

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 466**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2011 E 11701607 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2521779**

54 Título: **Recuperación mejorada de ácidos nucleicos de partículas magnéticas de vidrio**

30 Prioridad:

08.01.2010 US 684762

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

02.03.2015

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse, 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**JOHNSON, JENNY, A. y
KYGER, ERICH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 530 466 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

Recuperación mejorada de ácidos nucleicos de partículas magnéticas de vidrio

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención está relacionada con el campo del aislamiento de ácidos nucleicos y, específicamente, el campo del aislamiento de ácidos nucleicos utilizando soportes sólidos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El aislamiento de ácidos nucleicos es un paso importante en el diagnóstico molecular. La calidad y cantidad de los ácidos nucleicos aislados de una muestra afecta en gran medida al éxito de las aplicaciones de diagnóstico. Las aplicaciones clínicas y de campo también exigen que el procedimiento de aislamiento sea rápido y susceptibles de automatización.

Existen muchos procedimientos para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de diversos organismos y tejidos. Algunos tipos de muestras clínicas y ambientales presentan desafíos especiales para el aislamiento de ácidos nucleicos con éxito. Por ejemplo, ciertos tejidos tales como el hueso contienen gran cantidad de material extracelular que requieren de su eliminación antes de poder acceder a los ácidos nucleicos. Algunos organismos, tales como hongos, plantas y bacterias poseen paredes celulares o membranas externas que requieren de tratamiento químico agresivo. Los reactivos utilizados en los tratamientos agresivos representan un desafío para las aplicaciones posteriores que utilizan los ácidos nucleicos aislados. Por otra parte, la degradación de los ácidos nucleicos durante este tratamiento agresivo puede conducir a un resultado falso negativo en la prueba de detección posterior. Sin embargo, para ser clínicamente aceptable, un procedimiento diagnóstico debe tener suficiente sensibilidad, es decir, evitar resultados falsos negativos en las muestras de los pacientes. Por lo tanto en el campo del diagnóstico molecular, hay una necesidad de mejora de los métodos de aislamiento de ácidos nucleicos con el fin de hacer que los procedimientos de diagnóstico sean sensibles, fiables y fácil de realizar.

Un requisito previo para el éxito de las pruebas de diagnóstico basadas en ácidos nucleicos es el aislamiento de ácidos nucleicos, no degradados y libres de inhibidores. Al mismo tiempo, hay una demanda de procedimientos simples y de fácil automatización de aislamiento de ácido nucleico. Recientemente se ha hecho popular el aislamiento de ácidos nucleicos utilizando soportes sólidos, tales como, por ejemplo, micropartículas esféricas. Especialmente populares son las micropartículas magnéticas que contienen o están recubiertas con una sustancia similar al vidrio, comúnmente conocidas como "partículas de vidrio magnético" o "PVM". Los procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos que emplean PVM requieren comparativamente pocos pasos y son fácilmente automatizables. Especialmente populares son las PVM hechas por el método de sol-gel, descritas en la publicación europea EP 1.154.443 o las patentes US 6.255.477 y 6.870.047.

Las descripciones generales y ejemplos específicos de PVM obtenidas mediante el método sol-gel se encuentran fácilmente disponibles en la literatura (véase, por ejemplo la EP 1.154.443). Estas PVM consisten en un núcleo ferromagnético recubierto de material similar al vidrio a base de sílice. El núcleo ferromagnético contiene típicamente óxidos de hierro, por ejemplo, Fe_3O_4 o Fe_2O_3 . El núcleo puede ser un núcleo de hierro simple, o puede estar hecho de un material compuesto. El núcleo también puede consistir en una estructura cristalina, cerámica o similar al vidrio en el que está incrustado óxido de hierro. El revestimiento de vidrio puede constar de material amorfo que contiene óxido de silicio y además puede contener uno o más óxidos metálicos tales como óxido de boro (B_2O_3), óxido de aluminio (Al_2O_3), óxido de calcio (CaO), óxido de bario (BaO), óxido de potasio (K_2O), óxido de sodio (Na_2O), óxido de magnesio (MgO) u óxido de plomo (Pb_2O_3). En algunas realizaciones, el vidrio es óxido de silicio y también contiene uno o más compuestos en el siguiente intervalo de concentraciones: B_2O_3 (0-30%), Al_2O_3 (0-20%), CaO (0-20%), BaO (0-10%), K_2O (0-20%), Na_2O (0-20%), MgO (0-18%), Pb_2O_3 (0-15%). El vidrio también puede contener un porcentaje menor (0-5%) de un número de otros óxidos tales como Mn_2O_3 , TiO_2 , As_2O_3 , Fe_2O_3 , CuO y CoO . Las superficies hechas de una composición de vidrio de borosilicato han mostrado ser especialmente eficaces. Los vidrios de borosilicato tienen un contenido de óxido de boro de más del 25%, por ejemplo una composición 70/30 de SiO_2/B_2O_3 .

Las partículas magnéticas se modifican en ocasiones con grupos funcionales que facilitan la unión de los ácidos nucleicos. Tales grupos incluyen, sin limitación, oligonucleótidos poli-T, para la captura de ácidos nucleicos que contienen poli-A, estreptavidina, para la captura de ácidos nucleicos marcados con biotina y secuencias sonda específica para la captura de ácidos nucleicos que contienen una secuencia única complementaria a la sonda. Sin embargo, son de utilidad más universal las partículas magnéticas con superficies no modificadas que son capaces de aislar cualquier ácido nucleico presente en la muestra, independientemente de la secuencia.

Un protocolo de aislamiento de ácido nucleico típico usando PVM comienza con la disrupción de las células o tejidos con el fin de liberar los ácidos nucleicos. Los procedimientos de disrupción de los tejidos que se utilizan habitualmente son de naturaleza química, enzimática o física, lo que incluye el ultrasonido, alta presión, fuerzas de cizallamiento, bases fuertes, detergentes o agentes caotrópicos, proteasas o lipasas. Para la lisis química y

enzimática, el reactivo de lisis incluye típicamente un agente tamponante, una sal, una o más de entre sustancias desnaturizantes y sustancias caotrópicas, una proteasa y opcionalmente, un inhibidor de la nucleasa y un conservante. El reactivo de lisis provoca la digestión de las proteínas, la inhibición de nucleasas, y la solubilización de los lípidos, lipoproteínas y similares. Por ejemplo, el agente tampón puede ser Tris, la sal puede ser una sal de sodio, de potasio, un amonio o una sal de magnesio, tal como un cloruro o un acetato, el detergente puede ser dodecilsulfato de sodio, Triton-X o Tween, el reactivo caotrópico puede ser urea, tio-urea, yoduro de sodio, dodecilsulfato de sodio, perclorato de sodio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio o hidrocloreto de guanidinio, el inhibidor de la nucleasa puede ser un quelante tal como EDTA, el conservante puede ser una azida metálica, y la proteasa puede ser proteinasa K. Típicamente, la muestra se incuba con el reactivo de lisis a temperaturas entre 70 y 100°C, por ejemplo, de 90 a 95°C.

Para la mayoría de las muestras, los reactivos y condiciones de lisis descritos anteriormente son suficientes para lograr la lisis de las células y liberar ácidos nucleicos en solución. Por desgracia, para algunos tipos de muestras, la lisis plantea un reto mayor. Algunas células, organismos y tejidos requieren condiciones de lisis agresivas con el fin de romper la pared celular o el tejido y liberar el contenido celular. Por ejemplo, los patógenos Gram-positivos tales como *Mycobacterium tuberculosis* tienen paredes celulares de peptidoglicano ricas en lípidos. Hay una necesidad mundial de métodos rápidos de detección de *M. tuberculosis* y otras micobacterias. Sin embargo, el aislamiento de ácidos nucleicos es a menudo un factor limitante para alcanzar los niveles deseables de sensibilidad de los ensayos. Ver Neonakis et al. (2008) "Molecular diagnostic tools in micobacteriology", *J. Microbiol. Methods*, 75:111. Actualmente la sensibilidad deseada en un ensayo de detección de micobacterias se consigue con un procedimiento de aislamiento de ácido nucleico de múltiples pasos que incluye pasos repetidos de lavado y centrifugación. Ver Shamputa et al. (2004) "Molecular genetic methods for diagnosis and antibiotic resistance detection of mycobacteria from clinical specimens", *APMIS*, 122:728. Tal procedimiento, sin embargo, no es automatizable y no es práctico para la mayoría de usuarios.

En un procedimiento típico de aislamiento de ácidos nucleicos usando PVM, después de que los compartimentos celulares en la muestra se han roto para liberar los ácidos nucleicos, la muestra se pone en contacto con las PVM a fin de lograr la unión de los ácidos nucleicos a las PVM. Las PVM se pueden añadir a la muestra antes de la lisis. Por ejemplo, las PVM puede estar presente en el recipiente en el que se añade la muestra inicial. Se ha determinado que la presencia de PVM no afecta a la lisis de la muestra. Alternativamente, la muestra se pueden lisar primero e introducir las PVM sólo después de que se complete la etapa de lisis.

Para lograr la unión a las PVM, la muestra se mezcla típicamente con PVM y se incuba en esta mezcla de unión durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca la unión (por ejemplo, el documento EP 1.983.051). Las mezclas de unión conocidas pueden comprender, por ejemplo, una sal adecuada(s) y/o un ácido nucleico reactivo precipitante como polialquilenglicol o alcohol (véase, por ejemplo, la US 20060003357, US 6534262 y WO 2004/ 042058). Esta etapa se puede optimizar fácilmente mediante la determinación de la cantidad de ácidos nucleicos inmovilizados sobre la superficie de las partículas de vidrio magnéticas en diferentes puntos en el tiempo o mediante la determinación del rendimiento de ácidos nucleicos después de diferentes tiempos de incubación. Generalmente, tiempos de incubación de entre 10 segundos y 30 minutos son apropiados para los ácidos nucleicos.

En la mayoría de ejemplos, el reactivo de lisis que contiene los ácidos nucleicos liberados es un entorno adecuado para que se produzca la unión a las PVM. Sin embargo, en algunos casos, el reactivo de lisis no es el entorno adecuado para la unión de ácidos nucleicos a la superficie de partículas de vidrio magnéticas. Especialmente cuando las partículas de vidrio magnéticas tienen una superficie no modificada, la unión entre los ácidos nucleicos y la superficie de las partículas depende de condiciones tales como el pH y la fuerza iónica de la mezcla de unión. Se ha descrito que la máxima unión de los ácidos nucleicos a las PVM se produce a pH bajo, tal como pH 5 o inferior. Sin embargo, para algunas aplicaciones, puede no lograrse tal pH bajo de la mezcla de unión. Por ejemplo, el reactivo de lisis para lisar las micobacterias tiene un valor de pH de 12 o superior. En un procedimiento típico para el aislamiento de ácidos nucleicos de micobacterias, se reduce el pH durante una etapa de neutralización después de la lisis celular, pero a no menos de pH 9. A pH 9 o superior, la unión de los ácidos nucleicos a las partículas de vidrio magnéticas es ineficiente. Hasta el momento actual, esta ineficiencia de unión se ha superado con tiempos de incubación prolongados. Esta manera de resolver el problema es poco práctica para las aplicaciones clínicas. Por otra parte, la incubación prolongada amenaza la estabilidad de los moldes de ácido nucleico, especialmente los moldes de RNA.

El documento WO 2004/013155 describe un método para estabilizar o separar los ácidos nucleicos a partir de una muestra que comprende una fase sólida que tiene un núcleo magnético y una capa externa que contiene sílice capaz de unirse a ácidos nucleicos protegidos de la degradación. Los ácidos nucleicos unidos a la fase sólida se tratan posteriormente con una amina primaria como la etilendiamina para su desprotección.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención es un método para separar los ácidos nucleicos a partir de una solución de muestra que contiene ácidos nucleicos, que comprende poner en contacto la solución de la muestra con una fase sólida capaz de unirse a ácidos nucleicos y una mezcla de unión que comprende un compuesto de etileno-amina; la incubación de la

solución de muestra que contiene la fase sólida bajo condiciones en las que los ácidos nucleicos pueden unirse a la fase sólida, y separar la fase sólida de la solución. El método incluye opcionalmente una etapa de lavado de los ácidos nucleicos unidos antes de la elución. En algunas realizaciones, el método incluye la detección de los ácidos nucleicos después del aislamiento. La invención incluye además una mezcla de reacción para aislar los ácidos nucleicos, y la mezcla contiene una fase sólida capaz de unirse a los ácidos nucleicos y un compuesto de etileno-amina. La invención también incluye un equipo para la separación de ácidos nucleicos a partir de una muestra utilizando fase sólida, y el equipo comprende: una fase sólida capaz de unirse a ácidos nucleicos y un compuesto de etileno-amina. La fase sólida capaz de unirse a ácidos nucleicos aplicada de acuerdo con la invención comprende partículas que tienen un núcleo magnético y una capa externa que contiene sílice. El compuesto de etileno-amina que se usa de acuerdo con la presente invención se caracteriza por una fórmula general $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(NHCH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-NH}_2$, en la que n es 0-10 o más.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 Definiciones

Tal y como se usa en el presente documento, el término "compuesto de etileno-amina" se refiere a una molécula que tiene una fórmula general $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(NHCH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-NH}_2$, en la que n es 0-10 o más. Compuestos de etileno-amina útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, etilendiamina (EDA), dietilentriamina (DETA), trietilentetramina (TETA), tetraetilenpentamina (TEPA) y pentaetilen-hexamina (PEHA). Un experto en la materia apreciará que otros compuestos de etileno-amina son útiles en la presente invención.

En la presente memoria, el término "muestra" se refiere a una mezcla o solución que contiene la sustancia de interés, por ejemplo, un ácido nucleico. La muestra puede comprender un tejido sólido o líquido, un fluido corporal, un cultivo o suspensión de células eucariotas (incluyendo plantas, hongos, animales o células humanas) y un cultivo o suspensión de células procariotas (incluyendo células bacterianas). La muestra puede comprender virus. La muestra puede comprender también una solución libre de células que contiene una sustancia de interés. Dependiendo de la naturaleza de la muestra, puede requerir un tratamiento químico o físico para facilitar el aislamiento de la sustancia de interés de la muestra.

Tal como se utiliza aquí, el término "componente" de una muestra biológica se refiere a una clase de moléculas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) o un objetivo específico tal como una proteína específica o secuencia de ácido nucleico que se desea detectar.

Tal y como se utiliza aquí, el término "ácido nucleico" se refiere a polímeros de desoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa) (es decir, DNA), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) (es decir, el RNA), y cualquier otro N-análogo de glicósido de una base de purina o pirimidina, o bases de purina o pirimidina modificadas, o una combinación de las mismas.

En el método de la presente invención, los ácidos nucleicos se aíslan a partir de una muestra usando partículas de vidrio magnético, en la que la unión de los ácidos nucleicos a las partículas de vidrio magnéticas se ve reforzada por la presencia de uno o más compuestos de etileno-amina.

En algunas realizaciones, la muestra contiene células enteras. Las células se lisan usando un reactivo de lisis adecuado para alterar las membranas celulares y, si están presentes, las paredes celulares con el fin de liberar los ácidos nucleicos de los compartimentos celulares y subcelulares. Se conocen en la materia varios métodos para lisar células y tejidos. Se hace referencia y se describen muchos métodos en Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3ª Ed, 2001)).

En algunas realizaciones, la muestra contiene bacterias Gram-positivas. Las bacterias Gram-positivas se lisan utilizando un reactivo de lisis que comprende una base química fuerte (por ejemplo hidróxido alcalino), un detergente y una sal, y que tiene un pH mayor que 12. En algunas realizaciones, la muestra que contiene bacterias Gram-positivas se calienta a entre 80°C y 100°C, normalmente aproximadamente 95°C y se incuba durante entre 5 y 30 minutos, por lo general aproximadamente 15 minutos.

Según la presente invención, la muestra que contiene ácidos nucleicos libres de compartimentos celulares y subcelulares se pone en contacto con partículas de vidrio magnéticas en condiciones adecuadas para la unión de ácidos nucleicos a las partículas de vidrio magnéticas. Las partículas de vidrio magnéticas usadas de acuerdo con la presente invención se entiende que son una fase sólida capaz de unirse a ácidos nucleicos, que comprenden partículas que tienen un núcleo magnético y una capa externa que contiene sílice. Se ha descubierto que la adición de compuestos de etileno-amina, que tiene una fórmula general $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-NH}_2$, en la que n es 0-10 o más, a la mezcla de unión aumenta en gran medida la eficiencia de unión de los ácidos nucleicos a la superficie de partículas de vidrio magnéticas. Este fenómeno es especialmente beneficioso a pH alto. La eficiencia de unión se incrementa aún más en presencia de sales metálicas, por ejemplo, sales de magnesio o manganeso, tales como las sales de cloruro o acetato, en la mezcla de unión.

En algunas realizaciones, la concentración de compuestos de etileno-amina está entre 10 y 65 mM, por ejemplo, 16 mM.

Después de la etapa de unión, las partículas de vidrio magnéticas con ácidos nucleicos unidos se pueden separar de la solución que contiene compuestos de etileno-amina. Dependiendo del tamaño y tipo de partículas de vidrio magnéticas, las partículas o bien se separan del fluido durante el periodo de incubación, o permanecen en suspensión después de la incubación y requieren una separación posterior. Si se requiere una etapa de separación, las partículas con ácidos nucleicos unidos se separan de la solución de la muestra mediante la aplicación de un campo magnético. Por ejemplo, las partículas de vidrio magnéticas se pueden atraer a la pared o fondo del recipiente de la muestra en la que se realizó la incubación. El líquido que contiene las sustancias no unidas y los contaminantes presentes en la muestra puede entonces retirarse del recipiente de la muestra mediante pipeteo o aspiración.

Las partículas de vidrio magnéticas con ácidos nucleicos unidos opcionalmente pueden lavarse una o más veces con uno o más soluciones de lavado. Una solución de lavado tiene una composición que no causa la liberación de los ácidos nucleicos de la superficie de la partícula, pero elimina los contaminantes no deseados que siguen asociados a los ácidos nucleicos o partículas de vidrio magnéticas. En algunas realizaciones, la solución inicial de lavado contiene alcohol, por ejemplo etanol o isopropanol. La solución de lavado puede contener también una sal caotrópica y un tampón. En algunas realizaciones, la solución de lavado subsiguiente está libre de alcohol, pero contiene una sal, un tampón y, opcionalmente, un conservante. Esta etapa de lavado puede tener lugar mediante la incubación de la solución de lavado con las partículas de vidrio magnéticas a las que se unen los ácidos nucleicos. Las partículas pueden resuspenderse durante este paso para lograr el máximo contacto con el fluido de lavado. La solución de lavado contaminada se retira entonces del recipiente de la muestra.

Después de la última etapa de lavado, las partículas de vidrio magnéticas con ácidos nucleicos unidos se pueden secar brevemente al vacío, o se puede permitir que el líquido de lavado residual se evapore. Si se desea, los ácidos nucleicos pueden separarse de las partículas magnéticas y retirarse opcionalmente del recipiente que contiene las partículas magnéticas, dejando las partículas atrás. Los ácidos nucleicos se pueden eluir de las partículas de vidrio magnéticas usando un tampón que tenga un bajo contenido en sal. En algunas realizaciones, el tampón de elución contiene Tris. Opcionalmente, el tampón de elución puede contener conservantes e inhibidores de nucleasa, por ejemplo quelantes tales como EDTA. En otras realizaciones, el tampón de elución es agua con o sin conservantes.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden permanecer unidos a las partículas magnéticas durante las aplicaciones posteriores (véase, por ejemplo la publicación de solicitud estadounidense N° 20040014070). En otras realizaciones, los ácidos nucleicos se desprenden de las partículas de vidrio magnéticas, pero las partículas permanecen en el recipiente con los ácidos nucleicos en las aplicaciones posteriores. Por ejemplo, la publicación US 20040014070 muestra que las partículas de vidrio magnéticas obtenidas mediante el método sol-gel mejoran la eficiencia de la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR. En otros casos, los ácidos nucleicos pueden separarse de las partículas de vidrio magnéticas después de la elución. Típicamente, la solución que contiene ácidos nucleicos se retira del recipiente que contiene las partículas de vidrio magnéticas.

En algunas realizaciones, el método de aislamiento de ácidos nucleicos incluye además la amplificación y detección de los ácidos nucleicos diana aislados. Por ejemplo, la amplificación y detección se realizan mediante PCR, véase Principle and applications for DNA amplification (Ed. HA Erlich, Freeman Press, Nueva York, Nueva York, 1992), PCR Protocols: a guide to methods and aplicaciones (Ed. Innis, et al, Academic Press, San Diego, California, 1990). La amplificación y detección también se pueden realizar a través de la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Patentes US N° 5.185.243, 5.679.524 y 5.573.907) o cualquier otra tecnología de amplificación de ácido nucleico adecuada. Aunque cualquier método de análisis posterior es compatible con el método de aislamiento de la presente invención, la composición de la solución de lisis y la solución de unión de acuerdo con la presente invención son especialmente compatibles con la posterior aplicación de PCR.

En un ensayo de PCR en tiempo real, la señal generada por la sonda marcada es proporcional a la cantidad de ácido nucleico diana de entrada. Cuanto mayor sea la entrada, antes la señal de fluorescencia cruza un valor umbral predeterminado (Ct). Por lo tanto se pueden determinar cantidades relativas o absolutas de ácido nucleico diana mediante la comparación de las muestras entre sí o con una muestra de control con una cantidad conocida de ácido nucleico.

En otra realización, la invención es una mezcla de reacción para aislar ácidos nucleicos que comprenden partículas de vidrio magnéticas con un núcleo magnético y una capa externa que contiene sílice. La mezcla de reacción puede contener un reactivo de lisis, y el reactivo comprende uno o más detergentes. La mezcla de reacción comprende además un compuesto de etileno-amina que tiene una fórmula general $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-NH}_2$, en la que n es 0-10 o más, y opcionalmente, una sal metálica como, por ejemplo, una sal de magnesio o manganeso, uno o más conservantes, y/o uno o más quelantes. En algunas realizaciones, el reactivo de lisis tiene un valor de pH de 12 o más. En algunas realizaciones, el reactivo de lisis en la mezcla de reacción comprende uno o más detergentes a una concentración del 1-10%, uno o más quelantes tales como EDTA a una concentración de 0,5-2 mM, uno o más conservantes, tales como azida sódica a una concentración del 0,01-0,1%, un compuesto de etileno-amina a una

concentración de 10-65 mM y una sal metálica, tal como sal de magnesio o manganeso, tal como un cloruro o un acetato a una concentración de 5-25 mM.

5 En algunas realizaciones, la mezcla de reacción contiene además una muestra que incluye los ácidos nucleicos a aislar. En algunos casos, la muestra contiene lisados de bacterias Gram-positivas como fuente de ácido nucleico. En otras realizaciones, la mezcla de reacción contiene partículas de vidrio magnéticas. En algunos casos, las partículas se fabrican por el método sol-gel que se describe en la patente US 6.870.047 y las referencias citadas en la misma.

10 En otra realización, la invención es un equipo para el aislamiento de ácidos nucleicos utilizando partículas de vidrio magnéticas que tienen un núcleo magnético y una capa externa que contiene sílice. El equipo incluye, además, un reactivo de lisis, y el reactivo comprende uno o más detergentes, y opcionalmente, uno o más conservantes. El equipo comprende además un compuesto de etileno-amina que tiene una fórmula general $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(NHCH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-NH}_2$, en la que n es 0-10 o más, y opcionalmente, una sal de magnesio o manganeso. En algunas realizaciones, el reactivo de lisis, el compuesto de etileno-amina y la sal de magnesio o manganeso se proporcionan en recipientes separados. En algunas realizaciones, el reactivo de lisis puede tener un valor de pH de 12 o más. En algunas realizaciones, el reactivo de lisis incluido en el equipo comprende uno o más detergentes a una concentración de entre el 1-10%, uno o más quelantes tales como EDTA a una concentración de entre 0,5-2 mM, uno o más conservantes, tales como azida sódica a una concentración de entre el 0,01-0,1%, un compuesto de etileno-amina a una concentración de entre 10-65 mM y una sal de magnesio o manganeso, tal como cloruro de magnesio o acetato de manganeso en una concentración entre 5-25 mM. Las partículas de vidrio magnéticas con un núcleo magnético y una capa externa que contiene sílice incluidas en el equipo se pueden incorporar en el reactivo de lisis o estar presentes en un recipiente separado en el equipo. Cuando dichas partículas de vidrio magnéticas están presentes en un recipiente separado, las partículas pueden resuspenderse en un alcohol tal como el isopropanol. En algunos casos, las partículas magnéticas incluidas en el equipo de la presente invención se fabrican mediante el método sol-gel que se describe en la patente US 6.870.047. El equipo incluye, además, un reactivo de neutralización, un reactivo de lavado y un reactivo de elución. El reactivo de neutralización contiene un tampón, una sal, uno de dichos compuestos de etileno-amina y opcionalmente un conservante, y tienen un pH de entre 6 y 8, más preferiblemente pH 7,5. El tampón puede ser Tris, la sal puede ser cloruro de magnesio, iones de magnesio o manganeso y el conservante puede ser azida sódica. El reactivo de lavado puede contener alcohol. El reactivo de elución puede contener un tampón y un conservante, y tener un pH de 8,5.

Ejemplos

35 Sólo como ilustración y no para limitar el alcance de la invención, el método se aplicó al aislamiento de ácidos nucleicos a partir de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB).

Ejemplo 1:

40 Para la lisis, la muestra que comprende 100 μl de una suspensión de células de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) o el mismo volumen de DNA de MTB en fosfato 67 mM de pH 6,8 se combinó con 400 μl de reactivo de lisis (NaOH 50 mM, Triton X-100 al 1%, EDTA 1 mM, NaN_3 al 0,05%, pH 12+) y se incubó durante 15 minutos a 95°C. A continuación, se añadieron 400 μl de reactivo de neutralización (etileno-amina 8-64 mM, Tris 200 mM, MgCl_2 8-23 mM o $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, NaN_3 al 0,05%, pH 7,5). Luego se añadieron 100 μl de partículas de vidrio magnéticas (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ) y la muestra se incubó durante 5-30 min. a temperatura ambiente o a 37°C. Las partículas de vidrio magnéticas se separaron a continuación mediante la eliminación del sobrenadante, y se lavaron dos veces con citrato de sodio dihidrato 7,5 mM, MIT al 0,05% (p/v), pH 4,1. Los ácidos nucleicos se eluyeron con 50-100 μl de reactivo de elución (Tris 30 mM, pH 8,5, metil-4-hidroxibenzoato de metilo (metilparabeno) al 0,2% p/v, NaN_3 al 0,09%). Los procedimientos post-lisis se realizaron de forma manual o automáticamente mediante el instrumento Hamilton Star (Hamilton Robotics, Inc., Reno, Nev.).

50 El ácido nucleico aislado se analizó mediante PCR cuantitativa, también conocida como PCR en tiempo real. La PCR se realizó con 50 μl de eluido y 50 μl de mezcla maestra que comprende tricina 154 mM, hidróxido de potasio 110 mM, acetato de potasio 190 mM, 19% de glicerol (v/v), DMSO al 2,3%, dATP 1,16 mM, dCTP 1,16 mM, dGTP 1,16 mM, dUTP 1,16 mM, el cebador directo y reverso, la sonda diana, la sonda de control interno, la polimerasa de DNA, la glicosilasa de uracilo-N-DNA, azida sódica al 0,09% (p/v), pH 8,50, y 20 copias/ reacción de DNA de control interno. Las condiciones de amplificación en el Cobas® TaqMan® 48 Analyzer fueron: 5 min. a 50°C seguido de dos ciclos de 98°C durante 20 s, 61°C s, y 70°C s, y luego 55 ciclos de 95°C durante 25 s, 61°C durante 40 s y 70°C durante 20 s.

60 Los resultados se expresan como el valor "ciclos hasta el umbral" (Ct) (un número de ciclo en el que la fluorescencia de una muestra excede la fluorescencia de fondo y por lo tanto "cruza el umbral"). El Ct es un reflejo de la cantidad de partida del molde de ácido nucleico. Un valor de Ct menor indica una cantidad mayor de partida del molde de ácido nucleico en la reacción, mientras que un valor de Ct más alto indica una cantidad de partida inferior del molde de ácido nucleico en la reacción. Las Tablas 1-3 muestran los valores de Ct para cada reacción de PCR que contiene ácidos nucleicos aislados utilizando el método de la presente invención.

Tabla 1

Recuperación de ácidos nucleicos de MTB completos con la ayuda de un copolímero de etileno-amina y una sal metálica		
[TETA*] mM	Ct	Desv. estándar (n = 2)
8	37,0	1,24
16	36,4	0,55
32	36,1	0,42
64	37,0	0,05
[TETA] MM / [MgCl ₂] mM	Ct	Desv. estándar (n = 2)
0,0	38,8	0,35
8,10	36,6	0,22
16,15	36,3	0,12
32,15	36,7	0,61

*TETA - trietilentetramina

Tabla 2

Recuperación de ácidos nucleicos de MTB completos con la ayuda de varias etileno-aminas y una sal metálica					
Nº	Aditivos	Unión a TA		Unión a 37°C	
		Ct	Desv. estándar (n = 3)	Ct	Desv. estándar (n = 3)
1	8 mM MgCl ₂	29,70	0,05	29,42	0,12
2	8 mM MgCl ₂ + 16 mM EDA*	30,16	0,33	29,65	0,05
3	8 mM MgCl ₂ + 16 mM DETA	29,02	0,05	28,96	0,17
4	8 mM MgCl ₂ + 16 mM TETA	28,61	0,03	28,28	0,17
5	8 mM MgCl ₂ + 16 mM TEPA	28,37	0,19	28,29	0,09
6	8 mM MgCl ₂ + 16 mM PEHA	31,46	0,30	31,57	0,30
Nº	Aditivos	Unión a TA		Unión a 37°C	
		Ct	Desv. estándar (n = 3)	Ct	Desv. estándar (n = 3)
1	23 mM MgCl ₂	30,62	0,23	31,11	0,40
2	23 mM MgCl ₂ + 16 mM EDA	30,30	0,27	30,40	0,31
3	23 mM MgCl ₂ + 16 mM DETA	28,47	0,06	28,77	0,22
4	23 mM MgCl ₂ + 16 mM TETA	28,33	0,19	28,31	0,41
5	23 mM MgCl ₂ + 16 mM TEPA	28,57	0,14	28,59	0,10
6	23 mM MgCl ₂ + 16 mM PEHA	31,78	1,10	29,96	0,59

*EDA – etilendiamina, DETA – Dietilentriamina, TETA – Trietilentetramina, TEPA – Tetraetilenpentamina, PEHA - pentaetilenhexamina

5

Tabla 3

Recuperación de ácidos nucleicos de MTB completos con la ayuda de un copolímero de etileno-amina y diversas sales metálicas			
Nº	Aditivos	Ct	Desv. estándar (n = 3)
1	Ninguno	36,74	0,52
2	8 mM MgCl ₂	30,78	0,41
3	16 mM TETA	28,22	0,05
4	8 mM Mg(OAC) ₂ + 16 mM TETA*	28,45	0,26
5	23 mM Mg(OAC) ₂ + 16 mM TETA	28,78	0,29
6	8 mM Mn(OAC) ₂ + 16 mM TETA	31,07	0,15
7	23 mM Mn(OAC) ₂ + 16 mM TETA	32,65	0,11
Nº	Aditivos	Ct	Desv. estándar (n = 3)
1	Ninguno	34,73	0,36
2	8 mM MgCl ₂	27,17	0,20
3	16 mM TEPA	31,50	0,80
4	8 mM Mg(OAG) ₂ + 16 mM TEPA	26,95	0,23
5	23 mM Mg(OAC) ₂ + 16 mM TEPA	26,82	0,27

6	8 mM Mn(OAc) ₂ + 16 mM TEPA	26,85	0,44
7	23mm Mn(OAc) ₂ + 16 mM TEPA	30,50	0,65
* TETA - trietilentetramina			

Tabla 4

Recuperación de ácido nucleico de MTB libre de células con la ayuda de un compuesto etileno-amina y sales metálicas			
Nº	Aditivos	Ct	Std Dev (n = 3)
1	Ninguno	42,86	0,55
2	8 mM MgCl ₂	35,38	0,22
3	16 mM TEPA*	39,10	3,77
4	8 mM Mg(DAC) ₂ + 16 mM TEPA	35,57	0,63
5	23 mM Mg(OAc) ₂ + 16 mM TEPA	35,52	0,58
6	8 mM Mn(OAc) ₂ + 16 mM TEPA	35,78	0,32
7	23mm Mn(OAc) ₂ + 16 mM TEPA	39,70	0,76
Nº	Aditivos	Ct	Std Dev (n = 3)
1	Ninguno	42,99	1,33
2	8 mM MgCl ₂	35,15	0,12
3	23 mM MgCl ₂	35,78	0,72
4	8 mM Mg(OAc) ₂	35,46	0,20
5	23 mM Mg(OAc) ₂	37,17	0,48
6	16 mM TETA	35,15	0,19
7	8 mM MgCl ₂ + 16 mM TEPA	34,68	0,14
8	23 mM MgCl ₂ + 16 mM TEPA	34,47	0,19
9	8 mM Mn(OAc) ₂ + 16 mM TEPA	34,66	0,29
10	23mm Mn(OAc) ₂ + 16 mM TEPA	34,65	
* TETA - trietilentetramina			

5 Los resultados demuestran que los compuestos de etileno-amina mejoran la recuperación de ácidos nucleicos utilizando soportes sólidos tales como partículas de vidrio magnéticas. La mejora es aún mayor en presencia de sales metálicas, por ejemplo, sales de magnesio o manganeso, tales como cloruros o sales de acetato.

10 Aunque la invención se ha descrito en detalle en referencia a ejemplos específicos, será evidente para un experto en la materia que pueden hacerse diversas modificaciones dentro del alcance de esta invención. Así, el alcance de la invención no debe estar limitada por los ejemplos descritos en el presente documento, sino por las reivindicaciones que se presentan a continuación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para separar los ácidos nucleicos a partir de una solución de muestra que contiene ácidos nucleicos, que comprende
- 10 a. poner en contacto la solución de la muestra con una fase sólida capaz de unirse a ácidos nucleicos y una mezcla de unión que comprende un compuesto de etileno-amina;
- b. incubar la solución de muestra que contiene la fase sólida bajo las condiciones en las que los ácidos nucleicos puede unirse a la fase sólida; y
- 10 c. separar la fase sólida de la solución, en el que dicha fase sólida capaz de unirse a ácidos nucleicos comprende partículas que tienen un núcleo magnético y una capa exterior que contiene sílice y dicho compuesto de etileno-amina que tiene una fórmula general $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(NHCH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-NH}_2$, en el que n es 0 - 10 o más.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además el lavado de los ácidos nucleicos unidos a la fase sólida.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además la elución de los ácidos nucleicos a partir de la fase sólida.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que dicha solución de muestra se obtiene mediante la lisis de células.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dicha solución de muestra se obtiene mediante la lisis de bacterias Gram-positivas seleccionadas de entre un grupo constituido por Bacillus, Clostridium, Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus, Mycobacterium y combinaciones de los mismos.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, en el que la mezcla de unión en el paso (a) comprende además iones metálicos.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la mezcla de unión contiene iones magnesio o manganeso.
- 30 8. El método de la reivindicación 1, en el que la mezcla de unión en el paso (a) comprende, además, un hidróxido de un metal alcalino y un detergente.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en el que la mezcla de unión comprende una mezcla de volúmenes iguales de Solución 1 (NaOH 50 mM, Triton X-100 al 1%, EDTA 1 mM, NaN_3 al 0,05%, pH 12+) y Solución 2 (etileno-amina 10-65 mM, Tris 200 mM, MgCl_2 5-25 mM, NaN_3 al 0,05%, pH 7,5)
- 40 10. Una mezcla de reacción para la separación de ácidos nucleicos a partir de una muestra que comprende una fase sólida, y que comprende: una fase sólida capaz de unirse a ácidos nucleicos, que comprende partículas que tienen un núcleo magnético y una capa externa que contiene sílice, y un compuesto de etileno-amina que tiene una fórmula general $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-NH}_2$, en la que n es 0-10 o más y iones metálicos.
- 45 11. La mezcla de reacción de la reivindicación 10, que comprende además un hidróxido de un metal alcalino y un detergente.
12. La mezcla de reacción de la reivindicación 10, que comprende iones magnesio o manganeso.
- 50 13. Un equipo para la separación de ácidos nucleicos a partir de una muestra usando una fase sólida, que comprende: una fase sólida capaz de unirse a ácidos nucleicos, que comprende partículas que tienen un núcleo magnético y una capa externa que contiene sílice, un compuesto de etileno-amina que tiene una fórmula general $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-NH}_2$, en la que n es 0 - 10 o más, y uno o más de entre un reactivo de lisis, un reactivo de neutralización, un reactivo de lavado y un reactivo de elución, en el que el reactivo de lisis contiene un hidróxido de un metal alcalino y un detergente, y el reactivo de neutralización contiene uno de dichos compuestos de etileno-amina, iones magnesio o de manganeso y un tampón.