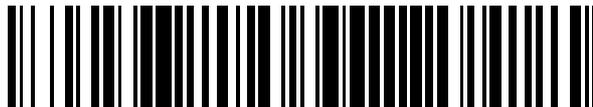


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 947**

51 Int. Cl.:

C12N 1/06 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2012 PCT/EP2012/001363**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012 WO12146338**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2012 E 12718901 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2702136**

54 Título: **Método para lisar células**

30 Prioridad:

27.04.2011 EP 11003449

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

01.03.2018

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**SLAGHUIS, JOERG;
ROSSMANITH, PETER;
FUCHS, SABINE;
MESTER, PATRICK, JULIAN y
WAGNER, MARTIN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 656 947 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para lisar células

5 La presente invención se relaciona con un método para lisar células, especialmente células bacterianas, y para aislar ácidos nucleicos. La muestra se trata con una solución de lisis que comprende al menos un líquido inmiscible con agua y se calienta. Después, la mezcla se enfría y se le agrega agua para que, después de que se enfríe, se genere un sistema de dos fases. Los ácidos nucleicos pueden hallarse en la fase acuosa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los ácidos nucleicos, tales como el ADN, se usan ampliamente en el campo de la biología molecular para investigación y análisis clínicos. Los métodos más comunes para analizar el ADN abarcan la transferencia Southern, la amplificación con métodos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación. Usando estos métodos, pueden determinarse diferencias entre las secuencias de ADN para ayudar a identificar genes, realizar selecciones, identificar patógenos o efectuar diagnósticos. En todos estos análisis, se necesitan muestras de ADN purificadas para obtener resultados consistentes y válidos.

15 El análisis y la manipulación in vitro de los ácidos nucleicos típicamente están precedidos por un paso donde se aíslan los ácidos nucleicos, es decir, se los separa de los contaminantes no deseados que pudieran interferir con el procesamiento ulterior. En la mayor parte de los procedimientos de investigación y diagnóstico relacionados con la biología molecular, primero es necesario extraer los ácidos nucleicos. En un protocolo de extracción de ADN típico, las células que contienen el ácido nucleico de interés se recolectan y se lisan.

20 La lisis celular es un proceso donde se liberan materiales de las células al destruir su membrana, que en particular puede comprender extraer materiales intracelulares para aislar ADN o ARN, el cual posteriormente ha de ser procesado con métodos como la PCR o los abordajes de clonación.

25 Los métodos para lisar células pueden clasificarse como mecánicos o no mecánicos. Los métodos mecánicos abarcan la ultrasonificación, la destrucción con homogenizadores, la compresión, por ejemplo, con prensas francesas, la descompresión o la pulverización, entre otros. Los métodos no mecánicos abarcan métodos químicos, térmicos o enzimáticos, entre otros. En los métodos químicos, que son métodos no mecánicos, pueden usarse, por ejemplo, ácidos, bases, detergentes, solventes o reactivos caotrópicos, entre otros. En especial, en los métodos químicos suelen usarse detergentes. Los detergentes alteran las membranas lipídicas dobles lisando las proteínas para liberar el contenido celular. Los detergentes tienden a usarse para lisar células animales. La mayoría de los detergentes desnaturalizan las proteínas. Sin embargo, para lisar las células es necesario agregar un reactivo por separado, que debe ser eliminado posteriormente. Una PCR puede inhibirse, por lo cual el proceso puede tener una duración importante.

En los métodos enzimáticos, se usan lisozimas o proteasas, entre otras.

35 Los métodos térmicos abarcan congelación-descongelación, calentamiento, impacto osmótico e impacto eléctrico, entre otros. Por ejemplo, las células pueden lisarse poniéndolas en contacto con objetos calientes, por ejemplo, placas, o repitiendo ciclos de congelación a -70°C y descongelación a temperatura ambiente.

En WO 96/36706 se describe la lisis de células de *E. coli* calentándolas a más de 80°C en una solución de lisis acuosa.

En US 2006/0141556 se describe la lisis de células mediante la aplicación de microondas para incrementar la temperatura. Los incrementos en la presión del vapor se impiden agregándole compuestos zwitteriónicos o líquidos iónicos a la muestra. Subsiste la necesidad de un método de lisis rápido y eficaz.

40 DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCION

Se ha determinado que las células, especialmente las células bacterianas, pueden lisarse eficazmente aplicando una solución de lisis que comprende un líquido inmiscible con agua, calentando la mezcla, y una vez que se enfría, agregándole agua o un amortiguador para generar un sistema de dos fases. Los ácidos nucleicos pueden hallarse en la fase acuosa y pueden someterse directamente a cualquier procesamiento ulterior, por ejemplo, una PCR.

45 Por lo tanto, la presente invención se relaciona con un método para lisar células bacterianas que comprende

(a) proveer una muestra que comprende células;

(b) agregarle a la muestra una solución de lisis que comprende al menos un aceite o un líquido iónico inmiscible con agua, de modo tal que el volumen de la solución de lisis sea al menos idéntico al volumen de la muestra;

(c) calentar la mezcla obtenida en el paso (b) a una temperatura superior a 80°C;

(d) si la temperatura en el paso (c) es superior a 100°C, enfriar la muestra a una temperatura inferior a 100°C; y

5 (e) agregarle a la mezcla agua o una solución amortiguadora acuosa para generar una fase líquida inmiscible con agua y una fase acuosa, donde al menos 50% de los ácidos nucleicos pueden hallarse en la fase acuosa.

En una forma de realización preferida, la mezcla se calienta a una temperatura de entre 100°C y 150°C.

En una forma de realización preferida, en el paso (d), la muestra se enfría a una temperatura de entre 20°C y 40°C.

10 En una forma de realización preferida, la solución de lisis agregada en el paso (b) comprende al menos un aceite o un líquido iónico. En una forma de realización más preferida, comprende al menos un líquido iónico.

En una forma de realización preferida, la solución de lisis agregada en el paso (b) comprende al menos un líquido iónico a base de bis(trifluorometilsulfonil)imida [Ntf₂]. Es decir, el anión del líquido iónico es bis(trifluorometilsulfonil)imida [Ntf₂]. En una forma de realización preferida, la solución de lisis agregada en el paso (b) comprende tris(pentafluoretil)trifluorofosfato de trihexil(tetradecil)fosfonio [Ttp][Fap] y/o bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-1-
15 metilpirrolidinio [bmpyr][Ntf₂].

En una forma de realización especialmente preferida para las células Gram positivas, antes de agregar la solución de lisis en el paso (b1), la muestra se preincuba con al menos un líquido iónico a base de N,N-dimetil-etanolamónio [DMAE]. Es decir, el catión del líquido iónico es N,N-dimetil-etanolamónio [DMAE]. En una forma de realización, después del paso (e), la mezcla resultante se incuba con una proteinasa. En una forma de realización, después del
20 paso (e) y la incubación opcional con una proteinasa, los ácidos nucleicos en la fase acuosa se someten directamente a una PCR, particularmente a una PCR en tiempo real, una electroforesis (en agarosa o poliacrilamida) o un abordaje de clonación, por ejemplo, unión o digestión con enzimas de restricción.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

25 El término "ácido nucleico", según se lo emplea en la presente, hace referencia a cualquier tipo de ADN o ARN conocido en la técnica. Los ejemplos abarcan ADN genómico, ARN mensajero y ADN plasmídico.

El término "amortiguador", según se lo emplea en la presente, hace referencia a soluciones o composiciones acuosas que resisten los cambios en el pH cuando se las combina con ácidos o bases en una solución o una composición. Esta resistencia a los cambios en el pH se debe a las propiedades de amortiguación de las soluciones. Por ende, las
30 soluciones o las composiciones que presentan actividad de amortiguación transitoria se denominan soluciones amortiguadoras o amortiguadores. Los amortiguadores generalmente no tienen una capacidad ilimitada para mantener el pH de una solución o una composición. Por el contrario, suelen ser útiles para mantener el pH dentro de determinados rangos, por ejemplo, entre 7 y 9. Típicamente, los amortiguadores son útiles para mantener el pH en un rango de un logaritmo sobre su pKa y debajo de él (véase, por ejemplo, C. Mohan, Buffers, A guide for the preparation and use of buffers in biological systems, CALBIOCHEM, 1999). Los amortiguadores y las soluciones amortiguadoras
35 suelen prepararse a partir de sales, o preferiblemente a partir de componentes no iónicos, por ejemplo, TRIS o HEPES. El amortiguador que se usa en el método de la invención preferiblemente se selecciona entre amortiguadores de fosfato, solución salina amortiguada con fosfato (PBS), amortiguadores de 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (TRIS), solución salina amortiguada con TRIS(TBS) o TRIS/EDTA (TE).

40 Las células que se lisan con el método de la invención son células bacterianas. Las células particularmente preferidas son células bacterianas Gram positivas o Gram negativas, y en especial se seleccionan entre *Listeria* spp., *S. aureus*, *Salmonella* spp., *C. jejuni* o *E. Coli*. La muestra de la invención puede ser cualquier muestra que comprenda células. La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de un alimento, un fluido corporal, particularmente sangre, plasma o suero, agua o un tejido. En una forma de realización preferida, la muestra se procesa a partir de una muestra compleja con un método que comprende

45 (a) proveer una muestra compleja;

(b) incubar la muestra con

- al menos un caótopo,

- un amortiguador y
- al menos un detergente; y

(c) aislar las células de la mezcla resultante por centrifugación o filtración. Pueden hallarse detalles sobre este procedimiento para aislar células de una muestra compleja en EP 2049677.

5 La muestra de la invención también puede generarse a partir de una muestra compleja con un método que comprende

(a) proveer una muestra compleja;

b) incubar la muestra con una solución de extracción que comprende al menos $MgCl_2$ y/o un líquido iónico; y

10 (c) aislar las células de la mezcla del paso (b), preferiblemente mediante una centrifugación, una unión por afinidad y/o una filtración. Pueden hallarse detalles sobre este procedimiento para aislar células de una muestra compleja en WO 2010145754.

Según la presente invención, una muestra compleja puede ser, por ejemplo, una muestra de un alimento, un fluido corporal, particularmente sangre, plasma o suero, agua o un tejido. Típicamente, las muestras complejas comprenden una matriz compleja (es decir, comprenden proteínas, lípidos e hidratos de carbono, entre otros) y/o tienen una viscosidad alta.

15 Según la presente invención, un líquido inmisible con agua es un aceite o un líquido iónico que no puede mezclarse con agua.

20 Un aceite apropiado para el método de la invención es cualquier aceite líquido a temperatura ambiente que tiene un punto de ebullición y un punto de inflamación superiores $150^{\circ}C$, más preferiblemente superiores a $200^{\circ}C$. Además, el aceite debe ser inmisible con agua. Esto implica que los aceites apropiados para el método de la invención forman un sistema de dos fases cuando se los mezcla con agua a temperaturas de entre $20^{\circ}C$ y $80^{\circ}C$. Los ejemplos de aceites apropiados abarcan aceites orgánicos, aceites minerales, aceites de silicona y aceites esenciales.

25 Los aceites orgánicos son aceites que comprenden al menos ácidos grasos y/o triglicéridos. Los aceites orgánicos líquidos a temperatura ambiente típicamente comprenden ácidos grasos monoinsaturados o poliinsaturados con cadenas que tienen 6-30 átomos de carbono. Los ejemplos de aceites orgánicos apropiados abarcan aceite de colza y aceite de ricino.

Los aceites minerales son aceites que comprenden aceites de parafina, aceites naftémicos y/o aceites aromáticos. Los aceites minerales preferidos abarcan aceites de parafina que comprenden una mezcla de alcanos más pesados, por ejemplo, aceite blanco pesado (CAS 8012-95-1).

30 Los aceites de silicona apropiados preferiblemente son aceites de silicona lineales que responden a la fórmula general $R(R_2SiO)_nSiR_3$, donde cada R es independientemente un residuo de C_1 - C_8 -alquilo lineal o ramificado, aunque preferiblemente todos los R en la molécula son idénticos. Un ejemplo de un aceite de silicio apropiado es el poli(dimetilsiloxano) (CAS 63148-62-9).

Los ejemplos de aceites esenciales abarcan terpenos y terpenoides.

35 Los líquidos iónicos o las sales líquidas que se usan en la presente invención son especies iónicas que típicamente consisten en un catión y un anión orgánicos. No contienen moléculas neutras y generalmente tienen puntos de fusión inferiores a 373 K .

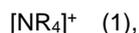
40 Los líquidos iónicos están siendo investigados exhaustivamente debido a que podrían tener múltiples aplicaciones. Véase, por ejemplo, R. Sheldon, Catalytic reactions in ionic liquids, Chem. Commun., 2001, 2399-2407; M. J. Earle, K. R. Seddon, Ionic liquids – Green solvent for the future, Pure Appl. Chem., 72 (2000), 1391-1398; P. Wasserscheid, W. Keim, Ionische Flüssigkeiten – neue Lösungen für die Übergangsmetallkatalyse, Angew. Chem., 112 (2000), 3926-3945; T. Welton, Room temperature ionic liquids – Solvents for synthesis and catalysis, Chem. Rev., 92 (1999), 2071-2083; R. Hagiwara, Ya. Ito, Room temperature ionic liquids of alkylimidazolium cations and fluoroanions, J. Fluorine Chem., 105 (2000), 221-227.

45 En general, en el método de la invención pueden usarse líquidos iónicos de la fórmula general K^+A^- conocidos en la técnica, particularmente inmiscibles con agua.

El anión A⁻ del líquido iónico suele seleccionarse entre haluros, tetrafluoroboratos, hexafluorofosfatos o derivados de éstos, por ejemplo, PF₃(R_f)₃, cianamida, tiocianato o imidas de la fórmula general [N(R_f)₂]⁻ o [N(XR_f)₂]⁻, donde R_f es un alquilo sustituido parcial o completamente con flúor que comprende 1-8 átomos de C y X representa SO₂ o CO. Los aniones haluros pueden seleccionarse entre cloruro, bromuro o yoduro, preferiblemente cloruro o bromuro.

- 5 No hay restricciones para el catión K⁺ en el líquido iónico. Sin embargo, se prefieren los cationes orgánicos, particularmente amonio, fosfonio, uonio, tiouronio, guanidinio o cationes heterocíclicos como el pirrolidinio.

Los cationes amónicos pueden describirse, por ejemplo, con la fórmula (1)



donde

- 10 cada R es independientemente

H, donde todos los sustituyentes R no pueden ser simultáneamente H, OR' o NR'₂, con la condición de que a lo sumo un sustituyente R en la fórmula (1) sea OR' o NR'₂,

un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-20 átomos de C,

un alqueno de cadena lineal o ramificada que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces dobles,

- 15 un alquino de cadena lineal o ramificada que tiene 2-20 átomos C y uno o más enlaces triples,

un cicloalquilo saturado o parcial o completamente insaturado que tiene 3-7 átomos de C, que puede estar sustituido con grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C,

- 20 donde uno o más R pueden estar parcial o completamente sustituidos con halógenos, particularmente -F y/o -Cl, o parcialmente sustituidos con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'₂, -SO₂NR'₂, -C(O)X, -SO₂OH, -SO₂X o -NO₂, y donde uno o dos átomos de carbono no adyacentes en R que no están en la posición α pueden reemplazarse por átomos y/o grupos de átomos seleccionados entre -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N⁺R'₂-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO₂NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'₂)NR'-, -PR'₂=N- o -P(O)R'-, donde R' es H, C₁-C₆-alquilo no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado, C₃-C₇-cicloalquilo o fenilo no sustituido o sustituido, y X es un halógeno.

Los cationes de fosfonio pueden describirse, por ejemplo, con la fórmula (2)

- 25 $[\text{PR}^2_4]^+ \quad (2),$

donde

cada R² es independientemente H, OR' o NR'₂,

un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-20 átomos de C,

un alqueno de cadena lineal o ramificada que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces dobles,

- 30 un alquino de cadena lineal o ramificada que tiene 2-20 átomos C y uno o más enlaces triples,

un cicloalquilo saturado o parcial o completamente insaturado que tiene 3-7 átomos de C, que puede estar sustituido con grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C,

- 35 donde uno o más R² pueden estar parcial o completamente sustituidos con halógenos, particularmente -F y/o -Cl, o parcialmente sustituidos con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'₂, -SO₂NR'₂, -C(O)X, -SO₂OH, -SO₂X o -NO₂, y donde uno o dos átomos de carbono no adyacentes en R² que no están en la posición α pueden reemplazarse por átomos y/o grupos de átomos seleccionados entre -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N⁺R'₂-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO₂NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'₂)NR'-, -PR'₂=N- o -P(O)R'-, donde R' es H, C₁-C₆-alquilo no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado, C₃-C₇-cicloalquilo o fenilo no sustituido o sustituido, y X es un halógeno.

- 40 Sin embargo, se excluyen los cationes de las fórmulas (1) y (2) donde cuatro o tres sustituyentes R y R² están completamente sustituidos con halógenos, por ejemplo, tris(trifluorometil)metilamonio, tetra(trifluorometil)amonio o tetra(nonafluorobutil)amonio.

Los cationes de uronio pueden describirse, por ejemplo, con la fórmula (3)



y los cationes de tiouronio pueden describirse con la fórmula (4)



5 donde

cada uno de R³ a R⁷ es independientemente hidrógeno, donde se excluye el hidrógeno para R⁵,

un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-20 átomos de C,

un alqueno de cadena lineal o ramificada que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces dobles,

un alquino de cadena lineal o ramificada que tiene 2-20 átomos C y uno o más enlaces triples,

10 un cicloalquilo saturado o parcial o completamente insaturado que tiene 3-7 átomos de C, que puede estar sustituido con grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C,

donde uno o más de los sustituyentes R³ a R⁷ pueden estar parcial o completamente sustituidos con halógenos, particularmente -F y/o -Cl, o parcialmente sustituidos con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'₂, -SO₂NR'₂, -C(O)X, -SO₂OH, -SO₂X o -NO₂, y donde uno o dos átomos de carbono no adyacentes en R³ a R⁷ que no están en la posición α pueden reemplazarse por átomos y/o grupos de átomos seleccionados entre -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N⁺R'₂-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO₂NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'₂)NR'-, -PR'₂=N- o -P(O)R'-, donde R' es H, C₁-C₆-alquilo no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado, C₃-C₇-cicloalquilo o fenilo no sustituido o sustituido, y X es un halógeno.

15

Los cationes de guanidinio pueden describirse con la fórmula (5)



donde

cada uno de R⁸ a R¹³ es independientemente hidrógeno, -CN, NR'₂, -OR',

un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-20 átomos de C,

un alqueno de cadena lineal o ramificada que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces dobles,

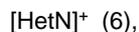
25 un alquino de cadena lineal o ramificada que tiene 2-20 átomos C y uno o más enlaces triples,

un cicloalquilo saturado o parcial o completamente insaturado que tiene 3-7 átomos de C, que puede estar sustituido con grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C,

donde uno o más de los sustituyentes R⁸ a R¹³ pueden estar parcial o completamente sustituidos con halógenos, particularmente -F y/o -Cl, o parcialmente sustituidos con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'₂, -SO₂NR'₂, -C(O)X, -SO₂OH, -SO₂X o -NO₂, y donde uno o dos átomos de carbono no adyacentes en R⁸ a R¹³ que no están en la posición α pueden reemplazarse por átomos y/o grupos de átomos seleccionados entre -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N⁺R'₂-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO₂NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'₂)NR'-, -PR'₂=N- o -P(O)R'-, donde R' es H, C₁-C₆-alquilo no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado, C₃-C₇-cicloalquilo o fenilo no sustituido o sustituido, y X es un halógeno.

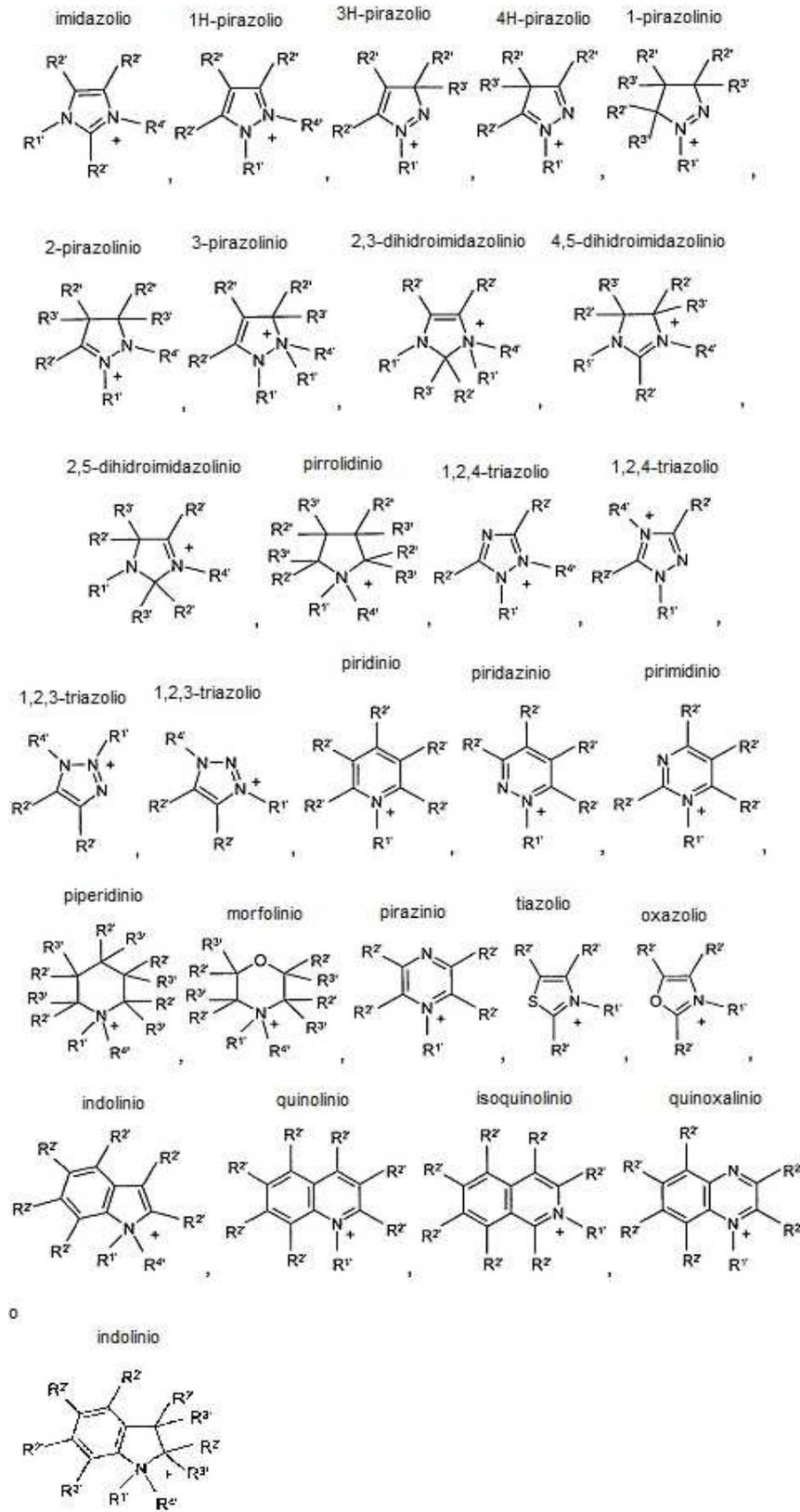
30

35 Además, pueden emplearse cationes de fórmula general (6)



donde

HetN⁺ es un catión heterocíclico seleccionado entre los siguientes:



donde cada uno de los sustituyentes R¹ a R⁴ es independientemente, hidrógeno, -CN, -OR', -NR'₂, -P(O)R'₂, -P(O)(OR')₂, -P(O)(NR'₂)₂, -C(O)R', -C(O)OR',

un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-20 átomos de C,

un alqueno de cadena lineal o ramificada que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces dobles,

un alquino de cadena lineal o ramificada que tiene 2-20 átomos C y uno o más enlaces triples,

5 un cicloalquilo saturado o parcial o completamente insaturado que tiene 3-7 átomos de C, que puede estar sustituido con grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C,

un heteroarilo, heteroaril-C₁-C₆-alquilo o aril-C₁-C₆-alquilo saturado o parcial o completamente insaturado,

donde los sustituyentes R¹, R², R³ y/o R⁴ también pueden formar juntos un sistema de anillos,

10 donde uno o más de los sustituyentes R¹ a R⁴ pueden estar parcial o completamente sustituidos con halógenos, particularmente -F y/o -Cl, o parcialmente sustituidos con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'₂, -SO₂NR'₂, -C(O)X, -SO₂OH, -SO₂X o -NO₂, pero donde R¹ y R⁴ no pueden estar completamente sustituidos por halógenos, y donde en los sustituyentes R¹ a R⁴, uno o dos átomos de carbono no adyacentes ni unidos a heteroátomos pueden ser reemplazados por átomos y/o grupos de átomos seleccionados entre -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N⁺R'₂-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO₂NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'₂)NR'-, -PR'₂=N- o -P(O)R'-, donde R' es H, C₁-C₆-alquilo no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado, C₃-C₇-cicloalquilo o fenilo no sustituido o sustituido, y X es un halógeno.

Para los fines de la invención, los sustituyentes completamente insaturados también se consideran sustituyentes aromáticos.

20 Los líquidos iónicos inmiscibles con agua que son apropiados para el método de la invención son líquidos iónicos que no pueden mezclarse con agua. Esto implica que los líquidos iónicos apropiados para el método según la presente invención forman un sistema de dos fases cuando se los combina con agua a una temperatura de entre 20°C y 80°C. Se describen líquidos iónicos hidrófobos inmiscibles con agua, por ejemplo, en US 5827602.

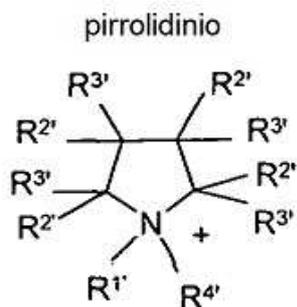
Los líquidos iónicos usados en la invención preferiblemente son líquidos, es decir, preferiblemente son líquidos a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

25 En una forma de realización preferida, el anión A⁻ del líquido iónico inmiscible con agua se selecciona entre imidas de las fórmulas generales [N(R_i)₂]⁻, [N(XR_i)₂]⁻ o PF₃(R_i)₃, donde Rⁱ es un alquilo parcial o completamente sustituido con flúor que comprende 1-8 átomos de C y X representa SO₂ o CO.

En una forma de realización más preferida, el anión A⁻ del líquido iónico inmiscible con agua es tris(pentafluoretil)trifluorofosfato [Fap], y en especial es bis(trifluormetilsulfonyl)imida [Ntf₂].

30 Se ha descubierto que el anión A⁻ del líquido iónico inmiscible con agua es fundamental para determinar si un líquido iónico es apropiado como catión para el método de la invención. Se ha descubierto que los líquidos iónicos que comprenden aniones tris(pentafluoretil)trifluorofosfato [Fap], y especialmente aquellos que comprenden un anión bis(trifluormetilsulfonyl)imida [Ntf₂], no solamente proveen una fase inmiscible con agua cuando se los combina con cationes apropiados, sino que también permiten incrementar la cantidad de ácidos nucleicos en la fase acuosa.

Cuando se usa un anión [Fap] o [Ntf₂], el catión del líquido iónico inmiscible con agua preferiblemente es



35 donde cada uno de los sustituyentes R¹ a R⁴ es independientemente hidrógeno o un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-20 átomos C, o

un catión de fosfonio de fórmula (2)

$[\text{PR}_2\text{4}]^+$ (2),

donde cada R_2 es independientemente H o un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-20 átomos de carbono. Los líquidos iónicos inmiscibles con agua preferidos para usar en la invención abarcan tris(pentafluoretil)trifluorofosfato de trihexil(tetradecil)fosfonio $[\text{Ttp}][\text{Fap}]$, bis(trifluorometilsulfonil)imida de trihexil(tetradecil)fosfonio, bis(trifluorometilsulfonil)imida de N-butildietanolamonio y especialmente bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-1-metilpirrolidinio $[\text{bmpyrr}][\text{Ntf}_2]$.

5 La presente invención se relaciona con un método para lisar térmicamente células bacterianas en presencia de al menos un aceite o un líquido iónico inmiscible con agua. El líquido no solamente se usa durante la lisis térmica, sino también para aislar los ácidos nucleicos de la mezcla después de la lisis, lo cual es más importante.

15 La muestra con las células que se desea lisar se pone en contacto con una solución de lisis que comprende al menos un líquido inmiscible con agua. Típicamente, la muestra se pone en contacto con un volumen de la solución de lisis que es al menos idéntico al volumen de la muestra. Eso implica, por ejemplo, que si la muestra tiene un volumen de 5 μl , se la pone en contacto con al menos 5 μl de la solución de lisis. En una forma de realización preferida, el volumen de la solución de lisis es al menos el triple del volumen de la muestra. En una forma de realización más preferida, es al menos 5 veces el volumen de la muestra.

En una forma de realización preferida, la solución de lisis solamente comprende un líquido inmiscible con agua, pero también puede comprender sustancias adicionales, por ejemplo, uno o más líquidos inmiscibles con agua adicionales. En una forma de realización preferida, la solución de lisis comprende al menos un líquido iónico inmiscible con agua.

20 La mezcla de la muestra y la solución de lisis se calienta posteriormente a una temperatura superior a 80°C para efectuar la lisis térmica. En una forma de realización preferida, se la calienta a una temperatura de entre 80°C y 200°C, más preferiblemente entre 100°C y 150°C.

El calentamiento puede realizarse por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, en un bloque de calentamiento, con microondas, bajo una manta calefactora o con ultrasonido.

25 Típicamente, la mezcla se incuba durante un período breve a la temperatura deseada. La duración de la incubación típicamente varía entre 2 segundos y 5 minutos, dependiendo de la temperatura seleccionada, el tipo de células que se desea lisar y el volumen de la mezcla.

30 Para extraer los ácidos nucleicos, la mezcla se pone en contacto con agua o una solución amortiguadora acuosa. Cuando la mezcla de la muestra y la solución de lisis se calienta a una temperatura superior a 100°C, es necesario enfriarla a una temperatura inferior 100°C antes de agregar el agua o la solución amortiguadora acuosa.

En una forma de realización preferida, independientemente de la temperatura a la que se ha realizado la lisis térmica, la mezcla se enfría posteriormente a una temperatura inferior a 50°C, preferiblemente entre 4°C y 40°C, más preferiblemente entre 20°C y 40°C, antes de agregar el agua o la solución amortiguadora acuosa.

35 La adición del agua o la solución amortiguadora acuosa a la mezcla da como resultado la formación de un sistema de dos fases: una fase que comprende el líquido inmiscible con agua, una fase acuosa que comprende el agua o la solución amortiguadora acuosa.

El pH del agua o la solución amortiguadora acuosa que se agrega típicamente es de entre 4 y 12. En una forma de realización preferida, es de entre 6 y 10, y más preferiblemente es de entre 6,5 y 8,5.

40 Típicamente, no hay un límite para la cantidad de agua o solución amortiguadora acuosa que se le agrega a la mezcla de la muestra y la solución de lisis. Preferiblemente, el volumen del agua o la solución amortiguadora acuosa es entre 1/10 y 10 veces el volumen de la mezcla de la muestra y la solución de lisis. Eso implica que la proporción preferiblemente es de entre 1:10 y 10:1. En una forma de realización más preferida, es de entre 1:2 y 2:1.

Después de agregar el agua o la solución amortiguadora acuosa, la mezcla preferiblemente se agita para proveer una mezcla completa de las dos fases. Esto puede realizarse, por ejemplo, por agitación o centrifugación.

45 Suele haber residuos celulares y proteínas desnaturalizadas en la interfase entre la fase líquida acuosa y la fase inmiscible con agua. La fase acuosa puede ser separada para aislar los ácidos nucleicos, o bien puede ser sometida directamente a un análisis, tal como una PCR en tiempo real.

Se ha descubierto que, usando líquidos iónicos con un anión [Ntf₂], puede incrementarse especialmente la cantidad de ácidos nucleicos en la fase acuosa. Cuando se usan otros líquidos o aceites iónicos inmiscibles en agua según la invención, la cantidad de ácidos nucleicos que pueden hallarse en la fase acuosa típicamente es de aproximadamente 50% o más, pero cuando se usan líquidos iónicos con un anión [Ntf₂], la cantidad de ácidos nucleicos en la fase acuosa típicamente supera 70% (con relación a la cantidad total de ácidos nucleicos en la mezcla).

En una forma de realización preferida, antes de agregar la solución de lisis, la muestra puede preincubarse con sustancias para favorecer la lisis. Las sustancias para favorecer la lisis abarcan, por ejemplo, detergentes, sustancias caotrópicas y líquidos iónicos miscibles en agua. Se ha descubierto que una preincubación con sustancias que comprenden cationes de amonio, especialmente líquidos iónicos miscibles con agua, resulta especialmente favorable para las muestras que comprenden células bacterianas Gram positivas. Los ejemplos de sustancias apropiadas que comprenden cationes de amonio abarcan las que comprenden un catión [NR₄]⁺ de fórmula (1),

donde

cada R es independientemente H,

un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-20 átomos de C,

un alqueno de cadena lineal o ramificada que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces dobles,

un alquino de cadena lineal o ramificada que tiene 2-20 átomos C y uno o más enlaces triples,

un cicloalquilo saturado o parcial o completamente insaturado que tiene 3-7 átomos de C, que puede estar sustituido con grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C,

donde uno o más R pueden estar parcial o completamente sustituidos con halógenos, particularmente -F y/o -Cl, o parcialmente sustituidos con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'₂, -SO₂NR'₂, -C(O)X, -SO₂OH, -SO₂X o -NO₂, y donde uno o dos átomos de carbono no adyacentes en R que no están en la posición α pueden reemplazarse por átomos y/o grupos de átomos seleccionados entre -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N⁺R'₂-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO₂NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'₂)NR'-, -PR'₂=N- o -P(O)R'-, donde R' es H, C₁-C₆-alquilo no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado, C₃-C₇-cicloalquilo o fenilo no sustituido o sustituido, y X es un halógeno.

Las sustancias apropiadas que comprenden un catión [NR₄]⁺ de fórmula (1) y no son líquidos iónicos abarcan, por ejemplo, amoníaco acuoso, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl o NH₄OOH.

En una forma de realización más preferida, la preincubación se realiza con al menos un líquido iónico a base de N,N-dimetil-2-hidroxietilamonio [DMAE]. El catión de estos líquidos iónicos es [DMAE]. El anión preferiblemente se selecciona entre propionato, acetato, octanoato, 2-hidroxiacetato, trifluoroacetato o 2-hidroxibutirato. Los líquidos iónicos más preferidos para la preincubación son el 2-hidroxibutirato de N,N-dimetil-2-hidroxietilamonio, y especialmente el propionato de N,N-dimetil-2-hidroxietilamonio.

La preincubación típicamente se realiza agregándole las sustancias para favorecer la lisis, por ejemplo, el líquido iónico, a la muestra. Las sustancias para favorecer la lisis pueden agregarse como sustancias puras o pueden mezclarse con agua o una solución amortiguadora acuosa. El volumen que se agrega típicamente es de entre 10 veces y 1/10 del volumen de la muestra. Si se usan líquidos iónicos como sustancias para favorecer la lisis, preferiblemente se los mezcla con agua o un amortiguador acuoso con antelación y luego se los agrega a la muestra. La cantidad del líquido iónico en la fase acuosa típicamente es de entre 0,05 y 6 M, preferiblemente entre 0,5 y 2 M. A la muestra pueden agregársele una o más sustancias para favorecer la lisis. Después de agregar las una o más sustancias para favorecer la lisis (por ejemplo, propionato de N,N-dimetil-2-hidroxietilamonio), la mezcla típicamente se incuba durante entre 5 y 30 minutos a temperaturas de entre 20°C y 100°C. En una forma de realización preferida, la incubación se realiza durante entre 10 y 20 minutos a una temperatura de entre 70°C y 90°C.

Después, para realizar la lisis térmica de la invención, se mezcla el líquido inmiscible con agua con la muestra y la sustancia para favorecer la lisis.

En otra forma de realización preferida, después de realizar la lisis térmica y agregar agua o una solución amortiguadora acuosa, el sistema de dos fases puede tratarse con una proteinasa para fijar los ácidos nucleicos libres que se adhieren a las proteínas o los residuos celulares. La proteinasa preferida es la proteinasa K. Típicamente, la mezcla de las dos fases se incuba con la proteinasa a temperaturas de entre 20°C y 60°C, preferiblemente aproximadamente 56°C, durante entre 10 y 60 minutos, preferiblemente entre 10 y 30 minutos. Después, el material sólido puede eliminarse por centrifugación. La fase acuosa con los ácidos nucleicos puede aislarse y someterse a un análisis adicional. Para inactivar la proteinasa después de usarla, la muestra típicamente se trata con un inactivador o se calienta. En la técnica

se conocen diversos métodos para inactivar las proteinasas. Un método preferido es la inactivación con calor, para lo cual puede calentarse la muestra a aproximadamente 100°C. Un tratamiento con una proteinasa es especialmente útil para incrementar el rendimiento del ADN genómico aislado. En general, no es necesario para aislar plásmidos u oligonucleótidos más cortos, que normalmente no se adhieren a las proteínas ni los residuos celulares.

5 Típicamente, con el procedimiento de la invención se provee una fase acuosa donde los ácidos nucleicos están presentes con una pureza suficiente para someterlos directamente a una PCR, tal como una PCR en tiempo real, una electroforesis (en agarosa o poliacrilamida) o un abordaje de clonación, por ejemplo, unión o digestión con enzimas de restricción.

10 Para las aplicaciones donde se necesita una pureza especialmente alta o cuando la muestra original comprende impurezas específicas, puede agregársele una tercera fase a la mezcla después de la lisis y la separación. La tercera fase puede ser, por ejemplo, un solvente orgánico o una fase polimérica inmiscible con la fase acuosa y la fase líquida inmiscible con agua. Si se usa un aceite como líquido inmiscible con agua, la tercera fase también puede comprender un líquido iónico inmiscible con el agua, y si el líquido inmiscible con agua comprende un líquido iónico inmiscible con el agua, la tercera fase puede ser, por ejemplo, un aceite. La tercera fase ofrece posibilidades adicionales para extraer las impurezas de la fase acuosa, que de otro modo no podrían ser separadas de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, las impurezas orgánicas pueden extraerse agregando una tercera fase compuesta por un solvente orgánico. Por ejemplo, las proteínas pueden removerse agregando una fase que comprende polímeros.

15 Otro abordaje para incrementar incluso más la pureza de los ácidos nucleicos consiste en ajustar el pH o proveer un gradiente de densidad o un gradiente de sal antes de separar la fase acuosa y la fase líquida inmiscible con agua, de manera tal que los productos secundarios precipiten o se transfieran a la interfase entre la fase acuosa y la fase de líquido inmiscible con agua. En especial, si se usan líquidos iónicos como líquidos inmiscibles con agua, también puede usarse una centrifugación para eliminar los productos secundarios precipitados desde la fase acuosa, ya que ésta se halla sobre la fase del líquido iónico.

20 Los ácidos nucleicos aislados con el método según la presente invención pueden usarse para analizar cuantitativa o cualitativamente las células en la muestra. Esto puede realizarse, por ejemplo, con una PCR, particularmente una PCR en tiempo real, una electroforesis (en agarosa o poliacrilamida) o un abordaje de clonación, por ejemplo, unión o digestión con enzimas de restricción.

Para evaluar o verificar la eficacia del aislamiento, puede incrementarse la cantidad de ácidos nucleicos en la muestra.

30 El método de la invención facilita y acelera significativamente la lisis celular y la extracción de los ácidos nucleicos. La duración del procedimiento suele ser de entre 10 y 20 minutos sin una preincubación o entre 50 y 60 minutos con una preincubación. Además, con un sistema de dos o incluso tres fases pueden eliminarse automáticamente las impurezas, que se transfieren a la fase líquida inmiscible con agua (como sales cuando se usan líquidos iónicos inmiscibles con agua), quedan atrapadas en la interfase entre la fase líquida inmiscible con agua y la fase acuosa (por ejemplo, proteínas más grandes o residuos celulares) o pueden eliminarse agregando selectivamente una tercera fase (por ejemplo, agregando solventes orgánicos para eliminar impurezas orgánicas), entre otras posibilidades.

35 También se describe un conjunto de elementos para lisar células que comprende al menos un recipiente con un líquido inmiscible con agua y un recipiente con una proteinasa. En una forma de realización preferida, la proteinasa es la proteinasa K. En otra forma de realización preferida, el líquido inmiscible con agua es un líquido iónico inmiscible con agua. El conjunto de elementos también puede comprender un recipiente con al menos un líquido iónico a base de N,N-dimetil-2-hidroxietilamonio [DMAE], preferiblemente propionato de N,N-dimetil-2-hidroxietilamonio. Un recipiente es cualquier caja, botella o medio apropiado para almacenar y envasar el líquido inmiscible con agua, el aceite o una proteinasa. Los recipientes apropiados son conocidos en la técnica.

El método de la invención es un sistema de lisis muy rápido y eficaz. La presente invención se ilustra con mayor detalle en las figuras y los ejemplos, pero no está limitada por ellos.

45 En la figura 1 se representa la estructura química de los iones que forman parte de los líquidos iónicos preferidos.

La figura 2 es un ejemplo de un esquema de flujo de los pasos que preferiblemente se realizan para lisar células Gram negativas. En este caso, generalmente no es necesaria una preincubación.

La figura 3 es un ejemplo de un esquema de flujo de los pasos que preferiblemente se realizan para lisar células Gram positivas. En este caso, con una preincubación típicamente se incrementa el rendimiento de los ácidos nucleicos.

En la figura 4 se proveen los resultados que se obtuvieron al lisar *Salmonella typhimurium* con incubaciones a diversas temperaturas y con diversas duraciones, en comparación con un método convencional, el conjunto de elementos Macherey & Nagel NucleoSpin®.

EJEMPLOS

- 5 En los siguientes ejemplos se representan las aplicaciones prácticas de la invención.

Salmonella y *Escherichia*

Lisis: 1 minuto a 120°C o 140°C en bis(trifluorometilsulfonyl)imida de 1-butil-1-metilpirrolidinio (bmpyrr Ntf₂)

Listeria

Preincubación con propionato de N,N-dimetil-2-hidroxietilamonio (DMAE prop) durante 10 minutos a 80°C.

- 10 Lisis: 1 minuto a 140°C en bis(trifluorometilsulfonyl)imida de 1-butil-1-metilpirrolidinio (bmpyrr Ntf₂), y luego 20 minutos con proteinasa K

Materiales y métodos

Si no se indica lo contrario, todos los productos químicos y los líquidos iónicos (IL) se adquirieron en Merck KGaA (Darmstadt, Alemania).

- 15 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo. Se usa *L. monocytogenes* EGDe (1/2a, número interno 2964) como organismo modelo para las bacterias Gram positivas. Se usa *S. typhimurium* (NCTC 12023), *E. coli* TOP10F' y *E. coli* TOP10F' +pPL2/IAC (Fruhirth et al., 2011) como organismos modelo para las bacterias Gram negativas. Todas las cepas se mantienen a -80°C usando la tecnología MicroBank (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Canadá). *L. monocytogenes* EGDe, *S. typhimurium* y *E. coli* TOP10F' +pPL2/IAC son parte de la colección de cepas bacterianas del Instituto de Higiene de la Leche del Departamento de Salud Pública Veterinaria y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Medicina Veterinaria de Viena, Austria. *E. coli* TOP10F' fue provista por Invitrogen GmbH (Lofer, Austria). Todas las cepas bacterianas se cultivan durante la noche en un caldo de triptona de soja con 0,6% (p/v) de extracto de levadura (TSB-Y, Oxoid, Hampshire, Reino Unido) a la temperatura óptima para su crecimiento, 37°C.

- 25 Aparato para los experimentos de destrucción de células. Como tubo para volúmenes pequeños (100 µl) de IL, se usa un micro cartucho de vidrio de 0,3 ml para botellas con rosca (40 x 6 mm, Fisherbrand, Fisher Scientific Austria GmbH, Viena, Austria) en un dispositivo para HPLC convencional.

- 30 Para realizar un calentamiento a más de 100°C, se fabricó un bloque de aluminio con orificios perforados ajustado a las dimensiones de los micro cartuchos y se lo colocó en un agitador magnético (IKAMAG® ECA, IKA-Labor Technik, Staufen i. Br., Alemania.). Las temperaturas reales siempre se miden directamente con un termómetro de metal (amadigit ad14th, Amarell, Kreuzwertheim, Alemania), con el IL correspondiente en un tubo de referencia.

Preparación de bacterias y experimentos de destrucción de células

Gram negativas

- 35 Preparación de *S. typhimurium* y *E. coli*. Se recolectan bacterias cultivadas durante una noche mediante una centrifugación durante 5 minutos a 6000 G, se las lava tres veces con ddH₂O y se las resuspende en ddH₂O en 1/20 del volumen inicial. Se colocan 10 µl del cultivo resuspendido en 100 µl de bmpyrr NTF₂, se cubre con papel de aluminio y se realizan incubaciones con diversas duraciones y temperaturas. Después de la incubación, se transfiere la "suspensión" a un tubo de 2 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), se agregan 250 µl de ddH₂O dos veces a los IL y se mezcla con una pipeta durante unos segundos. La suspensión se centrifuga brevemente y se somete la fase superior directamente a una PCR en tiempo real.

- 40 Gram positivas

- 45 Preparación de *L. monocytogenes*. Se recolectan bacterias cultivadas durante una noche mediante una centrifugación durante 5 minutos a 6000 G, se las lava tres veces con ddH₂O y se las resuspende en 1/20 del volumen inicial en una solución con 20% de propionato de DMAE (la duración y la temperatura se proveen en la tabla 1). Se colocan 10 µl del cultivo resuspendido en 100 µl de bmpyrr NTF₂, se cubre con papel de aluminio y se realizan incubaciones con diversas duraciones y temperaturas. Después de la incubación, se transfiere la "suspensión" a un tubo de 2 ml

(Eppendorf, Hamburgo, Alemania), se agregan 250 µl de ddH₂O dos veces a los IL y se mezcla con una pipeta durante unos segundos. La suspensión se centrifuga brevemente y se somete la fase superior directamente a una PCR en tiempo real.

5 Muestras control para los métodos de destrucción de células. Se emplean diez microlitros de la misma suspensión bacteriana usada en los métodos de destrucción de células para aislar ADN con el conjunto de elementos para tejidos NucleoSpin®, según un protocolo apropiado para bacterias Gram positivas. El paso con el amortiguador de pre-lisis (que comprende una lisozima) se prolonga durante una hora, mientras que el tratamiento con la proteinasa K se prolonga durante la noche. El paso final del protocolo ha sido modificado. En lugar de un lavado con 100 µl del amortiguador de elución BE precalentado (70°C), se realizan dos lavados con 50 µl de ddH₂O precalentada para eluir el ADN de la columna (Mayrl et al., 2009). Finalmente, se agregan 400 µl de ddH₂O para obtener un volumen idéntico al usado en los experimentos de destrucción de células.

15 Cuantificación del ADN de referencia en tiempo real por PCR. Se usa un mililitro de un cultivo de bacterias puras de cada especie para aislar ADN con el conjunto de elementos para tejidos NucleoSpin®, según un protocolo apropiado para bacterias Gram positivas. El paso con el amortiguador de pre-lisis (que comprende una lisozima) se prolonga durante una hora, mientras que el tratamiento con la proteinasa K se prolonga durante la noche. El paso final del protocolo ha sido modificado. En lugar de un lavado con 100 µl del amortiguador de elución BE precalentado (70°C), se realizan dos lavados con 50 µl de ddH₂O precalentada para eluir el ADN de la columna (Mayrl et al., 2009). La concentración del ADN se determina fluorimétricamente con un aparato Hoefer DyNA Quant 200 (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA, EEUU).

20 PCR en tiempo real. *S. typhimurium* se analiza según publicaciones precedentes (Mester et al., 2010; Roeder et al., 2010). La PCR en tiempo real con *L. monocytogenes* se realiza como se describió con anterioridad, usando como blanco un fragmento de 274 pares de bases del gen *prfA* de *L. monocytogenes* (D'Agostino et al., 2004; Rossmannith et al., 2006). El plásmido pPL2/IAC, que contiene un control interno para la amplificación, se somete a una PCR en tiempo real usando el protocolo para *L. monocytogenes* y una sonda pLuc-LM5 (Fruhirth et al. 2011). *E. coli* se analiza según el protocolo de Kaclikova et al. (2005).

En la figura 4 se representan los resultados la lisis de *Salmonella typhimurium* después de incubaciones con duraciones y temperaturas diferentes.

En la tabla 1 se provee un resumen de las condiciones de las reacciones para extraer ADN genómico de diversas cepas bacterianas.

30 En la tabla 2 se provee un resumen de las condiciones de las reacciones para extraer ADN plasmídico a partir de *E. Coli*.

En ambas tablas, se provee el rendimiento promedio en comparación con el obtenido con el conjunto de elementos para tejidos NucleoSpin®.

Cepas bacterianas	Líquido de preincubación	Líquido de incubación	Temperatura/duración de la incubación	Postincubación	Rendimiento promedio (%)
<i>S. typhimurium</i> (NCTC 12023)		bmpyrr Ntf ₂	80°C/1 minuto		88
		bmpyrr Ntf ₂ **	120°C/1 minuto		117
		bmpyrr Ntf ₂	150°C/1 minuto		109
		bmpyrr Ntf ₂	180°C/1 minuto		94
		Aceite de colza	120°C/1 minuto		92

ES 2 656 947 T3

<i>E. coli</i> TOP10F'		bmpyrr Ntf ₂	120°C/1 minuto		94
		bmpyrr Ntf ₂	140°C/1 minuto		131
		bmpyrr Ntf ₂	160°C/1 minuto		119
	DMAE prop 1,2 M, 10 minutos, 80°C	bmpyrr Ntf ₂	140°C/1 minuto		138
<i>L. monocytogenes</i> (1/2a, N° interno 2964)		bmpyrr Ntf ₂	140°C/1 minuto		2
	DMAE prop 1,2 M, 10 minutos, 80°C	bmpyrr Ntf ₂	140°C/1 minuto		89
	DMAE prop 1,2 M, 10 minutos, 80°C	bmpyrr Ntf ₂	140°C/1 minuto	Proteínasa K, 20 minutos, 56°C	98
	Amonio 1,2 M, 10 minutos, 80°C	bmpyrr Ntf ₂	140°C/1 minuto	Proteínasa K, 20 minutos, 56°C	57
	DMAE 1,2 M con 2-hidroxibutirato, 10 minutos, 80°C	bmpyrr Ntf ₂	140°C/1 minuto		9
	DMAE 1,2 M con 2-hidroxibutirato, 10 minutos, 80°C	bmpyrr Ntf ₂	140°C/1 minuto	Proteínasa K, 20 minutos, 56°C	64
	DMAE 1,2 M con trifluoroacetato, 10 minutos, 80°C	bmpyrr Ntf ₂	140°C/1 minuto		10
	DMAE 1,2 M con trifluoroacetato, 10 minutos, 80°C	bmpyrr Ntf ₂	140°C/1 minuto	Proteínasa K, 20 minutos, 56°C	30

Tabla 2

Cepa bacteriana	Líquido de preincubación	Líquido de incubación	Temperatura/duración de la incubación	Postincubación	Rendimiento promedio (%)
<i>E. coli</i> Top10F' +PPL2/IAC		bmpyrr NTF ₂	140°C/1 minuto		66

ES 2 656 947 T3

		bmpyrr NTF ₂	140°C/1 minuto	Proteinasa K, 20 minutos, 56°C	44
--	--	-------------------------	----------------	--------------------------------------	----

Aislamiento del ARN

Reactivos

- 5 Para mantener y cultivar *Campilobacter jejuni* DSMZ 4688, se usa una infusión de cerebro y corazón, glicerol, agar de soja triptico, extracto de levadura (Merck, Darmstadt, Alemania), agar Columbia y sangre de caballo lacada (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). El aislamiento del ARN se realiza con el conjunto de elementos para tejidos NucleoSpin® (Macherey-Nagel, Duren, Alemania) y el conjunto de elementos para aislar ARN High Pure (Roche, Mannheim, Alemania). Los reactivos usados en la RT-PCR en tiempo real (transcriptasa inversa SuperScript™ III, ARNasa™
- 10 OUT, SYT09, ANA polimerasa PlatinumTaq®) se obtienen en Invitrogen (Lofer, Austria), y los cebadores y las sondas se obtienen en MWG Biotech (Ebersberg, Alemania).

Cultivo de *Campilobacter jejuni* (DSMZ 4688)

- 15 Se inoculan 100 µl de una muestra congelada permanentemente (mantenida a -80°C con 20% v/v de glicerol, 20% v/v de sangre de caballo lacada y 60% v/v de caldo de infusión de corazón y cerebro) de la cepa DSMZ 4688 de *C. jejuni* con 9 ml de una infusión de cerebro y corazón (filtrada a través de una membrana) y se cultiva bajo condiciones microaeróbicas (3% de O₂, 10% de CO₂, 87% de N₂) durante 48 horas a 42°C. Para evaluar la pureza del cultivo, se procesan dos placas con agar Columbia y agar con triptona de soja más extracto de levadura (0,6% p/v), y para analizar la pureza obtenida con la infusión de cerebro y corazón, se siembran 100 µl del caldo en placas idénticas.

Aislamiento del ADN de *C. jejuni* DSMZ 4688 con bmpyrr NTF₂

- 20 En cada caso, se extrae una muestra de 1 ml de cada cultivo de 48 horas mediante una centrifugación durante 5 minutos a 6000 G, se la resuspende en 20 µl de H₂O tratada con DEPC, se coloca la cantidad total en 100 µl de bmpyrr NTF₂, se cubre con un papel de aluminio y se incuba durante un minuto a 120°C o 140°C. Después de la incubación, se le agregan 100 µl de H₂O tratada con DEPC o 90 µl del amortiguador para la incubación con la ADNasa y 10 µl de ADNasa I (protocolo del conjunto de elementos para aislar ARN High Pure) a la muestra y se coloca toda la suspensión en un tubo de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Además, las suspensiones se centrifugan durante unos pocos
- 25 segundos, y las muestras que contienen la ADNasa se incuban durante 60 minutos con agitación a temperatura ambiente, para luego interrumpir la actividad de la ADNasa calentando a 75°C durante 15 minutos. Por otra parte, las muestras tratadas con H₂O tratada con DEPC se enfrían con hielo. Después de realizar una centrifugación final, se transfiere fase superior de las muestras a un tubo nuevo y se la almacena a -80°C.

Aislamiento del ADN de *C. jejuni* con el conjunto de elementos para aislar ARN High Pure

- 30 Se extrae una muestra de 1 ml de cada cultivo de 48 horas mediante una centrifugación durante 5 minutos a 6000 G y se la somete al protocolo del conjunto de elementos para aislar ARN High Pure. Para estimar la influencia de la ADNasa I, se omite este paso en dos muestras.

Aislamiento del ADN y referencia para la extracción de ADN de *C. jejuni* con el conjunto de elementos para tejidos NucleoSpin®

- 35 Se recolecta un mililitro de un cultivo de 48 horas mediante una centrifugación durante 5 min a 6000 G y se usa su contenido de ADN como referencia para una comparación con el resultado obtenido con un método donde se emplea un líquido iónico. También se toma una muestra de una placa con agar Columbia para producir ADN de referencia. El aislamiento del ADN se realiza según el protocolo para bacterias Gram positivas del conjunto de elementos para tejidos NucleoSpin® (una lisozima durante 1 hora y una proteinasa K durante la noche). El paso final del protocolo se modifica.
- 40 En lugar de un lavado con 100 µl del amortiguador de elución BE precalentado (70°C), se realizan dos lavados con 50 µl de ddH₂O precalentada para eluir el ADN de la columna (Mayrl et al., 2009). La concentración del ADN de referencia se determina fluorimétricamente con un aparato Hoefer DyNA Quant 200 (Pharmacia Biotech, San Francisco, CA).

Manipulación de los ácidos nucleicos para la cuantificación

La síntesis del ADNc y el análisis en de RT-PCR tiempo real se realizan según el protocolo de Dzieciol et al. (2011).

- 5 En la tabla 3 se provee una comparación entre una forma de realización de la invención y un método de referencia (un conjunto de elementos comercial para aislar ARN) en el aislamiento de ARN de *C. jejuni*. La menor recuperación obtenida en el protocolo de la invención con un paso adicional de digestión con ADNasa y la eliminación de los residuos de ADN genómico fue el resultado de la duración del tratamiento con la ADNasa y no de un contenido ostensivamente bajo de ARN. Esto puede observarse en la tabla 5, donde se proveen resultados indicativos de un contenido bajo de ADN. Por lo tanto, la recuperación de ARN con el protocolo de la invención pareció ser significativa.

Tabla 3

	Copias cada 5 µl	Rendimiento (%)
Método convencional ^a	8,54E+05	
Método convencional sin tratamiento con ADNasa	9,74E+05	
bmpyrr NTF2, 1 minuto a 120°C	1.55E+06	181%
	1,53E+06	179%
bmpyrr NTF2, 1 minuto a 120°C con un tratamiento con ADNasa	2,21E+05	26%
	4,87E+04	6%
bmpyrr NTF2, 1 minuto a 140°C	1,62E+06	190%
	1,53E+06	180%
bmpyrr NTF2, 1 minuto a 140°C con un tratamiento con ADNasa	2,24E+05	26%
	5,06E+05	59%

^aConjunto de elementos para aislar ARN High Pure (Roche, Mannheim, Alemania)

- 10 En la tabla 4 se detalla la recuperación de ADN genómico durante los experimentos de la tabla 3.

Tabla 4

	Copias cada 5 µl	Rendimiento (%)
Método convencional ^a	6,10E+06	
bmpyrr NTF2, 1 minuto a 120°C	2,74E+06	45%
	3,31E+06	54%
bmpyrr NTF2, 1 minuto a 140°C	3,11E+06	51%
	3,08E+06	51%

^aConjunto de elementos para tejidos NucleoSpin® (Macherey-Nagel, Duren, Alemania), o un protocolo para bacterias Gram positivas (una lisozima durante 1 hora y una proteinasa K durante la noche)

- 15 En la tabla 5 se detalla el valor de RT(-) obtenido en los experimentos de la tabla 3. El valor de RT(-) es indicativo de la proporción de ADN en la muestra después del protocolo. Por ejemplo, un rango de 2 logaritmos representa un contenido de ADN en la muestra de 1%.

Tabla 5

Rango en la escala logarítmica	
Aislamiento del ARN	5,51
	5,75
Aislamiento del ARN sin tratamiento con ADNasa	3,58
	3,5
bmpyrr NTF2, 1 minuto a 120°C	2,67
	2,75
bmpyrr NTF2, 1 minuto a 120°C con un tratamiento con ADNasa	5,91
	5,47
bmpyrr NTF2, 1 minuto a 140°C	2,67
	2,78
bmpyrr NTF2, 1 minuto a 140°C con un tratamiento con ADNasa	5,24
	6,22

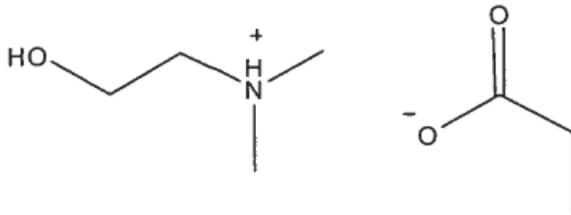
LISTA DE REFERENCIAS

- 5 D'Agostino, M., Wagner, M., Vazquez-Boland, J. A., Kuchta, T., Karpiskova, R., Hoorfar, J., Novella, S., Scotti, M., Elli-son, J., Murray, A., Fernandes, I., Kuhn, M., Pazlarova, J., Heuvelink, A., Cook, N., 2004, A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model – towards an international standard, *J. Food Prot.*, 67, 1646-1655.
- Dzienciol M., Wagner M., Hein I. (2011), CmeR-dependent gene Cj0561c is induced more effectively by bile salts than the CmeABC efflux pump in both human and poultry *Campylobacter jejuni* strains, *Res. Microb.*, 162, p. 991-998.
- 10 Frühwirth K., Fuchs S., Mester P., Wagner M., Rossmanith P., 2011, Cloning and characterization of a Δ -prfa *Listeria monocytogenes* strain containing an artificial single copy genomic internal amplification control (IAC), *Food An. Meth.*, DOI: 101007/s12161-011-9212-6.
- Kaclikova, E., Pangallo, D., Oravcova, K., Drahovska, H., Kuchta, T., 2005, Quantification of *Escherichia coli* by kinetic 5'-nuclease polymerase chain reaction (real-time PCR) oriented to sfmD gene, *Lett. Appl. Microbiol.*, 41, 132-135.
- 15 Mayrl, E., Roeder, B., Mester, P., Wagner, M., Rossmanith, P., 2009, Broad range evaluation of the matrix solubilization (matrix lysis) strategy for direct enumeration of food-borne pathogens by nucleic acids technologies, *J. Food Prot.*, 72, 1225-1233.
- Mester, P., Wagner, M., Rossmanith, P., 2010, Use of Ionic Liquid-Based Extraction for Recovery of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* from Food Matrices, *J. Food Prot.*, 73, 680-687.
- 20 Roeder, B., Wagner, M., Rossmanith, P., 2010, Autonomous growth of isolated single *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium cells in the absence of growth factors and intercellular contact, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 2600-2606.
- Rossmannith, P., Krassnig, M., Wagner, M., Hein, I., 2006, Detection of *L. monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the prfa gene, *Res. Microbiol.*, 157, 763-771.

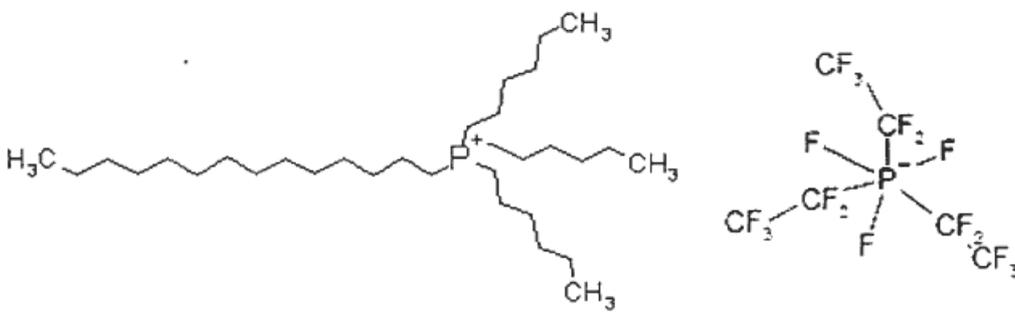
REIVINDICACIONES

1. Un método para lisar células bacterianas que comprende
- (a) proveer una muestra que comprende células;
- (b) agregarle a la muestra una solución de lisis que comprende al menos un aceite o un líquido iónico inmiscible con agua, de modo tal que el volumen de la solución de lisis sea al menos idéntico al volumen de la muestra;
- (c) calentar la mezcla obtenida en el paso (b) a una temperatura superior a 80°C;
- (d) si la temperatura en el paso (c) es superior a 100°C, enfriar la muestra a una temperatura inferior a 100°C; y
- (e) agregarle a la mezcla agua o una solución amortiguadora acuosa para generar una fase líquida inmiscible con agua y una fase acuosa, donde al menos 50% de los ácidos nucleicos pueden hallarse en la fase acuosa.
- 5 2. El método según la reivindicación 1, donde en el paso (c), la mezcla se calienta a una temperatura de entre 100°C y 150°C.
3. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 2, donde en el paso (d), la muestra se enfría a una temperatura de entre 20°C y 40°C.
4. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, donde la solución de lisis agregada en el paso (b) comprende un líquido iónico inmiscible con agua.
- 15 5. El método según la reivindicación 4, donde el anión del líquido iónico es bis(trifluormetilsulfonil)imida [Ntf₂].
6. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 4, donde la solución de lisis agregada en el paso (b) comprende tris(pentafluoretil)trifluorofosfato de trihexil(tetradecil)fosfonio [Ttp][Fap] y/o bis(trifluormetilsulfonil)imida de 1-butil-1-metilpirrolidinio [bmpyr][Ntf₂].
- 20 7. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 6, donde antes de agregar la solución de lisis en el paso (b1), la muestra se preincuba con una sustancia que comprende un catión de amonio [NR₄]⁺,
- donde
- cada R es independientemente H,
- un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene 1-20 átomos de C,
- 25 un alqueno de cadena lineal o ramificada que tiene 2-20 átomos de C y uno o más enlaces dobles,
- un alquino de cadena lineal o ramificada que tiene 2-20 átomos C y uno o más enlaces triples,
- un cicloalquilo saturado o parcial o completamente insaturado que tiene 3-7 átomos de C, que puede estar sustituido con grupos alquilo que tienen 1-6 átomos de C,
- 30 donde uno o más R pueden estar parcial o completamente sustituidos con halógenos, particularmente -F y/o -Cl, o parcialmente sustituidos con -OH, -OR', -CN, -C(O)OH, -C(O)NR'₂, -SO₂NR'₂, -C(O)X, -SO₂OH, -SO₂X o -NO₂, y donde uno o dos átomos de carbono no adyacentes en R que no están en la posición α pueden reemplazarse por átomos y/o grupos de átomos seleccionados entre -O-, -S-, -S(O)-, -SO₂-, -SO₂O-, -C(O)-, -C(O)O-, -N⁺R'₂-, -P(O)R'O-, -C(O)NR'-, -SO₂NR'-, -OP(O)R'O-, -P(O)(NR'₂)NR'-, -PR'₂=N- o -P(O)R'-, donde R' es H, C₁-C₆-alquilo no fluorado, parcialmente fluorado o perfluorado, C₃-C₇-cicloalquilo o fenilo no sustituido o sustituido, y X es un halógeno.
- 35 8. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 7, donde antes de agregar la solución de lisis en el paso (b1), la muestra se preincuba con al menos un líquido iónico basado en N,N-dimetil-2-hidroxiethylamonio [DMAE].
9. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 8, donde después del paso (e), la mezcla resultante se incuba con una proteinasa.
- 40 10. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 9, donde después del paso (e) y la incubación opcional con una proteinasa, la fase acuosa se somete directamente a una PCR en tiempo real.

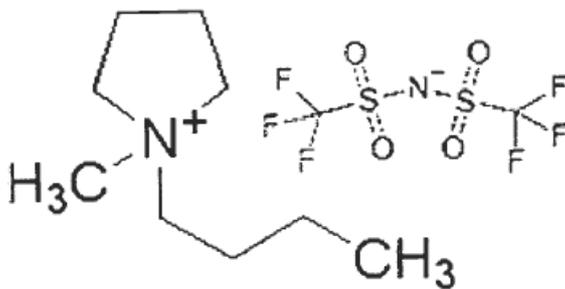
Fig. 1



Propionato de N,N-dimetil-2-hidroxiethylamonio [DMAE][prop]



Tris(pentafluoretil)trifluorofosfato de trihexil(tetradecil)fosfonio [Ttp][Fap]



Bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-1-metilpirrolidinio [bmpyrr][Ntf2]

Fig. 2

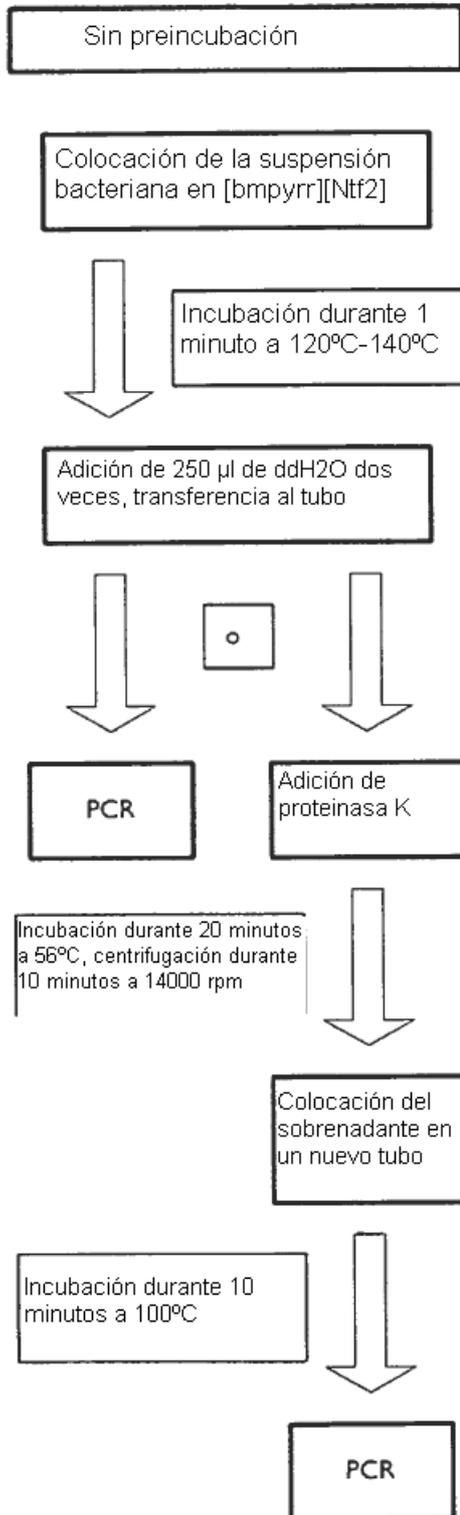
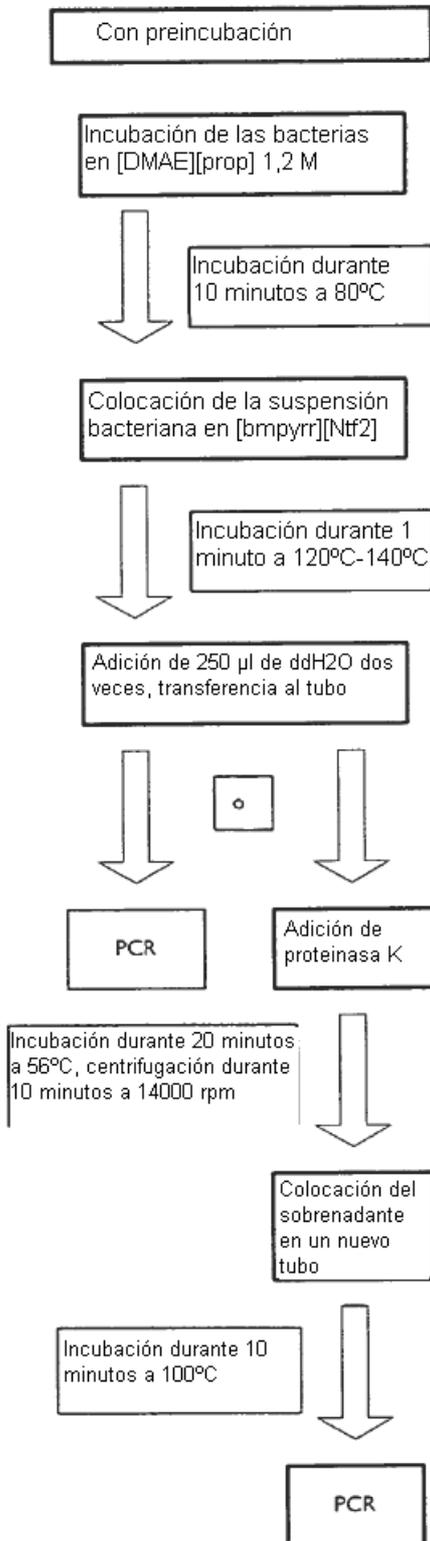


Fig. 3



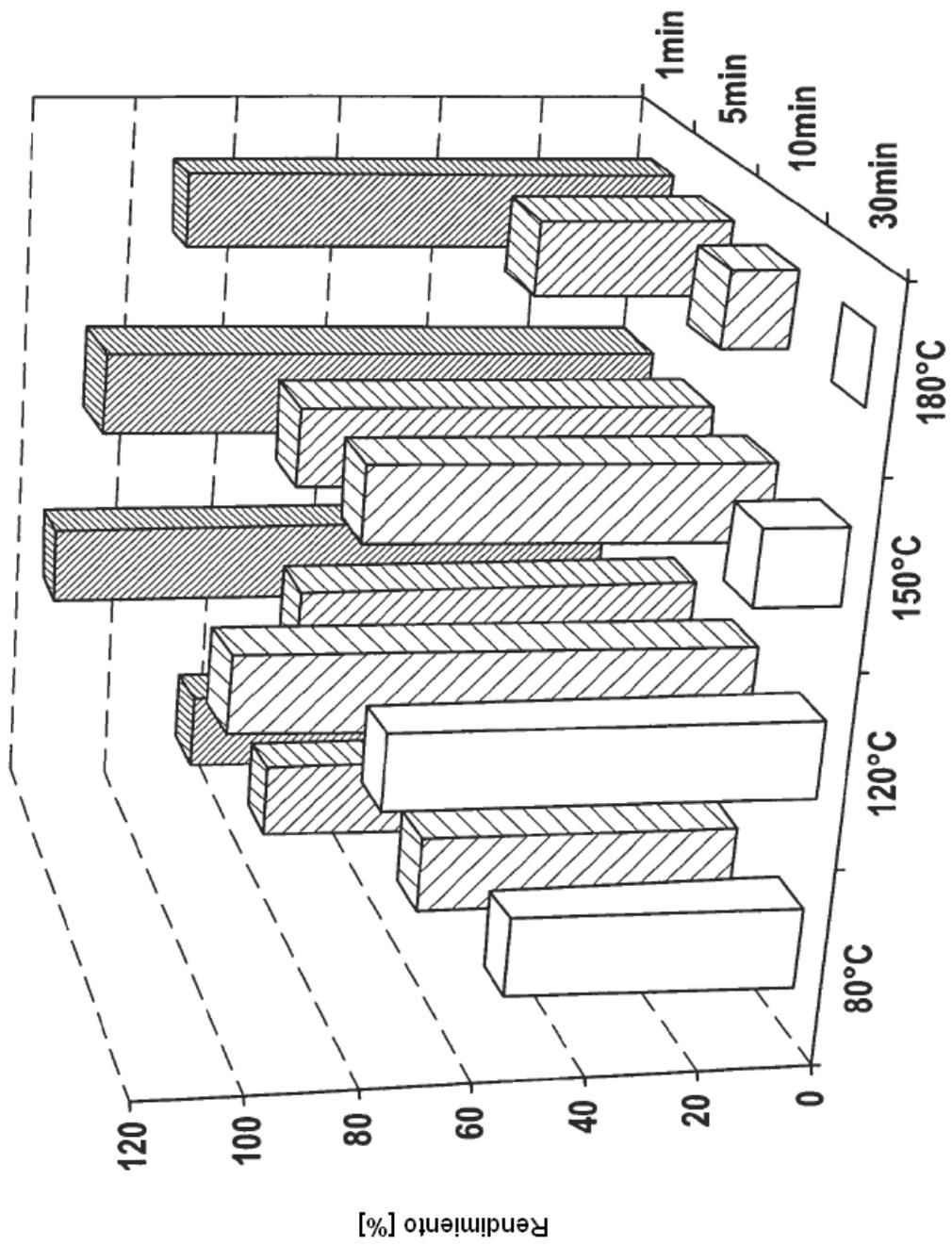


Fig. 4