

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 483**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2008 E 08847811 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2218791**

54 Título: **Método y kit para la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico**

30 Prioridad:

**05.11.2007 JP 2007287655**

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

**10.02.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MORI, YASUYOSHI;  
NOTOMI, TSUGUNORI y  
SHINDOME, TSUYOSHI**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

**ES 2 528 483 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 y kit para la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico

### Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método y a un kit para la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico.

### Antecedentes de la técnica

Las técnicas de amplificación de ácido nucleico, incluyendo métodos de PCR y LAMP, han llegado a usarse en muchos campos de la biología tales como biología molecular y medicina, y se usan comúnmente para la obtención del perfil de ADN, pruebas alimentarias, pruebas de saneamiento medioambiental y pruebas con animales y plantas.

10 Cuando la muestra de prueba es un líquido puede usarse directamente como muestra de amplificación de ácido nucleico para la amplificación del ácido nucleico diana, pero puesto que el ácido nucleico diana está presente en células en el caso de una muestra biológica, la muestra biológica debe disolverse usando un lisado celular (por ejemplo, una disolución de álcali o tensioactivo) y eluirse el ácido nucleico de las células para preparar la muestra de amplificación de ácido nucleico.

15 Por ejemplo, puede añadirse una disolución que contiene dodecilsulfato de sodio a la muestra biológica y calentarse la mezcla para desnaturalizar la proteína, o añadirse una disolución acuosa de hidróxido de sodio a la misma, para romper las membranas celulares y eluir el ácido nucleico para su uso como muestra de amplificación de ácido nucleico.

20 Los esputos y la saliva son muestras biológicas muy importantes para el diagnóstico de enfermedad pulmonar tal como tuberculosis.

Sin embargo, habitualmente es difícil amplificar de manera estable ácido nucleico a partir de esputo o saliva, y por tanto la detección de *Mycobacterium* en esputo o saliva para su diagnóstico se logra habitualmente licuando el esputo o la saliva muestreados con hidróxido de sodio o similar y realizando separación centrífuga, recogiendo las células de *Mycobacterium* como precipitado y cultivándolas (documento de patente 1).

25 Cuando se prepara una muestra de amplificación de ácido nucleico a partir de una muestra biológica distinta de esputo o saliva, sustancias tales como proteínas, polisacáridos y lípidos que se eluyen con el ácido nucleico de las células inhiben parcial o completamente la reacción de amplificación de ácido nucleico, y por tanto se obtienen resultados no reproducibles o la presencia o el nivel de expresión del ácido nucleico diana no puede evaluarse de manera precisa.

30 Además, el tensioactivo usado en la preparación de la muestra de amplificación de ácido nucleico a partir de la muestra biológica puede inhibir parcial o completamente la reacción de amplificación de ácido nucleico si está presente por encima de una determinada concentración en la muestra de amplificación de ácido nucleico, y por tanto la muestra de amplificación de ácido nucleico debe diluirse para la reacción de amplificación de ácido nucleico.

35 Por estos motivos ha sido muy difícil realizar el diagnóstico de pacientes mediante la amplificación de ácido nucleico diana y hacer pruebas precisas para alimentos o saneamiento medioambiental, o de animales o plantas.

[Documento de patente 1] Publicación de patente japonesa no examinada HEI n.º 9-173065

### Descripción de la invención

#### Problemas que van a solucionarse mediante la invención

40 Un objeto de la presente invención es eliminar sustancias en muestras biológicas y extractos de ácido nucleico que puedan inhibir la amplificación de ácido nucleico, y permitir una evaluación conveniente y precisa de la presencia de ácido nucleico diana o el nivel de expresión de un gen diana en una muestra biológica, mediante medios de amplificación de ácido nucleico que emplean una enzima.

#### Medios para solucionar los problemas

45 Con el fin de lograr el objeto establecido anteriormente, se proporciona un método para la preparación de una muestra para su uso en la amplificación de ácido nucleico, que va a usarse para la amplificación de ácido nucleico en una muestra biológica, método que comprende una etapa de extracción en la que se añade un reactivo de extracción de ácido nucleico a la muestra biológica para obtener un extracto de ácido nucleico, y una etapa de purificación en la que el extracto de ácido nucleico se pone en contacto con zeolita para obtener una muestra de amplificación de ácido nucleico adecuada para la amplificación de ácido nucleico, que permite la detección de ácido nucleico a alta sensibilidad.

50

- 5 El término "zeolita" se refiere colectivamente a sales de ácido aluminosilícico con microporos en sus cristales, y éstas tienen un esqueleto básico que es una estructura de red tridimensional de tetrahedros de  $\text{SiO}_4$  y  $\text{AlO}_4$  enlazados por átomos de oxígeno compartidos. La zeolita contiene cationes tales como iones de metales alcalinos, iones de metales alcalinotérreos, iones amonio o iones hidrógeno en los cristales, y "zeolita protonada" es zeolita que contiene iones hidrógeno en los cristales. La zeolita con una "estructura cristalina de mordenita" es zeolita que tiene una estructura cristalina que refleja una estructura esquelética en columna hexagonal. La zeolita es preferiblemente zeolita con una razón S/A (razón de abundancia de silicio/aluminio) de 20 o más, y más preferiblemente zeolita con una razón S/A de 39 o más.
- 10 Los presentes inventores han encontrado que sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico en muestras biológicas y extractos de ácido nucleico se adsorben eficazmente en la zeolita, pero que el propio ácido nucleico diana que va a usarse como molde para la reacción de amplificación de ácido nucleico no se adsorbe en la zeolita. El término "adsorbido" significa que la sustancia se incorpora uniéndose sobre la superficie de la zeolita o en sus microporos.
- 15 Puesto que el método de preparación descrito anteriormente permite que sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico, que están presentes en una muestra biológica o extracto de ácido nucleico, se eliminan de la muestra de amplificación de ácido nucleico, es posible preparar una muestra de amplificación de ácido nucleico que permite la detección reproducible de ácido nucleico diana incluso a partir de muestras biológicas que normalmente no permiten una fácil amplificación de ácido nucleico.
- 20 El reactivo de extracción de ácido nucleico es preferiblemente uno que comprende un tensioactivo y/o álcali, en el que el tensioactivo es más preferiblemente un tensioactivo aniónico.
- El tensioactivo aniónico es preferiblemente al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en sales de ácido alquilsulfúrico, sales de ácido alquiletersulfúrico y sales de ácido alquilbencenosulfúrico, prefiriéndose más dodecilsulfato de sodio.
- 25 Sales de ácido alquilsulfúrico, sales de ácido alquiletersulfúrico y sales de ácido alquilbencenosulfúrico como tensioactivos aniónicos pueden aumentar la eficacia de extracción de ácido nucleico a partir de muestras biológicas, permitiendo por tanto una eliminación eficaz de muestras de amplificación de ácido nucleico usando zeolita.
- La etapa de extracción es preferiblemente una etapa en la que se añade un reactivo de extracción de ácido nucleico a la muestra biológica, con la adición de una sal inorgánica, para obtener un extracto de ácido nucleico.
- 30 La etapa de purificación es preferiblemente una etapa en la que se añade zeolita al extracto de ácido nucleico y se mezcla, y entonces se aísla la zeolita mediante separación centrífuga o filtración para obtener la muestra de amplificación de ácido nucleico.
- La etapa de purificación también es preferiblemente una etapa en la que el extracto de ácido nucleico se hace pasar a través de una columna de eliminación empaquetada con zeolita para eliminar las sustancias que se adsorben sobre la zeolita, es decir, las sustancias que inhiben la detección de ácido nucleico de alta sensibilidad, para obtener la muestra de amplificación de ácido nucleico.
- 35 Usando una columna de eliminación empaquetada con zeolita se elimina la necesidad de una etapa de eliminación de la zeolita de la muestra de amplificación de ácido nucleico mediante separación centrífuga, y por tanto puede acortarse la etapa para la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico, al mismo tiempo que también se impide la pérdida de muestra de amplificación de ácido nucleico.
- 40 El método para la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico permite la preparación de una muestra de amplificación de ácido nucleico que es adecuada para la amplificación de ácido nucleico, ya sea la muestra biológica sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, heces, esputo, saliva, descarga nasal o fluido tomado con torundas, sin eliminar la viscosidad o diluir las sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico.
- La zeolita es preferiblemente zeolita protonada, y preferiblemente tiene una estructura cristalina de mordenita.
- 45 La zeolita protonada puede eliminar satisfactoriamente tensioactivos aniónicos de muestras de amplificación de ácido nucleico, y una estructura cristalina de mordenita permite que la desalación y neutralización de la muestra de amplificación de ácido nucleico se lleven a cabo simultáneamente.
- La descripción proporciona además un kit para la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico, que va a usarse en el método de preparación descrito anteriormente, comprendiendo el kit un reactivo de extracción de ácido nucleico y zeolita.
- 50 Puesto que este kit de preparación permite la eliminación de sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico, que están presentes en una muestra biológica o extracto de ácido nucleico, es posible preparar fácilmente una muestra de amplificación de ácido nucleico que permite la detección reproducible de ácido nucleico diana incluso a partir de muestras biológicas que no permiten una fácil amplificación de ácido nucleico.

El reactivo de extracción de ácido nucleico en el kit de preparación descrito anteriormente es preferiblemente uno que comprende un tensioactivo y/o álcali, en el que el tensioactivo es más preferiblemente un tensioactivo aniónico. La zeolita es preferiblemente zeolita protonada con una estructura cristalina de mordenita.

5 Si la zeolita está protonada y tiene una estructura cristalina de mordenita, será posible eliminar eficazmente tensioactivos aniónicos de las muestras de amplificación de ácido nucleico y llevar a cabo simultáneamente la desalación y neutralización.

10 Puesto que el kit de preparación de la invención permite la preparación de una muestra de amplificación de ácido nucleico adecuada para la detección de ácido nucleico altamente sensible, puede usarse satisfactoriamente como reactivo de composición en un kit de detección de amplificación de ácido nucleico, y si todos o parte de los reactivos en el kit de detección de amplificación de ácido nucleico son reactivos secos, será posible obtener una sensibilidad de detección superior y mejorar enormemente la operatividad para el examen génico.

#### Efecto de la invención

15 Según la invención es posible eliminar sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico, que están presentes en una muestra biológica o extracto de ácido nucleico, de una muestra de amplificación de ácido nucleico, y preparar una muestra de amplificación de ácido nucleico que permite la detección reproducible de ácido nucleico diana incluso a partir de muestras biológicas que normalmente no permiten una fácil amplificación de ácido nucleico. Según la invención, es posible preparar una muestra de amplificación de ácido nucleico que es adecuada para la amplificación de ácido nucleico, ya sea la muestra biológica sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, heces, esputo, saliva, descarga nasal o fluido tomado con torundas, sin requerir eliminación de la viscosidad o dilución de las  
20 sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico. También es posible, según la invención, eliminar satisfactoriamente tensioactivos aniónicos de muestras de amplificación de ácido nucleico y lograr simultáneamente la desalación y neutralización de muestras de amplificación de ácido nucleico.

#### **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es una vista en perspectiva de una columna de eliminación empaquetada con zeolita.

25 La figura 2 es un gráfico que muestra los resultados del examen de adsorción de ácido nucleico diana en zeolita (HSZ-690HOA por Tosoh Corp.).

La figura 3 es un gráfico que muestra los resultados del examen del efecto de neutralización de hidróxido de sodio de la zeolita.

La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados del examen del efecto de eliminación de SDS de la zeolita.

30 La figura 5 es un gráfico que muestra los resultados del examen del efecto de desalación de la zeolita.

La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados del examen de la influencia de la preparación de la muestra biológica y la composición del extracto de ácido nucleico sobre la amplificación del ácido nucleico diana.

35 La figura 7 muestra los resultados de la amplificación del ácido nucleico diana mediante LAMP, usando una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada a partir de sangre mediante tratamiento con zeolita (muestra tratada con zeolita) y una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita).

La figura 8 muestra los resultados (1) de una prueba para determinar cómo la reacción de amplificación de ácido nucleico se ve influida por la cantidad introducida de una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita en una mezcla de reacción de LAMP (25 µl).

40 La figura 9 muestra los resultados (2) de una prueba para determinar cómo la reacción de amplificación de ácido nucleico se ve influida por la cantidad introducida de una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita en una mezcla de reacción de LAMP (25 µl).

45 La figura 10 muestra los resultados de amplificación de ácido nucleico diana mediante PCR, usando una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita (muestra tratada con zeolita) y una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita).

La figura 11 muestra los resultados de amplificación de ácido nucleico diana mediante RT-LAMP, usando una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita (muestra tratada con zeolita) y una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita).

#### Explicación de símbolos

50 1: Tubo de centrifugación, 3: zeolita, 5: casete, 7: membrana, 10: columna de eliminación.

### Mejores modos para llevar a cabo la invención

Se explicarán ahora los modos preferidos de la invención.

5 El método de preparación de la descripción es un método para la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico, que va a usarse para la amplificación de ácido nucleico en una muestra biológica, método que comprende una etapa de extracción en la que se añade un reactivo de extracción de ácido nucleico a la muestra biológica para obtener un extracto de ácido nucleico, y una etapa de purificación en la que el extracto de ácido nucleico se pone en contacto con zeolita para obtener una muestra de amplificación de ácido nucleico adecuada para la amplificación de ácido nucleico para permitir la detección de ácido nucleico a alta sensibilidad.

10 El término "zeolita" se refiere colectivamente a sales de ácido aluminosilícico con microporos en sus cristales, y éstas tienen una estructura principal básica que es una estructura de red tridimensional de tetrahedros de  $\text{SiO}_4$  y  $\text{AlO}_4$  enlazados por átomos de oxígeno compartidos. La zeolita contiene cationes tales como iones de metales alcalinos, iones de metales alcalinotérreos, iones amonio o iones hidrógeno en los cristales, y "zeolita protonada" es zeolita que contiene iones hidrógeno en los cristales. Zeolita con una "estructura cristalina de mordenita" es zeolita que tiene una estructura cristalina que refleja una estructura esquelética en columna hexagonal. La zeolita es preferiblemente zeolita con una razón S/A (razón de abundancia de silicio/aluminio) de 20 o más, y más preferiblemente zeolita con una razón S/A de 39 o más.

15 El término "muestra biológica" usado a lo largo de toda la presente memoria descriptiva se refiere a un espécimen proporcionado para la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico, que es todo o una parte de células, tejidos u órganos biológicos, e incluye especímenes muestreados directamente del cuerpo así como especímenes obtenidos del medio ambiente tales como agua, suelo o aire. El término "muestra de amplificación de ácido nucleico" se refiere a una muestra preparada para su uso en amplificación de ácido nucleico diana, como una disolución que contiene el ácido nucleico diana.

20 La muestra biológica puede ser, por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, heces, esputo, saliva, descarga nasal o fluido tomado con torundas.

25 En la etapa de extracción, se añade preferiblemente un reactivo de extracción de ácido nucleico que contiene un tensioactivo aniónico y/o alcali a la muestra biológica para extraer el ácido nucleico, y el tensioactivo aniónico es preferiblemente al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en sales de ácido alquilsulfúrico, sales de ácido alquiletersulfúrico y sales de ácido alquibencenosulfúrico.

30 Los ejemplos de sales de ácido alquilsulfúrico incluyen dodecilsulfato de sodio, decilsulfato de sodio y laurilsulfato de sodio, los ejemplos de sales de ácido alquiletersulfúrico incluyen lauril éter sulfato de sodio, polioxietilenaureil éter sulfato de sodio y polioxietilenoiristil éter sulfato de sodio, y los ejemplos de sales de ácido alquibencenosulfúrico incluyen dodecibencenosulfato de sodio, etilbencenosulfato de sodio y butilbencenosulfato de sodio, entre los que se prefiere dodecilsulfato de sodio.

35 Como ejemplos de álcalis pueden mencionarse hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio y agua amoniacal, prefiriéndose particularmente hidróxido de sodio.

El procedimiento para la etapa de extracción puede realizarse basándose en un método de ebullición o un método de disolución con alcali que puede llevarse a cabo fácilmente por un experto en la técnica.

40 Específicamente, en un método de ebullición, la muestra biológica se coloca en un microtubo y, en el caso de una muestra biológica líquida (sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, suspensión de heces, esputo, saliva, descarga nasal o fluido tomado con torundas), el reactivo de extracción de ácido nucleico que contiene el tensioactivo aniónico se añade directamente y la mezcla se somete a ebullición durante 15 minutos, o se permite que repose durante 10-15 minutos en un bloque de calentamiento a  $95^\circ\text{C}$  (denominado "tratamiento térmico" a continuación en el presente documento). Cuando la muestra biológica es un sólido (tal como un tejido u órgano), puede añadirse una cantidad equivalente de agua esterilizada a un microtubo que contiene la muestra biológica, y la mezcla se somete rápidamente a congelación y fusión repetidas, o se suelta físicamente con una pipeta o espátula, y entonces se añade el reactivo de extracción de ácido nucleico que contiene tensioactivo aniónico antes del tratamiento térmico. El reactivo de extracción de ácido nucleico también puede añadirse a una suspensión de la muestra biológica en agua esterilizada o una disolución de tamponamiento, y suministrarse para el tratamiento posterior.

45 En el caso de una muestra biológica fácilmente extraíble, puede añadirse agua esterilizada y llevarse a cabo el tratamiento térmico sin adición del reactivo de extracción de ácido nucleico que contiene tensioactivo aniónico.

50 Para un método de disolución con alcali, por otro lado, la muestra biológica se coloca en un microtubo y, si la muestra biológica es un líquido, se añade directamente reactivo de extracción de ácido nucleico que contiene alcali y la mezcla se agita con un vórtex hasta la disolución de las células, antes del tratamiento térmico.

55 Cuando la muestra biológica es un sólido, puede añadirse una cantidad equivalente de agua esterilizada a un microtubo que contiene la muestra biológica, y la mezcla se somete rápidamente a congelación y fusión repetidas o

se suelta físicamente con una pipeta o espátula, de la misma manera descrita anteriormente, y entonces se añade el reactivo de extracción de ácido nucleico que contiene álcali y la mezcla se agita con un vórtex hasta la disolución del tejido u órgano, antes del tratamiento térmico.

5 Para un aumento de la eficacia de extracción, puede añadirse un tensioactivo aniónico al reactivo de extracción de ácido nucleico que contiene álcali para la extracción del ácido nucleico de la muestra biológica.

10 En la etapa de extracción, se añade preferiblemente un reactivo de extracción de ácido nucleico a la muestra biológica, con la adición de una sal inorgánica, para obtener un extracto de ácido nucleico. La condición de adición de sal inorgánica es la condición de que se añada una sal inorgánica a la mezcla de muestra biológica/reactivo de extracción de ácido nucleico, usando una disolución de la sal inorgánica en un tampón o similar para la dilución de la muestra biológica o usando un reactivo de extracción de ácido nucleico que contiene sal inorgánica, o una combinación de ambos procedimientos, para la extracción del ácido nucleico. El procedimiento para la extracción del ácido nucleico de la muestra biológica puede llevarse a cabo mediante el método descrito anteriormente con la condición de adición de una sal inorgánica.

15 Los ejemplos de sales inorgánicas incluyen sales de sodio y sales de potasio, prefiriéndose particularmente cloruro de sodio y cloruro de potasio. La cantidad de sal inorgánica añadida es preferiblemente de 5-100 mM y más preferiblemente de 15-30 mM como concentración final en la mezcla de la muestra biológica y el reactivo de extracción de ácido nucleico.

20 En la etapa de purificación, el extracto de ácido nucleico se pone en contacto con zeolita para eliminar del extracto de ácido nucleico las sustancias que se adsorben sobre la zeolita, y la zeolita es preferiblemente zeolita protonada y más preferiblemente tiene una estructura cristalina de mordenita. El término "adsorbido" significa que la sustancia se incorpora mediante unión sobre la superficie de la zeolita o en sus microporos.

25 El término "zeolita" se refiere colectivamente a sales de ácido aluminosilícico con microporos en sus cristales, y éstas tienen una estructura principal básica que es una estructura de red tridimensional de tetraedros de  $\text{SiO}_4$  y  $\text{AlO}_4$  enlazados por átomos de oxígeno compartidos. La zeolita contiene cationes tales como iones de metales alcalinos, iones de metales alcalinotérreos, iones amonio o iones hidrógeno en los cristales, y "zeolita protonada" es zeolita que contiene iones hidrógeno en los cristales. Zeolita con una "estructura cristalina de mordenita" es zeolita que tiene una estructura cristalina que refleja una estructura esquelética en columna hexagonal. La zeolita es preferiblemente zeolita con una razón S/A (razón de abundancia de silicio/aluminio) de 20 o más, y más preferiblemente zeolita con una razón S/A de 39 o más.

30 Como primer modo de la etapa de purificación, se añade zeolita al extracto de ácido nucleico y se mezcla con el mismo, y entonces se aísla la zeolita mediante separación centrífuga o filtración para obtener una muestra de amplificación de ácido nucleico. Este procedimiento puede eliminar sustancias que se adsorben sobre la zeolita del extracto de ácido nucleico, de modo que la disolución obtenida puede usarse como muestra de amplificación de ácido nucleico.

35 Como segundo modo de la etapa de purificación, el extracto de ácido nucleico se hace pasar a través de una columna de eliminación empaquetada con zeolita para eliminar las sustancias que se adsorben sobre la zeolita, para obtener una muestra de amplificación de ácido nucleico. Este procedimiento puede eliminar del extracto de ácido nucleico las sustancias que inhiben la detección de ácido nucleico de alta sensibilidad, de modo que la disolución que se eluye de la columna de eliminación puede usarse como muestra de amplificación de ácido nucleico.

40 Las sustancias que inhiben la detección de ácido nucleico de alta sensibilidad son componentes inhibidores tales como sales en el espécimen, o álcalis, tensioactivos y agua del reactivo de extracción.

La figura 1 es una vista en perspectiva de una columna de eliminación empaquetada con zeolita.

45 La columna de eliminación 10 comprende un casete 5 empaquetado con zeolita 3 montado sobre un tubo de centrifugación 1. El casete 5 está anclado firmemente al tubo de centrifugación 1 cerca del centro entre la abertura y la sección inferior del tubo de centrifugación, y tiene una construcción tal que el extracto de ácido nucleico aplicado a través de la abertura del tubo de centrifugación 1 no evita el contacto con la zeolita empaquetada en el casete 5.

50 Se proporciona una membrana 7 en la sección inferior del casete 5, y está diseñada de modo que incluso cuando la columna de eliminación 10 se ha centrifugado con un separador centrífugo, la zeolita 3 se sujeta mediante el casete 5 y no cae hacia la sección inferior del tubo de centrifugación 1. La membrana 7 puede ser, por ejemplo, papel de filtro, fibra de vidrio, un material textil no tejido de pulpa, rayón, fibras sintéticas, resina de flúor o similar. El peso de carga de la zeolita 3 puede ser de aproximadamente 300 mg hasta 100  $\mu\text{l}$  de muestra biológica, y esto puede ajustarse apropiadamente dependiendo del tipo y la cantidad de muestra biológica.

55 Los ejemplos de métodos para eliminar sustancias adsorbidas sobre la zeolita 3 del extracto de ácido nucleico, usando la columna de eliminación 10, incluyen un método de aplicación del extracto de ácido nucleico a la columna de eliminación 10 y esperar a que caiga de manera natural hacia abajo, y un método de centrifugación de la columna de eliminación en un separador centrífugo, y en cualquier método, la muestra de amplificación de ácido nucleico de

la que se han eliminado las sustancias adsorbidas sobre la zeolita 3, puede obtenerse en la sección inferior de la columna de eliminación 10.

5 Los diferentes tipos de reactivos, necesarios para el método para la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico según la invención, pueden empaquetarse previamente para su uso en un kit para la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico, o un kit para la detección de amplificación de ácido nucleico. En otras palabras, también se proporciona un kit para la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico y un kit para la detección de amplificación de ácido nucleico, que comprende zeolita y un reactivo de extracción de ácido nucleico que incluye un tensioactivo aniónico y/o un álcali.

10 Se mencionaron anteriormente ejemplos específicos para el tensioactivo aniónico, el álcali y la zeolita.

La zeolita está preferiblemente protonada y tiene una estructura cristalina de mordenita, y el kit puede comprender la columna de eliminación 10 empaquetada en lugar de zeolita.

15 Además, si todos o una parte de los reactivos en cada kit se liofilizan en la cantidad necesaria y se proporcionan como reactivos secos, es posible producir una sensibilidad de detección superior y también mejorar enormemente la operatividad para el examen génico.

### Ejemplos

La presente invención se explicará ahora en mayor detalle con referencia a los ejemplos, con la comprensión de que no se pretende que la invención se limite a estos ejemplos.

(Ejemplo 1) Examen de la adsorción de ácido nucleico diana sobre zeolita

20 Para la eliminación de sustancias que inhiben la reacción de amplificación de ácido nucleico, que están presentes en un extracto de ácido nucleico preparado a partir de una muestra biológica (sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico), usando zeolita, es una condición esencial que el ácido nucleico diana que se usará como molde no se adsorba sobre la zeolita. Se usaron por tanto tres tipos diferentes de zeolita para someter a prueba si el ácido nucleico diana que va a usarse como molde se adsorbe sobre la zeolita.

25 En primer lugar, se añadieron 80  $\mu$ l de agua esterilizada y 100  $\mu$ l de 2 x reactivo de extracción de ácido nucleico (NaOH 0,4 M, SDS al 1%) a un microtubo, y se calentó la mezcla a 95°C durante 15 minutos y entonces se permitió que reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos para que se enfriara, tras lo que se añadieron 20  $\mu$ l de disolución de ácido nucleico diana. Se usó una disolución de ADN genómico (100 copias/ $\mu$ l) extraído de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en cultivo como disolución de ácido nucleico diana.

30 A continuación, se añadieron 300 mg de suspensión de zeolita acuosa al microtubo que contenía la disolución de ácido nucleico diana y se mezclaron con la misma mediante inversión del microtubo, tras lo que se permitió que la mezcla reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se usó el sobrenadante obtenido mediante centrifugación como muestra de amplificación de ácido nucleico (muestra tratada con zeolita), amplificando el ácido nucleico diana en 10  $\mu$ l de la misma mediante el método de LAMP. La zeolita usada era de 3 tipos: HSZ-690HOA (forma protonada y forma de mordenita, producto de Tosoh Corp.), HSZ-940HOA (forma protonada y forma beta, producto de Tosoh Corp.) y HSZ-980HOA (forma protonada y forma beta, producto de Tosoh Corp.), y se sometió a prueba cada tipo de zeolita.

35 Para la prueba, se llevó a cabo la amplificación del ácido nucleico diana de la misma manera mediante LAMP usando una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada mediante la adición de un equivalente de agua esterilizada en lugar de la disolución de ácido nucleico diana (control negativo), y una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada mediante la simple adición de 9  $\mu$ l de agua esterilizada a 1  $\mu$ l de disolución de ácido nucleico diana (que contenía 100 copias de ADN genómico: control positivo).

40 Se usó el siguiente conjunto de cebadores para la amplificación del ácido nucleico diana mediante LAMP, poniéndolos en una mezcla de reacción de LAMP que tenía la siguiente composición, a 67°C durante 60 minutos, y se midió la turbidez que aumentó con la amplificación del ácido nucleico diana con un turbidímetro en tiempo real (LA-200, producto de Teramecs).

<Conjunto de cebadores para el método de LAMP usando el gen de girasa B de *M. tuberculosis* como ácido nucleico diana>

Cebador FIP de girasa B: 5'-gcggttgatgtgttcacgcacaaagttaagagccg-3' (SEQ ID NO: 1)

50 Cebador BIP de girasa B: 5'-gcgattcatagcagcatcgttccattgcatcgcgatctccac-3' (SEQ ID NO: 2)

Cebador F3 de girasa B: 5'-cgagccgaatccact-3' (SEQ ID NO: 3)

Cebador B3 de girasa B: 5'-cgactccgaatcccgg-3' (SEQ ID NO: 4)

Cebador LF de girasa B: 5'-gaagtcaccaggcc-3' (SEQ ID NO: 5)

Cebador LB de girasa B: 5'-tttccggcaagggcacc-3' (SEQ ID NO: 6)

<Composición de la mezcla de reacción de LAMP (25 µl)>

Cantidad prescrita de muestra de amplificación de ácido nucleico

5 Tris-HCl 20 mM (pH 8,8)

KCl 10 mM

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM

MgSO<sub>4</sub> 8 mM

Tween20 al 0,1%

10 dNTP 5,6 mM

Cebador FIP 1,6 µM

Cebador BIP 1,6 µM

Cebador F3 0,4 µM

Cebador B3 0,4 µM

15 Cebador LF 0,8 µM

Cebador LB 0,8 µM

16 U de Bst polimerasa

1 µl de FD (calceína)

DextranT40 al 1,6%

20 La figura 2 es un gráfico que muestra los resultados del examen de adsorción de ácido nucleico diana en zeolita (HSZ-690HOA de Tosoh Corp.). El eje vertical representa la turbidez de la mezcla de reacción de LAMP, y el eje horizontal representa el tiempo de reacción.

25 Como resultado, el momento de inicio de la amplificación de ácido nucleico diana con la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con la adición de zeolita (HSZ-690HOA, Tosoh Corp.) (muestra tratada con zeolita) era el mismo que el control positivo, demostrando por tanto que el tratamiento con zeolita no afectaba al momento de inicio de la amplificación de ácido nucleico diana. El resultado fue esencialmente el mismo para todas las zeolitas usadas: HSZ-690HOA (forma protonada y forma de mordenita, producto de Tosoh Corp.), HSZ-940HOA (forma protonada y forma beta, producto de Tosoh Corp.) y HSZ-980HOA (forma protonada y forma beta, producto de Tosoh Corp.), y por tanto el momento de inicio de la amplificación de ácido nucleico diana no se vio afectado por el tipo de zeolita usada.

30 Cuando se usó la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con la adición de un equivalente de agua esterilizada en lugar de la disolución de ácido nucleico diana (control negativo), no se encontró amplificación de ácido nucleico diana durante los 60 minutos de tiempo de reacción.

35 Estos resultados demostraron que el ácido nucleico en una muestra de amplificación de ácido nucleico esencialmente no se adsorbe sobre la zeolita.

(Ejemplo 2) Efecto de neutralización de álcalis en el reactivo de extracción de ácido nucleico y efecto de eliminación de tensioactivos aniónicos por la zeolita.

Entonces se examinó si el tratamiento con zeolita puede eliminar o no sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico en reactivos de extracción de ácido nucleico.

40 En primer lugar, con el fin de determinar si los álcalis en un reactivo de extracción de ácido nucleico pueden neutralizarse mediante tratamiento con zeolita, se añadieron 300 mg de una suspensión de zeolita acuosa (HSZ-690HOA de Tosoh Corp.) a las siguientes 6 disoluciones diferentes: n.<sup>os</sup> de muestras 1-6) que contenían hidróxido de sodio 0,2-0,4 M, y se mezclaron con las mismas mediante inversión, y entonces se midió el pH del sobrenadante obtenido mediante centrifugación (pH tras el tratamiento con zeolita) y se comparó con el pH antes del tratamiento con zeolita (pH antes del tratamiento con zeolita).

<Composiciones de 6 disoluciones diferentes que contienen hidróxido de sodio 0,2-0,4 M>

Muestra n.º 1: NaOH 0,4 M

Muestra n.º 2: NaOH 0,4 M, SDS al 0,5%

Muestra n.º 3: NaOH 0,4 M, SDS al 0,5%, NaCl 75 mM

5 Muestra n.º 4: NaOH 0,2 M

Muestra n.º 5: NaOH 0,2 M, SDS al 0,5%

Muestra n.º 6: NaOH 0,2 M, SDS al 0,5%, NaCl 75 mM

10 La figura 3 es un gráfico que muestra los resultados del examen del efecto de neutralización de hidróxido de sodio de la zeolita. El eje vertical representa el pH y el eje horizontal representa el n.º de muestra, mientras que los círculos blancos representan el pH antes del tratamiento con zeolita y los círculos negros representan el pH tras el tratamiento con zeolita.

Como resultado, se encontró que el pH de las 6 disoluciones diferentes que contenían hidróxido de sodio 0,2-0,4 M se redujo hasta casi la neutralidad (pH 7-8) mediante el tratamiento con zeolita, y la reducción del pH prácticamente no se vio afectada por SDS al 0,5% o NaCl 75 mM.

15 Estos resultados sugieren que la zeolita tiene un efecto de neutralización de componentes de álcali en reactivos de extracción de ácido nucleico.

20 A continuación, con el fin de examinar si puede eliminarse o no dodecilsulfato de sodio (SDS) en un reactivo de extracción de ácido nucleico mediante tratamiento con zeolita, se añadieron 80 µl de agua esterilizada y o bien 100 µl de disolución de SDS al 0,2% o bien disolución de SDS al 0,2% que contenía NaCl 75 mM a un microtubo y se calentó a 95°C durante 15 minutos, y entonces se enfrió mediante reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos, tras lo que se añadieron 20 µl de disolución de ácido nucleico diana. Se usó una disolución de ADN genómico (100 copias/µl) extraído de *M. tuberculosis* H37Rv en cultivo como disolución de ácido nucleico diana.

25 A continuación, se añadieron 300 mg de suspensión de zeolita acuosa (HSZ-690HOA de Tosoh Corp.) al microtubo que contenía la disolución de ácido nucleico diana y se mezclaron con la misma mediante inversión del microtubo, tras lo que se permitió que la mezcla reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se usó el sobrenadante obtenido mediante centrifugación como muestra de amplificación de ácido nucleico (muestra tratada con zeolita), amplificando el ácido nucleico diana en 12,5 µl de la misma mediante el método de LAMP.

30 Para la prueba, se llevó a cabo la amplificación del ácido nucleico diana de la misma manera mediante LAMP usando una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita), una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada mediante la adición de un equivalente de agua esterilizada en lugar de la disolución de ácido nucleico diana (control negativo) y una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada mediante la simple adición de 9 µl de agua esterilizada a 1 µl de disolución de ácido nucleico diana (que contenía 100 copias de ADN genómico: control positivo).

35 Se llevó a cabo la amplificación del ácido nucleico diana mediante LAMP usando un conjunto de cebadores que comprendía las secuencias de nucleótidos enumeradas como SEQ ID NO: 1-6 de la lista de secuencias, usados en el ejemplo 1, permitiéndoles que permanezcan en una mezcla de reacción de LAMP que tenía la composición descrita en el ejemplo 1, a 67°C durante 90 minutos, y se midió en tiempo real la turbidez que aumentó con la amplificación del ácido nucleico diana.

La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados del examen del efecto de eliminación de SDS de la zeolita.

40 La figura 4(a) muestra los resultados de la amplificación de ácido nucleico diana con la adición de la disolución de ácido nucleico diana a una disolución que contiene SDS al 0,1%, y la figura 4(b) muestra los resultados de la amplificación de ácido nucleico diana con la adición de la disolución de ácido nucleico diana a una disolución que contiene SDS al 0,1% y NaCl 75 mM. El eje vertical representa la turbidez de la mezcla de reacción de LAMP, y el eje horizontal representa el tiempo de reacción.

45 Como resultado, no se detectó amplificación de ácido nucleico diana cuando se usó la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita), mientras que se detectó amplificación de ácido nucleico diana cuando se usó la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita (muestra tratada con zeolita), y el momento de inicio de la amplificación de ácido nucleico diana era el mismo que para el control positivo. Estos resultados fueron aproximadamente los mismos cuando se llevó a cabo la amplificación de ácido nucleico diana con la adición de la disolución de ácido nucleico diana a una disolución que contenía NaCl 75 mM y SDS al 0,1%.

Por otro lado, cuando se usó la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con la adición de un

equivalente de agua esterilizada en lugar de la disolución de ácido nucleico diana (control negativo), no se encontró amplificación de ácido nucleico diana durante los 90 minutos de tiempo de reacción.

Estos resultados sugirieron que la zeolita tiene un efecto de eliminación de SDS en reactivos de extracción de ácido nucleico, y por tanto tiene un efecto de eliminación de tensioactivos aniónicos.

#### 5 (Ejemplo 3) Efecto de desalación de la zeolita

Se examinó si el tratamiento con zeolita puede eliminar o no NaCl en un extracto de ácido nucleico obtenido de una muestra biológica.

10 En primer lugar, se añadieron 500 µl de solución salina fisiológica a un microtubo, y se calentó la mezcla a 95°C durante 15 minutos y entonces se permitió que reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos para que se enfriara, tras lo que se añadieron 20 µl de disolución de ácido nucleico diana. Se usó una disolución de ADN genómico (100 copias/µl) extraído de *M. tuberculosis* H37Rv en cultivo como disolución de ácido nucleico diana.

15 A continuación, se añadieron 300 mg de suspensión de zeolita acuosa (HSZ-690HOA de Tosoh Corp.) al microtubo que contenía la disolución de ácido nucleico diana y se mezclaron con la misma mediante inversión del microtubo, tras lo que se permitió que la mezcla reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se usó el sobrenadante obtenido mediante centrifugación como muestra de amplificación de ácido nucleico, amplificando el ácido nucleico diana en 12,5 µl de la misma mediante el método de LAMP.

20 Para la prueba, se llevó a cabo la amplificación del ácido nucleico diana de la misma manera mediante LAMP usando una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita), una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada mediante la adición de un equivalente de agua esterilizada en lugar de la disolución de ácido nucleico diana (control negativo) y una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada mediante la simple adición de 9 µl de agua esterilizada a 1 µl de disolución de ácido nucleico diana (que contenía 100 copias de ADN genómico: control positivo).

25 Se llevó a cabo la amplificación del ácido nucleico diana mediante LAMP usando un conjunto de cebadores que comprendía las secuencias de nucleótidos enumeradas como SEQ ID NO: 1-6 de la lista de secuencias, usados en el ejemplo 1, permitiéndoles que permanezcan en una mezcla de reacción de LAMP que tenía la composición descrita en el ejemplo 1, a 67°C durante 60 minutos, y se midió en tiempo real la turbidez que aumentó con la amplificación del ácido nucleico diana.

La figura 5 es un gráfico que muestra los resultados del examen del efecto de desalación de la zeolita. El eje vertical representa la turbidez de la mezcla de reacción de LAMP, y el eje horizontal representa el tiempo de reacción.

30 Como resultado, el momento de inicio de la amplificación de ácido nucleico diana se retrasó 20 minutos cuando se usó la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita), en comparación con el control positivo, mientras que con la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita (muestra tratada con zeolita), el retraso en el momento de inicio de la amplificación de ácido nucleico diana no era más largo de 10 minutos.

35 Por otro lado, cuando se usó la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con la adición de un equivalente de agua esterilizada en lugar de la disolución de ácido nucleico diana (control negativo), no se encontró amplificación de ácido nucleico diana durante los 60 minutos de tiempo de reacción.

40 Estos resultados demostraron que la zeolita tiene un efecto de eliminación de NaCl en reactivos de extracción de ácido nucleico y muestras biológicas, es decir un efecto de desalación. Esto sugiere que incluso con muestras de amplificación de ácido nucleico que sólo pueden introducirse en cantidades limitadas en las mezclas de reacción de amplificación de ácido nucleico debido a la inhibición de la reacción de amplificación de ácido nucleico por NaCl en la muestra biológica, es posible aumentar la cantidad de introducción en la reacción de amplificación de ácido nucleico más allá del límite.

#### 45 (Ejemplo 4) Influencia de la preparación de la muestra biológica y la extracción de ácido nucleico sobre la amplificación de ácido nucleico diana

50 Se realizó una prueba para determinar el efecto del tratamiento previo con zeolita sobre la amplificación de ácido nucleico diana con la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada a partir de una muestra biológica que contenía sangre. Específicamente, se examinaron las condiciones de tratamiento de extracción de ácido nucleico y preparación de la muestra biológica con tratamiento previo con zeolita. Se usaron las siguientes 12 muestras biológicas diferentes y 3 extractos de ácido nucleico diferentes como muestras biológicas y extractos de ácido nucleico, y se realizó la amplificación de ácido nucleico diana mediante LAMP usando sus 36 combinaciones.

<Suspensiones de muestras biológicas>

Se prepararon suspensiones con 3 bases diferentes, específicamente agua esterilizada, solución salina fisiológica

diluida 3 veces (solución salina fisiológica 1/3) y sangre completa al 0-30% en solución salina fisiológica, y también se prepararon 12 suspensiones diferentes, que eran suspensiones de muestras biológicas que tenían las siguientes composiciones y una muestra control que no contenía sangre completa.

Agua esterilizada que no contenía sangre completa

5 Agua esterilizada que contenía sangre completa al 10%

Agua esterilizada que contenía sangre completa al 20%

Agua esterilizada que contenía sangre completa al 30%

Solución salina fisiológica 1/3 que no contenía sangre completa

Solución salina fisiológica 1/3 que contenía sangre completa al 10%

10 Solución salina fisiológica 1/3 que contenía sangre completa al 20%

Solución salina fisiológica 1/3 que contenía sangre completa al 30%

Solución salina fisiológica que no contenía sangre completa

Solución salina fisiológica que contenía sangre completa al 10%

Solución salina fisiológica que contenía sangre completa al 20%

15 Solución salina fisiológica que contenía sangre completa al 30%

<Reactivos de extracción de ácido nucleico>

Se prepararon los siguientes 3 reactivos de extracción de ácido nucleico diferentes (reactivos de extracción de ácido nucleico A-C) con diferentes concentraciones de cloruro de sodio. Se añadió azul de timol como indicador de pH.

Reactivo de extracción de ácido nucleico A: NaOH 174 mM, NaCl 0 mM, azul de timol al 0,00046%

20 Reactivo de extracción de ácido nucleico B: NaOH 174 mM, NaCl 5 mM, azul de timol al 0,00046%

Reactivo de extracción de ácido nucleico C: NaOH 174 mM, NaCl 10 mM, azul de timol al 0,00046%

En primer lugar, se añadieron 100 µl de cada suspensión de muestra biológica y 900 µl de cada reactivo de extracción de ácido nucleico a un microtubo, y se calentó la mezcla a 95°C durante 15 minutos y entonces se permitió que reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos para que se enfriara, tras lo que se añadió 1 µl de disolución de ácido nucleico diana. Se usó una disolución de ADN genómico (100 copias/µl) extraído de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en cultivo como disolución de ácido nucleico diana.

25

A continuación, se añadió una suspensión de zeolita acuosa (HSZ-690HOA de Tosoh Corp.) a 400 mg/ml al microtubo que contenía la disolución de ácido nucleico diana y se mezcló con la misma mediante inversión del microtubo, tras lo que se permitió que la mezcla reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se usó el sobrenadante obtenido mediante centrifugación como muestra de amplificación de ácido nucleico (muestra tratada con zeolita), amplificando el ácido nucleico diana en 30 µl de la misma mediante el método de LAMP.

30

Para la prueba, se llevó a cabo la amplificación del ácido nucleico diana de la misma manera mediante LAMP usando una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada mediante la adición de un equivalente de agua esterilizada en lugar de la disolución de ácido nucleico diana (control negativo) y una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada mediante la simple adición de 9 µl de agua esterilizada a 1 µl de disolución de ácido nucleico diana (que contenía 100 copias de ADN genómico: control positivo).

35

Se llevó a cabo la amplificación del ácido nucleico diana mediante LAMP usando un conjunto de cebadores que comprendía las secuencias de nucleótidos enumeradas como SEQ ID NO: 1-6 de la lista de secuencias, usados en el ejemplo 1, permitiéndoles que permanezcan en una mezcla de reacción de LAMP que tenía la composición descrita en el ejemplo 1, a 67°C durante 60 minutos, y se midió en tiempo real la turbidez que aumentó con la amplificación del ácido nucleico diana.

40

La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados del examen de la influencia de la preparación de la muestra biológica y la composición del extracto de ácido nucleico sobre la amplificación de ácido nucleico diana. El eje vertical representa el tiempo (min) (valor de Tt) para una turbidez de la mezcla de reacción de LAMP de 0,1. ND significa que no se detectó aumento en la turbidez. El eje horizontal representa la adición de sangre a la muestra biológica (%).

45

Como resultado, cuando se usó agua esterilizada que contenía sangre completa al 10-30% como muestra biológica

en condiciones que usan el reactivo de extracción de ácido nucleico A, el momento de inicio de la amplificación de ácido nucleico diana se retrasó 10-50 minutos en comparación con el control positivo, y la amplificación de ácido nucleico diana se inhibió de una manera dependiente de la cantidad de sangre añadida. Por otro lado, cuando se usó solución salina fisiológica como base de muestra biológica, el retraso en el momento de inicio de la amplificación de ácido nucleico diana se redujo en comparación con el uso de agua esterilizada.

Además, con todas las muestras biológicas que contenían sangre completa, el extracto de ácido nucleico (B) que tenía una concentración de NaCl de 5 mM y el extracto de ácido nucleico (C) que tenía una concentración de NaCl de 10 mM tenían un retraso reducido en el momento de inicio de la amplificación de ácido nucleico diana en comparación con el uso del extracto de ácido nucleico (A) que tenía una concentración de NaCl de 0 mM. El efecto de reducción del retraso en el momento de inicio de la amplificación de ácido nucleico diana era más notable con el extracto de ácido nucleico C que con el extracto de ácido nucleico B.

Cuando se compararon las intensidades de fluorescencia de las mezclas de reacción tras la mezcla de reacción de LAMP, la intensidad de fluorescencia detectada cuando se usó solución salina fisiológica que contenía sangre completa al 10% como muestra biológica era equivalente a la misma sin sangre completa, cuando se usó el extracto de ácido nucleico A. Además, la intensidad de fluorescencia era más débil pero positiva cuando se usó solución salina fisiológica que contenía sangre completa al 20% como muestra biológica, en comparación con la misma sin sangre completa.

Cuando se usó el extracto de ácido nucleico B, la intensidad de fluorescencia detectada cuando se usó solución salina fisiológica que contenía sangre completa al 10% y solución salina fisiológica que contenía sangre completa al 20% como muestra biológica era equivalente a la misma sin sangre completa. Además, la intensidad de fluorescencia era más débil pero positiva cuando se usó agua esterilizada que contenía sangre completa al 10% o solución salina fisiológica 1/3 que contenía sangre completa al 10% como muestra biológica, en comparación con la misma sin sangre completa.

Cuando se usó el extracto de ácido nucleico C, la intensidad de fluorescencia detectada cuando se usó agua esterilizada que contenía sangre completa al 10%, solución salina fisiológica 1/3 que contenía sangre completa al 10%, solución salina fisiológica que contenía sangre completa al 10% o solución salina fisiológica que contenía sangre completa al 20% como muestra biológica era equivalente a la misma sin sangre completa. Además, la intensidad de fluorescencia era más débil pero positiva cuando se usó solución salina fisiológica 1/3 que contenía sangre completa al 20% o solución salina fisiológica que contenía sangre completa al 30% como muestra biológica, en comparación con la misma sin sangre completa.

Se midió el contenido en proteína de la muestra de amplificación de ácido nucleico tras el tratamiento con zeolita y la muestra de amplificación de ácido nucleico antes del tratamiento con zeolita (bases de muestra biológica: agua esterilizada, extracto de ácido nucleico A), y se muestran en la tabla 1.

[Tabla 1]

Tratamiento con zeolita	Muestra biológica		Concentración de NaCl en disolución de extracción de ácido nucleico		
	Base	Adición de sangre (%)	0 mM	5 mM	10 mM
Antes del tratamiento	Agua esterilizada	10	1,85 ± 0,02		
		20	3,18 ± 0,02		
		30	4,31 ± 0,10		
Tras el tratamiento	Agua esterilizada	10	0,40 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,10 ± 0,00
		20	0,82 ± 0,01	0,53 ± 0,00	0,35 ± 0,00
		30	1,11 ± 0,00	0,73 ± 0,00	0,50 ± 0,00
	Solución salina fisiológica 1/3	10	0,28 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,06 ± 0,00
		20	0,66 ± 0,00	0,40 ± 0,00	0,27 ± 0,00
		30	1,09 ± 0,05	0,86 ± 0,00	0,53 ± 0,00
	Solución salina fisiológica	10	0,13 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,04 ± 0,00
		20	0,39 ± 0,00	0,27 ± 0,00	0,16 ± 0,00
		30	0,71 ± 0,00	0,59 ± 0,00	0,36 ± 0,00

Como resultado, se demostró que la zeolita tiene un efecto de eliminación de proteína de una muestra biológica, es decir un efecto de desproteínización. Cuando se compararon las bases de muestra biológica, la solución salina fisiológica 1/3 tuvo un efecto de desproteínización más fuerte que el agua esterilizada, y se presentó el mayor efecto de desproteínización cuando se usó solución salina fisiológica. Cuando se compararon los extractos de ácido nucleico, el efecto de desproteínización fue más fuerte cuando se usó el extracto de ácido nucleico (B) que tenía una concentración de NaCl de 5 mM que cuando se usó el extracto de ácido nucleico (A) que tenía una concentración de NaCl de 0 mM, y se presentó el mayor efecto de desproteínización cuando se usó el extracto de ácido nucleico (C) que tenía una concentración de NaCl de 10 mM.

- Estos resultados demostraron que el uso de una muestra biológica (o suspensión de muestra biológica) con una concentración de NaCl de 1/3-1/1 de solución salina fisiológica permite que el tratamiento de extracción de ácido nucleico se lleve a cabo en presencia de NaCl, reduciendo por tratamiento con zeolita posterior el efecto de inhibición de la amplificación de ácido nucleico de la sangre. Los resultados también demostraron que la zeolita tiene un efecto de desproteización. Se encontró que el efecto de desproteización era más alto cuando se usó una disolución que contenía NaCl para el tratamiento previo con zeolita, es decir para la preparación de la muestra biológica y/o el tratamiento de extracción de ácido nucleico. Tal como queda claro a partir del ejemplo 3, la zeolita también tiene un efecto de desalación, y por tanto reduce la acción de inhibición de la amplificación de ácido nucleico de NaCl en reactivos de extracción de ácido nucleico y muestras biológicas.
- Estos resultados sugieren que incluso con muestras biológicas que contienen sangre que han tenido una introducción limitada en la mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico debido a sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico en la sangre, es posible exceder el límite para permitir su uso para la reacción de amplificación de ácido nucleico.
- (Ejemplo 5) Efecto del tratamiento con zeolita sobre la amplificación de ácido nucleico diana en sangre tratada térmicamente mediante LAMP
- Puesto que se había mostrado que la zeolita tiene un efecto de eliminación de sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico en muestras de amplificación de ácido nucleico preparadas a partir de muestras biológicas, se prepararon muestras de amplificación de ácido nucleico a partir de sangre para examinar el efecto del tratamiento con zeolita sobre la amplificación del ácido nucleico diana.
- En primer lugar, se añadieron sangre (75 µl) muestreada de un sujeto y 75 µl de SDS al 0,025% a un microtubo, se calentó a 95°C durante 5 minutos y se enfrió en hielo, y entonces se sometió a separación centrífuga durante 1 minuto con una centrífuga de sobremesa (nombre comercial: Puchi-Hachi, producto de Waken Co., Ltd.), y se recuperó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 20 mg de suspensión de zeolita acuosa (HSZ-690HOA de Tosoh Corp.) a 20 µl del sobrenadante obtenido y se mezclaron con el mismo mediante inversión, tras lo que se permitió que la mezcla reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos, se añadieron 10<sup>4</sup> copias de ADNλ (Takara Bio, Inc.) a 10 µl del sobrenadante obtenido mediante centrifugación, y se usó la disolución como muestra de amplificación de ácido nucleico (muestra tratada con zeolita) para la amplificación del ácido nucleico diana mediante el método de LAMP.
- Para la prueba, se llevó a cabo la amplificación del ácido nucleico diana de la misma manera mediante LAMP usando una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita) y una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada mediante la simple adición de 10<sup>4</sup> copias de ADNλ a agua esterilizada (control positivo).
- Se usó el siguiente conjunto de cebadores para la amplificación del ácido nucleico diana mediante LAMP, poniéndolos en una mezcla de reacción de LAMP que tenía la siguiente composición a 67°C durante 60 minutos, y se midió en tiempo real la intensidad de fluorescencia (fluorescencia) que aumentó con la amplificación del ácido nucleico diana.
- <Conjunto de cebadores para el método de LAMP usando ADNλ como ácido nucleico diana>
- Cebador FIP de ADNλ: 5'-aggccaagctgcttgcggtagccggacgctaccagctct-3' (SEQ ID NO: 7)
- Cebador BIP de ADNλ: 5'-caggacgctgtggcattgcagatcataggtaaagcgcacgc-3' (SEQ ID NO: 8)
- Cebador F3 de ADNλ: 5'-aaaactcaatcaacaggcg-3' (SEQ ID NO: 9)
- Cebador B3 de ADNλ: 5'-gacggatatacaccacgatca-3' (SEQ ID NO: 10)
- Cebador LF de ADNλ: 5'-aggcatcccaccaacgggaa-3' (SEQ ID NO: 11)
- <Composición de la mezcla de reacción de LAMP (25 µl)>
- Cantidad prescrita de muestra de amplificación de ácido nucleico
- Tris-HCl (pH 8,8) 20 mM
- KCl 10 mM
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM
- MgSO<sub>4</sub> 8 mM
- Tween20 al 0,1%

dNTP 5,6 mM

Cebador FIP 1,6  $\mu$ M

Cebador BIP 1,6  $\mu$ M

Cebador F3 0,4  $\mu$ M

5 Cebador B3 0,4  $\mu$ M

Cebador LF 0,8  $\mu$ M

8 U de Bst polimerasa

Amarillo de oxazol 0,25  $\mu$ g/ml

10 La figura 7 muestra los resultados de la amplificación de ácido nucleico diana mediante LAMP, usando una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada a partir de sangre mediante tratamiento con zeolita (muestra tratada con zeolita) y una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita). El eje vertical representa la fluorescencia en la mezcla de reacción de LAMP que aumentó con la amplificación del ácido nucleico diana, y el eje horizontal representa el tiempo de reacción.

15 Como resultado, aunque se encontró amplificación de ácido nucleico diana en la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita), el momento de inicio de la amplificación de ácido nucleico diana se retrasó aproximadamente 5 minutos en comparación con el control positivo, y por tanto la amplificación de ácido nucleico diana se inhibió significativamente.

20 Por otro lado, el momento de inicio de la amplificación de ácido nucleico diana con la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita (muestra tratada con zeolita) era el mismo que el del control positivo, y por tanto no se inhibió la amplificación de ácido nucleico diana.

Estos resultados demostraron que el tratamiento con zeolita durante la preparación de una muestra de amplificación de ácido nucleico a partir de sangre elimina sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico en la sangre y SDS que se ha añadido para la extracción del ácido nucleico, eliminando por tanto la acción de inhibición de la amplificación de ácido nucleico diana de estas sustancias.

25 (Ejemplo 6) Examen de la cantidad de muestra de amplificación de ácido nucleico introducida en la mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico

30 Puesto que se había mostrado que la zeolita tiene un efecto de eliminación de sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico en muestras de amplificación de ácido nucleico preparadas a partir de muestras biológicas, se realizó una prueba para examinar en qué grado se introduce una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada a partir de esputo con respecto al volumen de la mezcla de reacción de amplificación de ácido nucleico.

35 En primer lugar, se añadieron esputo (100  $\mu$ l) muestreado de un sujeto y 100  $\mu$ l de 2 x reactivo de extracción de ácido nucleico (NaOH 0,4 M, SDS al 1%) a un microtubo, y se calentó la mezcla a 95°C durante 15 minutos y entonces se permitió que reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos para que se enfriara, tras lo que se añadieron 20  $\mu$ l de disolución de ácido nucleico diana. Se usó una disolución de ADN genómico (100 copias/ $\mu$ l) extraído de *M. tuberculosis* H37Rv en cultivo como disolución de ácido nucleico diana.

40 A continuación, se añadieron 300 mg de suspensión de zeolita acuosa (HSZ-690HOA de Tosoh Corp.) al microtubo que contenía la disolución de ácido nucleico diana y se mezclaron con la misma mediante inversión, tras lo que se permitió que la mezcla reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se usó el sobrenadante obtenido mediante centrifugación como muestra de amplificación de ácido nucleico (muestra tratada con zeolita), con 10, 12,5, 15, 17,5 ó 20  $\mu$ l de la misma en un total de 25  $\mu$ l de mezcla de reacción de LAMP para la amplificación de ácido nucleico diana mediante el método de LAMP.

45 Para la prueba, se llevó a cabo la amplificación del ácido nucleico diana de la misma manera mediante LAMP usando 10  $\mu$ l de una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita) y 10  $\mu$ l de una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada mediante la simple adición de 9  $\mu$ l de agua esterilizada a 1  $\mu$ l de disolución de ácido nucleico diana (que contenía 100 copias de ADN genómico: control positivo).

50 Se llevó a cabo la amplificación del ácido nucleico diana mediante LAMP usando un conjunto de cebadores que comprendía las secuencias de nucleótidos enumeradas como SEQ ID NO: 1-6 de la lista de secuencias, usados en el ejemplo 1, permitiéndoles que permanezcan en una mezcla de reacción de LAMP que tenía la composición descrita en el ejemplo 1 durante 60 minutos, y se midió en tiempo real la turbidez que aumentó con la amplificación

del ácido nucleico diana.

La figura 8 muestra los resultados (1) de una prueba para determinar cómo se ve influida la reacción de amplificación de ácido nucleico por la cantidad de introducción de una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita en una mezcla de reacción de LAMP (25 µl). El eje vertical representa el tiempo (min) (valor de Tt) para una turbidez de la mezcla de reacción de LAMP de 0,1. ND significa que no se detectó aumento en la turbidez.

Como resultado, no se detectó amplificación de ácido nucleico diana cuando se usaron 10 µl de la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita), mientras que con la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita (muestra tratada con zeolita), se detectó amplificación de ácido nucleico diana incluso con 20 µl de muestra de amplificación de ácido nucleico introducidos en 25 µl de mezcla de reacción de LAMP, mientras que el valor de Tt del control positivo era de aproximadamente 12 minutos en comparación con un valor de Tt de aproximadamente 18 minutos para la muestra tratada con zeolita, y por tanto no se encontró ninguna diferencia significativa entre las dos.

A continuación, se liofilizaron todos los componentes en la mezcla de reacción de LAMP distintos de la muestra de amplificación de ácido nucleico y sulfato de amonio, y se realizó la reacción de LAMP con la adición de 25 µl de la muestra tratada con zeolita mencionada anteriormente a la misma, midiendo en tiempo real la turbidez que aumentó con la amplificación de ácido nucleico diana.

Para la prueba, se llevó a cabo la amplificación del ácido nucleico diana de la misma manera mediante LAMP usando 25 µl de muestra de amplificación de ácido nucleico preparada mediante la adición de un equivalente de agua esterilizada en lugar de la disolución de ácido nucleico diana (control negativo) o una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada mediante la simple adición de 24 µl de agua esterilizada a 1 µl de disolución de ácido nucleico diana (que contenía 100 copias de ADN genómico: control positivo), añadiendo cada uno a los componentes en la mezcla de reacción de LAMP liofilizada.

La figura 9 muestra los resultados (2) de una prueba para determinar cómo se ve influida la reacción de amplificación de ácido nucleico por la cantidad de introducción de una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita en una mezcla de reacción de LAMP (25 µl). El eje vertical representa el tiempo (min) (valor de Tt) para una turbidez de la mezcla de reacción de LAMP de 0,1. ND significa que no se detectó aumento en la turbidez.

Como resultado, se detectó amplificación de ácido nucleico diana incluso cuando se introdujeron 25 µl de la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita (muestra tratada con zeolita) en 25 µl de mezcla de reacción de LAMP, mientras que el valor de Tt del control positivo era de aproximadamente 12 minutos en comparación con un valor de Tt de aproximadamente 14-18 minutos para la muestra tratada con zeolita, y por tanto no se encontró ninguna diferencia significativa entre las dos.

Estos resultados demostraron que la preparación de una muestra de amplificación de ácido nucleico a partir de una muestra biológica con tratamiento con zeolita permite que la mayoría de las sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico se eliminen al mismo tiempo que se permite la introducción de la muestra de amplificación de ácido nucleico al volumen máximo de la mezcla de reacción de LAMP. Esto sugiere que un método de preparación de una muestra de amplificación de ácido nucleico a partir de una muestra biológica con tratamiento con zeolita es altamente útil para la detección de ácido nucleico diana a partir de especímenes que han requerido una etapa de purificación del ácido nucleico debido a la abundancia de sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico en la muestra biológica, o para la detección de genes con niveles de expresión muy bajos. Además, cuando se usa este método junto con un reactivo de amplificación secado, el procedimiento de redisolución del reactivo de amplificación secado y el procedimiento de adición de la muestra pueden llevarse a cabo en la misma etapa, mejorando por tanto enormemente la operatividad durante el examen génico.

(Ejemplo 7) Efecto del tratamiento con zeolita sobre la amplificación de ácido nucleico diana mediante PCR

Puesto que se había demostrado que el tratamiento con zeolita durante la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico puede eliminar sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico, y se observó el efecto en la amplificación de ácido nucleico diana mediante el método de LAMP, se realizó una prueba para examinar el efecto del tratamiento con zeolita sobre la amplificación de ácido nucleico diana mediante PCR.

En primer lugar, se añadieron plasma sanguíneo (250 µl) muestreado de un sujeto y 250 µl de SDS al 0,5% a un microtubo y se calentó la mezcla a 95°C durante 15 minutos y se permitió que reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos, y entonces se añadieron 300 mg de suspensión de zeolita acuosa (HSZ-690HOA de Tosoh Corp.) a la misma y se mezcló mediante inversión, tras lo que se permitió que la mezcla reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos, se añadieron 10<sup>5</sup> copias de ADNλ (Takara Bio, Inc.) a 3 µl del sobrenadante obtenido mediante centrifugación y se usó la disolución como muestra de amplificación de ácido nucleico (muestra tratada con zeolita) para la amplificación del ácido nucleico diana mediante el método de PCR.

Para la prueba, se llevó a cabo la amplificación del ácido nucleico diana de la misma manera mediante PCR usando una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita) y una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada mediante la simple adición de  $10^5$  copias de ADN $\lambda$  a agua esterilizada (control positivo).

- 5 Se usó el siguiente conjunto de cebadores para la amplificación del ácido nucleico diana mediante PCR, poniéndolos en una mezcla de reacción PCR que tenía la siguiente composición, y se midió en tiempo real la intensidad de fluorescencia (fluorescencia) que aumentó con la amplificación del ácido nucleico diana.

<Conjunto de cebadores para el método de PCR usando ADN $\lambda$  como ácido nucleico diana>

Cebador sentido  $\lambda$ : 5'-aaaactcaaatcaacaggcg-3' (SEQ ID NO: 12)

- 10 Cebador antisentido  $\lambda$ : 5'-gacggatattcaccacgatca-3' (SEQ ID NO: 13)

<Composición de la mezcla de reacción PCR (50  $\mu$ l)>

Muestra de amplificación de ácido nucleico

1 U de Z-Taq (Takara Bio, Inc.)

1 x tampón Z-Taq (Takara Bio, Inc.)

- 15 dATP 0,2 mM

dCTP 0,2 mM

dGTP 0,2 mM

dTTP 0,2 mM

Cebador sentido  $\lambda$  0,2  $\mu$ M

- 20 Cebador antisentido  $\lambda$  0,2  $\mu$ M

Amarillo de oxazol 0,25  $\mu$ g/ml

- 25 La figura 10 muestra los resultados de la amplificación de ácido nucleico diana mediante PCR, usando una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita (muestra tratada con zeolita) y una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita). El eje vertical representa la fluorescencia en la mezcla de reacción PCR que aumentó con la amplificación del ácido nucleico diana, y el eje horizontal representa el tiempo de reacción.

- 30 Como resultado, no se detectó amplificación de ácido nucleico diana usando la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita), mientras que con la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita (muestra tratada con zeolita), la reacción de amplificación se produjo con suficiente sensibilidad, aunque el momento de inicio de la amplificación de ácido nucleico diana se retrasó aproximadamente 5 minutos en comparación con el control positivo.

(Ejemplo 8) Efecto del tratamiento con zeolita sobre la amplificación de ácido nucleico diana mediante RT-LAMP

- 35 Puesto que se había demostrado que el tratamiento con zeolita durante la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico puede eliminar sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico, y se observó el efecto en la amplificación de ácido nucleico diana mediante los métodos de LAMP y PCR, se realizó una prueba para examinar el efecto del tratamiento con zeolita sobre la amplificación de ácido nucleico diana mediante RT-LAMP.

- 40 En primer lugar, se añadieron plasma sanguíneo (250  $\mu$ l) muestreado de un sujeto y 250  $\mu$ l de SDS al 0,5% a un microtubo y se calentó la mezcla a 95°C durante 15 minutos y se permitió que reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos, y entonces se añadieron 300 mg de suspensión de zeolita acuosa (HSZ-690HOA de Tosoh Corp.) a la misma y se mezcló mediante inversión, tras lo que se permitió que la mezcla reposara a temperatura ambiente durante 5 minutos, se añadieron 80 copias de ARN genómico de coronavirus de SARS (Eiken Chemical Co., Ltd.) a 4  $\mu$ l del sobrenadante obtenido mediante centrifugación y se usó la disolución como muestra de amplificación de ácido nucleico (muestra tratada con zeolita) para la amplificación del ácido nucleico diana mediante el método de RT-LAMP.

- 45 Para la prueba, se llevó a cabo la amplificación del ácido nucleico diana de la misma manera mediante RT-LAMP usando una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita) y una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada mediante la simple adición de 80 copias de

ARN genómico de coronavirus de SARS a agua esterilizada libre de ARNasa (control positivo).

Se usó el siguiente conjunto de cebadores para la amplificación del ácido nucleico diana mediante RT-LAMP, poniéndolos en una mezcla de reacción de RT-LAMP que tenía la siguiente composición, y se midió con un turbidímetro en tiempo real la turbidez que aumentó con la amplificación del ácido nucleico diana.

- 5 <Conjunto de cebadores para RT-LAMP usando ARN genómico de coronavirus de SARS como ácido nucleico diana>
- Cebador FIP de SARS: 5'-tgcattgacagccctcgaagaagctattcgtcac-3' (SEQ ID NO: 14)
- Cebador BIP de SARS: 5'-gctgtgggtactaacctacctgtcaacataaccagtcgg-3' (SEQ ID NO: 15)
- Cebador F3 de SARS: 5'-ctaatagtttatcaccgc-3' (SEQ ID NO: 16)
- 10 Cebador B3 de SARS: 5'-ctctgggaattctgtgtt-3' (SEQ ID NO: 17)
- Cebador LF de SARS: 5'-aaagccaatccacgc-3' (SEQ ID NO: 18)
- Cebador LB de SARS: 5'-ccagctaggattttctacagg-3' (SEQ ID NO: 19)
- <Composición de la mezcla de reacción de RT-LAMP (25 µl)>
- Cantidad prescrita de muestra de amplificación de ácido nucleico
- 15 Tris-HCl 20 mM (pH 8,8)
- KCl 10 mM
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM
- MgSO<sub>4</sub> 8 mM
- Tween20 al 0,1%
- 20 dNTP 5,6 mM
- Cebador FIP 3,2 µM
- Cebador BIP 3,2 µM
- Cebador F3 0,8 µM
- Cebador B3 0,8 µM
- 25 Cebador LF 1,6 µM
- Cebador LB 1,6 µM
- 16 U de Bst polimerasa
- 2 U de transcriptasa inversa AMV
- 1 µl de FD (calceína)
- 30 La figura 11 muestra los resultados de la amplificación de ácido nucleico diana mediante RT-LAMP, usando una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita (muestra tratada con zeolita) y una muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita). El eje vertical representa la turbidez en la mezcla de reacción de RT-LAMP que aumentó con la amplificación del ácido nucleico diana, y el eje horizontal representa el tiempo de reacción.
- 35 Como resultado, no se detectó amplificación de ácido nucleico diana usando la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada sin tratamiento con zeolita (muestra no tratada con zeolita), mientras que con la muestra de amplificación de ácido nucleico preparada con tratamiento con zeolita (muestra tratada con zeolita), la amplificación reacción se produjo con suficiente sensibilidad, y el momento de inicio de la amplificación de ácido nucleico diana era aproximadamente 10 minutos antes en comparación con el control positivo.
- 40 [Lista de secuencias]
- <110> Eiken Kagaku Kabushiki Kaisha

<120> Método y kit para la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico

<130> 08-0542

5 <140> 08 847 811.0  
<141> 05-11-2008

<150> Documento PCT/JP2008/070089  
<151> 05-11-2008

10 <150> Documento JP2007-287655  
<151> 05-11-2007

<160> 19

15 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1  
<211> 36  
20 <212> ADN  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 1  
**gcggttgatg tgtttcacgc acaaagttaa gagccg** 36

25 <210> 2  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

30 <400> 2  
**gcgattcata gcagcatcgt tccattgcat cgcgatctcc ac** 42

<210> 3  
35 <211> 16  
<212> ADN  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 3  
40 **cgcagccgaa tccact** 16

<210> 4  
<211> 17  
<212> ADN  
45 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 4  
**cgactccgaa taccgg** 17

<210> 5  
50 <211> 15  
<212> ADN  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 5  
55 **gaagtccacc aggcc** 15

<210> 6  
<211> 17  
60 <212> ADN  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 6

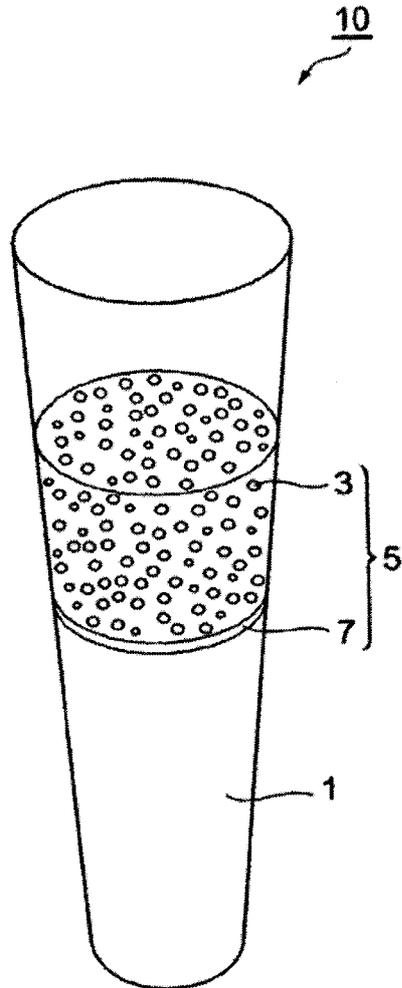
	<b>tttccggcaa gggcacc</b>	<b>17</b>
	<210> 7	
	<211> 40	
5	<212> ADN	
	<213> Fago lambda	
	<400> 7	
10	<b>aggccaagct gcttgcggta gccggacgct accagcttct</b>	<b>40</b>
	<210> 8	
	<211> 42	
	<212> ADN	
15	<213> Fago lambda	
	<400> 8	
	<b>caggacgctg tggcattgca gatcataggt aaagcgccac gc</b>	<b>42</b>
	<210> 9	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Fago lambda	
	<400> 9	
25	<b>aaaactcaaa tcaacaggcg</b>	<b>20</b>
	<210> 10	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Fago lambda	
	<400> 10	
	<b>gacggatatc accacgatca</b>	<b>20</b>
35	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Fago lambda	
40	<400> 11	
	<b>aggcatccca ccaacgggaa</b>	<b>20</b>
	<210> 12	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Fago lambda	
	<400> 12	
50	<b>aaaactcaaa tcaacaggcg</b>	<b>20</b>
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Fago lambda	
	<400> 13	
	<b>gacggatatc accacgatca</b>	<b>20</b>
60	<210> 14	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Virus de SARS	

	<400> 14	<b>tgcatgacag ccctcgaaga agctattcgt cac</b>	<b>33</b>
5	<210> 15 <211> 39 <212> ADN <213> Virus de SARS		
10	<400> 15	<b>gctgtgggta ctaacctacc tgtcaacata accagtcgg</b>	<b>39</b>
15	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Virus de SARS		
20	<400> 16	<b>ctaatatggt tatcaccgcg</b>	<b>20</b>
25	<210> 17 <211> 19 <212> ADN <213> Virus de SARS		
30	<400> 17	<b>ctctggtgaa ttctgtgtt</b>	<b>19</b>
35	<210> 18 <211> 15 <212> ADN <213> Virus de SARS		
40	<400> 18	<b>aaagccaatc cacgc</b>	<b>15</b>
40	<210> 19 <211> 21 <212> ADN <213> Virus de SARS		
	<400> 19	<b>ccagctagga ttttctacag g</b>	<b>21</b>

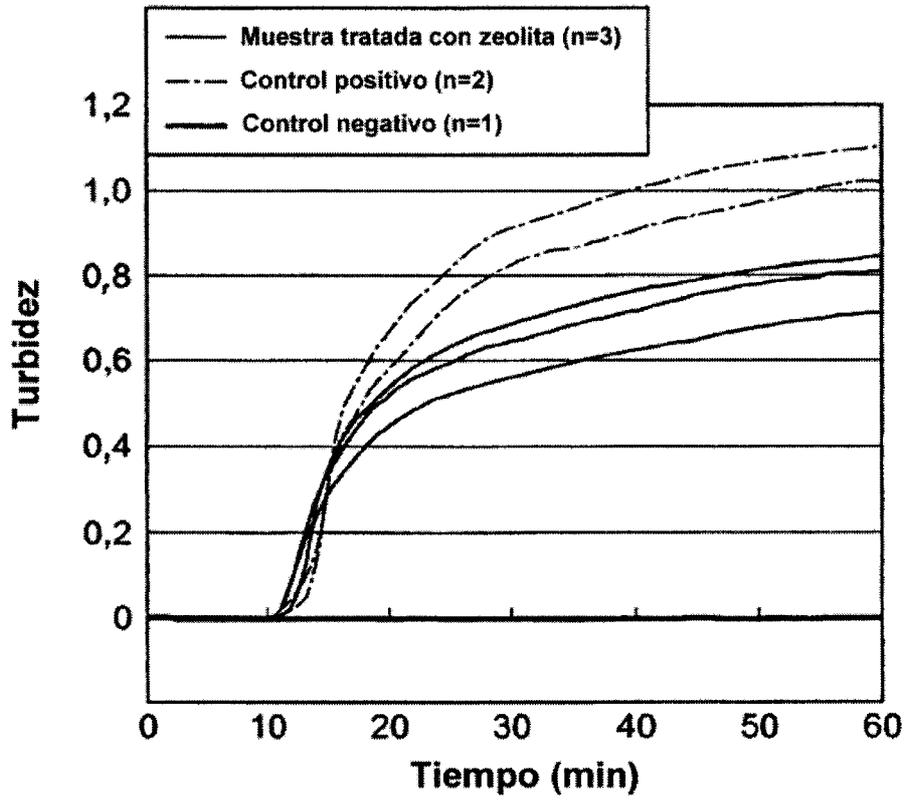
## REIVINDICACIONES

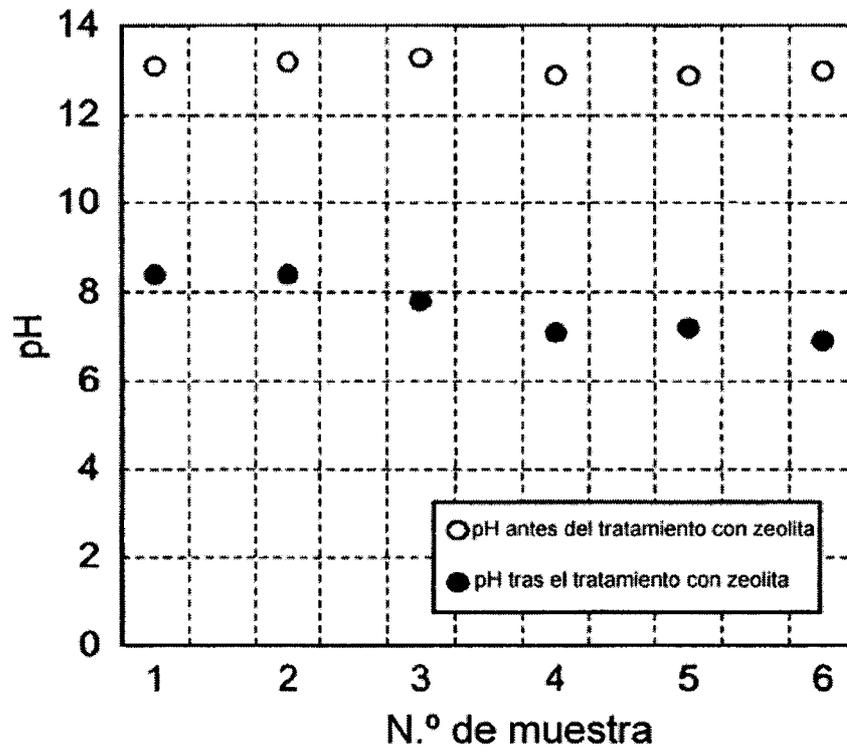
1. Método para la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico, que va a usarse para la amplificación de ácido nucleico en una muestra biológica, método que comprende:
  - 5 una etapa de extracción en la que se añade un reactivo de extracción de ácido nucleico a la muestra biológica para obtener un extracto de ácido nucleico, y
  - una etapa de purificación en la que el extracto de ácido nucleico se pone en contacto con zeolita para eliminar del extracto de ácido nucleico sustancias que inhiben la amplificación de ácido nucleico y se adsorben sobre la zeolita para obtener una muestra de amplificación de ácido nucleico
  - 10 en el que la muestra biológica es sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, heces, esputo, saliva, descarga nasal o fluido tomado con torundas y
  - en el que el reactivo de extracción de ácido nucleico contiene un tensioactivo y/o un álcali y
  - en el que la zeolita es una zeolita protonada, y tiene una estructura cristalina de mordenita.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el tensioactivo es un tensioactivo aniónico.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el tensioactivo aniónico es al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en sales de ácido alquilsulfúrico, sales de ácido alquiletersulfúrico y sales de ácido alquilbencenosulfúrico; o en el que el tensioactivo aniónico es dodecilsulfato de sodio.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa de extracción es una etapa en la que se añade un reactivo de extracción de ácido nucleico a la muestra biológica, con la adición de una sal inorgánica, para obtener un extracto de ácido nucleico.
- 20 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa de purificación es una etapa en la que se añade zeolita al extracto de ácido nucleico y se mezcla, y entonces se aísla la zeolita mediante separación centrífuga o filtración para obtener la muestra de amplificación de ácido nucleico; o en el que la etapa de purificación es una etapa en la que el extracto de ácido nucleico se hace pasar a través de una columna de eliminación empaquetada con zeolita para eliminar las sustancias que se adsorben sobre la zeolita, para obtener una muestra de amplificación de ácido nucleico.
- 25 6. Kit para la preparación de una muestra para su uso en amplificación de ácido nucleico, que va a usarse en el método de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo el kit un reactivo de extracción de ácido nucleico y zeolita, en el que la zeolita está protonada y tiene una estructura cristalina de mordenita.
- 30 7. Kit de preparación según la reivindicación 6, en el que el reactivo de extracción de ácido nucleico contiene un tensioactivo y/o un álcali.
8. Kit de preparación según la reivindicación 7, en el que el tensioactivo es un tensioactivo aniónico.
9. Kit para la detección de la amplificación de ácido nucleico, que comprende un kit de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
- 35 10. Kit para la detección de la amplificación de ácido nucleico, en el que todos o una parte de los reactivos en el kit para la detección de la amplificación de ácido nucleico según la reivindicación 9 son reactivos secos.

**Fig.1**

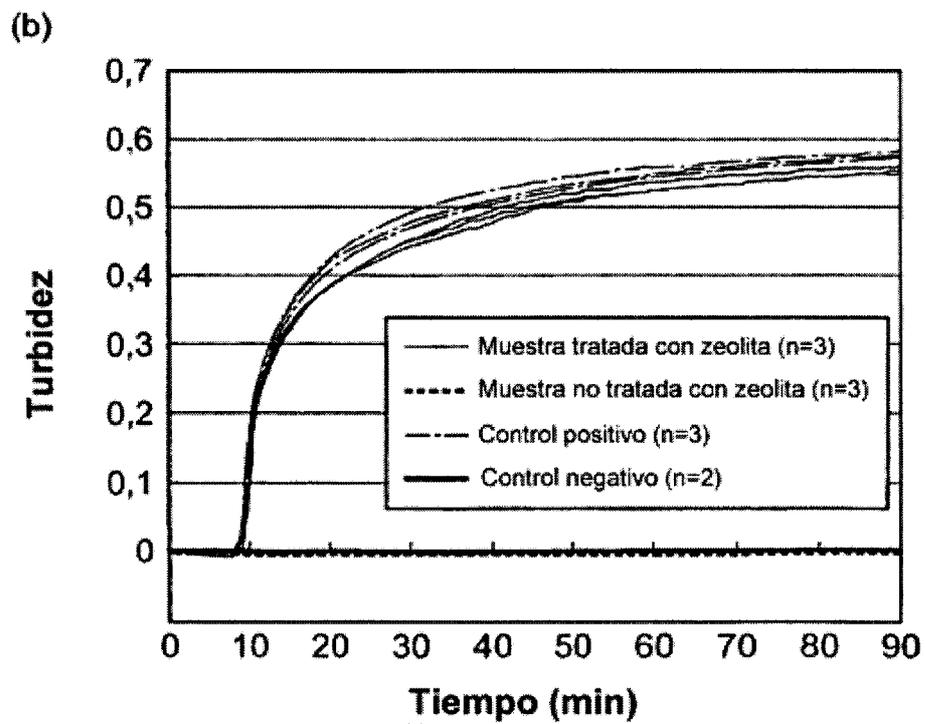
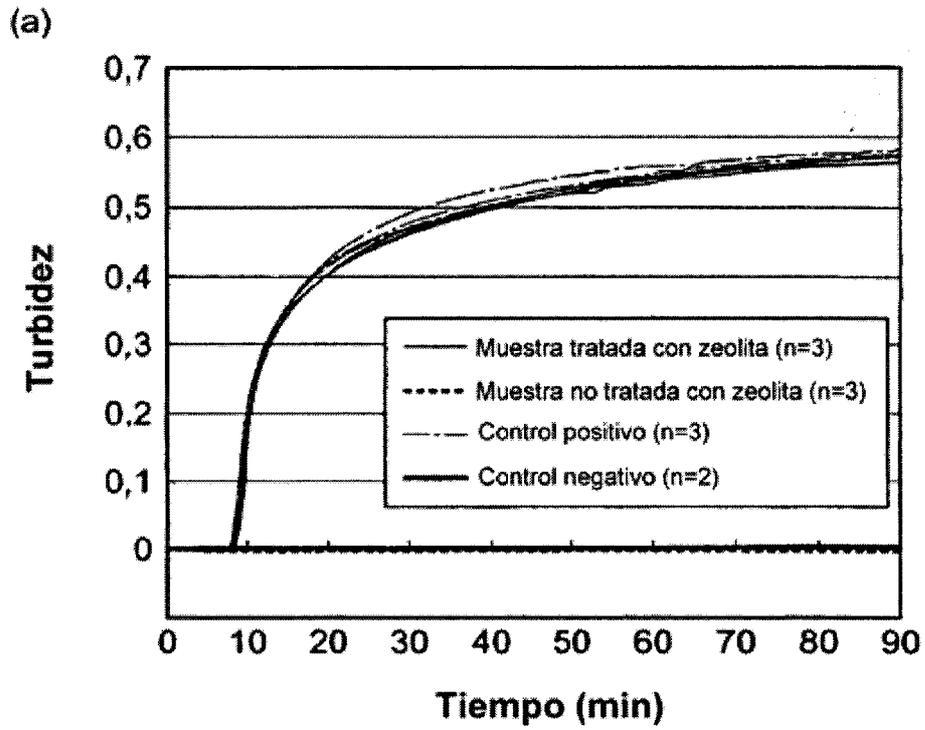


**Fig.2**

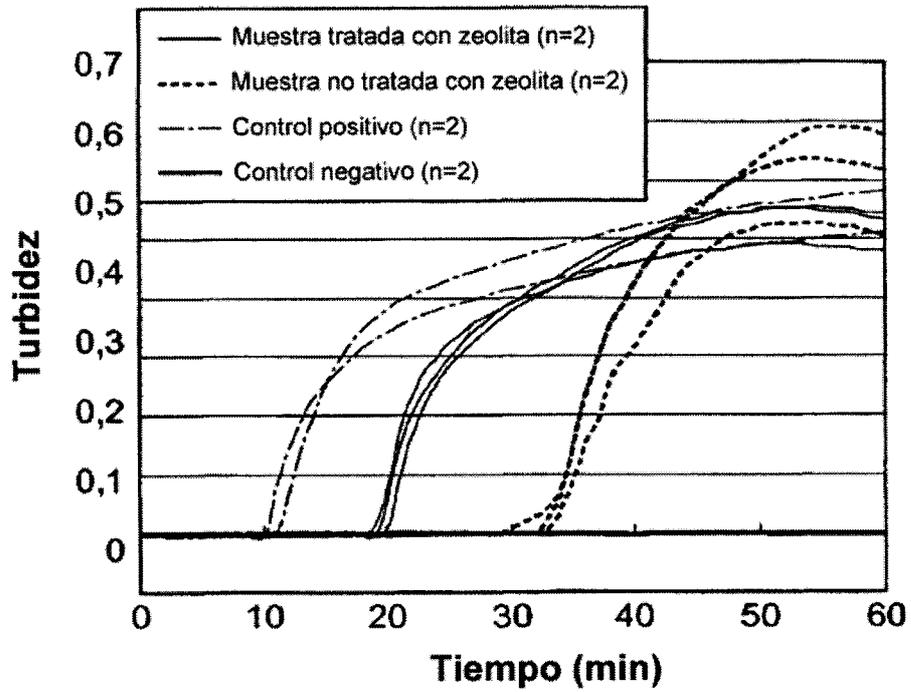


**Fig.3**

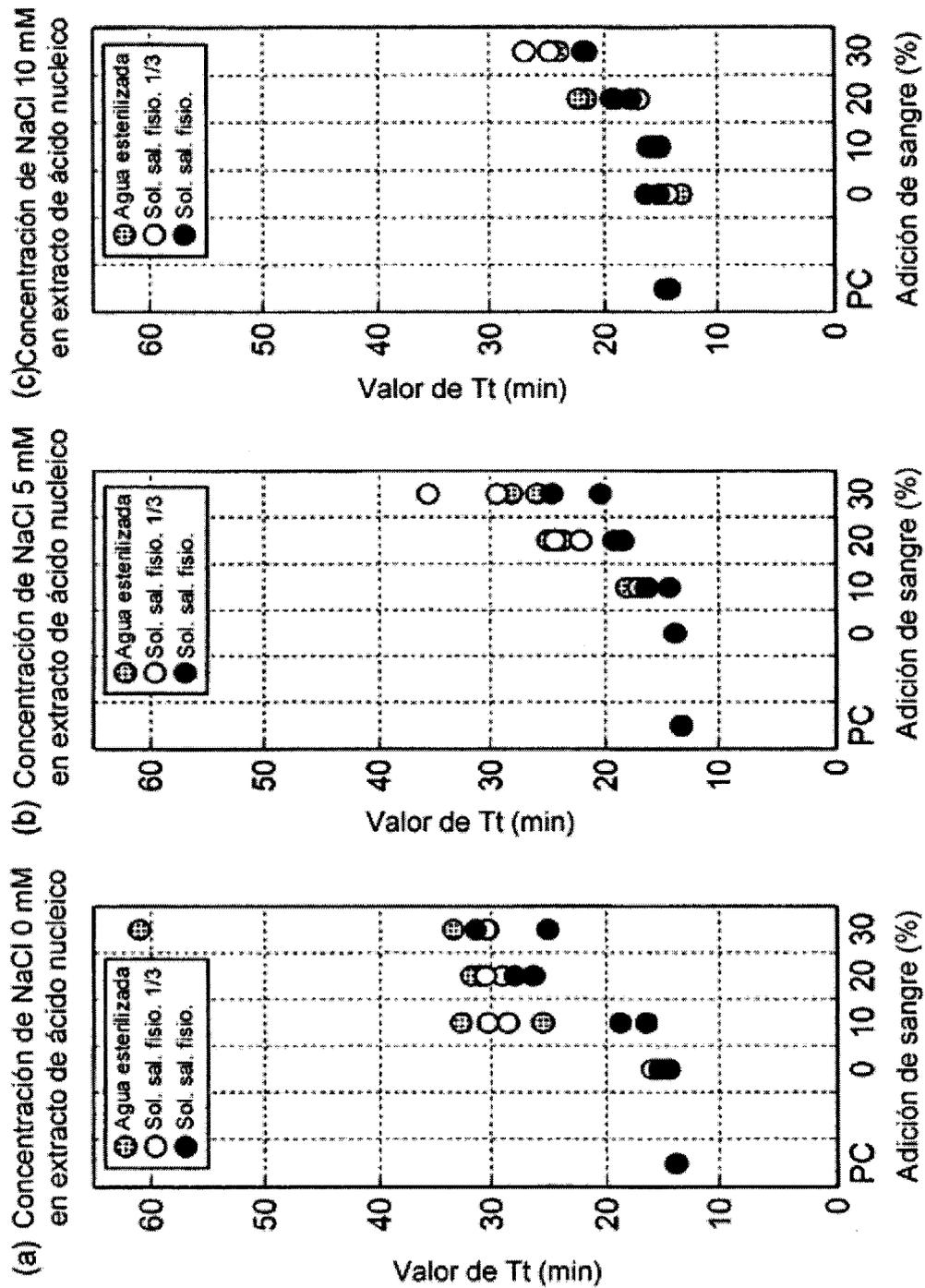
**Fig.4**



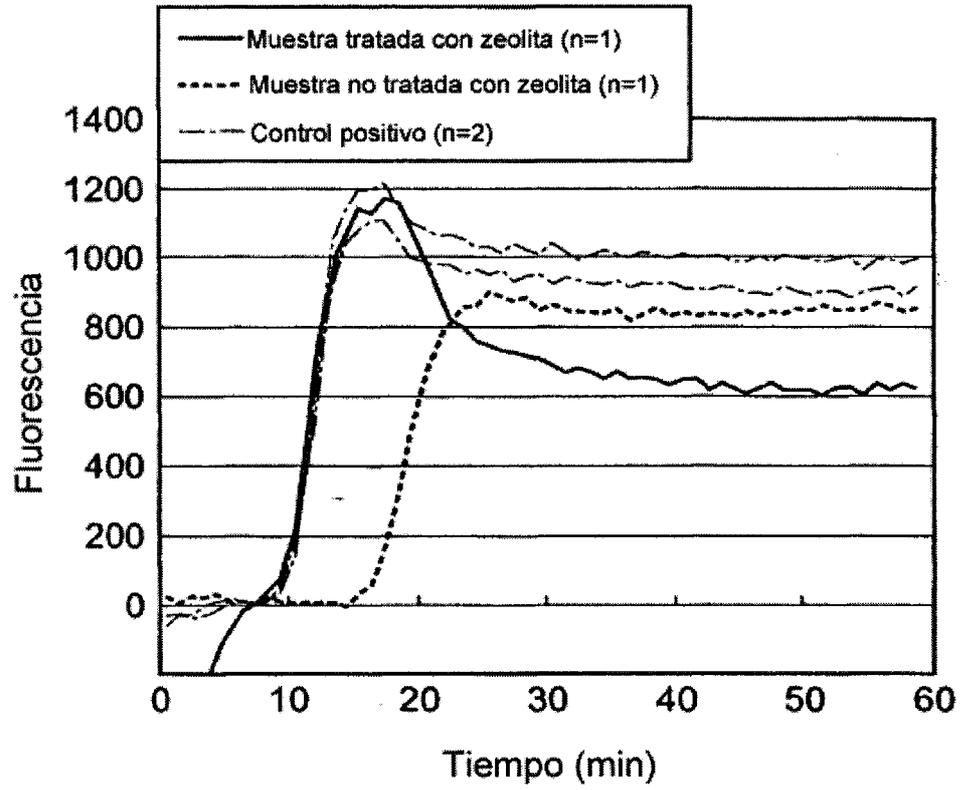
**Fig.5**



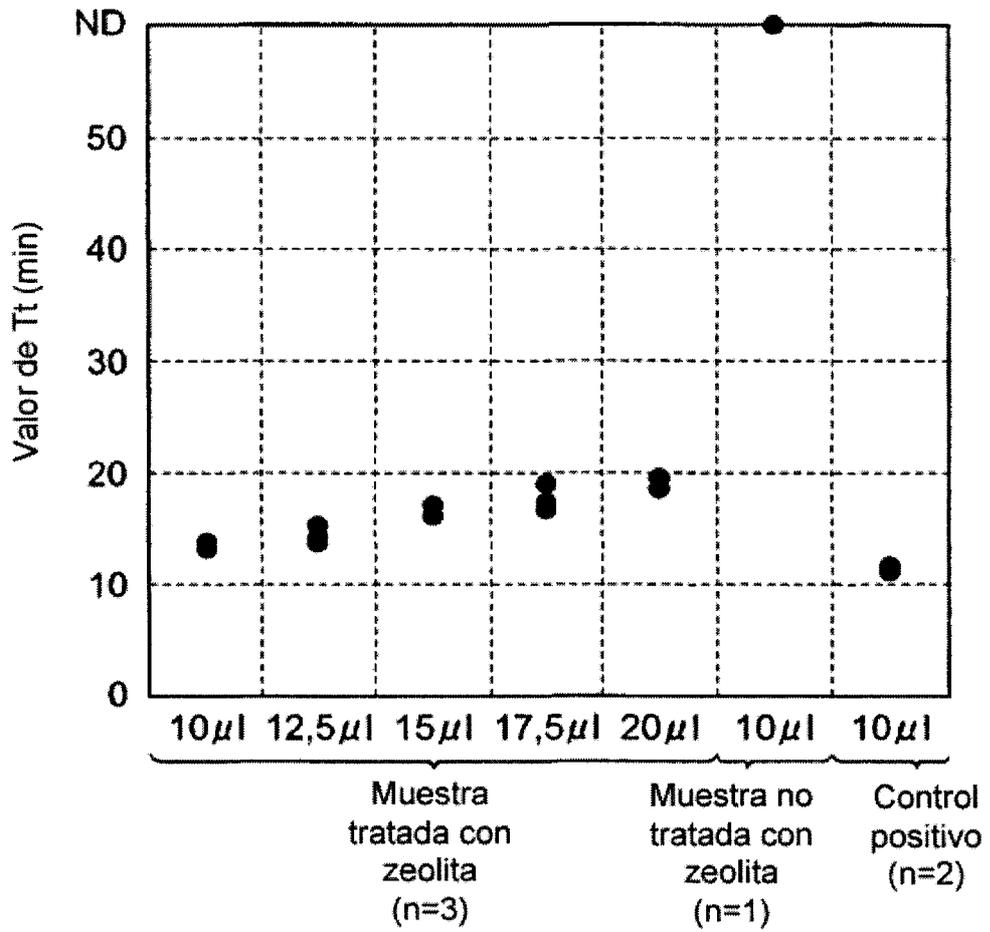
**Fig.6**



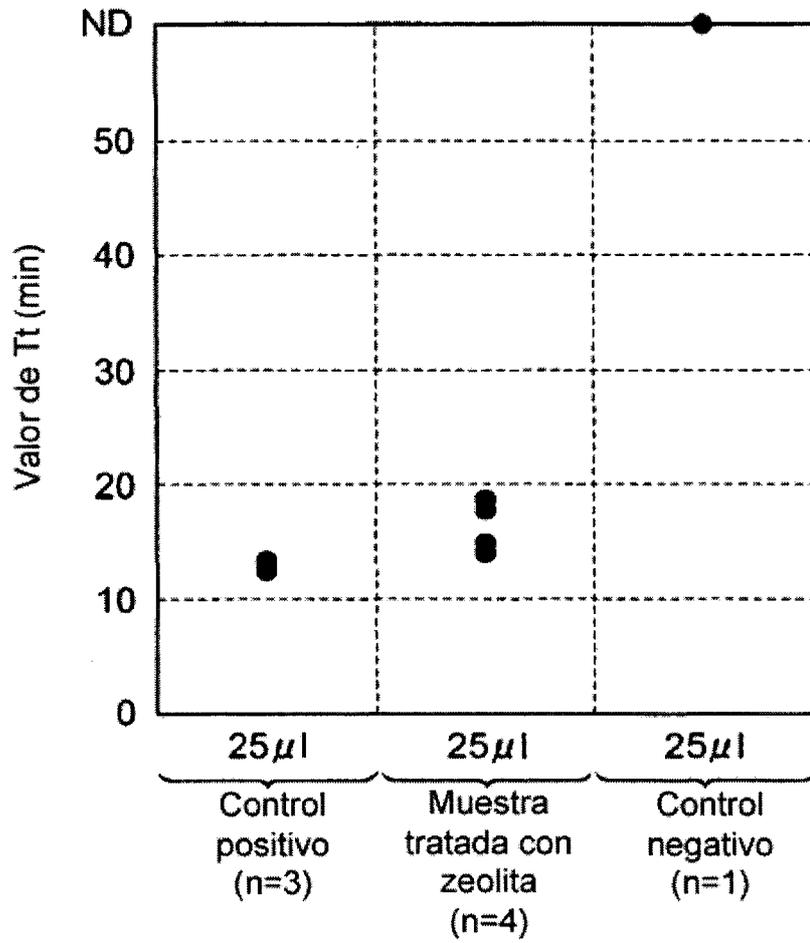
**Fig.7**



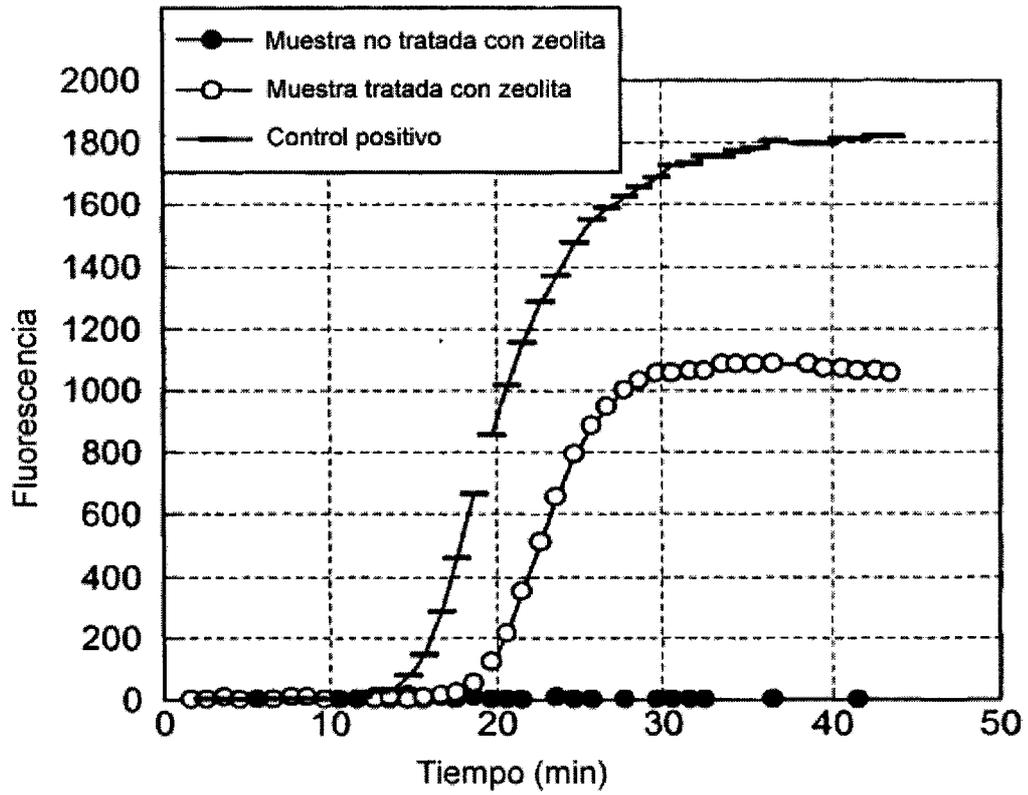
**Fig.8**



**Fig.9**



**Fig.10**



**Fig.11**

