

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 452**

51 Int. Cl.:

B01L 3/14 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2001 E 01907539 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1257364**

54 Título: **Recipiente para el análisis de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

15.02.2000 DE 10006662

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

04.02.2014

73 Titular/es:

**PREANALYTIX GMBH (100.0%)
FELDBACHSTRASSE
8634 HOMBRECHTIKON, CH**

72 Inventor/es:

HELFTENBEIN, ELKE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 441 452 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

Recipiente para el análisis de ácidos nucleicos

La presente invención se refiere a un recipiente para la recogida de muestras, preferiblemente para la recolección de sangre, en donde la sangre extraída se debe utilizar de forma particular para la estabilización, aislamiento y análisis de ácidos nucleicos. Por el estado de la técnica se conocen procedimientos para el aislamiento de ácidos nucleicos (véanse, por ejemplo, los documentos DE 19702907, EP 0389063 o WO 97/05248).

De manera convencional, durante la extracción la sangre se recoge en recipientes que ya contienen anticoagulantes tales como, por ejemplo, heparina, citrato o EDTA. De esta forma se evita que la sangre coagule. Las muestras de sangre obtenidas de este modo se pueden conservar, a temperaturas adecuadas, durante periodos de tiempo prolongados. Sin embargo, esta clase de obtención de sangre tiene considerables inconvenientes cuando se deben analizar ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, ARNm o ADN. Para estos fines, los ácidos nucleicos contenidos en la muestra se deben estabilizar de forma óptima ya en el mismo momento de la recogida, es decir, se debe evitar la degradación de los ácidos nucleicos presentes y, del mismo modo, la neosíntesis de ARNm.

Hasta la fecha, no se ha alcanzado este objetivo de almacenar de forma estable los ácidos nucleicos contenidos en el material de muestra, durante el almacenamiento de la sangre desde el momento de su extracción, por las siguientes razones:

Las células contienen nucleasas, es decir, enzimas que degradan los ácidos nucleicos tan pronto como entran en contacto con sus sustratos (ARN, ADN). La acción de las nucleasas celulares y extracelulares se halla normalmente bajo control fisiológico, con la condición de que las células se encuentren en su ambiente habitual. La extracción de sangre da lugar a modificaciones más o menos intensas de los ácidos nucleicos contenidos en todas las células. Entonces, en el interior de las células y/o a causa de la lisis celular, se produce la liberación de nucleasas hacia el medio exterior. Además, se sintetizan ácidos nucleicos con mayor o menor intensidad. Precisamente, el almacenamiento prolongado de la sangre produce el envejecimiento y la degradación de las células.

Un problema adicional del almacenamiento a largo plazo de muestras de sangre obtenidas por los procedimientos de extracción habituales es la fuerte alteración del material de muestra. Estas alteraciones tales como, por ejemplo, la intensa lisis celular, pueden dar lugar a que los procedimientos convencionales de aislamiento de ácidos nucleicos no tengan resultados satisfactorios en cuanto a la eficiencia y reproducibilidad.

Al margen de los problemas de almacenamiento estable de los ácidos nucleicos contenidos en el material de prueba, en los procedimientos actuales de recolección de sangre existen otras dificultades. A menudo, en el aislamiento de ácidos nucleicos los anticoagulantes habituales no se separan con suficiente eficiencia e interfieren en el análisis posterior de los ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Por ejemplo, en general la heparina es un inhibidor conocido de la PCR.

Por último, en el análisis cuantitativo de los ácidos nucleicos se plantea la cuestión de cómo se puede controlar el procedimiento completo, desde la recogida de la muestra hasta la medición de ácidos nucleicos, bajo condiciones estandarizadas. En el mejor de los casos, ya durante la recolección de la muestra, se debería agregar un ácido nucleico estándar definido cuantitativa y cualitativamente que se vaya a someter al proceso integral de recepción de la muestra y su determinación. Tampoco esto es viable con los actuales sistemas de extracción.

Un inconveniente adicional de la recolección de sangre convencional es el riesgo de transmisión de material infeccioso, dado que hasta la fecha se requiere la realización de etapas manuales durante el procedimiento para el aislamiento del ácido nucleico. No se puede excluir el contacto con agentes patógenos potencialmente infecciosos.

En la bibliografía se describe un procedimiento en el que la muestra de sangre se mezcla con sal de guanidinio inmediatamente después de su extracción del paciente (documento EP 0818542A1). En este procedimiento, la sal de guanidinio está en forma de polvo para aprovechar de este modo la mayor estabilidad de la sal de guanidinio. Este procedimiento tiene, sin embargo, serios inconvenientes, dado que, por ejemplo, la sal se debe disolver en primer lugar en la sangre incorporada. El proceso de disolución es particularmente dependiente de la temperatura y no se puede controlar debido a la opacidad del material de muestra utilizado. El uso de un producto de este tipo con fines diagnóstico-médicos resulta, por lo tanto, muy problemático.

Las nucleasas son enzimas extraordinariamente activas, que se pueden inhibir sólo bajo condiciones de desnaturalización extremas. La desnaturalización depende de la concentración de la sal de guanidinio en solución. En el procedimiento del documento EP 0818542 no se indica desde el comienzo una concentración inhibitoria de sal de guanidinio en solución. Por lo tanto, se produce una degradación incontrolada de ácidos nucleicos durante el proceso de disolución. Además, en este procedimiento se renuncia a la adición de agentes reductores, sin los cuales normalmente no es posible garantizar una inhibición eficaz, en especial de RNAsas.

Aparte de ello, la muestra obtenida según los métodos actuales no se puede utilizar directamente para el aislamiento adicional de ácidos nucleicos en fases sólidas. El empleo del polvo de sal de guanidinio tampoco permite la adición de estándares internos de ácidos nucleicos. No obstante, estos estándares son imprescindibles para el control del procedimiento y una cuantificación exacta.

5 La presente invención tuvo como problema técnico poner a disposición un recipiente que no presente los inconvenientes del estado de la técnica. De forma especial, la muestra recogida con el recipiente se debe poder destinar directamente a los procedimientos analíticos habituales de ácidos nucleicos, sin necesidad de llevar a cabo etapas adicionales para la preparación de la muestra.

10 Este problema se resuelve según la invención por medio de un recipiente para la recolección de muestras con las características de la reivindicación 1.

En las reivindicaciones secundarias se ofrecen realizaciones preferidas adicionales.

15 El recipiente según la invención posee las siguientes ventajas: 1. La muestra, preferiblemente sangre, se somete a lisis en el mismo momento de la extracción, para lo que el recipiente de recolección contiene ya una solución de lisis que, al mismo tiempo, es una solución estabilizadora de ácidos nucleicos, 2. La solución estabilizadora de ácidos nucleicos actúa estabilizando el material de muestra, en particular los ácidos nucleicos que contiene, inmediatamente después del contacto con la solución, 3. La solución estabilizadora de ácidos nucleicos se selecciona, adicionalmente, de manera que el material de la muestra se pueda utilizar directamente en el siguiente procedimiento de aislamiento, 4. La solución estabilizadora de ácidos nucleicos se puede separar en el siguiente aislamiento de forma tan eficaz que no se produce una inhibición, por ejemplo, de la PCR. 5. A la solución estabilizadora de ácidos nucleicos se le puede agregar un estándar interno. Esto permite el control del procedimiento completo, desde la recolección de la muestra hasta la detección del ácido nucleico. 6. La fase sólida presente en el recipiente es especialmente apropiada para un aislamiento posterior de los ácidos nucleicos unidos a la misma. Además, por medio de la unión preferida de los ácidos nucleicos a la fase sólida se simplifica el aislamiento posterior, dado que en el recipiente tiene lugar una primera separación del ácido nucleico y otros componentes adicionales de la muestra.

20 La solución estabilizadora de ácidos nucleicos se puede seleccionar de manera que el ácido nucleico se una a la superficie correspondiente inmediatamente después de la lisis celular, o lo haga sólo después de la adición de otros reactivos. El primer caso tiene lugar, por ejemplo, cuando se utiliza una superficie de vidrio en presencia de una sal de guanidinio. El segundo caso se produce, por ejemplo, depositando una superficie recubierta con biotina y la adición posterior de estreptavidina con propiedades de unión a los ácidos nucleicos.

El recipiente se puede usar básicamente para la recogida de cualquier fluido corporal. De forma particular, es adecuado para la recogida de fluidos corporales que contienen componentes celulares tales como, por ejemplo, también médula ósea. Preferiblemente, sin embargo, se trata de un recipiente para la recolección directa de sangre total de un donante.

35 El recipiente se compone, preferiblemente, de un recipiente para recolección de sangre actualmente disponible (por ejemplo, un tubo), que contiene un volumen definido de una solución estabilizadora de ácidos nucleicos y una fase sólida que fija ácidos nucleicos. En el tubo se aplica, preferiblemente, una presión negativa definida que permite la recolección de sólo un volumen determinado de sangre. El tubo se puede manejar con los métodos convencionales de la extracción de sangre. La solución contenida en el tubo contiene en su realización preferida los reactivos siguientes: una sal de guanidinio, por ejemplo tiocianato de guanidinio, un detergente, por ejemplo Triton-X-100, un agente reductor, por ejemplo ditiotreitól, y un sistema tamponante adecuado tal como, por ejemplo, citrato, Tris, MES o Hepes. En la composición descrita, la solución es compatible con el tubo de vacío. La solución se puede depositar sin problemas en el tubo de vacío, sin que se produzca ninguna limitación de la función estabilizadora deseada. El sistema completo carece de complicaciones especialmente para el donante de sangre y es seguro para la extracción de muestras.

La solución que contiene la sal de guanidinio y que actúa como sustancia de lisis y estabilizadora, la fase sólida que se une al ácido nucleico, la sustancia tamponante, el agente reductor y el detergente son estables al almacenamiento y transforman la sangre fresca recogida en un material que es también estable al almacenamiento y que se puede usar inmediatamente para el análisis o aislamiento posterior de ácidos nucleicos.

50 Como sal de guanidinio se prefieren tiocianato de guanidinio y/o cloruro de guanidinio.

Preferiblemente, la sal de guanidinio está presente en una concentración de 1 hasta 8,0 M.

Como sustancia tamponante se prefieren Tris o citrato, y el pH exacto se ajusta preferiblemente con HCl. Otros tampones posibles son, sin embargo, HEPES, MOPS, MES, tampón citrato y fosfato tal como, por ejemplo, PBS.

5 Como fase sólida se pueden usar todos los materiales capaces de fijar ácidos nucleicos. Especialmente apropiadas son las partículas de vidrio, polímeros que se unen a ácidos nucleicos recubiertos con dichas partículas, recubrimientos que fijan ácidos nucleicos del sistema de extracción o partículas recubiertas con sílice. La superficie de la fase sólida que fija ácidos nucleicos puede estar recubierta, de manera alternativa, con moléculas de unión específicas (por ejemplo, estreptavidina, oligonucleótidos, ácidos péptido-nucleicos (APN)) que interaccionan con moléculas marcadoras sobre los ácidos nucleicos o directamente con los ácidos nucleicos. La conformación de los materiales depende únicamente de la forma del sistema de extracción y del subsiguiente método de aislamiento. Son especialmente apropiadas las conformaciones que se pueden utilizar inmediata y directamente después para el procesamiento posterior de ácidos nucleicos, y son muy especialmente adecuadas las superficies que son compatibles con los procedimientos de aislamiento actuales tales como, por ejemplo, partículas magnéticas o materiales no tejidos.

10 Las fases sólidas apropiadas están disponibles en el comercio, por ejemplo partículas magnéticas recubiertas con sílice como las que contiene el Kit de Aislamiento de ARNm para Sangre/Médula Ósea (Roche).

15 La concentración del tampón es preferiblemente de entre 10 y 300 mM y, de forma especialmente preferida, de entre 10 y 100 mM.

Como detergente se prefiere Triton-X-100. Otros detergentes posibles son NP-40, Tween 20, Polidocanol u otros detergentes.

La concentración del detergente es preferiblemente de 5 a 30% (p/v) y, de forma especialmente preferida, de 10 a 20% (p/v).

20 Como agente reductor se prefiere DTT, aunque también se pueden usar β -mercaptoetanol, TCEP (Tris-(2-carboxietil)-fosfina) u otros agentes reductores.

La concentración preferida del agente reductor es de 0,1 a 10% (p/v); se prefieren en especial 0,5 a 2% (p/v).

El pH de la solución es preferiblemente de 3,0 a 9,0 y, de forma especialmente preferida, de 4,0 a 7,5.

25 De manera especial, el pH de la solución se selecciona de modo que tras la adición del material de muestra se obtenga un valor de pH en el intervalo de 5,0 a 7,5. Puesto que mediante el establecimiento de la presión negativa se determina el volumen de muestra que se extraerá, mediante el depósito de una concentración de tampón deseada o de un volumen correspondiente de solución es posible garantizar que, tras la recogida del volumen total de la muestra, se obtenga también el pH deseado. Se prefiere de forma especial un pH de entre 6,3 y 6,9 tras la recogida de la muestra.

30 Una solución especialmente preferida contiene tiocianato de guanidinio 4,5 M, Tris/HCl 50 mM, 15% (p/v) de Triton-X-100, DTT 100 mM, una fase sólida de partículas de vidrio o partículas magnéticas recubiertas con sílice, en donde el pH se ajusta de modo que, tras la adición de sangre, se obtenga un pH de 6 a 7,5.

35 En otra realización preferida, el volumen para la recogida de la muestra de sangre exhibe una presión negativa que se puede ajustar de forma que en el recipiente se absorba un volumen de sangre previamente determinado después de haber insertado un recipiente para sangre. En el mercado hay disponibles también recipientes de vacío correspondientes.

El recipiente que contiene la sangre recogida se puede someter entonces directamente al análisis siguiente, o se puede conservar durante un periodo mayor de tiempo (hasta varios días o semanas), sin inconvenientes para la calidad de la muestra.

40 En el procedimiento según la invención, la sangre recién extraída se pone en contacto directamente en el recipiente de recolección de sangre con la solución descrita anteriormente, de manera que se detienen todos los procesos que pueden modificar el patrón de ácidos nucleicos de la muestra. Preferiblemente, los ácidos nucleicos pueden estar presentes en el recipiente ya fijados a la fase sólida o unirse a la fase sólida en una etapa de reacción posterior.

45 Los datos de los ácidos nucleicos detectados, calculados posteriormente en el marco de la analítica de ácidos nucleicos, representan por lo tanto de forma muy precisa la situación real en el momento de la recolección de la sangre, tanto en lo que respecta a las cantidades como a los tipos de ácidos nucleicos.

50 Preferiblemente, la cantidad de sangre recolectada corresponde a 0,1 hasta 4 veces la solución contenida en el recipiente. Esta última se encuentra presente preferiblemente en un volumen de 0,5 hasta 5,0 ml. De este modo, la concentración final de sal de guanidinio tras la adición de sangre es preferiblemente de 1,0 a 5 M, preferiblemente de 1,0 a 3,0 M.

El recipiente según la invención se utiliza entonces, preferiblemente, para la recolección de sangre en los casos en que la muestra de sangre se debe emplear para el análisis de ácidos nucleicos.

El uso de la solución indicada anteriormente como componente del sistema de extracción descrito garantiza por sí solo la lisis inmediata de las células y la estabilización simultánea de la muestra, a través de la inactivación inmediata de las nucleasas. Sorprendentemente, la muestra de sangre obtenida de este modo se puede conservar incluso a temperatura ambiente durante varios días. El sistema de extracción garantiza, además, la manipulación libre de contaminación e infecciones de la muestra desde el aislamiento de los ácidos nucleicos hasta su análisis. En el procedimiento usado actualmente para el aislamiento de ácidos nucleicos, siempre han sido necesarias hasta ahora etapas de manipulación adicionales (tales como la transferencia de la muestra de sangre extraída hacia los reactivos para aislar los ácidos nucleicos, etc.), lo que se asocia con un riesgo adicional de infección o de contaminación de la muestra.

De manera sorprendente, los ácidos nucleicos unidos a la fase sólida también se pueden aislar fácilmente del material de muestra tras un almacenamiento prolongado. La presencia de la fase sólida durante la lisis de la muestra conduce a la unión inmediata de los ácidos nucleicos a la superficie. De esta forma, se evitan pérdidas de rendimiento causadas, por ejemplo, por la formación de precipitados que pueden aparecer después del almacenamiento prolongado, puesto que la superficie con los ácidos nucleicos unidos de manera prácticamente cuantitativa se puede separar fácilmente del sistema.

La muestra obtenida con el sistema de extracción de sangre se puede someter a procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos empleados en la actualidad; con el uso de partículas magnéticas recubiertas con sílice es posible recurrir a los procedimientos convencionales actuales (separación magnética, lavado, elución de los ácidos nucleicos).

Por lo tanto, la presente invención consta de un sistema de extracción de muestras, concebido de forma que se satisfacen las condiciones siguientes: 1. Recolección controlada de la muestra y estabilización simultánea de los ácidos nucleicos (ADN, ARN) contenidos en el material de prueba. 2. Recolección de la muestra, en la que se puede renunciar por completo al uso de anticoagulantes. 3. Unión de los ácidos nucleicos (inmediatamente o después de otra etapa procedimental) a una fase sólida contenida en la muestra. 4. La muestra obtenida con el sistema descrito se puede integrar fácilmente en los sistemas de aislamiento de ácidos nucleicos existentes. 5. El sistema, junto con la muestra contenida en su interior, es estable al almacenamiento.

Además, de forma sorprendente se ha demostrado que la muestra obtenida con el sistema de extracción descrito es estable al almacenamiento en el recipiente, sin degradación de los ácidos nucleicos, durante un periodo de tiempo más prolongado.

Los ejemplos siguientes explican la invención.

Figura 1:

Recipiente para recolección de muestras con sustancia estabilizadora de ácidos nucleicos (N-sS), vacío definido, con fase sólida, y sellado con un tapón.

Figura 2:

Representación gráfica de un análisis sobre gel (agarosa al 1%) de ARNr de 28S y 18S, que han sido conservados en el recipiente de recolección de muestras durante periodos de tiempo diferentes. Columna 1: Aislamiento y separación del ARN inmediatamente después de la recolección de la muestra (sin almacenamiento); Columna 2: Almacenamiento durante un mes a -20°C; Columna 3: Almacenamiento durante 6 días a 4°C. La cantidad de ARN obtenido correspondió a un volumen de sangre de 120 µl.

Figura 3:

Representación gráfica de un análisis sobre gel (agarosa al 1%) de ADN que ha sido conservado en el recipiente de recolección de muestras durante periodos de tiempo diferentes. Columna 1: Aislamiento inmediatamente después de la recolección de la muestra (sin almacenamiento); Columna 2: Almacenamiento durante un mes a -20°C; Columna 3: Almacenamiento durante 6 días a 4°C. La cantidad de ADN obtenido correspondió a un volumen de sangre de 10 µl.

Figura 4:

Representación gráfica de un análisis sobre gel de ARN de MS2 aislado, tras incubación en suero/solución estabilizadora con/sin DTT, después de 180 min a 40°C.

Columna 1: Control positivo: ARN de MS-2; Columna 2: Marcador de ADN; Columnas 3 a 5: ARN de MS-2 tras incubación con solución estabilizadora que contiene DTT (triple determinación); Columnas 6 a 8: ARN de MS-2 tras incubación con solución estabilizadora sin DTT (triple determinación).

Figura 5:

Representación gráfica de un análisis sobre gel de ARN de MS2, aislado tras la incubación en suero/solución estabilizadora durante 3 días a 40°C. En la columna correspondiente se indica el contenido de tiocianato de guanidinio (contenido de GTC) de la solución estabilizadora tras la adición de suero en la que se incubó el ARN citado.

Columna 1: GTC 2,70 M; Columna 2: GTC 2,5 M; Columna 3: GTC 2,36 M; Columna 4: GTC 2,2 M; Columna 5: GTC 2,08 M; Columna 6: 1,94 M; Columna 7: GTC 1,80 M; Columna 8: GTC 1,66 M.

Figura 6:

Representación gráfica de un análisis sobre gel de los amplificados por PCR de ARN de MS2, aislados después de 1 u 8 días de incubación a 40°C en suero/solución estabilizadora.

Columna 1: Amplificado del ARN aislado después de un día; Columna 2: Amplificado del ARN aislado después de 8 días; Columna 3: Marcador de ADN; Columna 4: Control positivo de ARN de MS2: 0,8 µg en 10 µl de transcriptasa inversa, diluido 1:50, amplificado a 1 µl.

Figura 7:

Representación gráfica de un análisis sobre gel de ARN de MS2 aislado después de 6 (Columnas 2 a 12) o 13 días (Columnas 14 a 19) de incubación a temperatura ambiente en suero/solución estabilizadora. Detrás de la correspondiente columna se muestra el valor de pH alcanzado tras la mezcla de suero y solución estabilizadora.

Columnas 1, 13, 20: Marcador de ADN; Columna 2: pH 8,0; Columna 3: pH 7,7; Columna 4: pH 7,5; Columna 5: pH 7,35; Columna 6: pH 7,18; Columnas 7, 14: pH 7,07; Columnas 8, 15: pH 6,94; Columnas 9, 16: pH 6,8; Columnas 10, 17: pH 6,72; Columnas 11, 18: pH 6,68; Columnas 12, 19: pH 6,7. Las soluciones estabilizadoras del ARN en las Columnas 12, 19 tuvieron el mismo valor de pH que las del ARN en la Columna 11, pero contuvieron GTC 5 M en lugar de 4 M.

Figura 8:

Representación gráfica de la detección de ARN y ADN en gel de agarosa estándar (agarosa al 1%). Columna 1: Marcador de peso molecular; Columna 2 a 4: Ácidos nucleicos aislados; Columna 2: Ácido nucleico de lisado de sangre total mezclado con ARN de MS2 (7 días); Columna 3: Ácido nucleico de lisado de sangre total mezclado con ARN de MS2 (0 días, control); Columna 4: Ácido nucleico de lisado de sangre total (7 días); Columna 5: Ácido nucleico de lisado de sangre total (0 días, control). Las bandas anteriores muestran ADN cromosómico (claramente reconocible en las 4 muestras), y las bandas inferiores en las Columnas 2 y 3 muestran el ARN de MS2 agregado y aislado.

Ejemplo 1:

Sistema de extracción de sangre

En una realización preferida, el sistema de extracción de sangre puede estar formado del modo siguiente (véase Figura 1): Se rellena un tubo con un volumen definido de la solución estabilizadora de ácidos nucleicos, se agrega una fase sólida que fija ácidos nucleicos y se genera un vacío definido y, a continuación, se cierra con un tapón. El tapón está construido de manera que es compatible con los accesorios para la toma de muestras (cánulas, etc.). En el presente ejemplo, se depositaron 2,2 ml de reactivo y el vacío se ajustó de modo que, al extraer la muestra, se pudieran recoger exactamente 2,2 ml de sangre. Los ácidos nucleicos contenidos en la corriente de sangre recolectada se transformaron inmediatamente a una forma estable.

Observaciones generales acerca de los ejemplos siguientes.

Si no se indica lo contrario, la sustancia estabilizadora de ácidos nucleicos (N-sS) descrita en los ejemplos siguientes tuvo la siguiente composición: Tris 45 mM, tiocianato de guanidinio 5 M, 0,8% (p/v) de ditreititol, 18% (p/v) de Triton-X-100, pH 6,0.

En todos los ejemplos descritos, la sustancia estabilizadora de ácidos nucleicos se mezcló con la muestra en una proporción de 1 a 1 (1 volumen de N-sS más 1 volumen de material de muestra).

En todos los ejemplos, la sangre se estabilizó agregándola inmediatamente después de la recolección al tubo que contiene N-sS.

Ejemplo 2:

Estabilidad del ácido nucleico tras la mezcla de material de muestra y N-sS. Aislamiento de ARN y ADN del lisado de muestra con superficies derivatizadas con sílice.

Material y Métodos:

- 5 El material de muestra para el aislamiento de ADN y ARN se usó inmediatamente después de la recolección, después del almacenamiento durante 6 días a 4°C y después del almacenamiento durante 1 mes a -20°C.

10 Para el aislamiento de ARN (Fig. 2) se empleó el Kit de Aislamiento de ARN High Pure (Boehringer Mannheim, n° de catálogo 1828 665). Las instrucciones que aparecen en el prospecto de envase se modificaron del modo siguiente: El volumen de 2,4 ml de lisado de muestra se aplicó en la columna como 4 partes alícuotas de 600 µl respectivamente, de manera que, en total, se aplicó material de muestra procedente de 2,4 ml de lisado. Todas las etapas restantes se llevaron a cabo según el prospecto de envase. Finalmente, el ARN se eluyó con 100 µl de tampón de elución.

15 Para el aislamiento de ADN (Fig. 3) se empleó el Kit QiaAmp Blood (n° de catálogo de Qiagen 29104). El procedimiento estándar descrito en el prospecto de envase se modificó en diferentes puntos: Se aplicaron directamente 400 µl de volumen de la muestra a la columna, sin utilizar el reactivo de unión que contiene el kit. Se agregaron 25 µl de solución madre de proteinasa-K y la muestra se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente, la columna se incorporó en un recipiente de recogida y se centrifugó del modo descrito en el prospecto de envase. Todas las etapas adicionales, hasta el uso de etanol, se llevaron a cabo de la forma descrita en el prospecto de envase. El volumen de elución fue de 200 µl.

20 Ejemplo 3:

Importancia de los reactivos reductores (por ejemplo, DTT) en la solución estabilizadora para la estabilización a largo plazo de ARN

Material y Métodos:

Solución estabilizadora utilizada:

25 GTC 4,0 M; 13,5% de Triton-X-100; Tris/HCl 45 mM; con o sin DTT 120 mM. Se mezclaron 700 µl de suero con 700 µl de solución estabilizadora. Después de 2 min de incubación, se agregaron 20 µl de ARN de MS2 (0,8 µg/µl de Roche Diagnostics). Las muestras se incubaron durante 180 min a 40°C y, seguidamente, se procesaron en partes alícuotas de 400 µl con el Kit de ARN total High Pure de Roche, según el Experimento 1. Las muestras se eluyeron en 50 µl y se congelaron a -20°C. El análisis se llevó a cabo mediante gel de agarosa (véase Fig. 4).

30 Resultado: Sin la adición de reactivos reductores a la solución estabilizadora no es posible lograr una estabilización a largo plazo de ARN.

Ejemplo 4:

Estabilidad de ARN de MS2 en suero/solución estabilizadora: Dependencia de la concentración de GTC

Material y Métodos:

35 Soluciones estabilizadoras utilizadas: GTC 3 a 5 M; 13,5% de Triton-X-100; DTT 50 mM; Tris/HCl 42 mM;

pH de las soluciones: aprox. 4,0;

pH de las soluciones tras la adición de suero: aprox. 6,7.

40 Se mezclaron 2 ml de suero con 2,5 ml de la correspondiente solución estabilizadora. Después de un tiempo de incubación de 2 a 5 min, se agregaron 90 µl de ARN de MS2 (0,8 µg/µl de Roche) y se incubó a 40°C. A intervalos regulares se retiraron 400 µl de muestra y se procesaron con el Kit de ARN total High Pure de Roche, según el Experimento 1. Las muestras se eluyeron en 50 µl y se congelaron a -20°C. Para el análisis de la integridad de ARN se aplicaron 20 µl de eluato sobre un gel de agarosa al 1,5% (Fig. 5). El análisis por PCR de fase inversa tuvo lugar mediante transcriptasa inversa (TI)-AMV y PCR. Respectivamente, 10 µl del eluato se sometieron a transcripción inversa por medio de TI-AMV (Roche) y, a continuación, se analizaron por PCR cuantitativa en el dispositivo Lightcycler.

45

ES 2 441 452 T3

Mezcla para TI: (42°C durante 1 h)	4,0 µl 2,0 µl 0,5 µl 1,0 µl 1,9 µl 0,6 µl 10 µl	Tampón de TI-AMV dNTP's (concentración final 10 mM) Inhibidor de RNasa (Roche, 20 unidades) Cebador 2827 (concentración final 1 µM) DMPC-agua TI-AMV (Roche, 15 unidades) Molde de ARN
	20 µl	

- 5 La PCR se llevó a cabo en el Lightcycler a una temperatura de hibridación de 61°C, usando SYBR-Green como sistema de detección. Todas las muestras con un ciclo umbral mayor de 20 se consideran negativas, dado que la señal detectada se atribuye exclusivamente a la formación de dímeros del cebador. Esto se puede demostrar claramente por el análisis de las curvas de fusión en el LightCycler (Roche). El producto de TI se diluyó a 1:50 con agua bidestilada y se empleó 1 µl del mismo para una PCR de 10 µl según el esquema siguiente:

Mezcla para PCR:	1,6 µl 5,9 µl 0,25 µl 0,25 µl 1,0 µl 1,0 µl	MgCl ₂ (solución madre 25 mM) DMPC-agua Cebador 2827 (solución madre 20 mM) Cebador 2335 (solución madre 20 mM) SYBR-Green-Mastermix (Roche) Mezcla de TI
	10 µl	

El amplificado de PCR se aplicó en su totalidad sobre un gel de agarosa al 2% (véase Fig. 6).

10 Resultado:

- La Figura 5 muestra el ARN de MS2 eluido después de 3 días de incubación a 40°C, detectado en gel de agarosa. Aunque después de 8 días a 40°C todavía todas las muestras de ARN están amplificadas y se pueden detectar claramente, al cabo de 3 días se pueden observar ya diferencias manifiestas en la integridad del ARN en función del contenido de GTC. En este sentido, un contenido de sal menor que 2 M en el suero/solución estabilizadora resulta ventajoso para la integridad del ARN.

- 15 No se muestra el hecho de que 2 min después de la adición de suero, el ARN de MS2 está completamente degradado por las RNasas y, por consiguiente, ya no se detecta ARN. Con este ejemplo fue posible confirmar que la degradación del ARN se puede retrasar claramente por la adición de solución estabilizadora al suero. Después de 8 días a 40°C en suero/solución estabilizadora se puede detectar sin dificultades ARN de MS2 mediante PCR (Fig. 6).

20 Ejemplo 5

Estabilidad de ARN de MS2 en suero/solución estabilizadora: Dependencia del valor de pH de la muestra mezclada con solución estabilizadora

Material y Métodos

Solución utilizada:	4 M (5 M) 14,4% 50 mM 45 mM	GTC Triton X 100 DTT Tris HCl
---------------------	--------------------------------------	--

pH tras la adición de suero entre 6,7 y 8,0

- 25 Se mezclaron 2,5 ml de solución estabilizadora con 2,0 ml de suero. Después de la adición de 90 µl de ARN de MS2 (0,8 µg/ml, Roche), las muestras se incubaron a temperatura ambiente. A intervalos regulares se procesó el ARN de 500 µl de muestra con el Kit de ARN viral de Roche, según el ejemplo 4 y se aisló en 50 µl de tampón de elución. Se analizaron 20 µl del eluato mediante gel de agarosa (véase Fig. 7).

Resultados:

- 30 El pH del suero/solución estabilizadora y, por lo tanto, también el pH y el nivel de tampón de la solución estabilizadora, son decisivos para la estabilización de ARN a largo plazo. Mientras que con un valor de pH de 8,0 no

se pudo detectar ARN intacto ya al cabo de 2 días, con un intervalo de pH entre 6,6 y 7,0 se detectó ARN intacto todavía después de 13 días de incubación a temperatura ambiente. Sin embargo, además del valor de pH, el ajuste óptimo de la concentración de GTC es importante para la estabilización de ARN a largo plazo (véase Ejemplo 4). El ejemplo representado pone de manifiesto que para la estabilización de ARN a largo plazo es mejor una concentración final de GTC en la muestra estabilizada de GTC 2,2 M que la de 2,8 M.

Ejemplo 6

Demostración de la estabilidad de una superficie que fija ácidos nucleicos en presencia de solución estabilizadora con el uso de partículas magnéticas recubiertas con sílice

Material y Métodos

Solución utilizada:	4,5 M	GTC
	15%	Triton X 100
	100 mM	DTT
	50 mM	MES

A partir del Kit de Aislamiento de ARNm para Sangre/Médula Ósea (Roche Molecular Biochemicals) se extrajeron las partículas magnéticas recubiertas con sílice. La cantidad de partículas usadas por ml fue de aprox. 35 mg. El sistema de recolección de sangre, compuesto por el tubo de recolección, la solución estabilizadora y las partículas magnéticas, se almacenó a temperatura ambiente durante 14 días. A continuación, se recogió sangre total con este sistema. Como control se utilizó un sistema de recolección recién preparado (tubo, solución estabilizadora, partículas magnéticas). Se llevó a cabo el aislamiento de los ácidos nucleicos contenidos en el material de muestra a partir de las dos preparaciones. Las partículas magnéticas se retiraron con un imán y se eliminó el sobrenadante. Las partículas se suspendieron nuevamente en etanol al 50%, Tris 10 mM, pH 7,0 y se lavaron múltiples veces con la misma solución. Por último, las partículas se calentaron a 70°C en Tris/HCl 10 mM, mediante lo cual los ácidos nucleicos se desprenden de las partículas magnéticas. Las partículas se separaron magnéticamente y el sobrenadante que contuvo los ácidos nucleicos se analizó en gel de agarosa estándar.

Resultado:

	Muestra (14 días, TA)	Control (0 días)
Detección de ácidos nucleicos en gel	+	+

Tabla 1:

Después de 14 días de almacenamiento, la propiedad de fijación de la fase sólida a los ácidos nucleicos no se ha modificado. La muestra, al igual que el control, exhiben las mismas propiedades de fijación de ácidos nucleicos.

Ejemplo 7

Estabilidad, aislamiento y detección de ADN y ARN después de 7 días de almacenamiento, con unión simultánea a partículas magnéticas recubiertas con sílice

Material y Métodos

Solución utilizada:	4,5 M	GTC
	15%	Triton X 100
	100 mM	DTT
	50 mM	MES
	35 mg/ml	Partículas

Se mezclaron 4 sistemas de recolección de sangre (tubos) que contuvieron la suspensión descrita anteriormente con 1 ml de sangre total. Dos de los tubos (lisado de sangre total) se mezclaron adicionalmente con 25 µg de ARN de MS2. Cada uno de los tubos con ambas preparaciones (lisado de sangre total +/- ARN de MS2) se sometió inmediatamente después a aislamiento de ácidos nucleicos (realización, véase Ejemplo 6). Los otros dos tubos se almacenaron a temperatura ambiente durante 7 días. Después de este periodo de tiempo, se llevó a cabo el aislamiento de ácidos nucleicos. El volumen de elución fue de 200 µl por 200 µl de volumen de sangre total. Los ácidos nucleicos se analizaron en gel de agarosa estándar.

Resultado:

Después de 7 días de almacenamiento en el sistema de recolección de muestras (solución, fase sólida) se demuestra la estabilidad del ADN cromosómico y del ARN de MS2 (Fig. 8).

REIVINDICACIONES

1. Recipiente para la recogida de muestras, preferiblemente recolección de sangre, que contiene una solución acuosa que contiene una sal de guanidinio, una sustancia tamponante, un agente reductor y un detergente, que es capaz de estabilizar los ácidos nucleicos, y una fase sólida, capaz de fijar ácidos nucleicos, caracterizado por que tiene una presión negativa en el espacio previsto para la recolección de muestras.
2. Recipiente según la reivindicación 1, caracterizado por que la sal de guanidinio se selecciona entre tiocianato de guanidinio y cloruro de guanidinio.
3. Recipiente según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que la sal de guanidinio está presente en una concentración de 1 hasta 8 M.
4. Recipiente según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la solución tiene, tras la adición del material de muestra, un valor de pH de 4 a 7,5, y por que la solución tamponante se selecciona entre Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris), ácido 2-(4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil)-etanosulfónico (HEPES), ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico (MOPS), ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES), tampón de citrato y fosfato.
5. Recipiente según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la fase sólida está presente, de manera separada, como material no tejido, filtro, partícula, gel, esfera, tapón y/o varilla, y/o está unida directamente con el recipiente.
6. Recipiente según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la sustancia tamponante está presente en una concentración de 10 a 300 mM.
7. Recipiente según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el detergente se selecciona entre Triton-X-100, NP-40, Polidocanol y Tween 20.
8. Recipiente según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que el detergente está presente en una concentración de 5 a 30% en peso.
9. Recipiente según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que el agente reductor se selecciona entre ditioneitol (DTT), β-mercaptoetanol y Tris(2-cloroetil)fosfato (TCEP).
10. Recipiente según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que el agente reductor está presente en una concentración de 0,1 a 10,0% en peso.
11. Recipiente según una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que el pH de la solución se encuentra entre 4,0 y 7,5.
12. Recipiente según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que tras la adición del material de muestra se alcanza un valor de pH entre 5,0 y 7,5.
13. Recipiente según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que la solución contiene los siguientes componentes: Tiocianato de guanidinio 4,5 M; MES 50 mM; 15% (p/v) de Triton-X-100; DTT 100 mM, en donde el pH se ajusta de forma que, tras la adición de sangre, se obtiene un pH de 6,0 a 7,5.
14. Procedimiento para estabilizar y/o aislar ácidos nucleicos de la sangre total, que comprende las etapas de recolectar sangre total en un recipiente según una de las reivindicaciones 1 a 13 y, eventualmente, aislar los ácidos nucleicos unidos a la fase sólida.

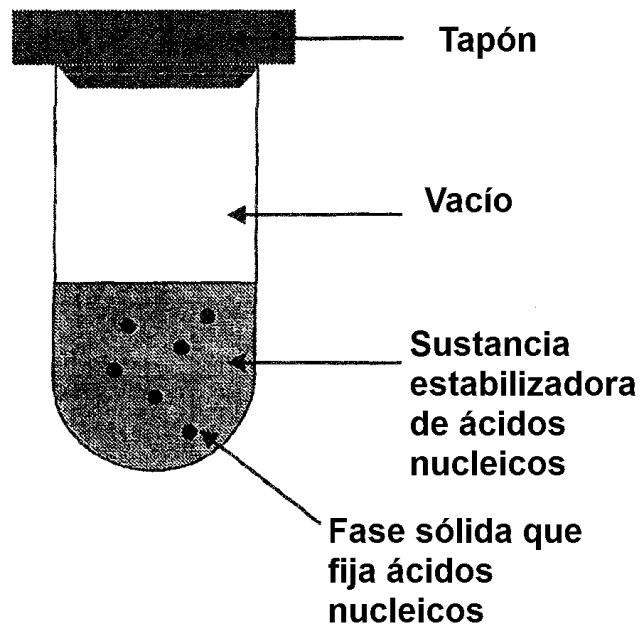


Fig. 1

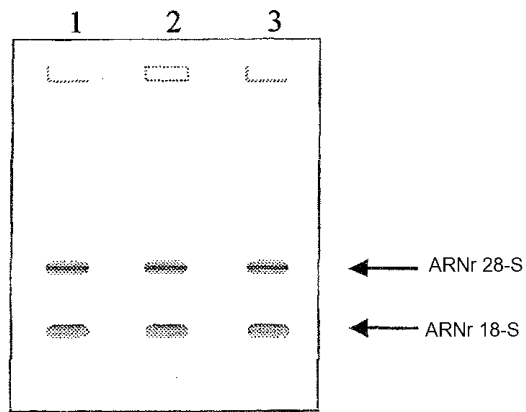


Fig. 2

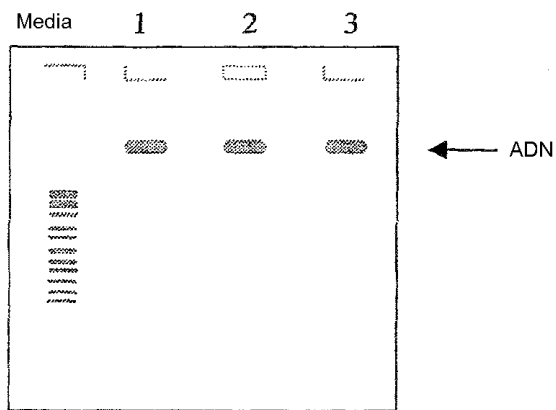


Fig. 3

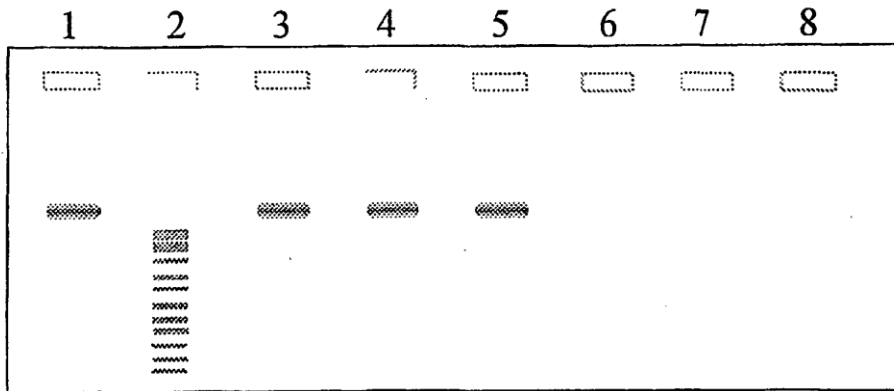


Fig. 4

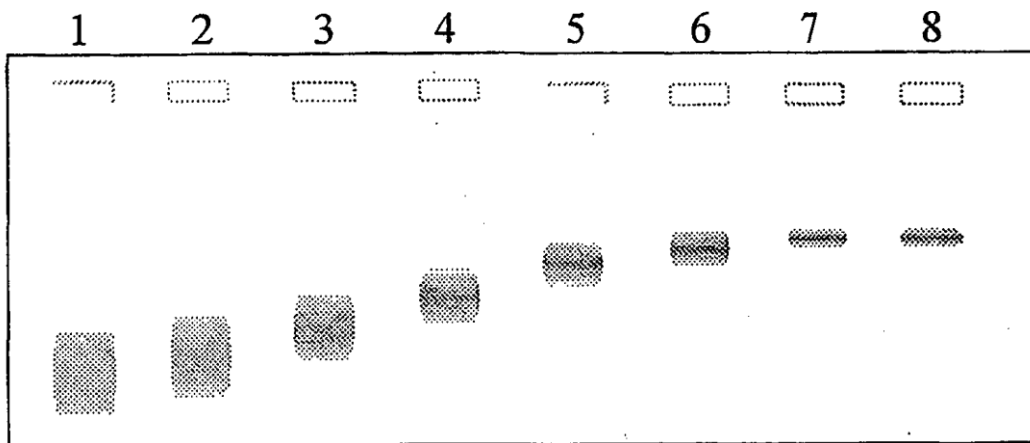


Fig. 5

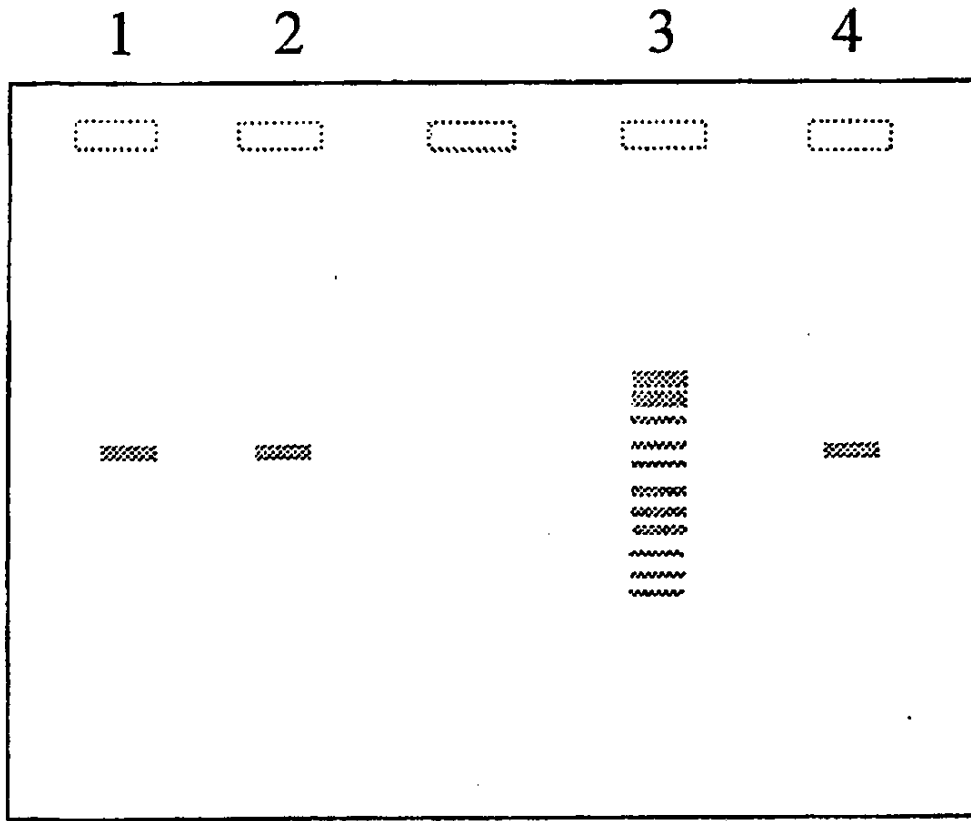


Fig. 6

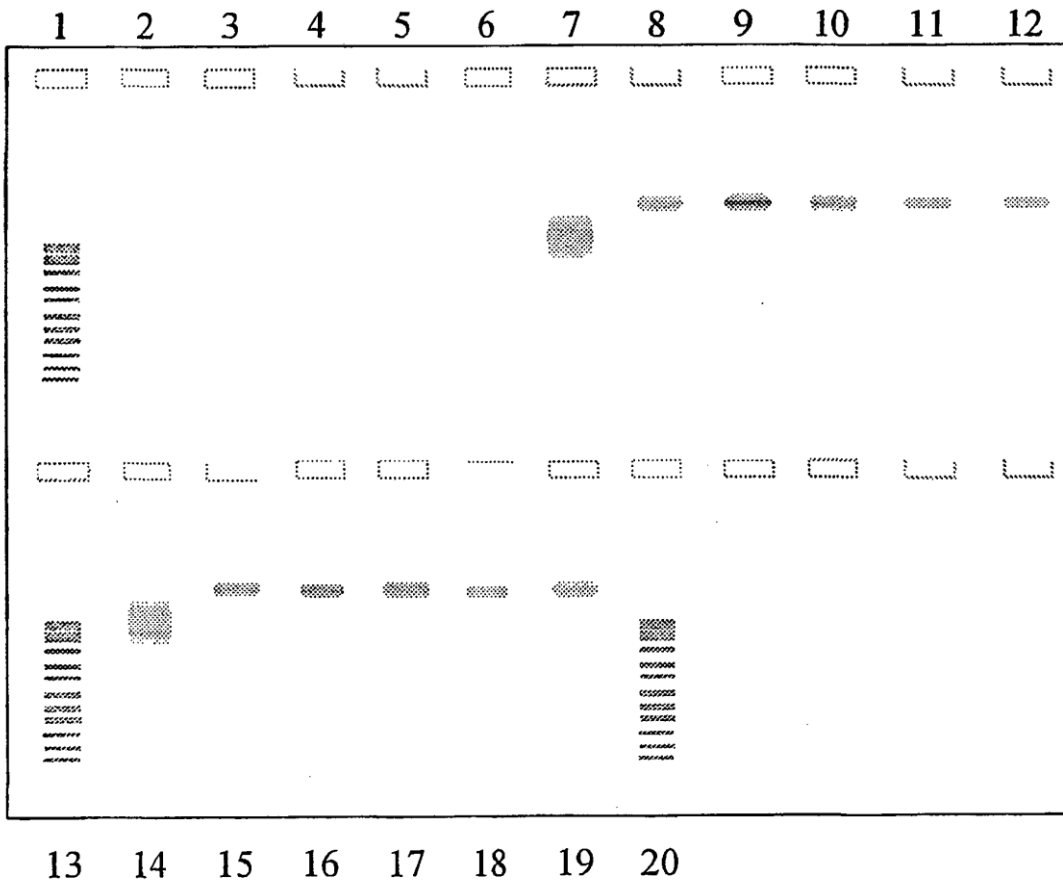


Fig. 7

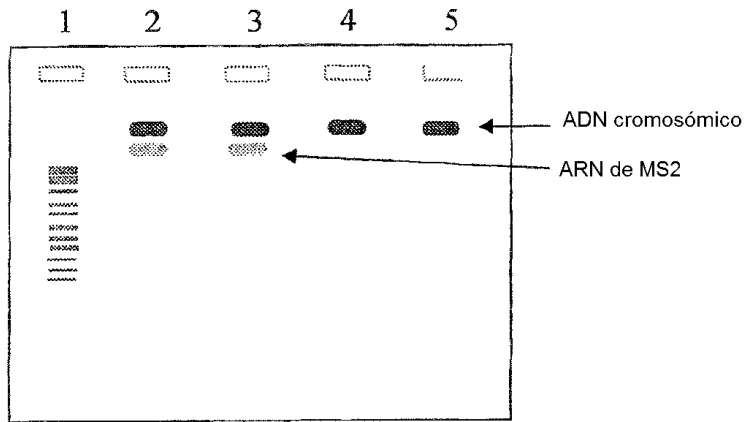


Fig. 8