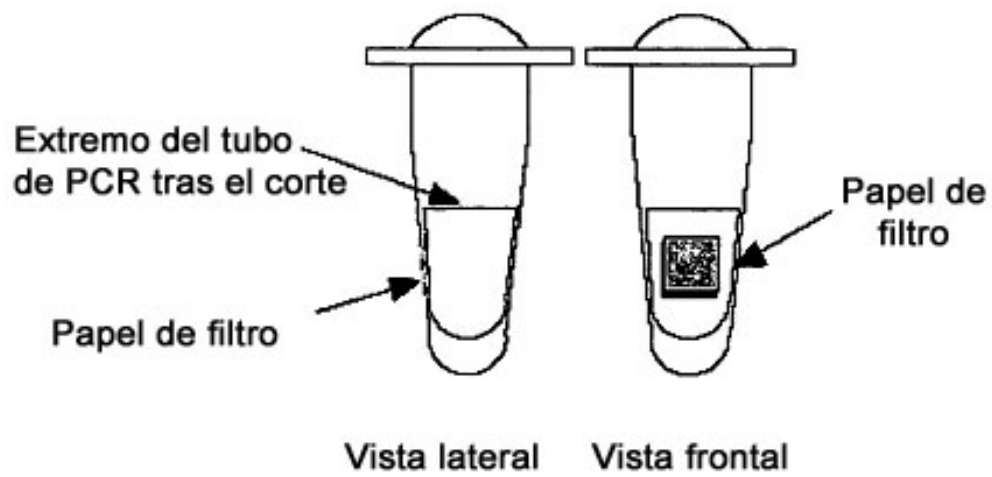


Fig. 2

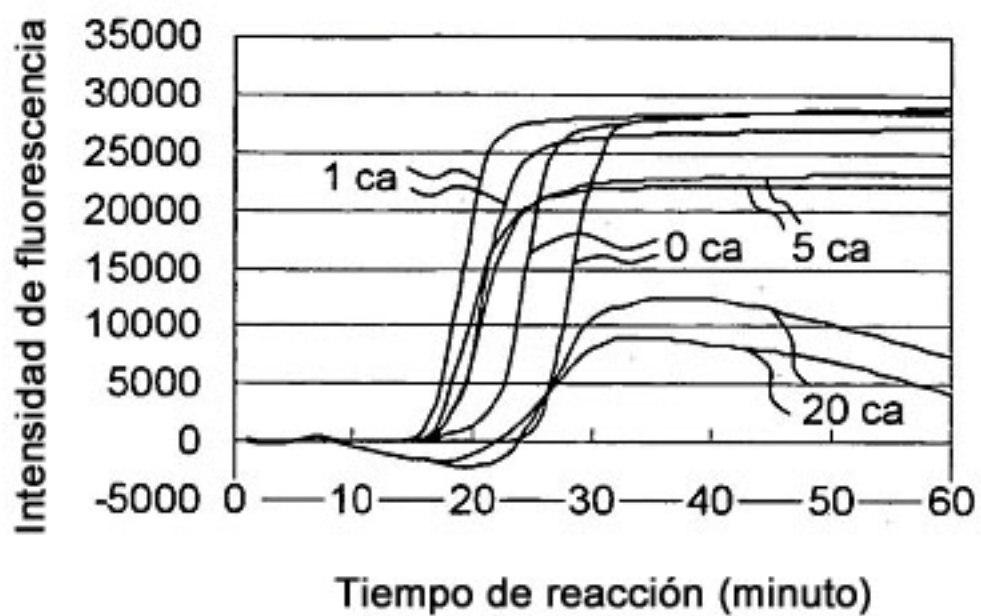
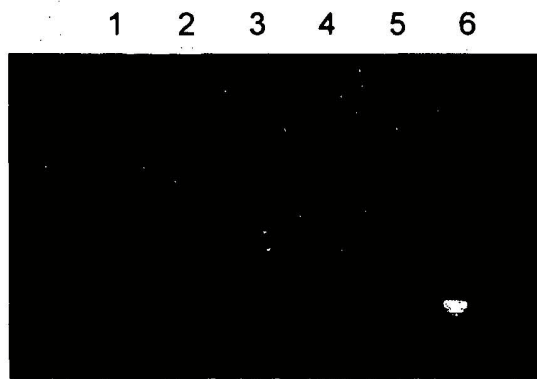


Fig. 3

A



B

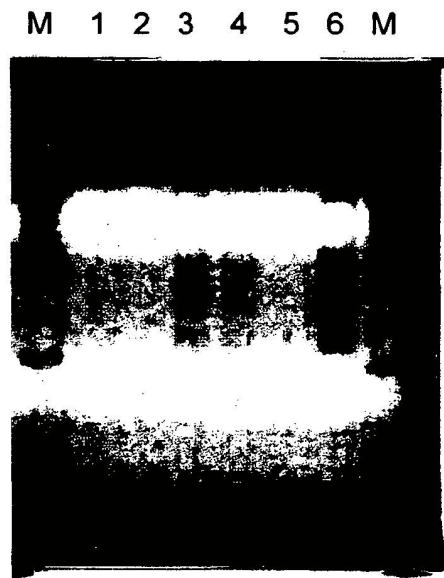
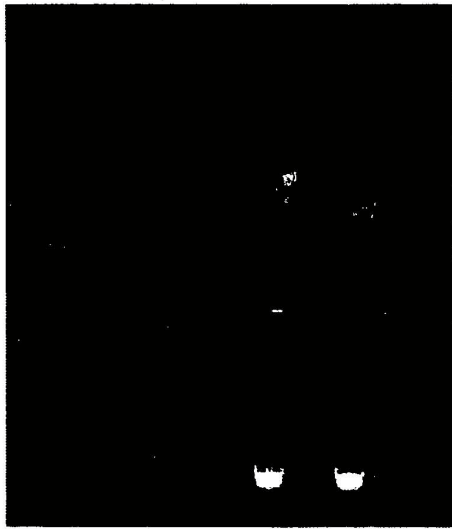


Fig. 4

A



B

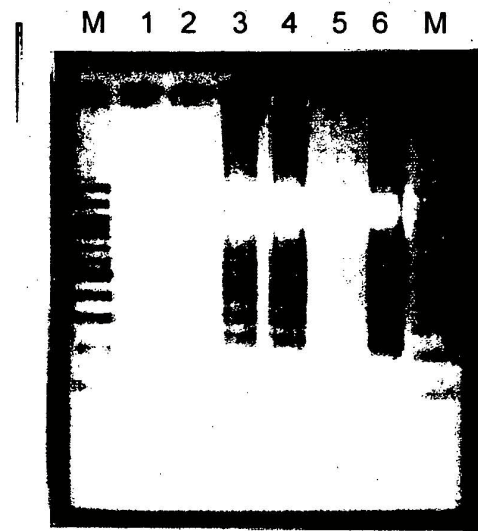
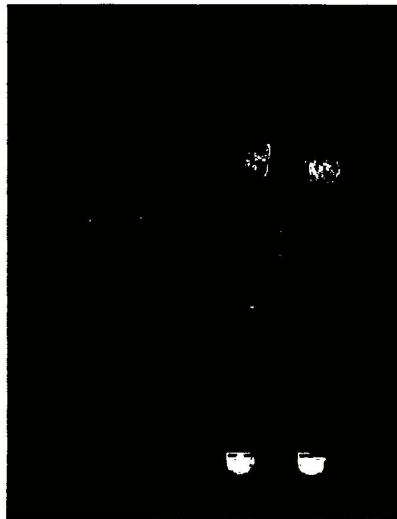


Fig. 5

A



B

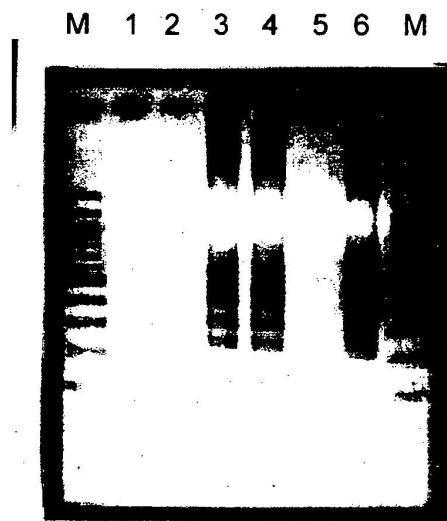
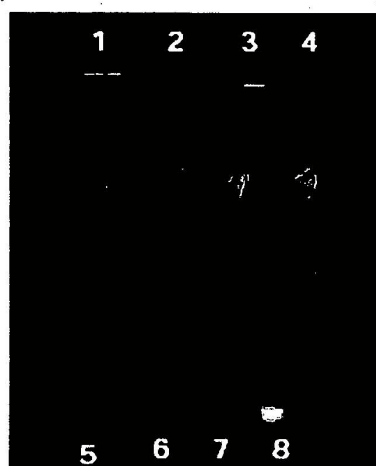


Fig. 6

A



B



Fig. 7

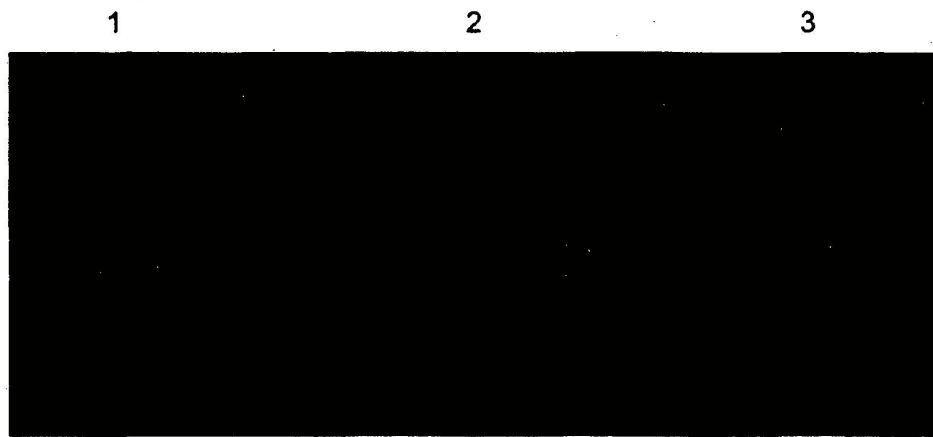


Fig. 8

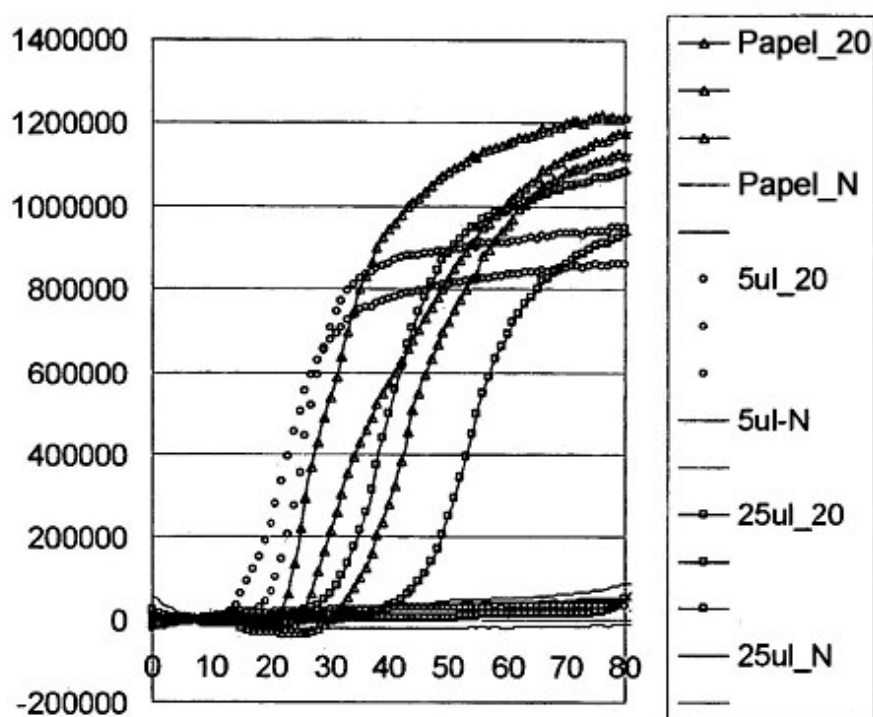


Fig. 9

