

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 784**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2005 E 05761305 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 1778863**

54 Título: **Análisis integrado de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

29.06.2004 FI 20045248

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

07.09.2016

73 Titular/es:

**WALLAC OY (100.0%)
Mustionkatu 6
20750 Turku, FI**

72 Inventor/es:

**OLLIKKA, PIA y
YLIKOSKI, ALICE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 581 784 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

Análisis integrado de ácidos nucleicos

Campo de la invención.

- 5 La presente invención se refiere a un método integrado de análisis de ácidos nucleicos, y más en particular a un pretratamiento de muestra simplificado, que hace que el método sea automatizado más fácilmente. El método de la presente invención proporciona la reducción al mínimo de los riesgos relacionados con la contaminación debido a la mínima manipulación de las muestras.

Antecedentes de la invención.

- 10 Como consecuencia del rápido desarrollo de la prueba genómica, el análisis de ácido nucleico entero es una creciente tarea en muchos laboratorios de genética. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método bien establecido para la amplificación o multiplicación de secuencias de ácidos nucleicos, y el método se usa rutinariamente en numerosas áreas de aplicación, tales como los ensayos microbiológicos, estudios de expresión, determinación de la variación genética en la población y pruebas genéticas, forenses y análisis de alimentos y del ambiente. Las pruebas de ácidos nucleicos que usan PCR implican generalmente tres etapas: preparación de la muestra, amplificación y detección. Sin embargo, los procedimientos para realizar las pruebas que se usan hoy en día suelen ser laboriosos. La tendencia actual es hacia ensayos simplificados que permiten la automatización del análisis de los ácidos nucleicos.

- 15 El aumento del número de pruebas que se han de realizar hace que surja la necesidad de operaciones rentables basadas en la integración y la automatización de los procedimientos de ensayo, y la automatización del análisis de ADN completo es una tarea creciente en muchos laboratorios de genética. Aunque se han descrito varios intentos para llevar a cabo análisis de ADN como ensayos de alta producción, la logística de la manipulación de la muestra desde la preparación y el pretratamiento de la muestra hasta el análisis final requiere todavía la manipulación manual y el transporte físico de las muestras. Además, la necesidad de transferir físicamente muestras de ADN amplificadas dentro del laboratorio plantea un grave riesgo de contaminación.

Sjöroos et al. (Clin. Chem. 2001, 47: 498 - 504) y Vålmaa et al. (J. Immunol. Meth. 1998, 219: 131 - 137) describen métodos para realizar PCR multiplex y detección de hibridación en un pocillo individual de una placa de microtítulo. Aunque estos planteamientos reducen el tiempo de práctica en comparación con los métodos no integrados convencionales, todavía implican manipulación manual y requieren la adición y la eliminación de varios reactivos.

- 20 La publicación de patente internacional WO 00/12675 describe un dispositivo que integra la extracción del ácido nucleico, la amplificación de la diana específica y la detección en un dispositivo único. Sin embargo, el dispositivo consiste en diversas cámaras de reacción separadas para realizar diferentes etapas de extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos. Así pues, el dispositivo no está totalmente integrado.

- 25 Strizhkov et al. (Biotechniques 2000, 29: 844 - 857) describen el uso de almohadillas de gel de microchip para la amplificación y detección del ácido nucleico. Este método no implica la extracción integrada del ácido nucleico pero requiere usar ADN aislado como material de partida. Además, el sistema requiere la manipulación manual ya que la cámara de hibridación se desmonta después de la amplificación, y el microchip ha de lavarse y secarse al aire manualmente.

- 30 Un tipo de un ensayo simplificado que reduce la manipulación de la muestra viene proporcionado por los llamados ensayos en tubo cerrado. En los ensayos en tubo cerrado, el producto de la PCR se analiza en el tubo de amplificación por un método homogéneo, tal como TaqMan® (patente de EE. UU. nº 5.210.015) o por faros o balizas moleculares (patente de EE. UU. nº 5.118.801). Estos planteamientos permiten la integración de la amplificación y la detección. Sin embargo, les falta la integración de la preparación de la muestra con la amplificación y la detección.

- 35 Nurmi et al. (Analyt. Biochem. 2001, 299: 211 - 217) describen un método para un análisis genético de alta producción usando fluorometría resuelta en el tiempo y detección en tubo cerrado. Sin embargo, el método carece de extracción integrada del ácido nucleico.

- 40 Se requiere el pretratamiento de la muestra para eliminar los inhibidores comunes a la amplificación de ácido nucleico que puede estar presente en muestras procedentes de fuentes biológicas. Los inhibidores de la amplificación incluyen, por ejemplo, agentes quelantes de origen natural, enzimas y/o proteínas que pueden dañar bien sea las plantillas de ácido nucleico o bien las polimerasas de la PCR usadas en las reacciones de amplificación. Además, los anticoagulantes comunes que se usan para tratar muestras de sangre entera pueden interferir con las reacciones de amplificación de los ácidos nucleicos.

- 45 Se han desarrollado numerosas tecnologías para purificar los ácidos nucleicos procedentes de muestras biológicas, pero todos los procedimientos disponibles requieren mucho tiempo y mucho trabajo. Hay varias estaciones automáticas para la preparación de muestras que están disponibles en el mercado, basadas en columnas de extracción de sílice-caotrópico (patente de EE. UU. nº 5.234.809), tales como QIAamp®, o similares, y varios

5 sistemas de esferas magnéticas. Un planteamiento diferente es la tecnología FTA® (patente de EE. UU. nº 5.496.562) que lisa las membranas de las células tan pronto como la muestra se aplica sobre una matriz de filtración recubierta que permite la inmovilización de los ácidos nucleicos sobre la matriz. Después del lavado, los ácidos nucleicos se pueden liberar de manera que les permite ser amplificados por PCR.

Ulvik et al. (Clin. Chem. 2001, 47: 2050 – 2053) describen un método de genotipado de SNP en sangre entera no procesada y suero mediante PCR en tiempo real, en donde las muestras de sangre entera se depositan en el fondo de las placas de 96 pocillos y se secan. Después se realiza la PCR en tiempo real usando un ensayo TaqMan® en un ensayo en tubo cerrado.

10 Otro planteamiento está representado por el desarrollo de diferentes matrices sólidas para recoger, transportar, almacenar y purificar muestras biológicas, tales como sangre entera clínica, saliva o muestras fecales, para el análisis de ácidos nucleicos. La patente de EE. UU. nº 5.807.527 describe un medio sólido para el almacenamiento a largo plazo de ADN sanguíneo, que comprende una composición, que protege contra la degradación del ADN, un agente desnaturalizante de proteínas y una trampa de radicales libres.

15 Otro ejemplo de este planteamiento es el descrito en la patente de los Estados Unidos nº 5.939.259, que describe un material absorbente, que no se une irreversiblemente a los ácidos nucleicos, que está impregnado con una sal caotrópica.

20 En estas tecnologías conocidas, el ADN de las muestras de sangre almacenadas se extrae del medio antes de realizar la PCR, o el ADN se usa en la PCR in situ sobre el medio sólido después de una extensa purificación, como se describe en la patente de los Estados Unidos nº 5.807.527. La extracción o elución del ADN del medio requiere un procedimiento de múltiples etapas con soluciones e incubaciones especiales.

25 Las tecnologías conocidas usando medios sólidos para recoger, almacenar y purificar el ADN implican por tanto procedimientos de etapas múltiples, de los que algunos usan varios viales y soluciones separadas, para generar una muestra útil para amplificación y detección. Además, algunos de estos métodos producen residuos de una forma innecesaria.

Breve descripción de los dibujos.

La Figura 1 es una presentación gráfica del resultado de la prueba comparativa descrita en el Ejemplo 1, que analiza el efecto del prelavado de las muestras secas en el papel de recogida.

30 La Figura 2 es una presentación gráfica del resultado de la prueba descrita en el Ejemplo 2, en donde se realiza la liberación de ADN de muestras secas, la amplificación y la detección del ADN amplificado en un solo vial de reacción.

La Figura 3 es una presentación gráfica del resultado de la prueba descrita en el Ejemplo 3, en donde se lleva a cabo la liberación del ADN de muestras secas, la amplificación y la detección del ADN amplificado en un único vial de reacción, y en donde se han añadido todos los reactivos necesarios al mismo tiempo.

35 La Figura 4 es una presentación gráfica del resultado de la prueba descrita en el Ejemplo 4, en donde se aplica una muestra de sangre entera a una matriz absorbente en el vial de reacción, y la amplificación y detección del ADN amplificado se llevan a cabo en el mismo vial de reacción.

La Figura 5 es una presentación gráfica del resultado de la prueba descrita en el Ejemplo 5, en donde se proporcionan todos los reactivos necesarios en forma seca en el vial de reacción.

Breve descripción de la invención.

45 La presente invención se refiere a un método para analizar un ácido nucleico diana en una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas de i) transferir una matriz absorbente a un vial de reacción de compartimento único; ii) proporcionar una muestra biológica que contiene dichos ácidos nucleicos diana o aplicarla a dicha matriz absorbente; iii) proporcionar a dicho vial de reacción una mezcla de reactivos para amplificar dichos ácidos nucleicos; iv) proporcionar a dicho vial de reacción una mezcla de reactivos de detección; v) sellar o cerrar herméticamente dicho vial de reacción; vi) realizar una reacción de amplificación; y vii) detectar los ácidos nucleicos amplificados, en donde las etapas vi) y vii) se llevan a cabo en dicho vial sin eliminar dicha matriz del vial de reacción y sin abrir dicho vial de reacción.

50 Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para el análisis de un ácido nucleico diana en una muestra biológica, en el que las etapas de amplificación y detección se llevan a cabo en viales de reacción sellados sin añadir ni eliminar ningún reactivo ni otros componentes después de la etapa de amplificación.

La presente invención se refiere además a un método en el que dicha muestra se aplica sobre la matriz inmediatamente antes de transferir la matriz a dicho vial de reacción, sin secado ni almacenamiento.

La presente invención se refiere además a un método en el que dicha matriz se transfiere al vial de reacción antes de aplicar la muestra directamente a dicha matriz.

- 5 La presente invención se refiere además a un método en el que al menos parte de dichos reactivos de amplificación y mezclas de detección se proporcionan en forma seca antes de añadir la muestra, incluyendo dicho método una etapa opcional más de adición de agua antes de llevar a cabo la etapa de amplificación.

Descripcion detallada de la invención.

- 10 La presente invención proporciona un método integrado para analizar ácidos nucleicos contenidos en una muestra biológica, que comprende el pretratamiento simplificado de la muestra, la amplificación del ácido nucleico diana que se ha de analizar, y la detección de dicha secuencia diana. Gracias al pretratamiento simplificado de la muestra, el método permite la automatización y la integración de la preparación de la muestra, la amplificación y el análisis de los ácidos nucleicos.

- 15 La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que las etapas de amplificación y detección se pueden realizar en muestras recogidas y, opcionalmente, almacenadas en medios sólidos, sin extracción, lavado o elución previa de los ácidos nucleicos. Solamente se necesita una breve incubación para inactivar los inhibidores y para liberar los ácidos nucleicos.

- 20 La inactivación de los inhibidores y la desnaturalización de las proteínas perturbadoras se logran usando matrices sólidas basadas en cualquier material poroso o absorbente, por ejemplo, papel de filtro basado en celulosa, o guata, taco de algodón o tela o material plástico sintético. Las matrices adecuadas para su uso en el método de acuerdo con la presente invención incluyen materiales absorbentes que se unen al material proteínico, pero que no se unen irreversiblemente a los ácidos nucleicos, y que están impregnados, por ejemplo, con una base, un ácido, agentes reductores, sales caotrópicas, detergentes u otros agentes para desnaturalizar inhibidores naturales dentro de la muestra. El material de matriz sólida adecuado para ser usado en la presente invención se puede proporcionar en forma de hojas planas, hisopos, tabletas, pellas o perlas, o como una malla o entramado.

- 25 Tales materiales de matriz sólida son fácilmente disponibles e incluyen, por ejemplo, la matriz de papel proporcionada por Schleicher & Schuell bajo las marcas comerciales 903™ de papel de recogida de muestras o IsoCode® para la recogida, almacenamiento, transporte y purificación del ADN.

- 30 En una realización preferida de la presente invención, se proporciona la muestra biológica en tal matriz absorbente. Al menos una porción de la matriz que contiene la muestra se transfiere al vial de reacción, junto con los reactivos para la amplificación y detección. El vial de reacción se sella después y se pasa a un dispositivo para realizar la reacción de amplificación. El ADN de la muestra es liberado mediante un breve tratamiento térmico. Opcionalmente, si los reactivos no son termoestables, por ejemplo en caso de amplificación isotérmica, la liberación del ADN puede llevarse a cabo a temperatura ambiente. Sorprendentemente, después de la amplificación la detección se puede llevar a cabo sin abrir el vial de reacción o eliminar dicha matriz.

- 35 También se ha encontrado sorprendentemente que la muestra se puede aplicar sobre la matriz inmediatamente antes de su uso. Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, la muestra se aplica sobre una matriz sólida adecuada, y después al menos una parte de la matriz se transfiere al vial de reacción, sin secado previo de la matriz. Después de la adición de los reactivos necesarios, se realizan las etapas de amplificación y detección.

- 40 Además, sorprendentemente se ha encontrado que la matriz sólida puede proporcionarse en el vial de reacción y que la muestra puede aplicarse directamente sobre la matriz, y añadirse los reactivos necesarios una vez que la muestra ha sido aplicada. A continuación se realizan las etapas de amplificación y detección en el vial sellado.

- 45 Se entiende que el término "amplificación" incluye cualquier método para la amplificación de ácidos nucleicos conocido en la técnica, o bien métodos de ciclado térmico tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; patente de EE. UU. nº 4.683.202), PCR con transcriptasa inversa, (patente de EE. UU. nº 5.310.652), y reacción en cadena de la ligasa (LCR; patente de EE. UU. nº 5.185.243), y cualquier variación de los mismos, o métodos isotérmicos tales como la tecnología de la replicasa Q-Beta (patente de EE.UU. nº 4.786.600), amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA; patente de Estados Unidos nº 5.409.818), amplificación mediada por transcripción (TMA; patente de Estados Unidos nº 5.399.491), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA; patente de EE. UU. nº 5.455.166) y amplificación por desplazamiento múltiple (MDA; patente de Estados Unidos nº 6.124.120). Un método de amplificación preferido es la PCR asimétrica, descrita por Innis et al., PNAS 85 (24), 1988: 9436 - 40, que genera productos de amplificación monocatenarios.

- 55 Otros métodos de amplificación conocidos pueden también ser útiles en el método de análisis integrado de acuerdo con la presente invención. Los reactivos de amplificación y el procedimiento de amplificación pueden entonces variar de acuerdo con el método de elección.

5 La etapa de detección se lleva a cabo por cualquier método de detección adecuado que se elija. Así, los reactivos de detección pueden variar de acuerdo con el método elegido. Los métodos de detección adecuados se basan por ejemplo en reactivos de intercalado para detectar la acumulación de producto de amplificación o para realizar análisis de temperatura de fusión, o cebadores marcados, o la extensión del cebador específico en el que nucleótidos directa o indirectamente marcados se incorporan al producto de amplificación, o métodos en los que las sondas de detección directamente o indirectamente marcadas se degradan durante la extensión, o la hibridación con sondas directamente o indirectamente marcadas. La detección puede basarse por ejemplo en la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, desactivación de fluorescencia o etiquetas sensibles al entorno. Los métodos de detección adecuados también pueden incluir formación de imágenes de matriz de puntos o esferas por barrido confocal u onda evanescente. La etapa de detección se lleva a cabo preferiblemente en un formato de tubo cerrado sin eliminar los componentes de la matriz o no reaccionados, para evitar la manipulación posterior a la amplificación.

15 Un método de detección preferido se basa en la hibridación usando sondas marcadas que reconocen los ácidos nucleicos diana amplificados. En tal método, la hibridación, y por lo tanto el etiquetado de los ácidos nucleicos diana, se logra simplemente bajando la temperatura después de la amplificación a la temperatura de hibridación, si es necesario, después de lo cual la sonda marcada sin reaccionar se inactiva mediante una sonda complementaria. La detección de los híbridos marcados formados puede llevarse a cabo en el vial de reacción, sin eliminar la matriz u otros componentes no reaccionados. Así, los viales de reacción permanecen sin abrir después de realizar la reacción de amplificación.

25 En una realización preferida de la presente invención, el método se simplifica más de forma que al menos parte de los reactivos necesarios para realizar las etapas de amplificación y detección se proporciona en el vial de reactivo en forma seca antes de la adición de la muestra que se ha de analizar. Opcionalmente, la matriz absorbente se puede proporcionar también en el vial de reacción. Tal formato de ensayo integrado simplificado reduce al mínimo la manipulación manual, se automatiza fácilmente y hace que disminuya el riesgo de contaminación, ya que los viales de reacción pueden sellarse inmediatamente después de proporcionar la muestra y, si es necesario, añadir agua.

30 Puede analizarse una variedad de muestras usando los métodos de la invención para preparar una muestra para análisis molecular. Tales muestras incluyen fluidos corporales, tales como sangre completa, saliva, esputo, orina, heces, líquidos peritoneales y pleurales; lavados tales como muestras broncoalveolares, nasales, cervicales e intestinales; muestras de aspiración o biopsia; cultivos celulares o cultivos microbiológicos. Los ejemplos específicos no limitantes incluyen muestras de sangre entera y saliva. Las muestras biológicas pueden ser también muestras tomadas de los alimentos o muestras ambientales. Además de las muestras biológicas complejas, el método de la presente invención es igualmente adecuado para la amplificación y el análisis de muestras pretratadas, muestras purificadas, por ejemplo muestras en las que el ADN y/o ARN ya ha sido extraído y después almacenado en matriz.

35 En una realización preferida, el método de la presente invención se lleva a cabo de la forma que sigue. La muestra biológica, tal como sangre completa, se proporciona seca en una lámina o varilla absorbente matriz, o bien, opcionalmente, es aplicada a tal matriz por el usuario, y se deja secar sobre la matriz. Después del secado, al menos una parte se transfiere al vial de reacción. Se añaden los reactivos de amplificación, que comprenden cebadores, nucleótidos, polimerasa y tampones necesarios, así como la mezcla de detección, que comprende nucleótidos o sondas marcadas directa o indirectamente, y opcionalmente etiquetas secundarias, o intercaladores. Después se sella el vial y se pasa a un ciclador térmico. El ADN de las muestras es liberado por un breve tratamiento térmico. La amplificación procede después del precalentamiento. Después de la amplificación, se detecta la presencia y/o la composición del ácido nucleico a través del sello en el vial sin eliminar la matriz o incluso sin abrir los viales sellados en ninguna etapa.

45 En otra forma de realización muy preferida, el método de la presente invención se lleva a cabo como un ensayo multi-vial. El método se realiza usando un kit que contiene reactivos secos para la amplificación y el análisis, así como una matriz absorbente, bien sea como un disco en el fondo de los viales, o bien como una malla al menos parcialmente rellenando los viales. La muestra a analizar se aplica, sin tratamiento previo, directamente sobre la matriz en el vial de reacción. Después se añade agua en los viales y los viales se sellan y se pasan a un ciclador térmico. El ADN de las muestras se libera mediante un breve tratamiento térmico. La amplificación procede después del precalentamiento. Después de la amplificación, se detecta la presencia y/o la composición del ácido nucleico a través del sello de los viales, sin eliminar la matriz. Un formato adecuado fácilmente disponible para un kit de acuerdo con la presente invención es, por ejemplo, una placa de pocillos múltiples.

55 Los ejemplos que siguen se dan para ilustrar con más detalle realizaciones preferidas de la presente invención, pero no se pretende que limiten el alcance de la invención. Será evidente para un experto en la técnica que, a medida que avanza la tecnología, el concepto de la invención puede llevarse a efecto de varias maneras. La invención y sus formas de realización no se limitan a los ejemplos descritos anteriormente sino que pueden variar dentro del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos.

60 **Ejemplo 1**

Liberación de ácidos nucleicos de discos de muestra secada.

Este ejemplo muestra cómo puede simplificarse la elución de discos de sangre y saliva secas recomendada por el fabricante. Se omite el prelavado recomendado y se muestra que la liberación de ácidos nucleicos se puede realizar efectivamente también a temperatura ambiente. La liberación está automatizada mediante el uso de placas de filtro y filtración automatizada.

En primer lugar, se recogió de un voluntario sangre entera y saliva. Las muestras se aplicaron sobre papel de recogida IsoCode® (Schleicher y Schuell) y se dejaron secar. Para el análisis, se perforaron ocho discos de 1,5 mm y los ácidos nucleicos se eluyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, es decir, pre-lavado con 500 µl de agua destilada seguido de incubación a +95 °C durante 30 min en 135 µl de agua destilada. Otros ocho discos fueron incubados sin prelavado a +95 °C durante 30 min. Después de la incubación, se analizó el sobrenadante. La liberación automatizada se demostró perforando un disco de 1,5 mm junto con 40 µl de agua destilada a un vial en una placa de filtración de 96 pocillos, y las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Después de la incubación, la placa de filtro se alineó con la placa de reacción y el sobrenadante se transfirió a la placa de reacción por presión desde la parte superior de la placa de filtro.

La reacción de amplificación PCR y de detección en tubo cerrado se realizó en un volumen total de 50 µl y la concentración final en la mezcla de reacción fue la siguiente: 1 x tampón DyNAzyme™ (Finnzymes), 0,2 mM dNTP, MgCl₂ 2,5 mM, cebador directo exón 10 CFTR 0,1 µM (5' AAG CAC AGT GGA AGA ATT TC 3'), cebador inverso exón 10 CFTR 0,1 µM (5' CTC TTC TAG TTG ACG TGC T 3'), 0,02 U/µl de enzima DyNAzyme™ (Finnzymes), sonda de oligonucleótidos específica de analito 20 nM (5' TAA AGA AAA TAT CAT CTT TGG TGT TTC CTA TAA 3') marcada en su extremo 5' con un quelato Tb W14054 fluorescente estable (Wallac) y 0,4 µM sonda de desactivación complementaria a la sonda Tb (5' ATG ATA TTT TCT TTA 3') marcada en su extremo 3' con B HQ1 (Biosearch Technologies), 10 µl de sobrenadante de la incubación a 95 °C, y como control 0,4 ng/µl de muestra de ADN genómico purificado a partir de la sangre entera de un voluntario. El sobrenadante de la liberación automática se analizó mediante la adición de 10 µl de la mezcla de reacción a la concentración final que se ha descrito anteriormente.

El programa de PCR fue como sigue: Pre calentamiento a +95 °C 1 min; 35 ciclos de lo que sigue +95 °C 30 s, descenso desde +95 °C a +84 °C 0,2 °C/s, descenso desde +84 °C a +56 °C 2,5 °C/s, +56 °C 1 min, +66 °C, 1 min y extensión final 7 min. Después de la amplificación, la reacción se incubó a +30 °C durante 5 min, después de lo cual la fluorescencia resuelta en el tiempo se midió con un contador Victor2 1420 Multilabel Counter (Wallac).

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 1 mediante la media y la desviación estándar de la fluorescencia Tb resuelta en el tiempo de cada reacción por duplicado. Los controles de PCR negativos y positivos se representan por las barras A y B, respectivamente. Cuando la liberación simplificada (D y E) se compara con la elución por la recomendación del fabricante (C), se ve claramente que el análisis se puede realizar con discos de sangre (barras negras) y saliva (barras grises) sin prelavado tanto a temperatura ambiente (D) como a +95 °C (E). El resultado de los sobrenadantes es también comparable a la cantidad estimada de ADN genómico por disco de sangre.

Ejemplo 2.**Análisis de ADN de sangre entera y saliva.**

Este ejemplo muestra cómo el pretratamiento de las muestras de sangre y saliva se puede simplificar para permitir una automatización simple. La muestra se recoge en la matriz de desnaturalización de proteína, y la liberación de ácidos nucleicos de la matriz, la amplificación y la detección se llevan todas a cabo en un vial de reacción único. Después de la liberación, se añaden los reactivos de amplificación y detección y el vial de reacción se sella, y después de la amplificación y la incubación analítica corta, se mide la fluorescencia sin abrir el vial de reacción, es decir, sin eliminar la matriz.

En primer lugar, se recogió sangre entera y saliva de dos voluntarios. Las muestras se aplicaron sobre papel de recogida IsoCode® (Schleicher y Schuell) y se dejaron secar. Para el análisis, fueron perforados un disco de sangre de 1,2 mm o dos discos de saliva de 1,2 mm y los ácidos nucleicos fueron liberados a temperatura ambiente durante 30 min en 40 µl de agua destilada. La liberación se llevó a cabo en viales de PCR y como referencia en microtubos separados. Después de la liberación, se añadió la mezcla de reacción PCR/detección en el vial de PCR que comprende el disco. Como referencia, se analizó el sobrenadante de 40 µl de los tubos separados.

La reacción de amplificación por PCR y detección en tubo cerrado se realizó en un volumen total de 50 µl. Se añadió en la PCR una porción de 10 µl de la siguiente mezcla de reacción PCR/detección: 5 x tampón DyNAzyme™ (Finnzymes), 1 mM dNTP's, MgCl₂ 12,5 mM, 1 µM CFTR exón 10 cebador directo (5' AAG CAC AGT GGA AGA ATT TC 3'), 0,25 µM CFTR exón 10 cebador inverso (5' TAG CTC TTC TTG ACG TGC T 3'), 0,1 U/µl de enzima DyNAzyme™ (Finnzymes), 83 nM sonda de oligonucleótidos específica de analito (5' ACC AAA GATGAT ATT TAA A 3') marcada en su extremo 5' con un quelato W8184 Eu fluorescente estable (Wallac) y sonda desactivadora 166 nM complemento a la sonda Eu (5' TCA TTG GTG TTT 3') marcada en su extremo 3' con BHQ1 (Biosearch

Technologies). Como control, se analizaron 20 ng/reacción de muestra de ADN genómico purificado procedente de sangre entera de un voluntario.

5 El programa de PCR fue como sigue: Pre-calentamiento 95 °C 1 min; 35 ciclos de siguientes + 95 °C 30 s, + 56 °C, 1 min + 66 °C 1 min, extensión final de 7 min y última desnaturalización 8 min. Después de la amplificación, la reacción se incubó a + 40 °C durante 20 min y a + 22 °C durante 15 min, tras lo cual la fluorescencia resuelta en el tiempo se midió con un contador Victor2 1420 Multilabel Counter (Wallac) directamente desde el vial sin abrir.

10 Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 2 por la media y la desviación estándar de la fluorescencia Eu resuelta en el tiempo de cada reacción por triplicado. Los controles de PCR negativos y positivos son representados por las barras A y B, respectivamente. C - D representan los resultados de la sangre y EF a partir de muestras de saliva obtenidas a partir de 2 voluntarios. Cuando la liberación integrada en el vial de reacción sin la retirada de la matriz en cualquier punto (barras rayadas) se compara con la liberación en un vial separado (barras grises), se ve claramente que todo el análisis puede realizarse con discos de sangre y saliva sin eliminación del disco. El resultado indica que la liberación de la matriz se puede realizar a temperatura ambiente en el vial de
15 reacción y después de la amplificación la detección se puede realizar sin la eliminación de la matriz permitiendo la automatización sencilla de análisis conjunto.

Ejemplo 3.

Análisis integrado de ADN de sangre entera y saliva.

20 Este ejemplo muestra cómo la liberación de ácidos nucleicos de la matriz se puede simplificar aún más para permitir la automatización simple. La muestra se recoge sobre la matriz de desnaturalización de proteína, y la liberación de ácidos nucleicos, amplificación y detección se llevan todas a cabo en un único vial de reacción, incluso en presencia de reactivos de amplificación y detección. Se añade la matriz que comprende la muestra, junto con los reactivos de amplificación/detección a un vial de reacción, el vial se sella y después de la amplificación y una corta incubación analítica, se mide la fluorescencia sin abrir el vial de reacción, es decir, sin eliminar la matriz.

25 En primer lugar, se recogió sangre entera y saliva de dos voluntarios. Las muestras se aplicaron sobre papel de recogida IsoCode® (Schleicher y Schuell) y se dejaron secar.

30 Para el análisis, fueron perforados un disco de sangre de 1,2 mm o dos discos de saliva de 1,2 mm en viales de PCR. La reacción de amplificación de PCR y detección en tubo cerrado se realizó en un volumen total de 50 µl en la siguiente mezcla de reacción de PCR/detección: 1 x tampón HotStarTaq® (Qiagen), dNTP's 0,2 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 0,05% de BSA, cebador directo exón 10 de CFTR 0,2 µM (5' AAG CAC AGT GGA AGA ATT TC 3'), cebador inverso exón 10 de CFTR 0,05 µM (5' CTC TTC TAG TTG ACG TGC T 3'), 0,02 U/µl de enzima DyNAzyme™ (Finnzymes), 17 nM sonda de oligonucleótido específico del analito (5' ACC AAA GAT GAT ATT TAA A 3') marcada en su extremo 5' con un quelato Eu W8184 fluorescente estable (Wallac) y sonda de desactivación 33 nM complemento a la sonda Eu (5' TCA TTG GTG TTT 3') marcada en su extremo 3' con BHQ1 (Biosearch Technologies). Como control, se
35 analizaron 20 ng/reacción de muestra de ADN genómico de un voluntario en el disco. Como referencia, se realizó la liberación de ácidos nucleicos a temperatura ambiente durante 30 min en 40 µl de agua destilada, y se analizó en PCR/detección en tubo cerrado después de la adición de una porción de 10 µl de mezcla de reacción como 5 x concentrado.

40 El programa de PCR fue como sigue: Pre calentamiento +95 °C 15 min; 35 ciclos de lo siguiente +95°C 30 s, +56 °C, 1 min, +66 °C 1 min, extensión final 7 min y desnaturalización final 8 min. Después de la amplificación, la reacción se incubó a +40 °C durante 20 min y a + 22 °C durante 15 min, después de lo cual la fluorescencia resuelta en el tiempo se midió con un contador Victor2 1420 Multilabel Counter (Wallac).

45 Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 3 mediante la media y la desviación estándar de la fluorescencia Eu resuelta en el tiempo de cada reacción por triplicado. Los controles de PCR negativos y positivos son representados por las barras A y B, respectivamente. C - D representan los resultados de las muestras de sangre y E - F de las muestras de saliva obtenidas de 2 voluntarios. Cuando la liberación en los reactivos de amplificación/detección (barras grises) se compara con la liberación en agua destilada (barras blancas), el resultado es casi igual con ambos métodos. El resultado indica que la liberación de la matriz se puede realizar incluso en la mezcla de amplificación /detección, y todo el proceso se puede realizar en un solo vial en un formato de tubo cerrado que permite la automatización simple de todo el análisis.
50

Ejemplo 4.

Pretratamiento de la muestra y análisis de ADN de sangre entera integrados.

55 Este ejemplo muestra cómo la matriz que comprende la muestra puede ser usada en el análisis inmediatamente después de la aplicación de la muestra que permite el desarrollo de dispositivos de amplificación/detección que comprenden la matriz en el vial de reacción. La muestra se aplica sobre la matriz absorbente desnaturalizante de

proteína en el vial de reacción, se añaden los reactivos de amplificación/detección, el vial se sella y, después de la amplificación y la incubación analítica breve, se mide la fluorescencia sin abrir el vial de reacción.

5 La reacción de amplificación con PCR y detección en tubo cerrado se realizó en un volumen total de 50 µl. En primer lugar, un disco de 1,2 mm del papel de recogida IsoCode® (Schleicher y Schuell) fue perforado en viales de PCR. A continuación, se aplicó en el vial una muestra de 0,35 µl de sangre entera de un voluntario. Después de varios momentos, se añadió una porción de 50 µl de mezcla de reacción PCR/detección (como sigue): 1 × tampón Phusion™ HF (Finnzymes), 0,2 mM dNTP's, MgCl₂ 2,5 mM, 0,02% de BSA, cebador directo exón 10 de CFTR 0,2 µM (5' AAG CAC AGT GGA AGA ATT TC 3'), cebador inverso exón 10 de CFTR 0,05 µM (5' CTC TTC TAG TTG ACG TGC T 3'), 0,02 U/µl de enzima DyNAzyme™ (Finnzymes), 17 nM sonda de oligonucleótido específica de analito (5' ACC AAA GAT GAT ATT TAA A 3') marcada en su extremo 5' con un quelato Eu W8184 fluorescente estable (Wallac) y 33 nM complemento de sonda de desactivación a la sonda Eu (5' TCA TTG GTG TTT 3') marcada en su extremo 3' con BHQ1 (Biosearch Technologies). Como control, se analizaron 20 ng/reacción de muestra de ADN genómico de un voluntario en disco.

15 El programa de PCR fue como sigue: Pre calentamiento 95 °C 15 min; 35 ciclos de siguiente + 95°C 30 s, +56 ° C, 1 min +66 °C 1 min, extensión final de 7 min y desnaturalización final 8 min. Después de la amplificación, la reacción se incubó a + 40 °C durante 20 min y a +22 °C durante 15 min, después de lo cual la fluorescencia resuelta en el tiempo se midió con un contador Victor2 1420 Multilabel Counter (Wallac).

20 Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 4 mediante la media y la desviación estándar de la fluorescencia Eu resuelta en el tiempo de cada reacción en 4 replicados. Los controles de PCR negativos y positivos se representan mediante las barras A y B, respectivamente. C - F representan los resultados de las muestras de sangre analizadas. La señal a partir del análisis que se ha llevado a cabo inmediatamente después de aplicar la muestra al vial de amplificación/detección que comprende la matriz (F) es igual a las que se han dejado secar durante 1, 2 y 16 h (C - E, respectivamente). El resultado muestra que todo el proceso se puede realizar en un solo vial evitando múltiples etapas de pre-tratamiento de la muestra a la detección permitiendo una automatización muy simple.

Ejemplo 5.

Análisis de ADN integrado de sangre entera usando reactivos secos.

30 Este ejemplo muestra la extrema simplificación del proceso de análisis de ácidos nucleicos desde el pretratamiento de la muestra hasta la detección. Los reactivos se secan en el vial de reacción, y la muestra se aplica en la matriz absorbente de desnaturalización de proteína en el vial, o bien la matriz que contiene la muestra se perfora en el vial junto con el agua. A continuación, el vial se sella y después de la amplificación y la incubación analítica corta se mide la fluorescencia sin abrir el vial.

35 En primer lugar, se dejó secar una porción de 12,5 µl de mezcla de reacción de amplificación/detección siguiente en el vial de reacción a temperatura ambiente durante 2 h: 4 x tampón Phusion™ HF (Finnzymes), dNTP 0,8 mM, MgCl₂ 10 mM, 0,08% de BSA, 0,8 µM cebador directo exón 10 de CFTR (5' AAG CAC AGT GGA AGA ATT TC 3'), 0,2 µM cebador inverso exón 10 de CFTR (5' CTC TTC TAG TTG ACG TGC T 3'), 0,08 U/µl de enzima DyNAzyme™ (Finnzymes), 66 nM de sonda de oligonucleótido específica de analito (5' ACC AAA GAT GAT ATT TAA A 3') marcada en su extremo 5' con un quelato Eu W8184 fluorescente estable (Wallac) y 133 nM sonda de desactivación complemento a la sonda Eu (5' TCA TTG GTG TTT 3') marcada en su extremo 3' con BHQ1 (Biosearch Technologies).

45 A continuación, el vial de reacción que comprende los reactivos secos se utilizó en la reacción de amplificación por PCR y detección en tubo cerrado en un volumen total de 50 µl. Un disco de sangre de 1,2 mm de la muestra recogida previamente del voluntario en IsoCode® (Schleicher y Schuell) fue perforado en el vial de reacción con dispensación simultánea de 50 µl de agua destilada. O se perforó un disco de 1,2 mm de papel de recogida IsoCode® (Schleicher & Schuell) en el vial y, a continuación, se aplicó al vial una muestra de 0,35 µl de sangre entera de un voluntario, y se añadieron 50 µl de agua destilada. También, el sobrenadante después de la liberación de los ácidos nucleicos en 50 µl de agua destilada en un vial separado a temperatura ambiente durante 30 min se utilizó como muestra en el análisis. Como control positivo, se analizaron 20 ng/reacción de una muestra de ADN genómico de un voluntario en disco.

50 El programa de PCR fue como sigue: Pre calentamiento +95 °C 15 min; 35 ciclos de siguiente +95°C 30 s, +56°C, 1 min, + 66 °C 1 min, extensión final 7 min y desnaturalización final 8 min. Después de la amplificación, la reacción se incubó a +40 °C durante 20 min y a + 22 °C durante 15 min, después de lo cual se midió la fluorescencia resuelta en el tiempo con un contador Victor2 1420 Multilabel Counter (Wallac).

55 Los resultados de este experimento se representan en la Figura 5 mediante la media y la desviación estándar de la fluorescencia Eu en tiempo resuelto de cada reacción en 4 replicados. Los controles de PCR negativos y positivos se representan mediante las barras A y B, respectivamente. C - E representan los resultados de las muestras de sangre obtenidas de 3 voluntarios, respectivamente. Cuando la liberación integrada en el vial de reacción (barras

5 rayadas) se compara con la liberación en un vial separado (barras grises), se observa claramente que el análisis completo puede realizarse usando reactivos secos, incluso sin eliminar el disco. Además, E indica que la matriz se puede integrar en el vial de reacción que comprende los reactivos secos, y la muestra se puede aplicar justo antes del análisis. El resultado indica que todo el proceso de pretratamiento de la muestra hasta la detección se puede realizar en un solo vial de reacción que comprende todos los reactivos secos permitiendo una automatización extraordinariamente simple.

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar un ácido nucleico diana en una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas de
 - 5 i) transferir una matriz absorbente a un vial de reacción;
 - ii) proporcionar una muestra biológica que contiene dichos ácidos nucleicos diana a dicha matriz absorbente, o aplicarla a la misma;
 - iii) proporcionar en dicho vial de reacción una mezcla de reactivos para amplificar dichos ácidos nucleicos;
 - iv) proporcionar en dicho vial de reacción una mezcla de reactivos de detección;
 - 10 v) sellar dicho vial de reacción;
 - vi) realizar una reacción de amplificación; y
 - vii) detectar los ácidos nucleicos amplificados usando transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, en donde dicha muestra biológica se proporciona sin previa extracción, lavado o elución de los ácidos nucleicos, y
 - 15 las etapas vi) y vii) se llevan a cabo en dicho vial sin eliminar dicha matriz del vial y en donde la etapa de detección se realiza en tubos cerrados, sin abrir los sellos.
2. El método según la reivindicación 1, en donde la muestra es proporcionada en la matriz absorbente, y al menos una porción de dicha matriz es transferida al vial junto con dicha muestra.
3. El método según la reivindicación 2, en donde la muestra se aplica en la matriz inmediatamente antes de transferir dicha matriz al vial de reacción, sin secado ni almacenamiento.
4. El método según la reivindicación 1, en donde la matriz se transfiere al vial de reacción antes de la etapa ii) y la muestra se aplica en dicha matriz contenida en dicho vial.
5. El método según las reivindicaciones 1 a 4, en donde la matriz es un material absorbente que no se une irreversiblemente a ácidos nucleicos.
- 25 6. El método según la reivindicación 5, en donde la matriz comprende un agente de unión de proteína y/o un agente desnaturante de la proteína.
7. El método según la reivindicación 5, en donde la matriz comprende un agente caotrópico.
8. El método según las reivindicaciones 1 - 7, en donde al menos parte de las mezclas de reactivos de amplificación y detección está contenida en el vial de reacción en forma seca, incluyendo dicho método otra etapa opcional más de adición de agua antes de la etapa v).
- 30 9. El método según las reivindicaciones 1 - 8, en donde la amplificación se realiza mediante PCR.
10. El método según las reivindicaciones 1 - 9, en donde la etapa de detección se realiza por hibridación de la muestra amplificada con una sonda marcada fluorescentemente.
11. Un kit para su uso en un método según las reivindicaciones 1 - 10, que comprende al menos un vial de reacción que comprende: una matriz absorbente; y una mezcla de reactivos para amplificar dichos ácido nucleicos; y una mezcla de reactivos de detección para detectar dichos ácidos nucleicos amplificados; en donde al menos parte de dichas mezclas de reactivos y detección se proporcionan en forma seca.
- 35 12. Un kit según la reivindicación 11, en donde todos los reactivos se proporcionan en forma seca en dicho vial de reacción.

40

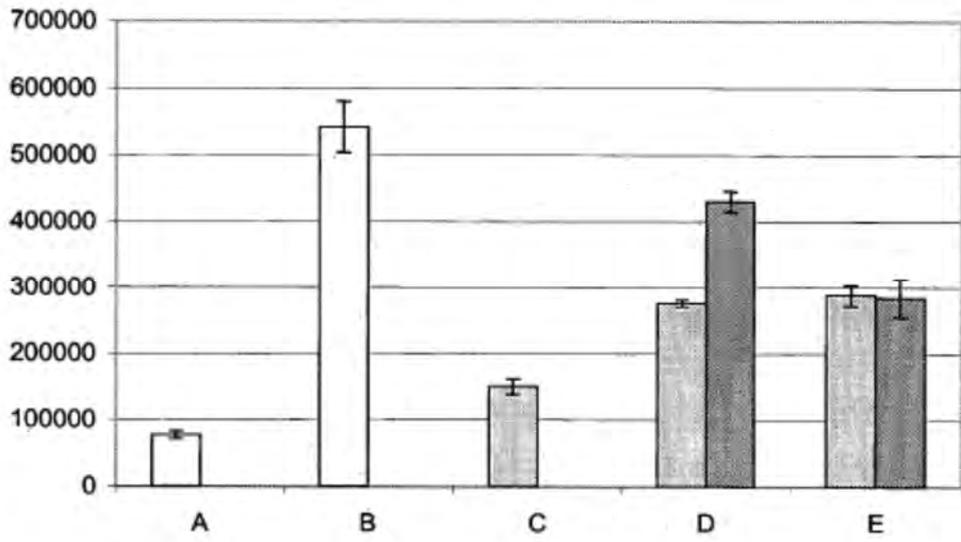


Fig. 1

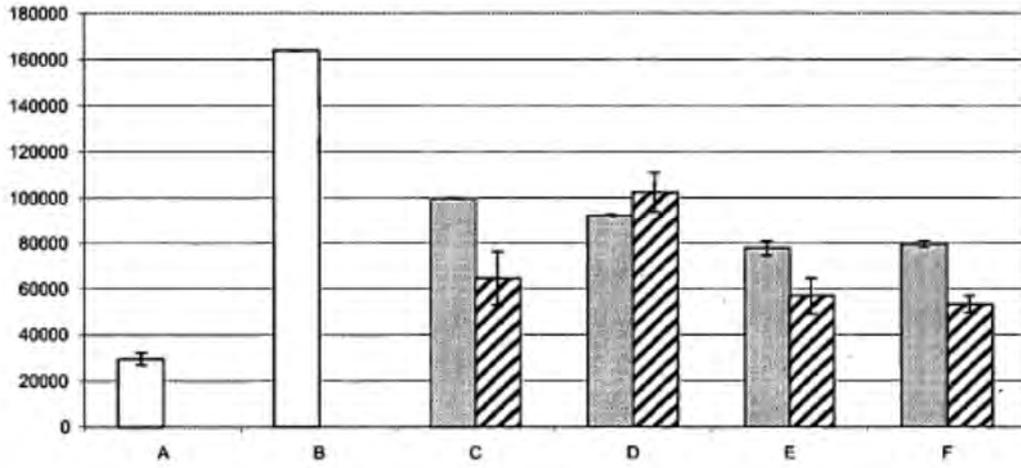


Fig. 2

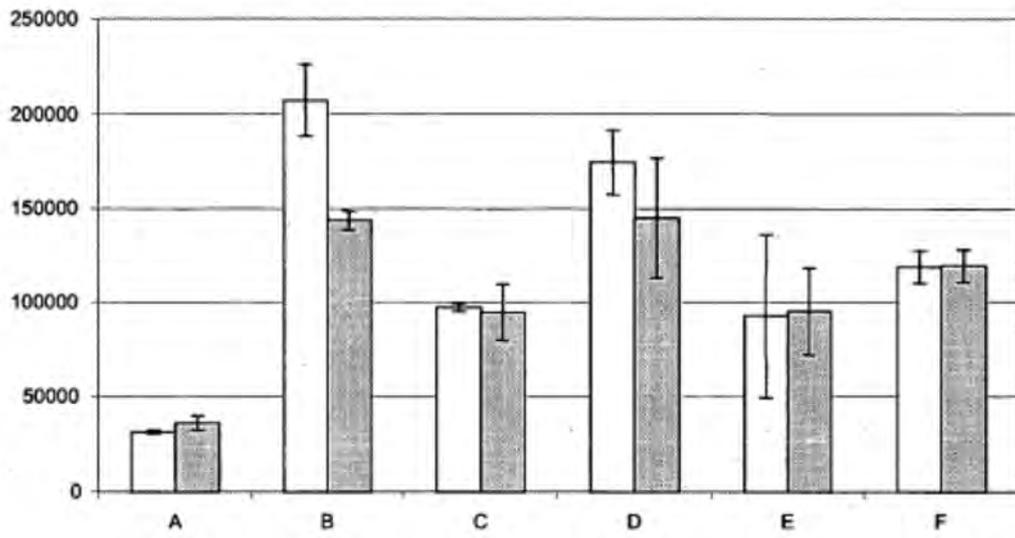


Fig. 3

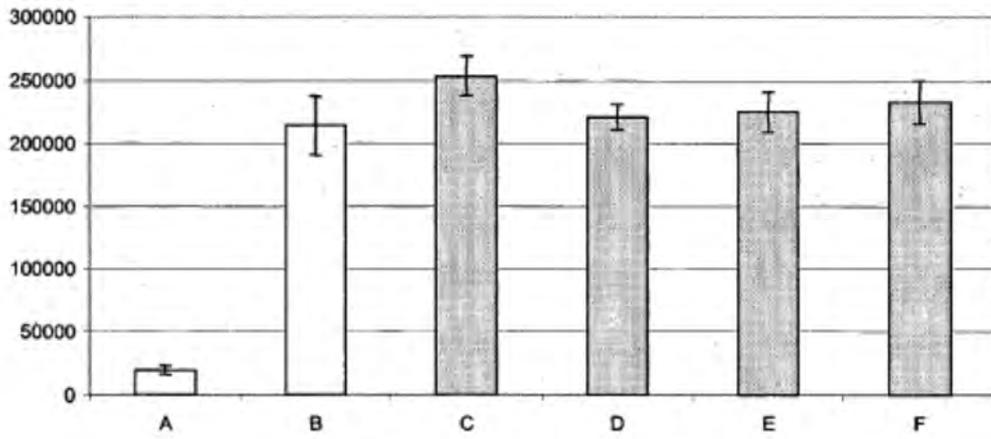


Fig. 4

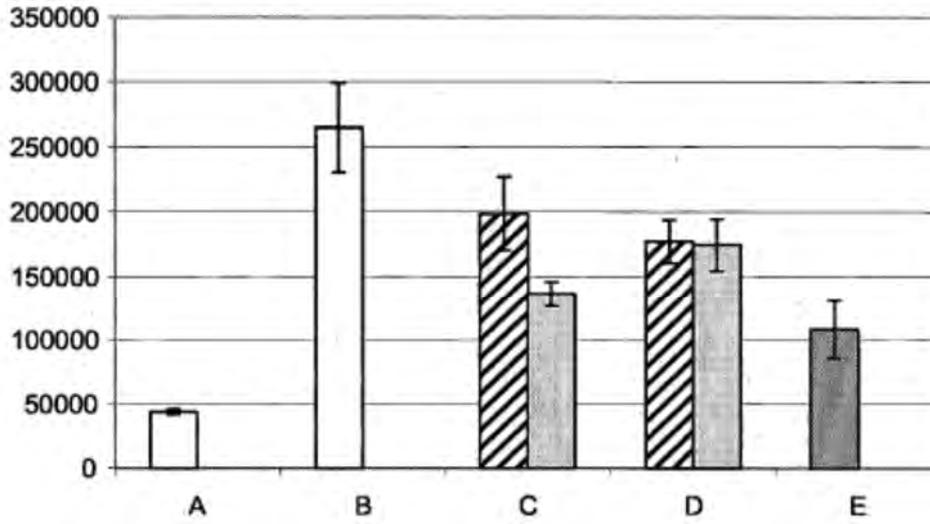


Fig. 5