

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 925**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2013 PCT/GB2013/051301**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO2013175188**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2013 E 13723942 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2855677**

54 Título: **Extracción de ácido nucleico**

30 Prioridad:

25.05.2012 GB 201209229

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

22.06.2017

73 Titular/es:

**EPISTEM LIMITED (100.0%)
48 Grafton Street
Manchester M13 9XX, GB**

72 Inventor/es:

COBB, BEN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 618 925 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

Extracción de ácido nucleico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y productos para la extracción de ácidos nucleicos de muestras biológicas, principalmente muestras biológicas que comprenden material celular. Los aspectos de la invención se refieren adicionalmente a métodos para preparar ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas para la
10 amplificación de ácido nucleico.

Antecedentes de la invención

Uno de los retos principales para el diagnóstico usando tecnología de amplificación de ácido nucleico es el pretratamiento del material celular para extraer ácidos nucleicos antes del proceso de amplificación. Las tecnologías basadas en sílice y basadas en perlas magnéticas son ineficaces (<10 %) y requieren la optimización para tipos específicos de diana; el mismo proceso generalmente no es compatible con otros tipos de muestra. Los procesos de alto rendimiento que usan fenol y cloroformo no son adecuados a causa de la toxicidad de los componentes. Los métodos basados en detergente ofrecen un proceso de lisis simple, pero requieren temperaturas elevadas (95 °C),
20 que no son compatibles con RT-PCR de una única etapa ya que la transcriptasa inversa no es térmicamente estable.

Los métodos actuales implican el aislamiento de ácidos nucleicos en una forma purificada, del resto de material celular. Esto generalmente requiere descomponer las células usando enzimas tales como lisozimas o detergentes.
25 Las micobacterias requieren un pretratamiento duro con NALC-NaOH para romper las células. Las proteínas se retiran por digestión usando proteasas apropiadas (por ejemplo, proteinasa K). Los ácidos nucleicos se unen a una resina de soporte o a una matriz cargada (por ejemplo, partículas magnéticas) y se lavan. Los ácidos nucleicos se retiran del soporte cargado a través de cambio de pH a un tampón apropiado. Esto produce ácidos nucleicos de alta pureza.
30

Los sistemas del estado de la técnica, por ejemplo, de Cepheid, Enigma Diagnostics, Roche, Geneprobe, BD, etc., integran este proceso convencional de extracción de ácido nucleico en laboratorio en sus instrumentos de diagnóstico. Sin embargo, esto es complejo, costoso y está dirigido a tipos específicos de muestras.

35 En el presente documento se describe un proceso para eliminar la complejidad de este proceso, suministrando ácidos nucleicos con capacidad de amplificarse por PCR en un sistema simple, desechable, basado en papel que funciona a temperatura ambiente, es capaz de romper células bacterianas, fúngicas y víricas, y libera ácidos nucleicos en solución para análisis directo para PCR.

40 Las solicitudes de patente internacional WO00/62023 y WO02/16383 de Whatman, Inc, describen métodos para producir la lisis de las células y aislar ácidos nucleicos usando medios de filtro recubiertos. El medio de filtro es nitrocelulosa tratada con FTA, que se recubre con un detergente aniónico, por ejemplo, SDS. El recubrimiento lisa las células, y el filtro tratado con FTA absorbe ácidos nucleicos en el mismo. El recubrimiento no se une covalentemente al filtro, y puede retirarse por lavado. Los ácidos nucleicos pueden eluirse del filtro para posterior procesamiento.
45

La solicitud de patente internacional WO2008/134464 de 3M Innovative Properties Company describe un sustrato con grupos funcionales unidos, un material de lisis, un material de matriz y un sacárido, para su uso en el aislamiento de ácidos nucleicos de las muestras.
50

La solicitud de patente de Estados Unidos 2007/0185322 to Akhavan-Tafti describe métodos para la extracción de ARN de una muestra, que implica el uso de una solución ácida y un material de unión a fase sólida que puede liberar ácidos nucleicos sin realizar lisis preliminar de las células. Se menciona el uso de sales de amonio cuaternario para unir los ácidos nucleicos. La solicitud de Estados Unidos 2005/0042661 de Tarkkanen et al. también describen el uso de compuestos de amonio cuaternario para liberar selectivamente ácidos nucleicos de las células.
55

Las solicitudes de patente internacional WO2004/087226 y WO2006/071191 de Appeartex AB, y la patente de Estados Unidos 5.064.613 de Higgs et al. describen composiciones antimicrobianas que incluyen sales de amonio cuaternario.
60

Kim et al: "Microfluidic sample preparation: cell lysis and nucleic acid purification", Integrative Biology, Royal Society of Chemistry, R.U., vol. 1, n.º 10, 1 de octubre de 2009, páginas 574-586, es una revisión que describe diversidad técnicas de lisis celular y de purificación de ácido nucleico.
65

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método de preparación de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica que comprende a) material celular que tiene una membrana celular, o b) material celular que tiene una pared celular, o c) material vírico que tiene una envuelta vírica o d) material vírico que tiene una cápsida vírica; comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un sustrato, estando el sustrato funcionalizado con un agente biocida que es capaz de i) debilitar la membrana celular, la pared celular, la envuelta vírica o la cápsida vírica; o ii) producir la lisis del material celular o vírico; donde el agente biocida comprende múltiples grupos funcionales, comprendiendo los múltiples grupos funcionales un grupo sililo, que está implicado en la unión del agente al sustrato; una cadena alquilo; y un grupo de cloruro de amonio.

De acuerdo con un aspecto de la descripción, se proporciona un método de preparación de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica que comprende a) material celular que tiene una membrana celular, o b) material celular que tiene una pared celular, o c) material vírico que tiene una envuelta vírica o d) material vírico que tiene una cápsida vírica; comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un sustrato, estando el sustrato funcionalizado con un agente biocida que es capaz de i) debilitar la membrana celular, la pared celular, la envuelta vírica o la cápsida vírica; o ii) producir la lisis del material celular o vírico.

El método puede comprender adicionalmente la etapa de someter la muestra a calor después de la etapa de contacto. Por ejemplo, la muestra puede añadirse directamente a una reacción de amplificación de ácido nucleico. La etapa de calor servirá para producir la lisis de la pared celular, la membrana celular, la envuelta vírica o la cápsida vírica debilitada, para liberar el ácido nucleico. La etapa de calor no siempre es necesaria para liberar el ácido nucleico, por ejemplo, si el agente biocida es capaz de producir la lisis del material celular o vírico.

De este modo, el método permite una preparación rápida y fácil de ácido nucleico a partir de una muestra biológica para procesamiento adicional.

El sustrato es preferiblemente un material de celulosa; por ejemplo, un papel de filtro de celulosa o una matriz de celulosa. El material de celulosa puede ser un papel compuesto; por ejemplo, un papel de celulosa compuesta que puede comprender una capa de flujo lateral, para retirar los contaminantes líquidos y de bajo peso molecular y los inhibidores de la muestra que se deposita sobre una superficie del papel. La celulosa tiene la ventaja de que tiene varios grupos hidroxilo expuestos a los que pueden unirse agentes biocidas. En ciertas realizaciones, el material de celulosa puede comprender adicionalmente reactivos para realizar acciones deseadas sobre la muestra; por ejemplo, RNasas, proteasas y similares, para la limpieza de la muestra. Un sustrato preferido es un papel de celulosa derivado de algodón y, en particular, papel FP 2992 de Hahnemuhle FineArt GmbH (Alemania).

Pueden usarse otros materiales de sustrato, preferiblemente aquellos que tienen grupos hidroxilo expuestos. Por ejemplo, el sustrato puede ser vidrio, plástico o similares. Aunque en una realización preferida el sustrato es un papel de filtro, que puede añadirse directamente a una reacción de amplificación de ácido nucleico, en otras realizaciones el sustrato puede adoptar la forma de un canal microfluidico o de un vaso de reacción o de otro recipiente, junto con el cual o dentro del cual puede pasar o estar contenida la muestra biológica.

El agente biocida comprende múltiples grupos funcionales. Los grupos funcionales incluyen un resto de unión, que está implicado en la unión del agente al sustrato; un resto hidrófobo; y un resto cargado. El resto hidrófobo es capaz de interaccionar con y penetrar en la pared celular o en la membrana celular. El resto hidrófobo es una cadena de alquilo, por ejemplo, alquilo C5-C30, preferiblemente alquilo C10-C20. Según la cadena alquilo penetra la pared celular delicada, la pared se debilita y perfora. El resto cargado está cargado positivamente, y es capaz de atraer una pared celular cargada, y puede alterar el flujo de iones y la homeostasis en contacto con una membrana celular, ayudando de ese modo a alterar la célula y liberar los ácidos nucleicos. El resto cargado es un grupo amonio cuaternario.

Los grupos funcionales son una cadena alquilo (el resto hidrófobo), un grupo sililo (el resto de unión) y un grupo de cloruro de amonio (el resto cargado).

Los agentes biocidas preferidos incluyen compuestos de amonio cuaternario sililados (SiQAC); en particular cloruro de 3-(trimetoxisilil) propildimetiloctadecil amonio (3-TPAC). Otros agentes biocidas de la descripción incluyen cloruros de bencilamonio. El modo letal de acción de los SiQAC está generalmente aceptado que discurre por adsorción de la molécula cargada positivamente en la superficie celular cargada negativamente, la alteración de la membrana celular por una cadena lipófila en la molécula de SiQAC, y difusión a través de la membrana que conduce a lisis celular.

Los expertos en la materia serán conscientes de otros agentes biocidas adecuados que pueden usarse. La selección de un agente particular estará guiada por la presencia de los grupos funcionales preferidos descritos anteriormente, y de la naturaleza de la muestra biológica pretendida - por ejemplo, cuando la muestra a procesarse es una muestra celular de mamífero, entonces no hay pared celular que penetrar, y pueden ser apropiados otros grupos funcionales.

Ejemplos de otros agentes biocidas que pueden usarse en la presente descripción incluyen:

a) poli(2-alkil-1,3-oxazolinas) telequéricas;

b) celulosa con un grupo de DDA antimicrobiano injertado a través de PEOx, que elimina las células microbianas que se aproximan en contacto (Bieser et al., (2011), Contact-Active Antimicrobial and Potentially Self-Polishing Coatings Based on Cellulose. *Macromol. Biosci.*, 11, 111-121);

c) saponinas que son glucósidos esteroides o triterpenoides, comunes en una gran cantidad de plantas, y se sabe desde hace tiempo que tienen una acción lítica sobre la membrana de los eritrocitos y muchas saponinas se sabe que son antimicrobianas (Francis et al., *British Journal of Nutrition* (2002), 88, 587-605). Se ha realizado investigación extensiva sobre las propiedades de permeabilización de membranas de las saponinas. También se ha observado que estos compuestos estructuralmente diversos eliminan protozoos y actúan como agente antifúngicos y antivíricos. Las membranas celulares aisladas de eritrocitos humanos, cuando se tratan con saponina, desarrollan poros de 40-50 Å de diámetro frente a los poros de 80 Å producidos en membranas artificiales (Seeman et al., 1973 Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. *Journal of Cell Biology* 56, 519-527).

Para una revisión de otras composiciones que pueden usarse, véase "Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces", Siedenbiedel y Tiller (2012) *Polymers*, 4, 46-71.

Preferiblemente, la muestra biológica puede comprender material celular que tiene una pared celular. Por ejemplo, el material celular puede ser células procariotas, tales como células bacterianas; o puede ser células vegetales o fúngicas. Como alternativa, la muestra biológica comprende material celular que tiene una membrana celular y ninguna pared celular. Por ejemplo, el material celular puede ser células eucariotas de animales, incluyendo células de mamífero o de insecto. Como alternativa, la muestra biológica puede comprender material vírico.

Un aspecto adicional de la presente descripción proporciona un método de amplificación de ácidos nucleicos en una muestra biológica, comprendiendo el método: preparar ácidos nucleicos de acuerdo con el método del primer aspecto anterior de la descripción; y someter los ácidos preparados a una etapa de amplificación de ácido nucleico, preferiblemente una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación puede realizarse con fines de diagnóstico.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un dispositivo para preparar ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica que comprende a) material celular que tiene una membrana celular, o b) material celular que tiene una pared celular, o c) material vírico que tiene una envuelta vírica o d) material vírico que tiene una cápsida vírica; comprendiendo el dispositivo un sustrato funcionalizado con un agente biocida que es capaz de i) debilitar la membrana celular, la pared celular, la envuelta vírica o la cápsida vírica; o ii) producir la lisis del material celular o vírico, donde el agente biocida comprende múltiples grupos funcionales, comprendiendo lo múltiples grupos funcionales un grupo sililo, que está implicado en la unión del agente al sustrato; una cadena alquilo; y un grupo de cloruro de amonio.

El sustrato es preferiblemente un material de celulosa.

En ciertas realizaciones, el sustrato puede integrarse en un cartucho de preparación de muestra o similar. Por tanto, el dispositivo puede comprender adicionalmente un vaso de reacción para recibir el sustrato, o una parte del sustrato. El dispositivo también puede comprender adicionalmente un medio para separar una parte del sustrato del resto del sustrato; esto puede permitir que un trozo del sustrato se separe una vez se ha añadido la muestra, y el trozo separado entonces se deja entrar en el vaso de reacción y se usa en una PCR.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la estructura de una molécula de SiQAC, 3-TPAC.

La Figura 2 ilustra la funcionalización de celulosa por un SiQAC.

La Figura 3 es un esquema del modo de acción de un SiQAC sobre una célula.

La Figura 4 muestra la detección de especies de un *Plasmodium* de sangre tratada con un SiQAC.

La Figura 5 compara diferentes métodos de procesamiento con papel para la extracción de ADN de *Mycobacterium*.

La Figura 6 muestra los datos de precisión para muestras clínicas.

La Figura 7 muestra ensayos de múltiples repeticiones de MTB a diferentes concentraciones extraídos de esputo usando el proceso descrito, mostrando el eje Y la temperatura de fusión máxima y mostrando el eje X la altura máxima.

La Figura 8 muestra el flujo de trabajo del proceso optimizado para la producción de papel funcionalizado con SiQAC y el análisis de muestras.

La Figura 9 muestra el aislamiento de ADN microbiano a partir de leche entera completa.

La Figura 10 muestra la amplificación de ácido nucleico obtenido de muestras de plasma positivo al VIH.

La Figura 11 muestra las secuencias obtenidas del ácido nucleico de VIH amplificado.

Descripción detallada de los dibujos

La presente descripción funciona generalmente del siguiente modo. Un sustrato, tal como papel de filtro de celulosa, se funcionaliza con un agente biocida, preferiblemente un SiQAC, más preferiblemente 3-TPAC. El sustrato funcionalizado puede usarse en la preparación de la muestra para extraer los ácidos nucleicos de una muestra celular para su uso en reacciones de PCR.

El material celular se deposita en la capa superior del papel. El líquido fluye a través del papel y el material celular queda atrapado sobre la superficie. La fase líquida y cualquier ión inhibidor de bajo peso molecular se dispersa en una capa de flujo lateral secundaria localizada por debajo de la capa de celulosa funcionalizada superficial.

Las células microbianas en la muestra (o células vegetales, animales o fúngicas) interactúan con la celulosa funcionalizada con SiQAC y se debilitan y/o lisan, liberando su contenido celular normalmente en 5 minutos de contacto.

Puede escindir un tampón de papel compuesto del sustrato, y añadirse directamente una reacción de PCR después de un periodo de 10 minutos. Adicionalmente, el calor inicial de la PCR puede servir para producir la lisis de cualquier célula restante con el fin de liberar los ácidos nucleicos adicionales.

La estructura de una molécula SiQAC [cloruro de 3-(trimetoxisililo) propildimetiloctadecil amonio (3-TPAC)] se muestra en la Figura 1. 3-TPAC se describió por primera vez en 1972 (véase, Isquith et al., (1972), Appl. Microbiol., 24:6 859-863, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC380687/pdf/applmicro00052-0033.pdf>).

Hay muchas versiones de la química básica (por ejemplo, cloruros de bencilamonio BAC), pero todos comparten ingredientes claves similares: variante de cloruro de amonio (el antimicrobiano activo), silicio como agente de unión (la parte sililo) y una cadena alcano. El cloruro de amonio es un grupo amonio cuaternario que se une a dos grupos metilo y de forma eficaz a dos grupos alquilo de cadena más larga. Esta función catiónica confiere propiedades antimicrobianas que provocan la descomposición de las membranas bacterianas, fúngicas y víricas, liberando el contenido de ácidos nucleicos. La cadena de alcano hidrófoba penetra en las paredes celulares. El grupo trimetoxisililo une la molécula a un sustrato (por ejemplo, celulosa) a través del grupo hidroxilo activo.

Los compuestos de amonio cuaternario son mortales para una amplia diversidad de organismos incluyendo bacterias, hongos y virus recubiertos, y a un menor grado para endosporas, *Mycobacterium tuberculosis* y virus sin envuelta. Muchos polímeros biocidas son conocidos con grupos de amonio cuaternario. Los compuestos de amonio cuaternario (QA) están entre los agentes antibacterianos más ampliamente usados para aplicaciones de salud médica y pública y han demostrado ser eficaces contra bacterias tanto gram negativas como gram positivas (Tashiro (2001) Macromol. Mater. Eng.; 286, 63-87).

Los polímeros catiónicos con grupos QA generalmente muestran mayores actividades antimicrobianas que sus correspondientes monómeros de bajo peso molecular [Ikeda y Tazuke, 1983, Makromol. Chem., Rapid Commun. 4 (1983) 459-461]. La mayor actividad se atribuye a mayor atracción electrostática entre la célula y el polímero debido a la mayor densidad de carga del polímero.

Los SiQAC funcionan a través de un proceso de dos etapas. La acción cargada positivamente sobre la molécula SiQAC atrae la pared celular cargada negativamente del microorganismo. Inicialmente, la cadena alquilo hidrófoba penetra en la pared celular similarmente hidrófoba de un organismo que entra en contacto con la misma. Según la cadena alquilo penetra en la pared celular delicada, la pared se debilita y perfora. En segundo lugar, según el grupo amonio cuaternario catiónico entra en contacto con la pared celular altera el flujo de iones y causa filtraciones en o desde la pared celular, provocando habitualmente la pérdida de la célula de sus contenidos o rotura dependiendo del entorno iónico. El grupo alquilo de amonio cuaternario cargado permanece sin cargar y está disponible para repetir el proceso indefinidamente.

A causa de este mecanismo de eliminación "físico" y "eléctrico", los microbios no tienen oportunidad de desarrollar resistencia o inmunidad contra el SiQAC.

Los compuestos de amonio cuaternario se usan ampliamente como desinfectantes, antisépticos, productos farmacéuticos y cosméticos y podrían ser una alternativa en la desinfección de frutos y hortalizas. Todos los compuestos de amonio cuaternario (QAC) son compuestos catiónicos que poseen una estructura básica (NH₄⁺). Estos compuestos penetran en la pared celular de las bacterias, reaccionando con la membrana citoplasmática induciendo lisis de la pared causada por enzimas autolíticas (McDonnell, G. y Russell, A. D. 1999 Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. Clinical Microbiology Reviews 12, 147-179).

Los grupos trimetoxisililo reaccionan con los grupos hidroxilo sobre superficies tales como vidrio y algodón para formar enlaces covalentes que retienen el compuesto QA en la superficie y evitan que se disuelva en agua. Los grupos trimetoxisililo también pueden reaccionar entre sí para formar un recubrimiento de silano reticulado, altamente estable, unido a superficies tratadas. Estos recubrimientos han demostrado conferir actividad biocida a las

superficies en muchas aplicaciones sin producir liberación de agentes químicos al entorno adyacente [Isquith et al., 1972; Isquith et al., 1973 patente de Estados Unidos 3.730.701; Speier y Malek, 1982 J of Colloid and Interface Science 89, 68; Walters et al., 1973, J., Appl. Microbiol. 25, 253].

5 Aunque estos recubrimientos eran muy eficaces como agente fungicida y antibacteriano, han sido ineficaces contra las esporas.

10 La Figura 2 ilustra la funcionalización de celulosa con una molécula SiQAC, 3-TPAC. En celulosa nativa inalterada, X representa hidrógeno, formando varios grupos hidroxilo (OH) colgantes. En la fase inicial más rápida, se forma un enlace entre la molécula y el grupo hidroxilo formando un éter de sililo. En la segunda etapa más lenta se forman entrecruzamientos entre los grupos dimetoxisililo adyacentes para formar un polímero de éter de silicona aleatorio alineado paralelo a la superficie del sustrato.

15 El resto catiónico no desempeña ninguna función en la unión a la superficie, pero está disponible ya que está unido a la superficie del sustrato. Su estructura es análoga a los compuestos de amonio cuaternario reconocidos como antisépticos tópicos de los que el cloruro de didecildimetilamonio (DDAC) es un ejemplo típico.

20 El mecanismo por el cual la molécula SiQAC queda unida a la superficie del sustrato es químicamente similar al de la reticulación de polieteno para formar PEX.

25 La Figura 3 es un diagrama esquemático que muestra el método de acción de la celulosa funcionalizada con SiQAC. Las cadenas de SiQAC se unen a las fibras de celulosa y quedan orientadas y reticuladas (marcadas A) para formar una capa activa. La cadena alquilo hidrófoba (marcada B) penetra en la pared celular similarmente hidrófoba del microorganismo. Según la cadena alquilo penetra en la pared celular delicada, la pared se debilita y perfora. Entonces, el grupo de amonio cuaternario catiónico (C) entra en contacto con la pared celular y altera el flujo de iones y causa filtraciones en o desde la pared celular, provocando habitualmente la pérdida de la célula de sus contenidos o, dependiendo del entorno iónico, la rotura de la célula completamente. En su estado debilitado, el proceso de secado rápido de las células debilita adicionalmente la pared celular de modo que durante el ciclo temprano de PCR, el material de ácido nucleico se libera en la solución y se amplifica durante la PCR.

30 Por tanto, el modo de acción de las moléculas SiQAC implica varios elementos distintos. Hay una perturbación de las bicapas lipídicas de la membrana citoplasmática y externas y las paredes celulares a través de la cadena alquilo, provocando una filtración generalizada y progresiva del material citoplasmático que provoca lisis celular, parcial o completa dependiendo de la fuerza iónica de la solución adyacente. Esto se aumenta por el grupo de amonio cargado positivamente que se asocia con el fosfolípido de membrana cargado negativamente. Incluso a baja 35 concentración de los componentes activos, se produce la filtración de los componentes citoplasmáticos de baja masa molar (por ejemplo, K⁺, ácidos nucleicos y aminoácidos). Los compuestos SiQAC son considerablemente más potentes que un compuesto de amonio cuaternario no sililado porque el grupo sililo se une a superficies causando que la parte antimicrobiana quede localmente concentrada y orientada.

40 El proceso de lisis celular por compuestos SiQAC funciona a temperatura ambiente, a diferencia de otros procesos en el estado actual de la técnica. La celulosa funcionalizada con SiQAC es adecuada para debilitar y/o destruir las paredes celulares de bacterias, de hongos y la envuelta proteica de partículas víricas. En realizaciones preferidas, proporciona material celular lisado que está listo para PCR en 5 minutos. Los sustratos funcionalizados y los métodos de la presente descripción posibilitan la extracción del ácido nucleico de ADN y de ARN combinado con 45 descontaminación de otros agentes potencialmente dañinos dentro de la muestra en una única etapa. También es posible extraer el ARN de partículas víricas, proporcionando un proceso de una única etapa que elimina la necesidad de un procesamiento de muestras complejas para acceder al ARN antes de RT-PCR.

50 Los métodos podrían usarse como medios de selección de tipos celulares para lisis, por ejemplo, los presentes datos muestran que después de 24 horas de incubación en sangre, las células de la sangre completa permanecen intactas, mientras que los eritrocitos blancos quedan lisados.

55 Se cree que el proceso de SiQAC es compatible con al menos los siguientes microorganismos:

60 Bacterias: MRSA, CA-MRSA; *Micrococcus* sp.; *Staphylococcus epidermis*; *Enterobacter agglomerans*; *Acinetobacter calcoaceticus*; *Staphylococcus aureus* (pigmentado); *Staphylococcus aureus* (no pigmentado); *Klbsiella pneumoniae* *moniae*; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Streptococcus faecalis*; *Escherichia coli*; *Proteus mirabilis*; *Citrobacter diversus*; *Salmonella typhosa*; *Salmonella choleraesuis*; *Cornyebacterium bovis*; *Mycobacterium smegmatis*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Brucella canis*; *Brucella abortus*; *Brucella suis*; *Streptococcus mutans*; *Bacillus subtilis*; *Clostridium perfringens*; *Haemophilus influenzae*; *Haemophilus suis*; *Lactobacillus casei*; *Leuconostoc lactis*; *Listeria monocytogenes*; *Propionibacterium acnes*; *Proteus vulgaris*.

65 Hongos: *Alternaria*; *Aspergillus flavus*; *Aspergillus fumigatus*; *Aspergillus niger*; *Aspergillus terreus*; *Aspergillus versicolor*; *Aureobadisiium pullulans*; *Cephalascus fragrans*; *Chaetomium globosum*; *Cladosporium herbarum*; *Epidermophyton*; *Fusarium nigrum*; *Fusarium solani*; *Glicocladium roseum*; *Mucor*; *Oospora lactis*; *Pencillium*

albicans; *Trichophyton mentagraphophytes*; *Pencillium elegans*; *Pencillium funiculosum*; *Pencillium humicola*; *Pencillium notatum*; *Pullularia pullulans*; *Penicillium variabile*; *Rhizopus nigricans*; *Ricoderm*; *Stachybotrys atra*; *Trichophyton interdigitalie*; *Trichoderma flavus*; *Penicillium citrinum*.

5 Levaduras y algas: *Saccharomyces cerevisiae*; *Candida albicans*; *Oscillatoria bormeti* LB143; *Anabaena cylindrica*; *Selenastrum gracile* B-325; *Pleurococcus* LB11; *Schenedesmus quadricuada*; *Gonium* LB 9c; *Volvox* LB 9; *Chlorella vulgaris*; *Cyanophyta* (verdeazuladas); *Chrysophyta* (marrones); *Chlorophyta* (verdes) *Seienastum*; *Chlorophyta* (verdes) *Protococcus*.

10 Virus: VIH; dengue; gripe A/B; SARS; H1N1 (gripe porcina); H3N2; herpes simple de tipo 1.

Otros: *Plasmodium malariae*.

15 Los detalles de la acción antimicrobiana de los SiQAC pueden encontrarse en Isquith et al (1972).

Ejemplos

El papel usado en todos los ejemplos fue el papel de celulosa derivado de algodón FP 2992 de Hahnemuhle FineArt GmbH (Alemania), salvo que se indique de otro modo:

20 Ejemplo 1: Purificación basada en papel de cultivos bacterianos con solución de SiQAC y caracterización del producto de PCR

Protocolo:

25 1. Preparar un cultivo O/N para una bacteria dada (*K. pneumoniae*, *S. aureus* y *M. Tuberculosis**) y recoger 50 µl. [*el cultivo MTB se ha inoculado durante dos semanas (D.O. 1,1)]
2. Preparar tres conjuntos de tarjetas a secar O/N

30 i. Papel no tratado
ii. Funcionalizado con 5 µl de solución de SiQAC (3-TPAC) diluida en 15 µl de agua
iii. Funcionalizado con 5 µl de solución de SiQAC /3-TPAC) diluida en 15 µl de TRIS-CI [pH 7,5]

35 3. Añadir 20 µl de los cultivos a cada conjunto de papel tratado y no tratado y secar a temperatura ambiente durante 10 minutos [repeticiones x4 en papel diferente para cada cultivo]
4. Retirar un disco perforado de papel usando una perforadora de biopsia estéril (1,5 mm).
5. Añadir el disco perforado a la mezcla de PCR (20 µl de volumen final)
6. Realizar 35 ciclos de 16S universal para cada uno de los ensayos; *K. pneumoniae* y *S. aureus*, MTB de GD/RIF
40 7. Usar pirosecuenciación convencional de los productos de PCR para *K. pneumoniae* y *S. aureus*

Resultados

45 1. La PCR de lechos convencionales (conjunto 1) para *K. pneumoniae* produjo un promedio de 18 lecturas de pb de alta calidad en pirosecuenciación
2. La PCR de lechos enriquecidos con 5 µl de solución de SiQAC (3-TPAC) añadidos a 15 µl de agua (conjunto 2) para *K. pneumoniae* produjo un promedio de 24 lecturas de pb de calidad media en pirosecuenciación
3. La PCR de lechos enriquecidos con 5 µl de solución de SiQAC (3-TPAC) añadidos a 15 µl de TRIS-CI [pH 7,5] (conjunto 3) para *K. pneumoniae* produjo un promedio de 28 lecturas de pb de alta calidad en pirosecuenciación
50 4. La PCR de lechos no tratados (conjunto 1) de *S. aureus* produjo un promedio de 16 lecturas de pb de alta calidad en pirosecuenciación
5. La PCR de lechos enriquecidos con 5 µl de solución de SiQAC (3-TPAC) añadidos a 15 µl de agua (conjunto 2) para *S. aureus* produjo un promedio de 20 lecturas de pb de alta calidad en pirosecuenciación
55 6. La PCR de lechos enriquecidos con 5 µl de solución de SiQAC (3-TPAC) añadidos a 15 µl TRIS-CI [pH 7,5] (conjunto 3) para *S. aureus* produjo un promedio de 25 lecturas de pb de alta calidad en pirosecuenciación
7. MTB de GD/RIF: la identificación de MTB fue correcta para los tres conjuntos de muestras, incluyendo la identificación de RIF en muestras procesadas a través de lechos enriquecidos con 5 µl de solución de SiQAC (3-TPAC) diluidos con 15 µl de TRIS-CI [pH 7,5]

Conclusiones:

60 El papel enriquecido con solución de SiQAC (3-TPAC) lisó de forma satisfactoria las células bacterianas permitiendo la PCR de los ácidos nucleicos extraídos. Esto se confirmó por la longitud sin procesar de la secuencia obtenida a través de pirosecuenciación, y la detección de punto final de MTB-RIF de *Mycobacterium tuberculosis* que es una célula difícil de descomponer, que requiere convencionalmente tratamientos duros con NALC-NaOH para conseguir el mismo nivel de alteración celular. El papel no tratado no produjo los mismos resultados. Se necesita TRIS-CI [pH

7,5] para tamponar el SiQAC.

Ejemplo 2: Detección de especies de *Plasmodium* de sangre tratado con solución de SiQAC.

5 La figura 4 muestra los resultados de detección de ácidos nucleicos de diferentes especies de *Plasmodium* en muestras de sangre obtenidas de pacientes infectados.

Ejemplo 3: Funcionalización de papel y métodos de uso

10 Se dan tres métodos alternativos de funcionalización de papel:

Proceso A

15 Papel funcionalizado con 20 µl de solución de SiQAC (3-TPAC), secado durante 24 horas y después lavado en 20 µl de TRIS-Cl 5 mM [pH 9,0], MgCl₂ 0,2 mM después secado y;

- i. Aplicar la muestra, secar durante 20 minutos, retirar el disco y añadir 20 µl de agua miliQ para PCR, o
- ii. Aplicar la muestra, secar durante 20 minutos, retirar el disco y aclarar en 20 µl de agua miliQ usando pipeteo suave, usar 20 µl en PCR

20 Proceso B

25 Papel funcionalizado con 20 µl de solución de SiQAC (3-TPAC), secado durante 30 minutos y lavado en TRIS-Cl 5 mM [pH 9,0], MgCl₂ 0,2 mM después secado y;

- i. Aplicar la muestra, secar durante 20 minutos, retirar el disco y añadir 20 µl de agua miliQ para PCR, o
- ii. Aplicar la muestra, secar durante 20 minutos, retirar el disco y aclarar en 20 µl de agua miliQ usando pipeteo suave, usar 20 µl en PCR

30 Proceso C

Papel funcionalizado con 20 µl de SiQAC (3-TPAC) y secado durante 30 minutos y;

- 35 i. Aplicar la muestra, secar durante 20 minutos, retirar el disco y aclarar en 20 µl de agua miliQ usando pipeteo suave, usar 20 µl en PCR, o
- ii. Aplicar la muestra, secar durante 20 minutos, retirar el disco y añadir 20 µl de TRIS-Cl 5 mM [pH 9,0], MgCl₂ 0,2 mM para PCR; o
- 40 iii. Aplicar la muestra, secar durante 20 minutos, retirar el disco y aclarar en 20 µl de TRIS-Cl 5 mM [pH 9,0], MgCl₂ 0,2 mM usando pipeteo suave, usar 20 µl en PCR

Los diversos procedimientos de procesamiento de papel diferentes se compararon para la extracción de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* de muestras clínicas de esputos sin procesar y los resultados se obtuvieron usando el procesamiento convencional de MTB Cepheid GeneXpert® usando NALC-NaOH. Los resultados se muestran en la Figura 5. (MTB = gen rpoB de *Mycobacterium* detectado; RIFs o RIFr = mutaciones de rifampicina detectadas; FALLIDO= sin detección). Los tres métodos de procesamiento liberaron ácidos nucleicos a un grado variable en solución para PCR permitiendo la detección del gen rpoB de múltiples copias y de una única copia y para detectar la mutación de rifampicina. Todos los procesos dieron datos comparativos al sistema patrón de oro GeneXpert®. El proceso C dio resultados "mejores" en comparación con el patrón de oro, dando un alto grado de alteración celular y estabilidad de ADN de alta calidad para el análisis de PCR, confirmado adicionalmente por pirosecuenciación. La pirosecuenciación mostró variaciones de secuencia observadas en 30 pb de secuencia de amplicones del ADN ribosómico de V2, las lecturas largas amarillas y azules ilustran la ausencia de mutaciones en la secuencia, que confirma la presencia de buenos productos de amplificación.

La Figura 6 muestra los datos de precisión cumulativa de cinco muestras clínicas de esputo (RIFs 4x y RIFr 1x), procesadas usando las 7 modificaciones diferentes descritas (es decir, 35 ensayos). La medición de las temperaturas de fusión para MTB (azul claro) y las mutaciones de rpoB que indican el estado de RIF (RIFs, RIFr) y las barras de error asociadas que representan la desviación típica a través de los datos puntuales medidos muestran que el proceso no influye en la precisión de la determinación del pico de fusión que está en ± 0,5 °C. Las metodologías convencionales pueden incluir en la precisión de la medición.

La Figura 7 muestra múltiples ensayos de repetición de MTB a diferentes concentraciones extraídas de esputo usando el proceso descrito, mostrando el eje Y la temperatura de fusión máxima y mostrando el eje X la altura máxima.

65 A la luz de estos ejemplos, la Figura 8 muestra el proceso optimizado para la funcionalización de papel con compuestos SiQAC y el análisis de la muestra.

Ejemplo 4. Pirosecuenciación de *Mycobacterium tuberculosis* extraído usando SiQAC de muestras de esputo

Se procesaron tres muestras de esputo usando tarjetas compuestas funcionalizadas con SiQAC (3-TPAC). Se añadieron discos de 1,5 mm a una amplificación convencional de ADN ribosómico de 16S sin inicio caliente (es decir, solamente ciclado) y los amplicones resultantes se analizaron usando pirosecuenciación. Los resultados mostraron buena amplificación de las regiones de secuencia central proporcionando >25 nucleótidos de longitudes de lectura indicativas de una buena extracción y amplificación:

Modo de búsqueda: búsqueda completa

Valor de identidad medio: 100 %

Motor de búsqueda: PyroMark Q96 ID

Base de datos de referencia: HULPII

Secuencia de referencia: *M. microti* ATCC19422.

Muestra 1 > CGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGTCCTTCTT

Muestra 2 > CGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGTCCTTCTT

Muestra 3 > CGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGTCC

Ejemplo 5: Aislamiento de ADN microbiano de leche completa

La leche completa es un tipo de muestra difícil para PCR con muchos inhibidores. El papel compuesto se funcionalizó usando el método preferido (ilustrado en la Figura 8). Se añadió un único disco de 1,5 mm de papel funcionalizado más muestra de leche en polvo a una mezcla convencional de PCR con cebadores para la amplificación de ADN ribosómico de 16S universal. El ADN amplificado se ejecutó en un gel convencional. La Figura 9 muestra los resultados. (Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: 5 µl de ADNg de referencia de *E. coli* + 1 µl de solución de SiQAC (3-TPAC) al 100 %; Carril 3: 5 µl de ADNg de referencia de *E. coli* + 1 µl de solución de SiQAC (3-TPAC) al 10 %; Carril 4: 5 µl de ADNg de referencia de *E. coli* + 1 µl de solución de SiQAC (3-TPAC) al 1 %; Carril 5: disco de 1,5 mm funcionalizado con solución de SiQAC (3-TPAC) al 10 % + 20 µl de leche entera completa; Carril 6: disco de 1,5 mm funcionalizado con solución de SiQAC (3-TPAC) al 1 % + 20 µl de leche entera completa; Carril 7: disco de 1,5 mm funcionalizado + 20 µl de leche entera completa; Carril 8: 1 µl leche entera completa).

Los datos mostrados demuestran que la funcionalización con SiQAC (3-TPAC) al 1 % potencia la amplificación en comparación con papel no tratado (carriles 6 y 7)

Los discos se comprobaron para bacterias residuales inoculando medio de enriquecimiento para bacterias lácticas (5 g/l de triptona, 1 g/l de dextrosa, 2,5 g/l de extracto de levadura y 1 g/l de leche desnatada en polvo) más agar al 4 % - R.C. MARSHALL (1993) Standard Methods for the Microbiological examination of dairy products, 16ª Ed. (American Public Health Association). El cultivo durante una noche mostró ausencia de crecimiento bacteriano en los discos tratados con SiQAC (3-TPAC) pero crecieron hasta confluencia en placas de cultivo de discos no tratados, lo que confirma que el papel funcionalizado descontaminaba el líquido en 15 minutos.

Ejemplo 6: RT-PCR de ARN extraído de virus VIH de suero usando tarjetas funcionalizadas

Sumario

Las tarjetas funcionalizadas funcionaban para RT-PCR anidada del amplicón K103 de VIH con una muestra de plasma de un paciente anónimo de diagnóstico positivo. Un ensayo paralelo con una muestra de sangre completa de un paciente diferente (también diagnosticado positivo) no dio resultados en PCR (sin fragmentos detectados en geles de agarosa al 1 %) o pirosecuenciación.

Descripción del ensayo

Se funcionalizaron dos tarjetas usando solución de purificación (solución PF, que contenía 3-TPAC) siguiendo el protocolo normalizado:

1. Abrir la tarjeta y aplicar 20 µl de solución PF 1/100 diluida en tampón (Tris HCl 5 mM (pH 9,0), MgCl₂ 0,2 mM)
2. Secar durante 15 minutos
3. Aplicar 20 µl de muestra*
4. Secar durante 15 minutos
5. Perforar un único disco y añadir a RT

*Las muestras serán plasma de sangre VIH positiva periférica (1) y sangre VIH positiva periférica (2)

La mezcla RT usada era el kit de síntesis de ADNc de Applied Biosystems Superscript VILO como se describe en el manual del usuario ajustando a un volumen final de 30 microlitros.

La PCR se preparó posteriormente del siguiente modo:

ES 2 618 925 T3

5 H2O - 5,8 µl
Tampón de PCR 10x - 5 µl
MgCl2 [50 mM] - 2 µl
dNTP •10 mM• - 1,2 µl
1849+ •10 mM• - 1 µl
3500- •10 mM• - 1 µl
Taq polimerasa Ultratools [1 u/µl] - 1 µl
ADNc del kit de síntesis de ADNc Superscript VILO - 30 µl

10 Los cebadores usados fueron:
1849+ 5'-GATGACAGCATGTCAGGGAG
3500- 5'-CTATTAAGTATTTTATGATGGGTCATAA

15 Programa de PCR:
94 °C 2 min, seguido por 45 ciclos de
94 °C 30 segundos
50 °C 30 segundos
72 °C 1 minuto 30 segundos; seguido por
20 72 °C 5 minutos
10 °C ∞

El producto de esta PCR es de 1702 pb de longitud y contiene la región gag-pro-pol de VIH1. Este amplicón se usó como molde para la segunda PCR.

25 La segunda PCR se preparó del siguiente modo:

30 H2O - 20 µl
Tampón de PCR 10x - 4 µl
MgCl2 [50 mM] - 1,6 µl
dNTP •10 mM• - 0,8 µl
K103F •10 mM• - 3,2 µl
BioK103F •10 mM• - 3,2 µl
Taq polimerasa Biotools [1 u/µl] - 0,5 µl
35 Producto de PCR de la PCR anidada - 5 µl

Los cebadores usados fueron:
40 K193F 5'-GGAATACCACATCCYGCAGG
BioK103R 5'-[Biotina]AATATTGCTGGTGATCCTTTCC

Programa de PCR:
45 95 °C 5 min, seguido por 30 ciclos de
95 °C 30 segundos
55 °C 30 segundos
72 °C 30 segundos; seguido por
72 °C 5 minutos
10 °C ∞

El producto de PCR de la segunda PCR es de 203 pb y se usó en la reacción de pirosecuenciación siguiendo el enfoque de enriquecimiento mostrado en la Figura 10.

50 RESULTADOS

Solamente la muestra de plasma dio buenas señales en el pirosecuenciador, la muestra de sangre no dio resultados en absoluto siguiendo el protocolo descrito. El cebador de secuenciación usado fue K103F (5'-GGAATACCACATCCYGCAGG) y la secuencia obtenida se enfrentó al genoma completo de VIH usando la herramienta BLAST del NCBI. La secuencia coincidía satisfactoriamente con el VIH - véase la Figura 11.

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica, que comprende a) material celular que tiene una membrana celular, o b) material celular que tiene una pared celular, o c) material vírico que tiene una envuelta vírica o d) material vírico que tiene una cápsida vírica; comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un sustrato, estando el sustrato funcionalizado con un agente biocida que es capaz de i) debilitar la membrana celular, la pared celular, la envuelta vírica o la cápsida vírica; o ii) producir la lisis del material celular o vírico; en donde el agente biocida comprende múltiples grupos funcionales, comprendiendo los múltiples grupos funcionales un grupo sililo, que está implicado en la unión del agente al sustrato; una cadena alquilo; y un grupo de cloruro de amonio.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de someter la muestra a calor después de la etapa de contacto.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que a) el sustrato es un material de celulosa; preferiblemente un papel de filtro de celulosa o una matriz de celulosa; más preferiblemente en donde el material de celulosa es un papel compuesto; mucho más preferiblemente, en donde el papel compuesto comprende una capa de flujo lateral para retirar el líquido y los contaminantes de bajo peso molecular y los inhibidores de la muestra que se depositan sobre una superficie del papel; o b) en donde el sustrato es vidrio o plástico.
4. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el sustrato está en forma de un canal microfluídico o de un vaso de reacción o de otro recipiente.
5. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la cadena alquilo es alquilo C5-C30, preferiblemente alquilo C10-C20.
6. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el agente biocida es un compuesto de amonio cuaternario sililado (SiQAC); más preferiblemente en el que el agente biocida es cloruro de 3-(trimetoxisililo) propildimetiloctadecil amonio.
7. El método de cualquier reivindicación anterior
- i. en el que a) la muestra biológica comprende material celular que tiene una pared celular; b) la muestra biológica comprende células animales eucariotas; o c) la muestra biológica comprende material vírico; o
 - ii. en el que el material celular comprende una célula procariota, o en el que el material celular comprende células vegetales o fúngicas.
8. Un método de amplificación de ácidos nucleicos en una muestra biológica, comprendiendo el método: preparar ácidos nucleicos de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y someter los ácidos nucleicos preparados a una etapa de amplificación de ácido nucleico, preferiblemente una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
9. Un dispositivo para preparar ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica, que comprende a) material celular que tiene una membrana celular, o b) material celular que tiene una pared celular, o c) material vírico que tiene una envuelta vírica o d) material vírico que tiene una cápsida vírica; comprendiendo el dispositivo un sustrato funcionalizado con un agente biocida que es capaz de i) debilitar la membrana celular, la pared celular, la envuelta vírica o la cápsida vírica; o ii) producir la lisis del material celular o vírico, en donde el agente biocida comprende múltiples grupos funcionales, comprendiendo los múltiples grupos funcionales un grupo sililo, que está implicado en la unión del agente al sustrato; una cadena alquilo; y un grupo de cloruro de amonio.
10. El dispositivo de la reivindicación 9, en el que sustrato es a) un material de celulosa; preferiblemente un papel de filtro de celulosa o una matriz de celulosa; más preferiblemente en el que el material de celulosa es un papel compuesto; o b) es vidrio o plástico.
11. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que el sustrato está en forma de un canal microfluídico o de un vaso de reacción o de otro recipiente.
12. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que la cadena alquilo es alquilo C5-C30, preferiblemente alquilo C10-C20.
13. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en el que el agente biocida es un compuesto de amonio cuaternario sililado (SiQAC); más preferiblemente en el que el agente biocida es cloruro de 3-(trimetoxisililo) propildimetiloctadecil amonio.
14. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que el sustrato está integrado en un cartucho de preparación de muestras o similar.

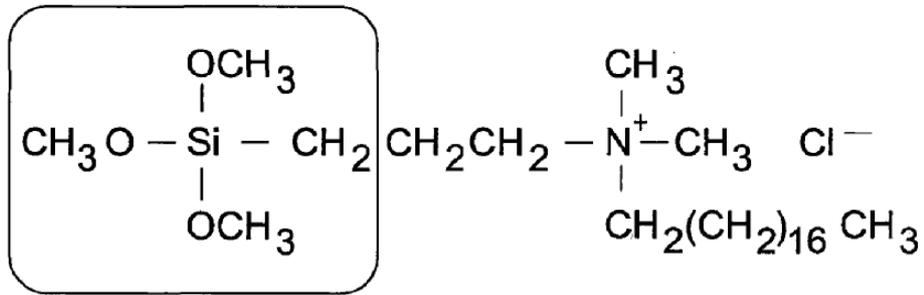
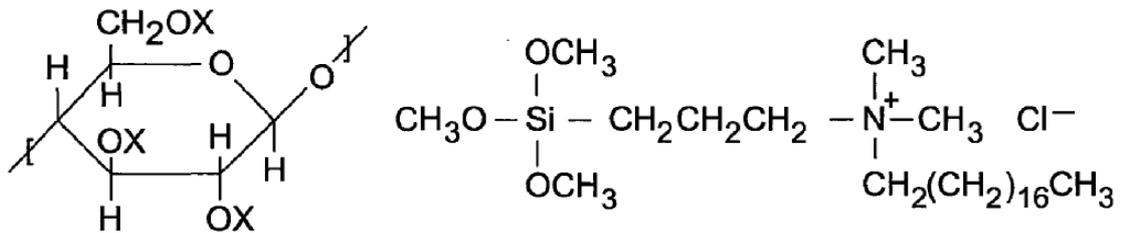


Fig.1



Superficie funcionalizada

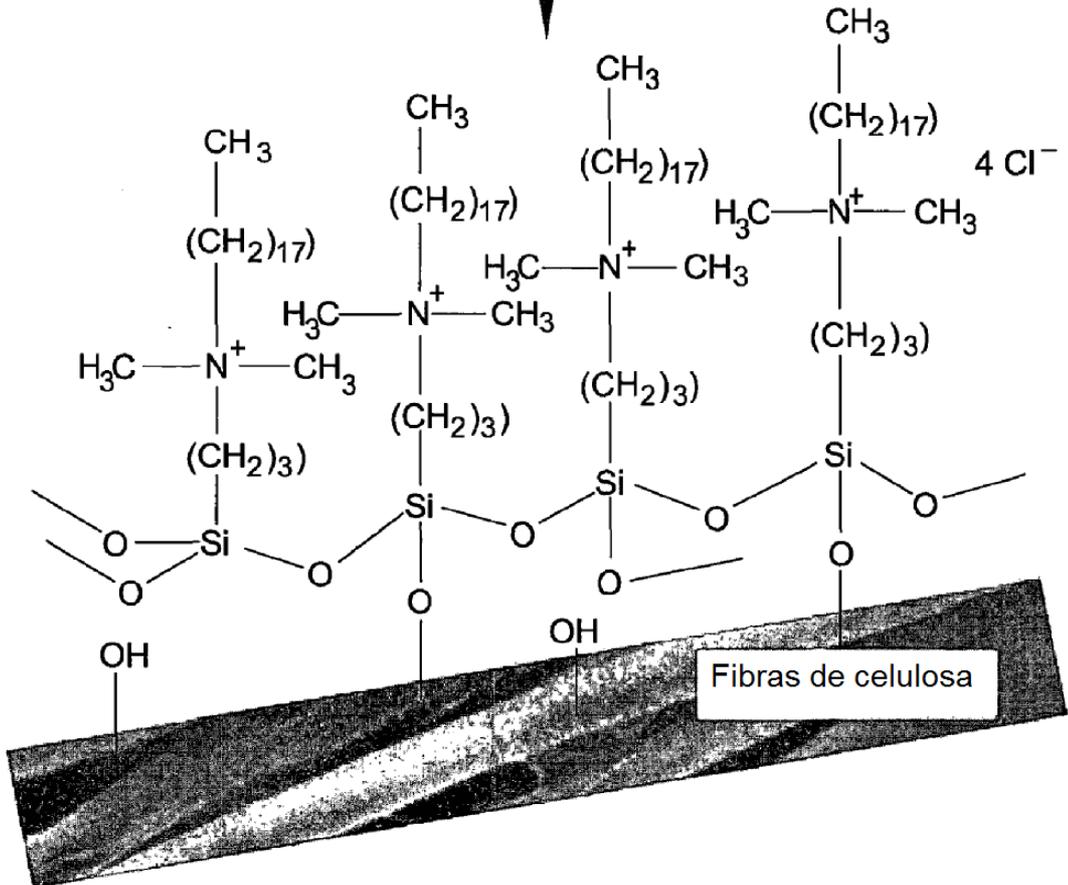


Fig.2

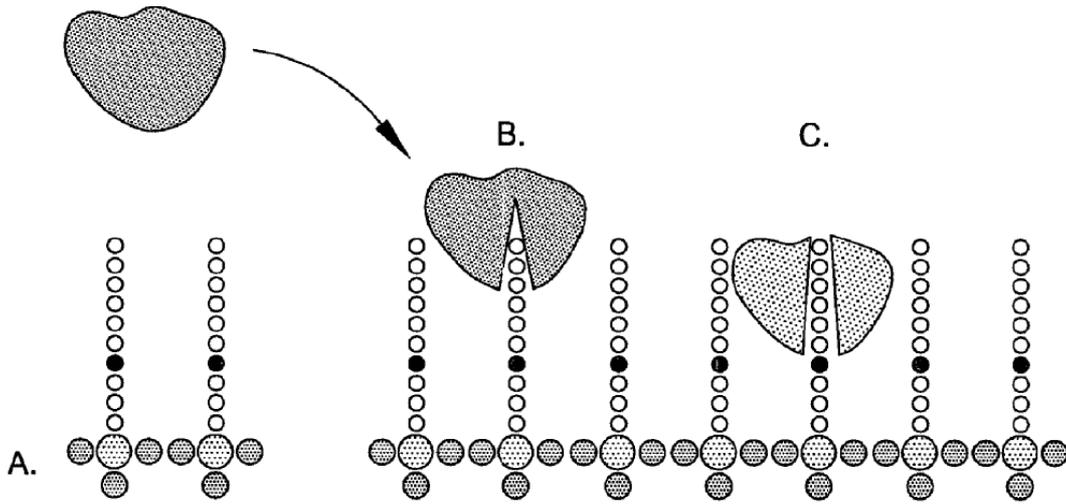


Fig.3

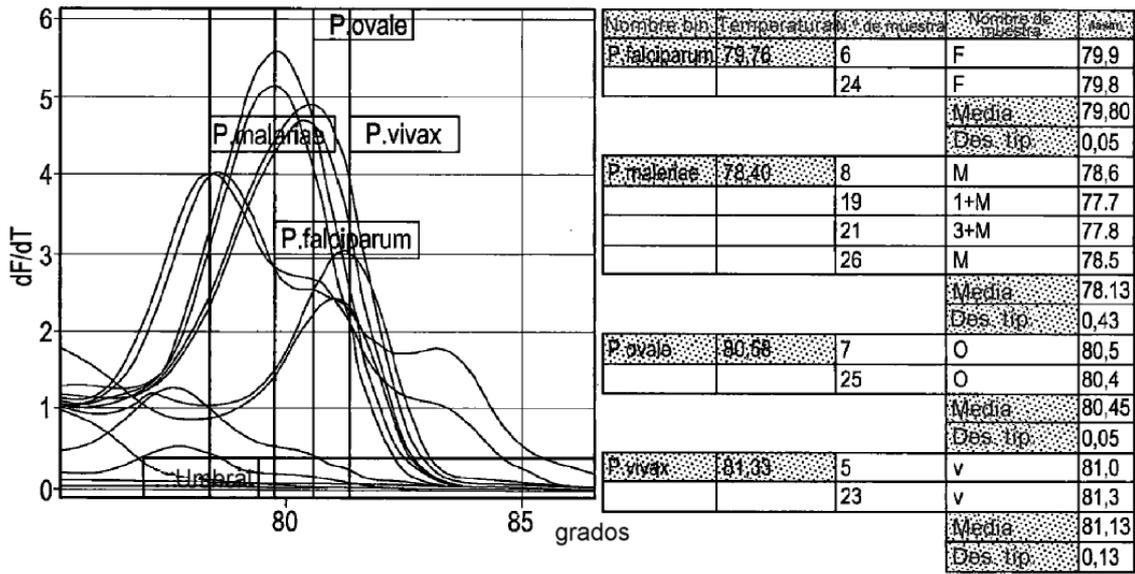


Fig.4

Muestra	GeneXpert	Genedrive						
		Proceso A		Proceso B		Proceso C		
		I	II	I	II	I	II	III
1	MTB RIF	MTB	MTB RIF	MTB	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF
2	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF
3	FALLIDO	FALLIDO	FALLIDO	FALLIDO	FALLIDO	FALLIDO	MTB	MTB
4	MTB RIF	FALLIDO	MTB RIF	FALLIDO	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF
5	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF	MTB RIF

Fig.5

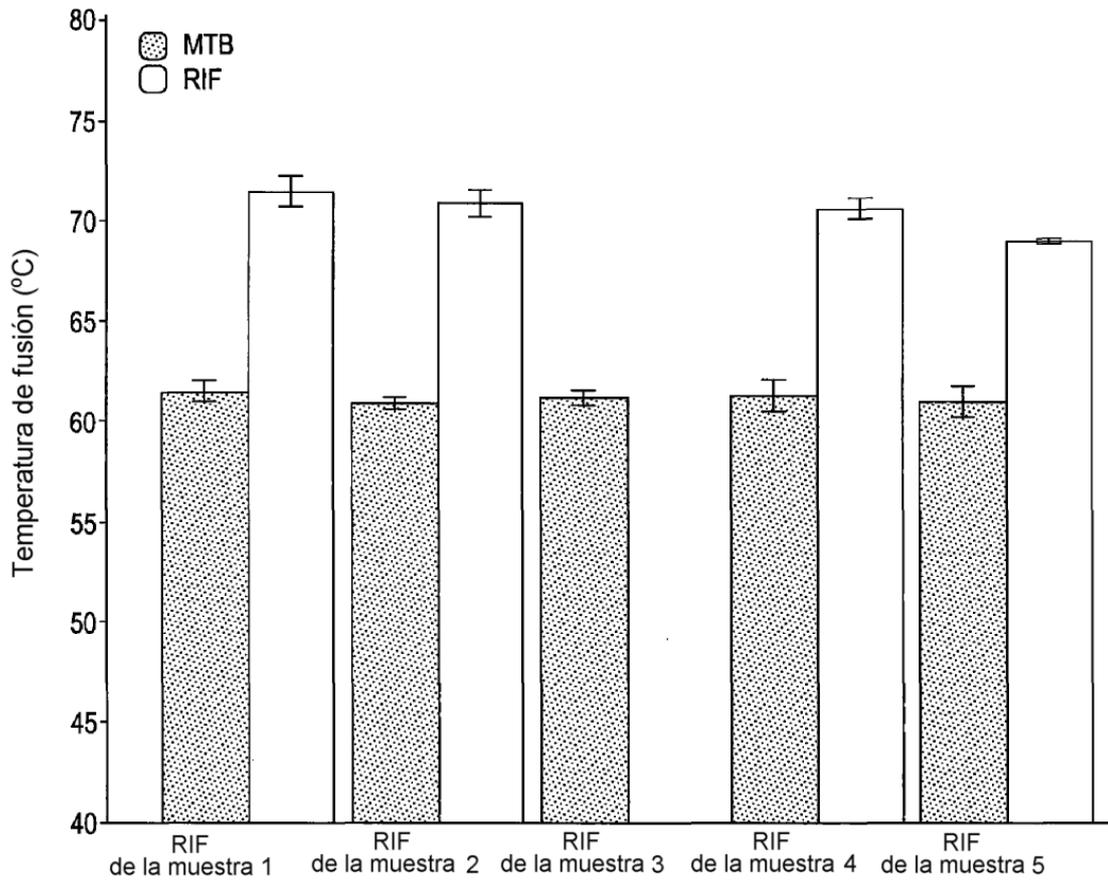


Fig.6

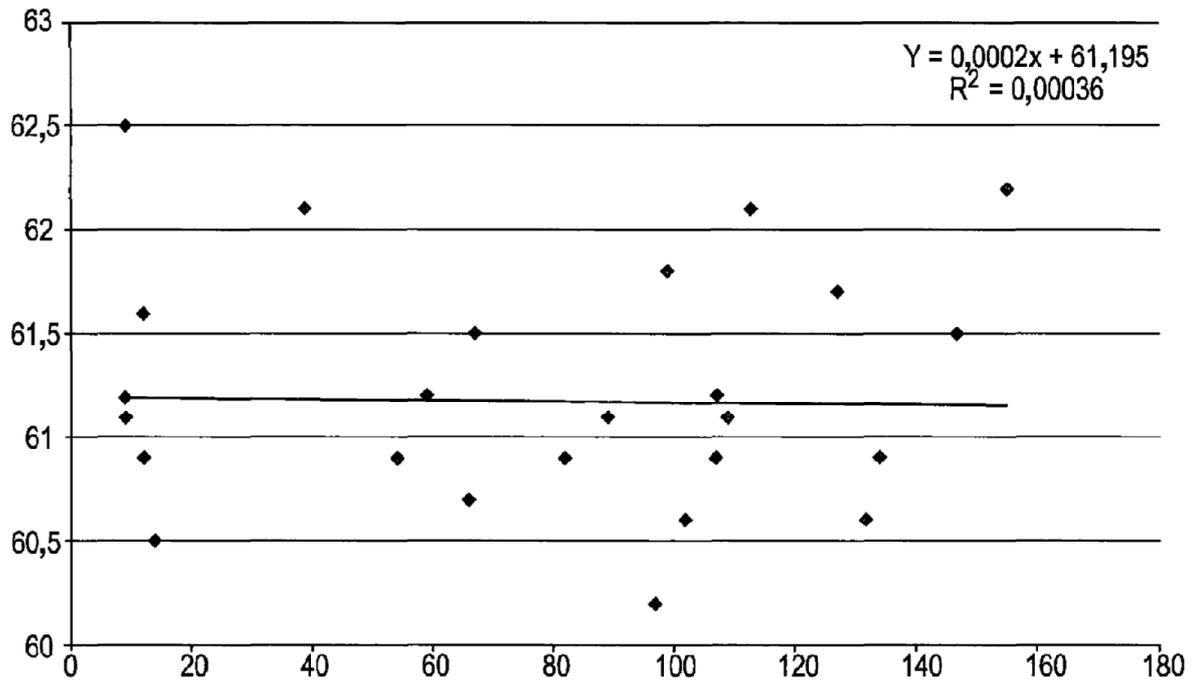


Fig.7

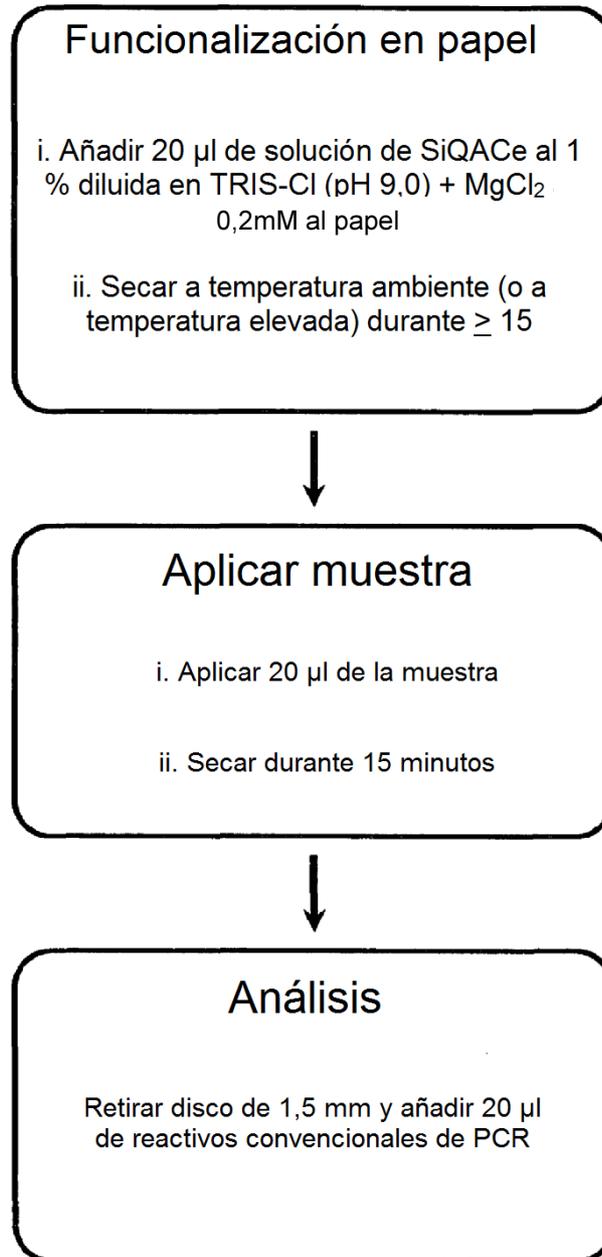


Fig.8

1 2 3 4 5 6 7 8

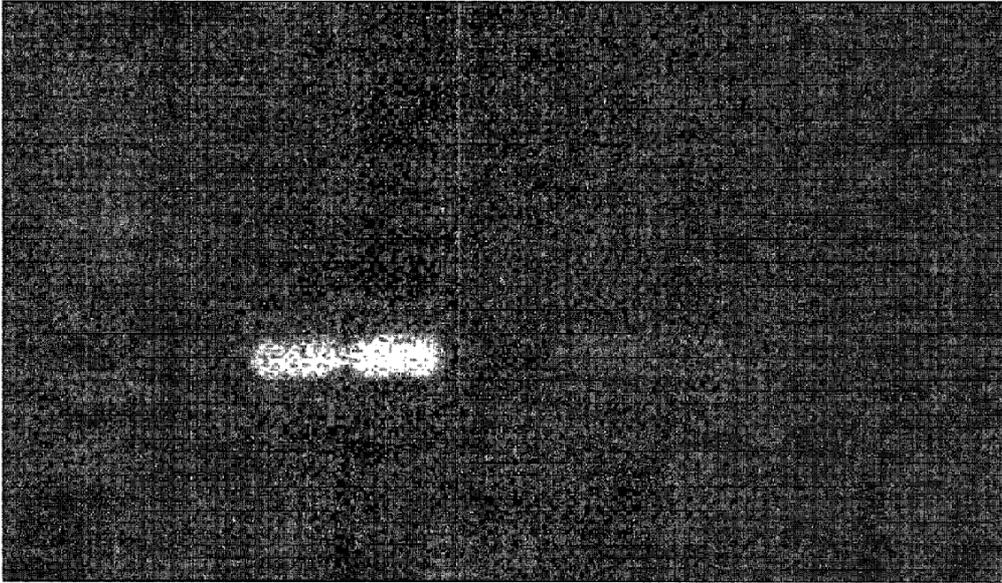
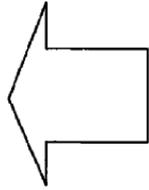


Fig.9

Pirosecuenciación



Amplificación

K103F con sentido 5' GGA ATA CCA CAT CCY GCA GG
 BiotK10GR antisentido 5' [Btm] AAT ATT GCT GGT GAT CCT TTC C

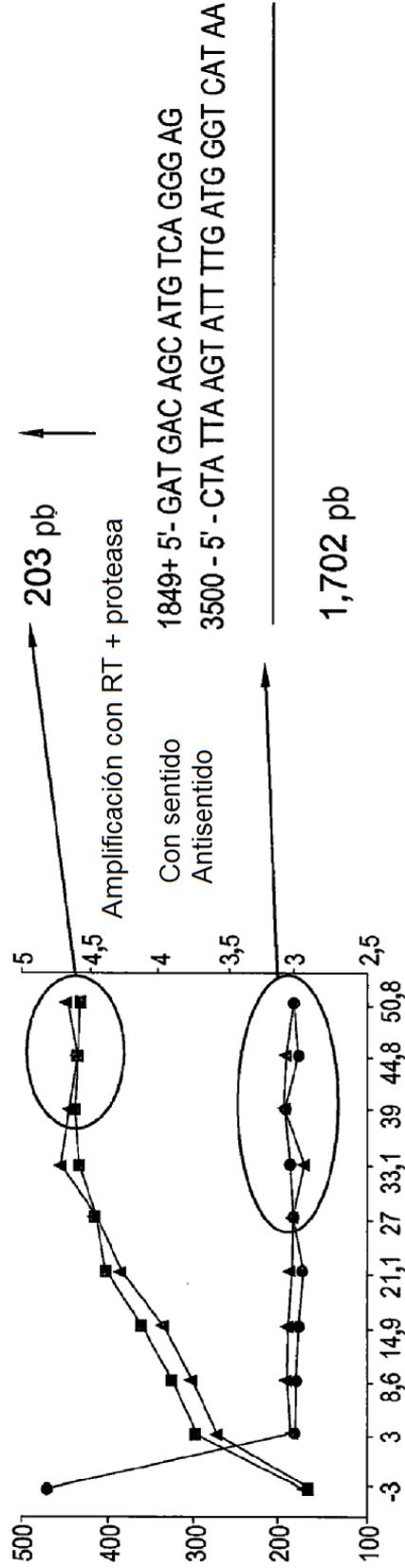


Fig.10



PyroMark ID - 110126 muestras Can Ruti HIV - 1/26/2011 11:43:20 AM
 Pocillo: A7 (110126 muestras Can Ruti HIV) (SSB)
 ID de entrada: VIH
 ID de muestra: VIH
 Resultado: AAATTGCCAA TGCCCAAGGC CAAATTGCAA TGATATAAA
 Calidad: comprobación (ventana de calidad: 20)
 0 superado, 1-37 comprobación, 38-39 fallido

▣ gb | FJ670525.1 | VIH-1 cepa ES X2425-2 de España, genoma completo
 Longitud = 8906

Valor = 30,2 bits (15), Esperado = 5,3
 Identidades = 15/15 (100%), Huecos = 0/15 (0%)
 Hebra: más/más

Consulta 22 AAATTGCAATGATAT 36
 |||
 Expuesta 6047 AAATTGCAATGATAT 6061

▣ gb | HQ110695.1 | VIH-1 clon 1993b6 gen de glucoproteína de envuelta (env) de EE.UU.
 cds parciales
 Longitud = 2613

Valor = 28,2 bits (14), Esperado = 21
 Identidades = 14/14 (100%), Huecos = 0/14 (0%)
 Hebra = más/más

Consulta 22 AAATTGCAATGATA 35
 |||
 Expuesta 384 AAATTGCAATGATA 397

▣ gb | HQ110694.1 | VIH-1 clon 1993b7 gen de glucoproteína de envuelta (env) de EE.UU.
 cds parciales
 Longitud = 2613

Valor = 28,2 bits (14), Esperado = 21
 Identidades = 14/14 (100%), Huecos = 0/14 (0%)
 Hebra = más/más

Consulta 22 AAATTGCAATGATA 35
 |||
 Expuesta 384 AAATTGCAATGATA 397

Fig.11