

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 492**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

A61B 5/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.1999** **E 09155622 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016** **EP 2071037**

54 Título: **Recipiente para la extracción de sangre**

30 Prioridad:

12.08.1998 DE 19836559

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

09.12.2016

73 Titular/es:

**PREANALYTIX GMBH (100.0%)
Feldbachstrasse
8634 Hombrechtikon, CH**

72 Inventor/es:

HELFTENBEIN, ELKE

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 593 492 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Recipiente para la extracción de sangre.

- 5 La presente invención se refiere a un recipiente para la extracción de sangre, donde la sangre extraída se debe utilizar particularmente para la estabilización y analítica de ácidos nucleicos.

10 Durante la extracción, la sangre se recoge habitualmente en recipientes que ya contienen anticoagulantes como, por ejemplo, heparina, citrato o EDTA. De este modo se evita que la sangre coagule. Las muestras de sangre obtenidas de este modo se pueden almacenar durante un tiempo prolongado a temperaturas adecuadas. Sin embargo, esta forma de obtención de sangre tiene considerables desventajas cuando se deben analizar ácidos nucleicos como, por ejemplo, ARN(m) o ADN. Para tales propósitos, sería preferible que los ácidos nucleicos que están contenidos en la muestra se estabilicen en el mismo momento de la extracción, es decir, se debería evitar la degradación de los ácidos nucleicos presentes, así como la neosíntesis de ARNm.

15 Hasta ahora, este objetivo del almacenamiento estable de los ácidos nucleicos contenidos en el material de muestra desde el momento de la extracción, prácticamente no se puede realizar en el caso del almacenamiento de sangre por los siguientes motivos:

20 Las células contienen nucleasas, enzimas que destruyen los ácidos nucleicos, en cuanto se ponen en contacto con sus sustratos (ARN, ADN). Normalmente, la acción de nucleasas celulares y extracelulares está bajo control fisiológico, siempre que las células estén en su entorno normal. La extracción de sangre conduce a modificaciones más o menos intensas de los ácidos nucleicos contenidos en las células. Así, las nucleasas se liberan dentro de las células y/o hacia el exterior por la lisis de células. Además, los ácidos nucleicos se sintetizan con más o menos intensidad. Precisamente el almacenamiento de sangre a largo plazo conduce a envejecimiento y destrucción de las células.

25 Un problema adicional durante el almacenamiento a largo plazo de muestras de sangre que se han obtenido de acuerdo con métodos de extracción convencionales es la fuerte modificación del material de muestra. Tales modificaciones como, por ejemplo, la lisis intensa de células, pueden conducir a que los métodos convencionales del aislamiento de ácidos nucleicos ya no funcionen con eficacia satisfactoria.

30 Aparte de los problemas de un almacenamiento estable de ácidos nucleicos que están contenidos en el material de muestra, en los métodos convencionales de extracción de sangre se producen dificultades adicionales. Los anticoagulantes convencionales frecuentemente no se separan con una eficacia suficiente durante el aislamiento de ácidos nucleicos e interfieren durante la posterior analítica de ácidos nucleicos como, por ejemplo, durante la amplificación mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La heparina, por ejemplo, es un inhibidor comúnmente conocido de la PCR.

35 Finalmente, en la analítica cuantitativa de ácidos nucleicos se plantea la cuestión de cómo se puede controlar todo el método desde la toma de la muestra hasta la medición de ácido nucleico en condiciones normalizadas. De forma ideal, al material de muestra se debería añadir en el mismo momento de la extracción un ácido nucleico patrón definido en cuanto a la cantidad y calidad, que se somete a todo el proceso de la toma de la muestra y la determinación. Esto tampoco se puede realizar con los sistemas de extracción convencionales.

40 Una desventaja adicional de la extracción de sangre convencional es el riesgo de la transmisión de material infeccioso, ya que hasta ahora se necesitan etapas manuales en el método para el aislamiento de ácidos nucleicos. No se puede excluir un contacto con agentes patógenos potencialmente infecciosos.

45 En la bibliografía se describe un método, en el que la muestra de sangre se mezcla directamente después de la extracción del paciente con sal de guanidinio (documento EP 0 818 542 A1). En este método, la sal de guanidinio está presente en forma de polvo, para utilizar de este modo la mayor estabilidad de la sal de guanidinio. Sin embargo, este método posee serias desventajas, ya que la sal, por ejemplo, en primer lugar se tiene que disolver en la sangre añadida. El proceso de disolución es particularmente dependiente de la temperatura y no se puede controlar debido a la opacidad del material de muestra usado. Por tanto, el uso de un producto correspondiente para propósitos de diagnóstico-médicos es sumamente problemático.

50 Adicionalmente, las nucleasas son enzimas sumamente activas, que solamente se pueden inhibir en condiciones extremadamente desnaturizantes. La desnaturalización depende de la concentración de la sal de guanidinio en solución. Una concentración inhibitoria de sal de guanidinio en solución no se da desde el principio en el método citado. Por tanto, se produce una degradación incontrolada de ácidos nucleicos durante el proceso de disolución. Además, en este método se omite la adición de agentes reductores, sin los que no se garantiza una inhibición eficaz -particularmente de RNAsas (véase el Ejemplo Nº 5).

Además, la muestra producida de este modo no se puede usar directamente para el aislamiento adicional de ácidos nucleicos en superficies de vidrio. Además, el uso de polvo de sal de guanidinio no permite la adición de patrones internos de ácidos nucleicos. Tales patrones son imprescindibles para el control del método y la cuantificación precisa.

- 5 El uso de una solución que contiene isotiocianato de guanidinio 8 M, sarkosyl al 1% y citrato sódico 50 mM para el aislamiento de ARN para la detección de virus Junín en muestras de sangre se describe en Lozano et al. (Virus Research 27(1993): 37-53). Sin embargo, ese documento no trata de la estabilización de los ácidos nucleicos de la muestra de sangre en sí, sino de la estabilización del ARN vírico posiblemente presente. El uso de una solución de tiocianato de guanidinio para la desnaturalización de proteínas de muestras tisulares se describe en MacDonald et al. (Methods in Enzymology 152(1987): 219-227), en el cual no se hace referencia a la estabilización a largo plazo de ácidos nucleicos en general ni a muestras de sangre en particular.

10 La presente invención se basa en el problema técnico de proporcionar un recipiente para la extracción de sangre, que no presente las desventajas del estado de la técnica. Particularmente, la muestra extraída con el recipiente se debe poder suministrar directamente a los métodos comunes de análisis de ácidos nucleicos, sin tener que realizar etapas adicionales de preparación de la muestra.

15 Este problema se resuelve de acuerdo con la invención mediante un recipiente para la extracción de sangre que tiene una cámara evacuada (en inglés "evacuated chamber"), el recipiente conteniendo una solución acuosa con los siguientes componentes:

- una sal de guanidinio;
- 20 - una sustancia tampón; y
- un detergente.

El recipiente de acuerdo con la invención posee las siguientes ventajas: 1. La sangre se lisa en el mismo momento de la extracción, debido a que el recipiente de extracción ya contiene una sustancia estabilizante de ácidos nucleicos en solución. 2. La sustancia estabilizante de ácidos nucleicos está compuesta de tal forma, que el material de muestra, particularmente los ácidos nucleicos contenidos en la misma, se estabilizan directamente después del contacto con la solución. 3. La muestra estabilizada, al contrario que todos los sistemas de extracción habituales hasta ahora como recipientes de extracción que contienen EDTA o heparina, ya no se tiene que seguir manipulando como material infeccioso. 4. La sustancia estabilizante de ácidos nucleicos está compuesta de tal forma, que el material de muestra se puede usar directamente en los métodos de aislamiento posteriores. 5. La sustancia estabilizante de ácidos nucleicos se puede separar durante el aislamiento posterior de forma tan eficaz, que no tiene lugar ninguna inhibición de la PCR. 6. A la sustancia estabilizante de ácidos nucleicos se puede añadir un patrón interno. Este permite el control de todo el método desde la extracción de la muestra hasta la detección de ácidos nucleicos.

El recipiente de extracción que se ha mencionado en el punto 1 consiste en un recipiente de extracción de sangre (tubo) convencional, en el que se pone un volumen definido de una sustancia estabilizante de ácidos nucleicos. A continuación, se proporciona al tubo un vacío parcial definido, que garantiza que durante la extracción solamente pueda entrar un volumen determinado de sangre. El tubo se puede manipular con métodos convencionales de extracción de sangre. En una realización preferida especial la solución contenida en el tubo contiene los siguientes reactivos: tiocianato de guanidinio, Triton-X-100, ditioneitol y un sistema tampón adecuado como, por ejemplo, citrato, Tris o Hepes. En la composición descrita, la solución es compatible con el tubo de vacío. Esta solución se puede almacenar sin problemas en el tubo de vacío, sin que se produzca una alteración de la función estabilizante deseada. Todo el sistema es particularmente sencillo para el donante de sangre y seguro durante la toma de la muestra.

La solución, que contiene la sal de guanidinio, la sustancia tampón, el agente reductor y/o el detergente es estable en almacenamiento y transforma la sangre suministrada, recién extraída en un material que también es estable en almacenamiento y que se puede suministrar directamente a los kits comunes de análisis de ácidos nucleicos (como, por ejemplo, de Roche o Qiagen).

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

Preferiblemente, la sal de guanidinio está presente en una concentración de 2,0 a 8,0 M. Como sustancia tampón se prefiere Tris o citrato, ajustándose el pH exacto preferiblemente con HCl. Sin embargo, otros tampones posibles son HEPES, MOPS, tampón citrato y fosfato como, por ejemplo, PBS.

La concentración de tampón está preferiblemente entre 10 y 300 mM, más preferiblemente entre 10 y 100 mM.

Como detergente se prefiere Triton-X-100. Son posibles detergentes adicionales NP-40, Tween 20, polidocanol u otros detergentes.

55 La concentración de detergente es preferiblemente del 5 al 30% (p/v), más preferiblemente del 10 al 20% (p/v).

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

La concentración preferida del agente reductor es del 0,1 al 10% (p/v); se prefiere particularmente del 0,5 al 2% (p/v).

5 El pH de la solución es preferiblemente de 3,0 a 9,0, más preferiblemente de 4,0 a 7,5, más preferiblemente de 5 a 6. El pH de la solución se selecciona particularmente de tal forma, que después de la adición del material de muestra se ajusta un valor de pH en el intervalo de 5,0 a 7,6. Se prefiere particularmente un pH entre 6,3 y 6,9 (véase el Ejemplo N° 8) Una solución particularmente preferida contiene preferiblemente tiocianato de guanidinio 4 M, Tris/HCl 45 mM, Triton-X-100 al 18, preferiblemente al 15%, (p/v), DTT al 0,8% (p/v) y posee un pH de 6,0.

10 El volumen para la recogida de la muestra de sangre presenta un vacío parcial, el cual se puede ajustar de tal forma que se succiona un volumen de sangre determinado de antemano al interior del recipiente después de que se haya realizado la punción de un vaso sanguíneo. En el mercado están disponibles los correspondientes recipientes de evacuación.

15 El recipiente, que contiene la sangre extraída, se puede suministrar inmediatamente después a la analítica posterior o se puede almacenar durante un periodo de tiempo prolongado (hasta varios días) sin desventajas para la calidad de la muestra.

20 En el método de acuerdo con la invención, la sangre recién extraída se pone en contacto directamente con la solución que se ha descrito anteriormente en el recipiente de extracción de sangre, de tal forma que se detienen inmediatamente todos los procesos que pueden modificar el perfil de ácidos nucleicos de la muestra. Por tanto, los datos determinados posteriormente con respecto a los ácidos nucleicos analizados representan de forma muy precisa el estado real en el momento de la extracción de sangre, tanto con respecto a las cantidades como a los tipos de los ácidos nucleicos.

25 Preferiblemente, la cantidad de sangre extraída es de 0,1 a 4 veces la solución presentada en el recipiente. La última comprende preferiblemente de 0,5 a 5,0 ml. Por tanto, la concentración final de sal de guanidinio después de la adición de sangre es de 1,0 a 5 M, preferiblemente de 1 a 3 M, particularmente se prefiere 2-3 M (véase el Ejemplo 7).

El recipiente de acuerdo con la invención se utiliza preferiblemente para la extracción de sangre cuando la muestra de sangre se debe usar para la analítica de ácidos nucleicos.

30 El uso de la solución que se ha mencionado anteriormente como componente del sistema de extracción que se ha descrito garantiza por sí solo la lisis inmediata de las células y la estabilización simultánea de la muestra por inactivación directa de las nucleasas. Sorprendentemente, la muestra de sangre obtenida de este modo se puede almacenar incluso a temperatura ambiente o superior a lo largo de varios días. Además, el sistema de extracción garantiza una manipulación segura en cuanto a la contaminación y no infecciosa desde la toma de la muestra pasando por el aislamiento de ácidos nucleicos hasta la analítica. En el método convencional del aislamiento de ácidos nucleicos siempre se necesitan hasta el momento etapas adicionales de manipulación (como la transferencia de la muestra de sangre extraída a los reactivos para el aislamiento de ácidos nucleicos, etc.), que están asociadas con un riesgo adicional de infección.

40 La muestra obtenida con el sistema de extracción de sangre es compatible con todos los métodos convencionales comunes de aislamiento de ácidos nucleicos. Se tienen que resaltar en este contexto particularmente métodos que se basan en la unión de ácidos nucleicos a superficies de vidrio, pero también métodos de extracción basados en disolventes y en la unión específica de secuencias a ácidos nucleicos complementarios.

45 Por tanto, la invención que se ha descrito consiste en un sistema de extracción de sangre que está concebido de tal forma que se cumplen las siguientes condiciones: 1. Extracción controlada de la muestra y estabilización simultánea de los ácidos nucleicos (ADN, ARN) contenidos en el material de muestra. 2. Extracción de la muestra, en la que se puede omitir completamente la utilización de anticoagulantes. 3. La muestra obtenida con el sistema de extracción de sangre que se ha descrito se puede utilizar de forma universal en todos los sistemas conocidos de aislamiento de ácidos nucleicos. 4. El sistema de extracción de sangre es estable en almacenamiento.

50 Adicionalmente se ha comprobado sorprendentemente que la muestra obtenida con el sistema de extracción que se ha descrito se puede almacenar en el recipiente a lo largo de un tiempo prolongado sin degradación de los ácidos nucleicos (véase los Ejemplos 2, 3, 7, 8).

Los siguientes ejemplos explican la invención.

Ejemplo 1:

5 El sistema de extracción de sangre puede estar compuesto del siguiente modo en una realización preferida (véase la Figura 1): un tubo se llena con un volumen definido de la sustancia estabilizante de ácidos nucleicos, se proporciona al mismo un vacío definido y se cierra con un septo. El septo está construido de tal forma que es compatible con los accesorios comunes para extracción de muestras (cánula, etc.). En el presente ejemplo se prepararon 2,2 ml de reactivo y el vacío estaba ajustado de tal forma, que durante la toma de la muestra pudieron entrar exactamente 2,2 ml de sangre. Los ácidos nucleicos contenidos en la corriente de sangre entrante se transfirieron directamente en forma estable.

10 Observación general con respecto a los ejemplos siguientes.

En todos los ejemplos descritos a continuación, la sustancia estabilizante de ácidos nucleicos (N-sS), a menos que se indique de otro modo, tenía la siguiente composición: Tris 45 mM, tiocianato de guanidinio (GTC) 5 M, ditioneitol (DTT) al 0,8% (p/v), Triton-X-100 al 18% (p/v), pH 6,0.

15 En todos los ejemplos descritos, la sustancia estabilizante de ácido nucleico, a menos que se indique de otro modo, se mezcló con la muestra con la proporción de 1 a 1 (1 volumen de N-sS más 1 volumen de material de muestra). Una concentración inferior de N-sS, por ejemplo, 1 volumen de N-sS más 5 volúmenes de muestra, podría conducir a degradación de ARN.

Para todos los ejemplos, la sangre se estabilizó añadiendo la misma directamente durante la extracción al tubo mezclado con N-sS.

20

Ejemplo 2:

Estabilidad de ácidos nucleicos después de mezcla de material de muestra y N-sS.

Aislamiento de ARN y ADN del lisado de muestra con superficies derivatizadas con sílice.

25

Materiales y Métodos:

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

30 Para el aislamiento de ARN (Figura 2) se usó el Kit de Aislamiento de ARN HighPure (Boehringer Mannheim, N° de Cat. 1828 665). Las instrucciones del prospecto se modificaron del siguiente modo: un volumen de 2,4 ml de lisado de muestra se aplicó en 4 alícuotas de 600 µl cada una sobre la columna, de tal forma que se aplicó un total de material de muestra de 2,4 ml de lisado. Todas las demás etapas se realizaron de acuerdo con el prospecto. El ARN se eluyó finalmente con 100 µl de tampón de elución.

35 Para el aislamiento de ADN (Figura 3) se utilizó el Kit de Sangre QiaAmp (Qiagen N° de Cat. 29104). El procedimiento convencional descrito en el prospecto se modificó en diferentes puntos: se pusieron 400 µl de volumen de muestra directamente sobre la columna, donde no se utilizó el reactivo de unión contenido en el kit. Se añadieron 25 µl de solución madre de proteinasa K y la muestra se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Después, la columna se puso en un recipiente de recogida y se centrifugó como se describe en el prospecto. Todas las demás etapas se realizaron, a excepción del uso de etanol, como se describe en el prospecto. El volumen de elución fue 200 µl.

40

Ejemplo 3:

45 Aislamiento de ARNm de lisado de muestra mediante el uso de partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina y oligo(dT) marcado con biotina (Figura 4):

Materiales y Métodos:

Se pusieron 20 ml de lisado de muestra en un recipiente. El ARNm se aisló de acuerdo con el siguiente método: en primer lugar se añadieron 30 ml de tampón de hibridación (Tris-HCl 20 mM, NaCl 300 mM, oligo(dT) marcado con biotina 6 nM, pH 7,4) al lisado. Después se añadieron 3 mg de partículas magnéticas con estreptavidina (Boehringer Mannheim). La muestra se mezcló y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Las partículas magnéticas se separaron con ayuda de un imán, el sobrenadante se desechó. Después, las partículas se resuspendieron en tampón de lavado 1 (Tris-HCl 10 mM, NaCl 200 mM, Triton-X-100 al 1%, pH 7,5) y se lavaron 3 veces con tampón de lavado 2 (Tris-HCl 10 mM, NaCl 200 mM, pH 7,5) (etapas de lavado: resuspensión, separación magnética, eliminación del sobrenadante). Después de la última etapa de lavado se retiró completamente el sobrenadante y las partículas se resuspendieron en 20 µl de agua destilada. La muestra se calentó durante 5 min a 70°C. Las partículas magnéticas se separaron y el sobrenadante, que contenía el ARNm, se analizó mediante electroforesis en gel.

Ejemplo 4:

Aislamiento del ADN y ARN mediante el uso de un documento modificado de acuerdo con Chomczynski y Sacchi (Analytical Biochemistry 162, 156-159 (1987)) (Ejemplo de un método basado en extracción con disolvente) (Figura 5):

Materiales y Métodos:

Se transfirieron 2 ml de volumen de muestra desde el recipiente de extracción de sangre a un tubo. Después, se añadieron 0,2 ml de una solución de acetato sódico 2 M, pH 4, 2 ml de fenol (saturado con agua) y 0,4 ml de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), donde después de la adición de cada solución se mezcló la muestra cuidadosamente. La solución completa se agitó intensamente durante 10 segundos y se incubó durante 15 minutos en hielo. La muestra se centrifugó durante 20 minutos a 4°C con 10000 g. Después de la centrifugación, el ARN estaba en la fase acuosa, el ADN y las proteínas, en la interfase y la fase fenólica. La fase acuosa se transfirió a un nuevo recipiente y se mezcló con un 1 ml de isopropanol. Para la precipitación del ARN se almacenó la muestra durante 1 hora a -20°C. Después de una nueva centrifugación a 4°C con 10000 g, el ARN estaba en el sedimento. Éste se recogió en 0,3 ml de tampón (tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM, pH 7,0, sarkosyl al 0,5% 2-mercaptoisopropanol 0,1 M), se transfirió a un nuevo recipiente Eppendorf de 1,5 ml y se mezcló con 1 volumen de isopropanol. Después de 1 hora de incubación a -20°C, la solución se centrifugó en una centrífuga Eppendorf durante 10 minutos a 4°C. El sedimento de ARN se recogió en etanol al 75% y se concentró por centrifugación (Speed vac) y se secó. Para procesamientos posteriores se disolvió la muestra en 100 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 6,5.

Ejemplo 5:

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

Materiales y Métodos:

Solución de estabilización usada: GTC 4,0 M; Triton X100 al 13,5%, Tris/HCl 45 mM; con o sin DTT 120 mM. Se mezclaron 700 µl de suero con 700 µl de solución de estabilización. Después de 2 min de incubación se añadieron 20 µl de ARN de MS2 (0,8 µg/µl de Roche). Las muestras se incubaron durante 180 min a 40°C y a continuación se prepararon en alícuotas de 400 µl con el Kit de ARN total High Pure de Roche. Las muestras se añadieron a la columna en un paso sin adición del reactivo de unión del kit y se centrifugaron de acuerdo con las instrucciones. Las siguientes etapas de lavado y la elución del ARN en 50 µl de tampón de elución se realizaron de acuerdo con las instrucciones. La analítica se realizó mediante gel de agarosa (véase la Figura 6).

Resultado: sin la adición de reactivos reductores a la solución de estabilización no se puede conseguir ninguna estabilización a largo plazo de ARN.

Ejemplo 6:

Estabilidad de ARN de MS2 libre en suero. Cinética de la degradación de ARN por componentes de la muestra.

5 **Materiales y Métodos**

Se realizaron adiciones puntuales de 10 µl de ARN de MS2 (0,8 µg/µl de Roche) a 250 µl de suero y se incubaron a temperatura ambiente. Inmediatamente después de la adición del ARN, después de 2 min a 50 min se detuvo la degradación natural del ARN en suero por adición de 250 µl de solución de estabilización. Todas las mezclas se realizaron como determinación por duplicado. Como patrón, una muestra se mezcló con ARN de MS2 solamente después de la adición de la solución de estabilización al suero y se procesó en paralelo. Todas las muestras se procesaron en paralelo con el Kit de ARN vírico High Pure de Roche. Las muestras se pusieron en una etapa sin adición del reactivo de unión del kit sobre la columna y se centrifugaron de acuerdo con las instrucciones. Las siguientes etapas de lavado y la elución del ARN en 50 µl de tampón de elución se realizaron de acuerdo con las instrucciones. 20 µl del eluato se separaron mediante un gel de agarosa nativo al 1,2% y se analizaron (véase la Figura 7).

Resultado: el ARN de MS2 no es estable en suero. Incluso dos minutos después de la adición de ARN a suero, el mismo se ha degradado completamente. Por la adición de solución de estabilización al suero con la proporción 1:1 se puede detener inmediatamente este proceso y se puede conseguir una estabilización del ARN en el momento de la adición de la solución de estabilización (= extracción de sangre).

Ejemplo 7:

Estabilidad de ARN de MS2 en suero/solución de estabilización: dependencia de la concentración de GTC

25

Materiales y Métodos:

Soluciones de estabilización usadas: GTC 3-5 M; Triton X100 al 13,5%; DTT 50 mM; Tris/HCl 42 mM

pH de las soluciones: aproximadamente 4,0

30 pH de las soluciones después de adición de suero: aproximadamente 6,7.

2 ml de suero se mezclaron con 2,5 ml de las respectivas soluciones de estabilización. Después de un tiempo de incubación de 2-5 min se añadieron 90 µl de ARN de MS2 (0,8 µg/µl de Roche) y se incubaron a 40°C. A intervalos regulares se extrajeron 400 µl de muestra y se prepararon con el Kit de ARN total High Pure de Roche de forma correspondiente al Ejemplo 5. Las muestras se eluyeron en 50 µl y se congelaron a -20°C. Para el análisis de la integridad del ARN se aplicaron 20 µl del eluato sobre un gel de agarosa al 1,5% (véase la Figura 8). Para el análisis por PCR de las muestras, 10 µl del eluato se sometieron a transcripción inversa mediante AMV-RT (Roche) y a continuación se analizaron mediante PCR en el Lightcycler:

| | | |
|--------------------|--------|---|
| Mezcla para RT: | 4,0 µl | tampón para AMV-RT |
| (42°C durante 1 h) | 2,0 µl | dNTP (concentración final 10 mM) |
| | 0,5 µl | inhibidor de RNasa (Roche, 20 unidades) |
| | 1,0 µl | cebador 2827 (concentración final 1 µM) |
| | 1,9 µl | DMPC-agua |
| | 0,6 µl | AMV-RT (Roche, 15 unidades) |
| | 10 µl | ARN molde |
| | 20 µl | |

ES 2 593 492 T3

La PCR se realizó en el Lightcycler a una temperatura de hibridación de 61°C mediante el uso de SYBR-Green como sistema de detección. Mezcla para PCR:

| | |
|---------|--|
| 1,6 µl | MgCl ₂ (solución madre 25 mM) |
| 5,9 µl | DMPC-agua |
| 0,25 µl | cebador 2827 (solución madre 20 mM) |
| 0,25 µl | cebador 2335 (solución madre 20 mM) |
| 1,0 µl | mezcla madre SYBR-Green (Roche) |
| 1,0 µl | mezcla de RT (diluida 1:50) |
| 10 µl | |

El producto de amplificación de la PCR se aplicó completamente sobre un gel de agarosa al 2% (véase la Figura 9).

Resultado:

5 Integridad del ARN después de 3 días a 40°C:

El gel de agarosa en la Figura 8 muestra 20 µl del ARN de MS2 eluido después de 3 días de incubación a 40°C. Después de este periodo de tiempo se pueden observar, dependiendo del contenido de GTC, claras diferencias en la integridad del ARN. De acuerdo con esto, para la integridad del ARN es ventajoso un contenido de sal inferior a 2 M en el suero/solución de estabilización.

10 Capacidad de amplificación del ARN después de 8 días a 40°C:

A pesar de que incluso después de 3 días a 40°C se pudo comprobar una degradación incipiente del ARN, todas las muestras de ARN se pudieron amplificar después de una incubación de 8 días a 40°C y se pudieron comprobar claramente. El producto de amplificación de la PCR se aplicó completamente sobre un gel de agarosa al 2% (véase la Figura 9).

15

Ejemplo 8:

Estabilidad de ARN de MS2 en suero/solución de estabilización: dependencia del valor de pH de la muestra mezclada con solución de estabilización.

20 Materiales y Métodos

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

pH después de adición de suero entre 6,7 y 8,0

25 2,5 ml de solución de estabilización se mezclaron con 2,0 ml de suero. Después de adición de 90 µl de ARN de MS2 (0,8 µg/ml, Roche), las muestras se incubaron a temperatura ambiente. A intervalos regulares se preparó el ARN de 500 µl de muestra con el Kit de ARN vírico de Roche de forma correspondiente al Ejemplo 6 y se aisló en 50 µl de tampón de elución. Se analizaron 20 µl del eluato mediante gel de agarosa (véase la Figura 10).

Resultado:

30 El pH del suero/solución de estabilización y, por tanto, también el pH y el intervalo de tampón de la solución de estabilización, es decisivo para la estabilización a largo plazo de ARN. Mientras que con un valor de pH de 8,0 ya no se pudo comprobar ningún ARN intacto incluso después de 2 días, en un intervalo de pH entre 6,6 y 7,0 todavía se puede comprobar ARN intacto después de 13 días de incubación a temperatura ambiente. Sin embargo, además el valor de pH también es importante una concentración de GTC ajustada óptimamente para la estabilización a largo plazo de ARN (véase también el Ejemplo 7). El ejemplo representado ilustra que para una estabilización a largo de plazo de ARN es mejor una concentración final de GTC en la muestra estabilizada de GTC 2,2 M que 2,78.

35

Leyendas

Fig. 1:

Recipiente de extracción de muestra con N-sS, vacío definido, sellado con septo.

5

Fig. 2:

Análisis en gel (agarosa al 1%) de ARN que se almacenó durante diferente tiempo en el recipiente de extracción de muestra. Columna 1: aislamiento directamente después de extracción de la muestra (ningún almacenamiento), columna 2: almacenamiento durante un mes a -20°C, columna 3: almacenamiento durante 6 días a 4°C. La cantidad del ARN aplicado se correspondía a un volumen de sangre de 120 µl.

10

Fig 3:

Análisis en gel (agarosa al 1%) de ADN que se almacenó durante diferente tiempo en el recipiente de extracción de muestra. Columna 1: aislamiento directamente después de extracción de la muestra (ningún almacenamiento), columna 2: almacenamiento durante un mes a -20°C, columna 3: almacenamiento durante 6 días a 4°C. La cantidad del ADN aplicado se correspondía a un volumen de sangre de 10 µl.

15

Fig. 4:

Análisis en gel (agarosa al 1%) de ARNm que se aisló de 10 ml de sangre (columna 2). Marcador de peso molecular (columna 1). Adicionalmente al ARNm son visibles las bandas de ARNr. Los contornos definidos de las bandas demuestran la integridad de los ácidos nucleicos.

20

Fig. 5:

Análisis en gel (agarosa al 1%) del ARN que se aisló de 120 µl de sangre.

25

Fig. 6:

Análisis en gel de ARN de MS2 aislado después de incubación en suero/solución de estabilización con/sin DTT durante 180 min a 40°C.

30

Columna 1: control positivo: ARN de MS2, columna 2: marcador de ADN, columna 3, 4, 5: ARN de MS2 después de incubación con solución de estabilización que contiene DTT, columna 6, 7, 8: ARN de MS2 después de incubación con solución de estabilización sin DTT

Fig. 7:

Análisis en gel de ARN de MS2 aislado después de incubación en suero durante 0-50 min

35

Columna 10, 17: patrón de ARN de MS2, columna 9, 16: marcador de ADN, columna 7, 8: incubación durante 0 min, columna 5, 6: incubación durante 2 min, columna 3, 4: incubación durante 5 min, columna 1, 2: incubación durante 10 min, columna 11, 12: incubación durante 15 min, columna 13, 14: incubación durante 30 min, columna 15: incubación durante 50 min

40

Fig. 8:

Análisis en gel de ARN de MS2 que se aisló después de incubación en suero/solución de estabilización durante 3 días a 40°C. El contenido de GTC de la solución de estabilización después de la adición de suero, en la que se incubó la respectiva muestra de ARN, se indica en la correspondiente columna.

45

Columna 1: GTC 2,70 M, columna 2: GTC 2,5 Método, columna 3: GTC 2,36 M, columna 4: GTC 2,20 M, columna 5: GTC 2,08 M, columna 6: GTC 1,94 M, columna 7: GTC 1,80 M, columna 8: GTC 1,66 M.

Fig. 9:

Análisis en gel de los productos de amplificación de PCR de ARN de MS2, que se aisló después de 1 u 8 días de incubación a 40°C en suero/solución de estabilización.

- 5 Columna **1**: producto de amplificación del ARN aislado después de 1 día, columna **2**: producto de amplificación del ARN aislado después de 8 días, columna **3**: marcador de ADN, columna **4**: control positivo de ARN de MS2: 0,8 µg en 10 µl de RT; diluido 1:50, 1 µl amplificado

Fig. 10:

- 10 Análisis en gel de ARN de MS2 aislado después de 6 (columna **2-12**) o 13 (columna **14-19**) días de incubación a temperatura ambiente en suero/solución de estabilización. Detrás de las columnas correspondientes se indica el valor de pH que se consiguió después de la mezcla de suero y solución de estabilización.

- 15 Columna **1, 13, 20**: marcador de ADN, columna **2**: pH 8,0, columna **3**: pH 7,7, columna **4**:pH 7,5, columna **5**:pH 7,35, columna **6**: pH 7,18, columna **7, 14**:pH 7,07, columna **8, 15**: pH 6,94, columna **9, 16**: pH 6,8, columna **10, 17**: pH 6,72, columna **11, 18**: pH 6,68 y columna **12, 19**: pH 6,7 La solución de estabilización del ARN en la columna **12, 19** tenía el mismo valor de pH que la del ARN en la columna **11**, sin embargo, contenía GTC 5 M en vez de 4 M.

REIVINDICACIONES

1. Recipiente para la extracción de sangre que tiene una cámara evacuada que se proporciona para recibir sangre, conteniendo el recipiente una solución acuosa con los siguientes componentes:
- 5 - una sal de guanidinio;
 - un agente tampón; y
 - un detergente.
2. Recipiente de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la sal de guanidinio se selecciona de tiocianato de guanidinio y cloruro de guanidinio.
- 10
3. Recipiente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque la sal de guanidinio está presente en una concentración de 1 a 8,0 M, preferiblemente de 2,5 a 8,0 M.
4. Recipiente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el agente tampón se selecciona de Tris, HEPES, MOPS, tampón citrato y tampón fosfato.
- 15
5. Recipiente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el agente tampón está presente en una concentración de 10 a 300 mM.
- 20
6. Recipiente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el detergente se selecciona de Triton-X-100[®], NP-40[®], polidocanol y Tween 20[®].
7. Recipiente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el detergente está presente en una concentración del 5 al 30% (p/p).
- 25
8. Recipiente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque comprende un agente reductor.
9. Recipiente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el agente reductor se selecciona de ditiotreitol, 3-mercaptoetanol y TCEP.
- 30
10. Recipiente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el agente reductor está presente en una concentración del 0,1 al 10,0% (p/p).
11. Recipiente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el pH de la solución está entre 4,0 y 7,5, o entre 4,0 y 6,5.
- 35
12. Recipiente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque comprende sangre recogida.
- 40
13. Recipiente de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque la sangre contenida ahí corresponde a de 0.1 a 4 veces el volumen de la solución en el recipiente.
14. Recipiente de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque la concentración final de sal de guanidinio después de la adición de sangre está entre 1.0 M y 5 M o entre 1.5 M y 5 M.
- 45

15. Método para la estabilización y/o aislamiento de ácidos nucleicos de sangre, caracterizado porque la sangre está presente, directamente después de la recogida, en un recipiente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, comprendiendo opcionalmente el aislamiento de ácidos nucleicos usando métodos establecidos.

5

16. Método de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado porque el pH de la solución se ajusta de manera que después de la adición del material de muestra se alcanza un valor de pH entre 4,0 y 7,5.

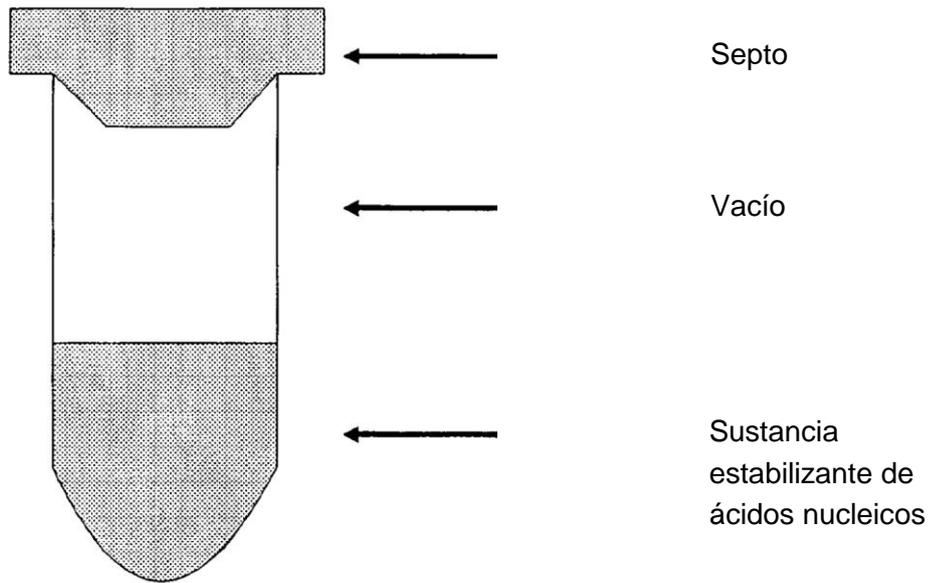


Fig. 1

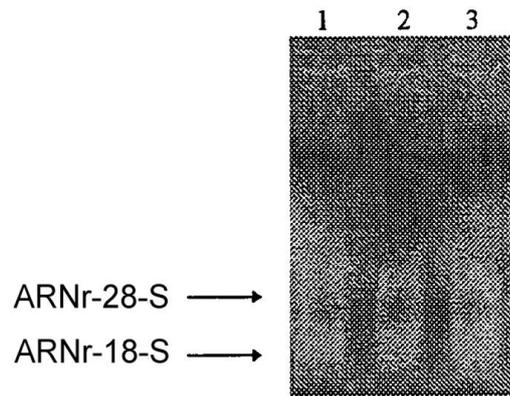


Fig. 2

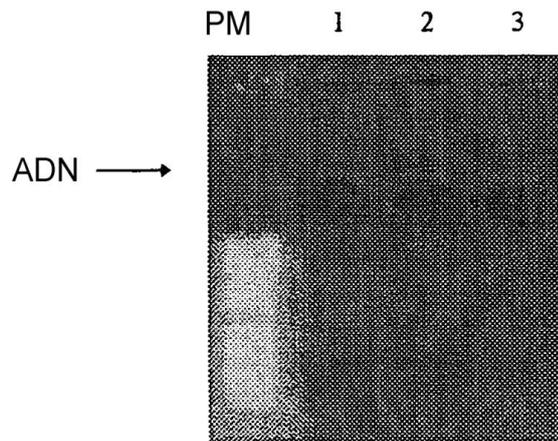


Fig. 3

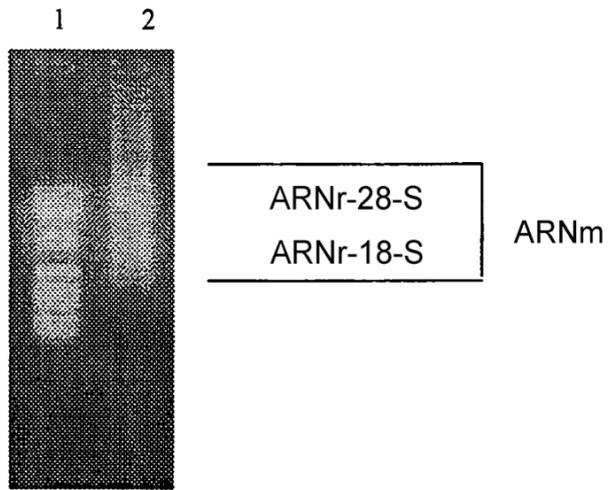


Fig. 4

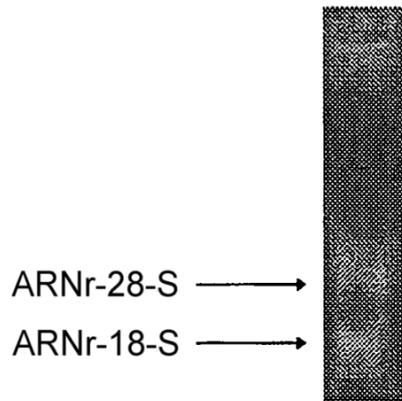


Fig. 5

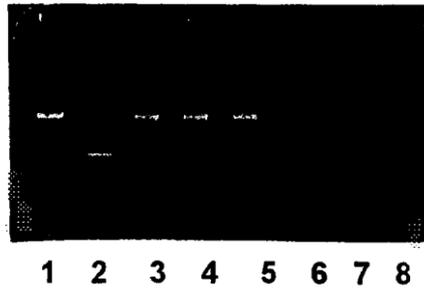


Fig. 6

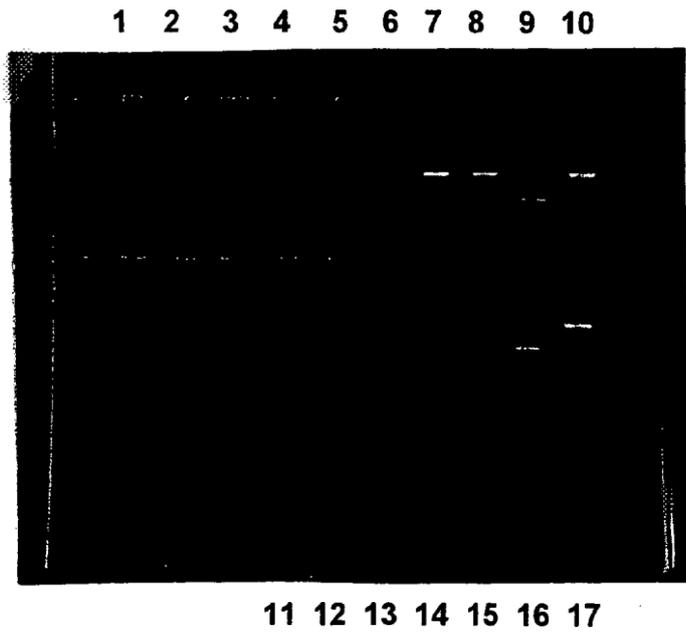


Fig. 7

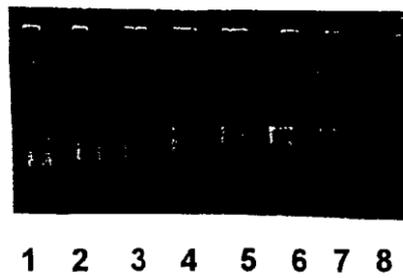
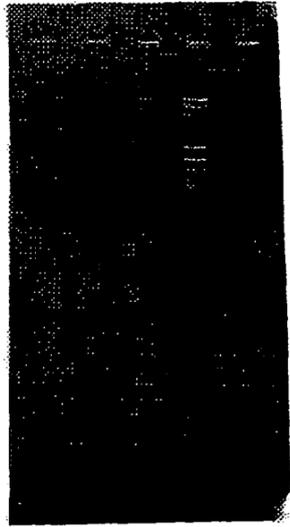


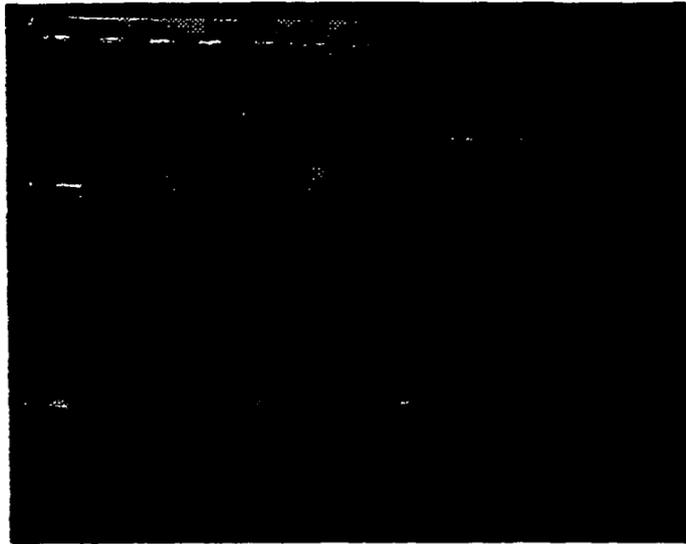
Fig. 8



1 2 3 4

Fig. 9

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



13 14 15 16 17 18 19 20

Fig. 10

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • EP 0818542 A1 [0008]

Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- 15 • LOZANO et al. *Virus Research*, 1993, vol. 27, 37-53 [0011] • CHOMCZYNSKI ; SACCHI. *Analytical Biochemistry*, 1987, vol. 162, 156-159 [0045]
• MACDONALD et al. *Methods in Enzymology*, 1987, vol. 152, 219-227 [0011]