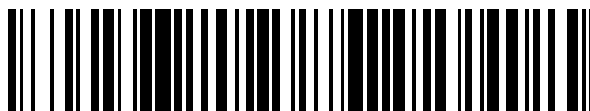


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 105**

51 Int. Cl.:

C07K 1/32 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2009 PCT/EP2009/055596**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2009 WO09135936**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2009 E 09742154 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2283026**

54 Título: **Procedimiento para el enriquecimiento y aislamiento de biomoléculas o virus**

30 Prioridad:

08.05.2008 DE 102008023297

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

08.03.2018

73 Titular/es:

**AJ Innuscreen GmbH (100.0%)
Robert-Roessle-Strasse 10
13125 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

HILLEBRAND, TIMO

74 Agente/Representante:

ÁLVAREZ LÓPEZ, Sonia

ES 2 658 105 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

Procedimiento para el enriquecimiento y aislamiento de biomoléculas o virus.

- 5 La invención se refiere a un procedimiento sencillo para el enriquecimiento de ácidos nucleicos y/o virus a partir de una muestra para el aislamiento posterior de ácidos nucleicos y una detección sensible en caso necesario.

La investigación de muestras biológicas relevantes desde el punto de vista diagnóstico, tales como muestras de suero, plasma, sangre, muestras de hisopos o frotis de órganos para la detección de agentes infecciosos, ha
10 adquirido una enorme importancia en los últimos años. Las infecciones víricas tales como el VIH, el VHC o el VHB van en aumento a escala mundial.

Los procedimientos de detección de ácidos nucleicos víricos comercialmente disponibles se basan en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos conocidas tales como PCR (reacción en cadena de la polimerasa), PCR en tiempo
15 real, NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) o detección de ADN ramificado. Sin embargo, los procedimientos de detección conocidos, particularmente en ensayos de muestras de gran volumen (por ejemplo, grupos de 96 muestras individuales de plasma), están alcanzando los límites de la sensibilidad de detección. El problema radica en el hecho de que las pruebas comerciales utilizadas siempre requieren el aislamiento de los ácidos nucleicos (por ejemplo, víricos). El aislamiento de ácidos nucleicos víricos generalmente se lleva a cabo a
20 partir de muestras líquidas con un volumen de 50 a 200 ml.

Para poder alcanzar un mayor grado de sensibilidad de detección o para poder analizar también muestras individuales agrupadas con sensibilidad, se requieren procedimientos para el procesamiento de muestras de gran volumen. Como esto no es posible con los procedimientos actuales de aislamiento de ácidos nucleicos, se intentó,
25 en un primer paso, enriquecer las partículas víricas de una muestra. Una posibilidad para enriquecer partículas víricas es la ultracentrifugación de la muestra que se pretende examinar. Con esto se produce una acumulación de partículas víricas en el fondo del recipiente de reacción. Este procedimiento está vinculado a una ultracentrífuga y además consume mucho tiempo y no es adecuado para el diagnóstico rutinario. Los procedimientos alternativos consisten en la precipitación de partículas víricas con polietilenglicol/cloruro de sodio y una centrifugación posterior
30 (Yamamoto et al., Virology 40(1970) 734; Morandi et al., J.Clin.Microbiol. 36 (1998) 1543-1538). Se utilizan diferentes mezclas de PEG y cloruro de sodio y estos reactivos se mezclan con la muestra biológica. Posteriormente, se incuba la preparación durante un tiempo prolongado en frío y, posteriormente, se obtienen los precipitados de virus (proteína) y NaCl/PEG por centrifugación. Estos procedimientos son complicados y requieren mucho tiempo. Además, el tratamiento posterior de los precipitados para el aislamiento de los ácidos nucleicos
35 víricos es problemático. A menudo, resulta muy difícil volver a disolver los precipitados. Esto afecta la eficacia y la calidad del aislamiento del ácido nucleico de manera significativa. En la memoria de la patente DE 19856415 C2 se describe un procedimiento que utiliza la precipitación de NaCl/PEG conocida, en la que posteriormente se realiza el aislamiento de los ácidos nucleicos de una manera convencional a través de la unión a una fase sólida de silicato. No es evidente, hasta qué punto se diferencia este procedimiento del procedimiento bien conocido de precipitación
40 de NaCl/PEG con los problemas conocidos. Además, este procedimiento también requiere incubación con refrigeración y una centrifugación durante 20 minutos.

El procedimiento supuestamente permite el aislamiento de ácidos nucleicos víricos de una muestra de hasta 10 ml. Otra variante comercialmente disponible, que supuestamente permite el procesamiento de hasta 1 ml de muestra,
45 está basada en el enriquecimiento de los ácidos nucleicos víricos utilizando un detergente especial. Una incubación inicial de la muestra con un reactivo de lisis conduce a la lisis de los virus. Posteriormente, se produce la formación de un "complejo ácido nucleico-detergente". La preparación se centrifuga y, a continuación, se trata el sedimento resultante proteolíticamente, y el ácido nucleico se aísla a su vez de una manera convencional mediante la unión a una fase sólida de silicato (QIAamp UltraSens Virus Handbook). Aquí también, se advierte sobre los problemas con
50 la resuspensión del pellet. Además, el procedimiento también permite solo el procesamiento de muestras con un volumen máximo de 1 ml.

El contenido de la publicación para información de solicitud de patente WO 03/095079 A2 es una membrana de filtro basada en fibras de alginato polimerizadas y otros materiales de soporte para enriquecer y/o separar componentes
55 de líquidos. Los componentes que se pretende enriquecer son protozoos. La aplicación está dirigida al ámbito de la determinación y acumulación de componentes microbiológicos en el agua potable, etc. Se describe un procedimiento para la producción de una capa de membrana especial (vellón) basada en un polímero de ácido poliurónico. En un procedimiento complejo, se genera una membrana de filtro, que luego se usa para el propósito previsto. En el procedimiento mencionado, se pasa un líquido sobre una membrana de filtro previamente preparada
60 en base a un polímero de ácido poliurónico. La publicación para información de solicitud de patente citada no da

ninguna indicación para disolver el polímero con el fin de realizar un posterior aislamiento de ácidos nucleicos de la muestra biológica o para aislar un ácido nucleico después del enriquecimiento de virus a partir de estos. Tampoco hay ninguna indicación de que los virus puedan enriquecerse con la membrana, ya que el principio de enriquecimiento se basa en el hecho de que el enriquecimiento de los protozoos tiene lugar en los poros definidos del polímero de ácido poliurónico. En el documento WO 03/095079 A2 no se describe ni se insinúa el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas. Tampoco hay evidencia de que la disolución del polímero tenga lugar con un tampón caotrópico.

En la patente US 5739019 A se describe el aislamiento de microorganismos de una muestra acuosa. La patente no describe ningún procedimiento para concentrar biomoléculas mediante polímeros basados en ácido poliurónico y en el que posteriormente se aíslan los ácidos nucleicos, sino que describe el mecanismo que permite que el ácido poliurónico se polimerice mediante la adición de cloruro de calcio. En la patente citada, se usa este mecanismo en el que se agrega ácido poliurónico gota a gota a una solución acuosa de cloruro de calcio y microorganismos, y los microorganismos se encapsulan luego en estas gotitas. Estos microorganismos encapsulados se cultivan luego, en etapas posteriores del procedimiento, en lo que se denomina medios de crecimiento selectivo. No se trata de un aislamiento posterior de ácidos nucleicos a partir de las biomoléculas para una prueba diagnóstica. No hay indicación de aislamiento del ADN.

En Tribune du Cebedeau, 1976, 29 (390), pp. 186-94, se informa del aislamiento de un virus. No se menciona el aislamiento de un ácido nucleico. Mediante alginato y cloruro de calcio, se produce una membrana de manera conocida. Por este filtro de membrana (sistema de filtro de alginato polimerizado) se pasa luego una solución desde la cual los virus quedan adsorbidos en el filtro o dentro del filtro. De esta manera se utiliza el procedimiento para enriquecer virus en o dentro de membranas (o mejor hidrogeles) mediante filtrado del líquido que contiene los virus a través de esta membrana de alginato.

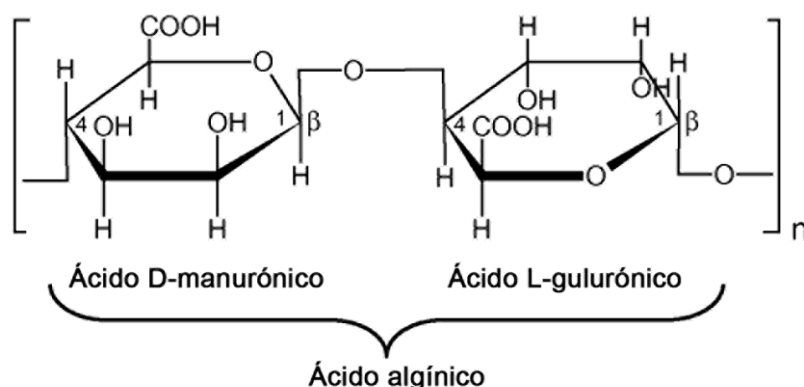
Los procedimientos descritos de la técnica anterior muestran claramente que el procesamiento de muestras de gran volumen per se, así como el aumento del volumen de una muestra para aumentar la sensibilidad en la detección de ácidos nucleicos víricos, todavía es complicado y se asocia con desventajas significativas.

En la técnica anterior, aún no se ha descrito que se pueden unir ácidos nucleicos al alginato polimerizado y recuperarlos posteriormente. Hasta el momento tampoco se sabe que se enriquecen los microorganismos (especialmente los virus) para luego aislar los ácidos nucleicos para detectar los virus después de la concentración.

Por lo tanto, la invención se basaba en el objetivo de permitir el enriquecimiento de ácidos nucleicos o virus, para poder procesar, en particular, muestras de gran volumen. El procedimiento debe ser compatible con un procedimiento posterior sencillo y rápido de aislamiento de ácidos nucleicos.

El problema se ha resuelto de acuerdo con las características de las reivindicaciones.

Sorprendentemente, se ha encontrado que determinados derivados de polisacáridos son eminentemente adecuados para el enriquecimiento de virus en muestras líquidas, siendo esta etapa de enriquecimiento compatible con procedimientos eficientes de aislamiento de ácidos nucleicos víricos. Los derivados de polisacáridos son las sales de ácidos poliurónicos. Los denominados alginatos de ácidos algínicos son particularmente adecuados. Los alginatos son elementos estructurales de las algas pardas. El alginato es un polisacárido compuesto por ácido α -L-gulurónico (G) y ácido β -D-manurónico (M) unidos por enlaces 1,4.



Forma dominios homopoliméricos en los que el ácido manurónico o el ácido gulurónico están presentes como un bloque.

5

Los alginatos se usan en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, p. ej., como agente gelificante en la industria alimentaria, como producto de acabado para textiles, para la producción de papeles fotográficos o en la clínica dental para la preparación de impresiones dentales y mandibulares.

10 El alginato es además un biomaterial importante. Al encapsular el tejido celular humano con alginato, es posible almacenar materiales exógenos, tales como células de un donante, sin que el sistema inmunitario lo detecte y lo destruya. Sin embargo, no hay ninguna sugerencia de que los alginatos puedan usarse como materiales de enriquecimiento vírico para un posterior aislamiento y purificación de los ácidos nucleicos víricos.

15 Para el procedimiento según la invención, se aprovecha la capacidad conocida de los alginatos para gelificar en soluciones con un bajo contenido de calcio y para formar los denominados hidrogeles. La causa de la gelificación se debe a la incorporación de iones de calcio en la estructura en zig-zag de los bloques GG. Sobre esta zona se aloja luego la estructura en zig-zag de otra molécula de alginato. Esto lleva a la formación de estructuras tridimensionales. La formación de geles también tiene lugar en combinación con ácidos fuertes. Además, las estructuras de gel

20 resultantes también pueden volver a destruirse de manera específica.

Aprovechando la formación de geles de alginato, se puede realizar el enriquecimiento de virus para un posterior análisis diagnóstico molecular a partir de una muestra líquida, en particular, a partir de muestras problemáticas de gran volumen, de manera extremadamente sencilla y rápida mediante el procedimiento según la invención. El

25 procedimiento es inofensivo con respecto al uso de productos químicos y no requiere ningún equipamiento especial.

El procedimiento según la invención para enriquecer virus a partir de una muestra para un posterior aislamiento de los ácidos nucleicos víricos comprende las siguientes etapas:

- 30 1. adición de una solución acuosa de una sal de un ácido poliurónico a la muestra
2. adición de una sustancia que induce la formación de gel/formación de pellet (p. ej., el uso de una solución de cloruro de calcio 1 M o de una solución de ácido clorhídrico al 1 %)
3. mezclar la muestra e incubación a temperatura ambiente
4. centrifugación de la muestra y eliminación del sobrenadante
- 35 5. disolución del pellet o pieza de gel y aislamiento posterior de los ácidos nucleicos víricos de forma convencional

A diferencia de la técnica anterior, no se usa ninguna membrana completamente polimerizada, sino dos componentes que, puestos en contacto directo, pueden producir un gel, y estos componentes se ponen en contacto

40 con una muestra a partir de la cual se aíslan ácidos nucleicos y/u otras biomoléculas. La pieza de gel que contiene las biomoléculas enriquecidas de la muestra estará visible después de la centrifugación. Anteriormente, la muestra es aún líquida y no está totalmente polimerizada.

A diferencia de la técnica anterior, no se usa ningún procedimiento en el que los microorganismos cultivados estén

45 en una solución acuosa que ya contenga un componente que forme complejos (por ejemplo, una solución acuosa de

cloruro de calcio) y en el que luego, por adición gota a gota de una solución de alginato, se obtengan gotas casi polimerizadas en las que estén incluidos los microorganismos.

El procedimiento según la invención difiere del procedimiento descrito en el documento WO 03/095079 A2 en que no se usa ninguna membrana basada en ácido poliurónico polimerizado, sino una que se basa en la combinación de un ácido poliurónico con una muestra biológica y un componente posterior que permita la formación de un gel. La muestra biológica se mantiene, el polímero se forma solo después de la centrifugación, ya que no se polimeriza toda la muestra. Por lo tanto, el procedimiento según la invención difiere claramente del documento WO 03/095079 A2. Además es un objetivo del procedimiento según la invención disolver el polímero con el fin de realizar un posterior aislamiento de ácidos nucleicos de la muestra biológica (también para aislar un ácido nucleico después del enriquecimiento de virus a partir de los mismos).

Las concentraciones de alginato y del reactivo para la formación de gel que se usaron en el procedimiento según la invención son extremadamente bajas. Esto implica que el proceso de gelificación no ocurre de manera visible, tal como se conoce de la industria alimentaria o como se describe para todas las aplicaciones de alginato. Después de la centrifugación, se elimina el sobrenadante. Se puede ver una pequeña pieza de gel o pellet en el fondo del recipiente de reacción, este gel/pellet contiene los virus que se concentraron a partir de la muestra. Posteriormente, la pieza de gel/pellet se vuelve a disolver mediante la adición de una solución que destruye la estructura del gel. En la última etapa, se realiza el aislamiento de los ácidos nucleicos víricos a partir de la muestra concentrada con procedimientos conocidos de aislamiento de ácidos nucleicos. La realización del procedimiento es extremadamente sencilla. El tiempo de incubación y la centrifugación posterior pueden completarse en un intervalo de entre 5 y 10 minutos. La disolución de la pieza de gel se lleva a cabo sin problemas. No se producen los problemas conocidos con una resuspensibilidad extremadamente difícil de precipitados de PEG/NaCl. No es necesario realizar una ultracentrifugación, de modo que se puede trabajar con centrífugas estándar de sobremesa normales. Los volúmenes de las muestras de partida líquidas se pueden elegir arbitrariamente, lo que permite una gama muy amplia de aplicaciones. Por ejemplo, se puede trabajar con muestras de 500 ml o incluso de 10 ml. Por tanto, existe una gama enormemente amplia de aplicaciones.

Mediante el procedimiento según la invención, el volumen de muestra inicial se reduce a la pieza de gel/pellet producida en el procedimiento según la invención, que luego puede procesarse sin dificultad en lo que se denomina formato mini del aislamiento de ácidos nucleicos.

Para el procedimiento según la invención, se combina, p.ej., una solución acuosa de alginato y una solución acuosa que contiene sales de cationes di o polivalentes (por ejemplo, cloruro de calcio o cloruro de aluminio). Del mismo modo, se puede combinar una solución acuosa de alginato y un ácido débil (ácido clorhídrico). La destrucción de la estructura del gel puede lograrse mediante una solución tamponada que contiene un agente quelante (EDTA) o también mediante la adición de una solución de citrato trisódico dihidratado. Asimismo, se puede disolver la pieza de gel/pellet en un tampón hiposalino (por ejemplo, Tris-HCl 10 mM) a un pH básico.

Una realización particularmente eficiente aprovecha el efecto observado de que la disolución de los geles de alginato resultantes también es perfectamente posible con tampones que se usan para el aislamiento de ácidos nucleicos. De esta manera, los denominados tampones caotrópicos destruyen, por ejemplo, sobre la base de sales de guanidinio los geles de alginato de una manera general, independientemente del procedimiento con el que se formó el gel de alginato. En la literatura especializada sobre alginatos y sus ámbitos de aplicación no se especifica dicho efecto observado.

En base a esta observación, se puede disolver el gel de alginato con un tampón caotrópico, que posteriormente puede usarse simultáneamente para el procedimiento de aislamiento de los ácidos nucleicos víricos en una función doble. En este caso preferente, se disuelve el gel de alginato con un tampón caotrópico después de la centrifugación y la eliminación del sobrenadante, y a continuación, se pone la preparación en contacto con un material de soporte mineral. Opcionalmente, también se le pueden añadir al tampón caotrópico otros componentes (alcoholes o detergentes o mezclas de alcoholes y detergentes) que pueden potenciar una optimización de la unión de los ácidos nucleicos víricos al material de soporte mineral. Los ácidos nucleicos unidos se lavan y finalmente se liberan del material de soporte. El aislamiento de ácidos nucleicos víricos a través del enriquecimiento de virus según la invención, a partir de una muestra de gran volumen puede, por tanto, lograrse en aproximadamente 30 minutos. El procedimiento según la invención es de esta manera significativamente más sencillo y más rápido que todos los demás métodos en este contexto y también mucho más rápido que las técnicas conocidas hasta el momento. Por lo tanto, el procedimiento según la invención resuelve el problema descrito de manera idónea.

Otro desafío diagnóstico se refiere al aislamiento de los denominados ácidos nucleicos libres o desnudos de

muestras biológicas. De nuevo, sería conveniente usar un volumen grande de la muestra que se vaya a analizar (por ejemplo, orina, suero, plasma) porque, debido a los niveles muy bajos de ácidos nucleicos libres, el procesamiento de un número pequeño de muestras no permite un análisis diagnóstico exhaustivo. Solo se puede lograr un aumento en la sensibilidad aumentando el volumen de la muestra. Sin embargo, no existe ningún procedimiento en la práctica de laboratorio para ello.

Sorprendentemente, se ha demostrado que, a su vez, las sales de ácidos poliurónicos, en particular, los alginatos o ácidos alginicos, también pueden enriquecer ácidos nucleicos a partir de muestras o se pueden usar excelentemente como material para el aislamiento de ácidos nucleicos de modo generalizado. Esto es especialmente inesperado, ya que se sabe que los ácidos nucleicos y los alginatos son polianiones. En este sentido, ya era muy sorprendente poder utilizar estos azúcares también para enriquecer ácidos nucleicos y aislarlos a continuación. En el procedimiento según la invención, se usa nuevamente el procedimiento, que también se describió para el enriquecimiento de virus a partir de muestras:

1. adición de una solución acuosa de una sal de un ácido poliurónico a la muestra
2. adición de una sustancia que induce la formación de gel (p. ej., el uso de una solución de cloruro de calcio 1 M o de una solución de ácido clorhídrico al 1 %)
3. mezclar la muestra e incubación a temperatura ambiente
4. centrifugación de la muestra y eliminación del sobrenadante
5. disolver la pieza de gel

El aislamiento de los ácidos nucleicos libres enriquecidos puede a su vez llevarse a cabo disolviendo la pieza de gel/pellet con los tampones ya descritos y aislando los ácidos nucleicos después con procedimientos conocidos, p. ej., a través de la unión a fases sólidas minerales. También se pueden usar nuevamente tampones caotrópicos para disolver la pieza de gel/pellet y, a continuación, aislar los ácidos nucleicos. Sin embargo, la purificación también se puede llevar a cabo mediante procedimientos clásicos, p.ej. a través de la precipitación de los ácidos nucleicos.

Un procedimiento particularmente sencillo para aislar ácidos nucleicos libres a partir de muestras es mezclar la muestra con una solución acuosa de alginato y un ácido. Después de la centrifugación, se elimina el sobrenadante y la pieza de gel se disuelve con un tampón básico e hiposalino (por ejemplo, Tris-HCl 10 mM, pH 9). La purificación de los ácidos nucleicos no es necesaria. La solución se puede usar inmediatamente para, por ejemplo, aplicaciones de PCR. Aquí se demuestra que los alginatos también pueden producir una intensificación de la reacción de amplificación.

Dicha variante de purificación se completa en pocos minutos y, en realidad, representa el aislamiento más sencillo de ácidos nucleicos en general. De nuevo, a modo de resumen, comprende las siguientes etapas:

1. adición de una solución acuosa de una sal de un ácido poliurónico a la muestra
2. adición de ácido a la muestra
3. mezclar la muestra e incubación a temperatura ambiente
4. centrifugación de la muestra y eliminación del sobrenadante
5. disolver la pieza de gel en un tampón hiposalino de pH ligeramente alcalino
6. uso inmediato del ácido nucleico aislado en una PCR

En esta realización particular, prácticamente tampoco hay limitación en el volumen de la muestra.

El procedimiento según la invención también es adecuado para aislar de manera generalizada ácidos nucleicos a partir de una muestra. Si los ácidos nucleicos que se pretenden aislar no están presentes como ácidos nucleicos libres, se puede lisar la muestra de una manera conocida. Los ácidos nucleicos liberados de la muestra se aíslan a su vez de acuerdo con el procedimiento según la invención. También en este caso, se puede llevar a cabo una purificación "clásica" de los ácidos nucleicos después de la disolución de la pieza de gel (que contiene el ácido nucleico enriquecido), o se puede usar la solución resultante de la disolución de la pieza de gel directamente para una reacción de PCR.

Además del enriquecimiento descrito de virus de diferentes muestras, el enriquecimiento de "ácidos nucleicos desnudos" y el enriquecimiento de ácidos nucleicos no "libres", también se enriquecen otras biomoléculas tales

como proteínas, enzimas, anticuerpos o receptores celulares de una muestra de manera no específica mediante los procedimientos descritos. Estos, así como también los ácidos nucleicos, se pueden usar después de una manera conocida por el experto en la técnica en otras aplicaciones posteriores.

- 5 Por lo tanto, el procedimiento descrito en el presente documento representa una posibilidad nueva y universal de enriquecimiento de una amplia variedad de biomoléculas para un procesamiento específico. Es extremadamente rápido y fácil de realizar y no requiere ningún equipamiento especial.

La universalidad de la invención se explicará con más detalle con referencia a los ejemplos de realización, en la que los ejemplos de realización no limitan el procedimiento según la invención.

Ejemplos de realización

Ejemplo de realización 1: Enriquecimiento de ácidos nucleicos en una muestra biológica lisada y uso posterior directo de los ácidos nucleicos liberados para una PCR

El enriquecimiento y posterior aislamiento de los ácidos nucleicos se realiza a partir de una muestra de hisopo (frotis de la mucosa oral) y se lleva a cabo de la siguiente manera:

- 20 1. Colocar el hisopo en un tubo de reacción de 1,5 ml. Añadir 400 µl de tampón de lisis (Triton X-100 al 5 %, hidrócloruro de guanidina 0,1 M) y 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml). incubación a 50 °C durante 5 min. Exprimir el hisopo y desecharlo.
2. Añadir 10 µl de una solución acuosa de alginato (1 %) y 50 µl de ácido clorhídrico al 1 %. Mezclar con un agitador de vórtice e incubar durante 2 min a temperatura ambiente
- 25 3. Centrifugación a velocidad máxima durante 1 min. Eliminar el sobrenadante por completo.
4. Agregar 1 ml de agua y centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto. Eliminar el sobrenadante por completo.
5. Añadir 200 µl de un tampón hiposalino (Tris HCl 10 mM, pH 9). Resuspender la pieza de gel/pellet y disolverlo a continuación por completo.

30 El ADN aislado se utilizó posteriormente para una PCR para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico específica para humanos. El resultado muestra la idoneidad del ácido nucleico para una aplicación de PCR.

La Figura 1 muestra la detección del producto de amplificación en un gel de agarosa.

35 Los números de referencia en la Figura 1 representan:

- 1- Estándar de tamaño de ADN
- 2-4- Productos de amplificación
- 5- Control de PCR

Ejemplo de realización 2: Enriquecimiento de ácidos nucleicos libres (ácido nucleico "desnudo") de una muestra de gran volumen en combinación con una purificación posterior de los ácidos nucleicos

En 5 ml de una muestra de agua (determinación triple), se recogió un fragmento de ADN de 560 pb. La muestra se transfiere a un tubo de centrifuga de 15 ml. El aislamiento del ácido nucleico libre se lleva a cabo de la siguiente manera:

1. Añadir 100 µl de una solución acuosa de alginato (1 %) y 500 µl de ácido clorhídrico al 1 %. Mezclar con un agitador de vórtice e incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
- 50 2. Centrifugación a 4500 rpm durante 10 min. Eliminar el sobrenadante por completo.
3. Resuspender la pieza de gel con 500 µl de una solución salina caotrópica (isotiocianato de guanidina 4 M)
4. Transferir la preparación a una columna de filtro de centrifugadora con material de fibra de vidrio (Whatmann GFD). Centrifugación a 12.000 rpm durante 1 min. Desechar el filtrado.
- 55 5. Lavar la columna del filtro de centrifugación con un tampón de lavado que contenga etanol (etanol al 80 %). Centrifugación a 12.000 rpm durante 1 min. Desechar el filtrado.
6. Secar la columna del filtro de centrifugación mediante una centrifugación corta.
7. Insertar la columna del filtro de centrifugación en un nuevo recipiente de reacción. Añadir 100 µl de un tampón hiposalino (Tris HCl 10 mM) y eluir el ácido nucleico de la columna.

60

El ácido nucleico libre aislado se aplicó posteriormente a un gel de agarosa. Como puede observarse, se pudo lograr una recuperación casi cuantitativa con el procedimiento.

La Figura 2 muestra la representación electroforética en gel con el fragmento de ADN recuperado.

5

Los números de referencia en la Figura 1 representan:

1- Estándar de tamaño de ADN

2- Fragmento de ADN antes de la purificación

3- 5 fragmentos de ADN después de la purificación a partir de 5 ml de agua

10

Ejemplo de realización 3: Enriquecimiento de virus y posterior aislamiento de los ácidos nucleicos víricos. Evidencia del aumento significativo de la sensibilidad mediante el uso de un volumen de muestra más grande.

A un medio de cultivo celular se le añadió suero que contenía virus VDVB a diversas concentraciones. Para el enriquecimiento de los virus, se usaron 1,8 ml de la muestra. Comparado con el procedimiento de enriquecimiento, se aisló el ácido nucleico vírico mediante un procedimiento estándar a partir de 200 µl de la muestra. La detección de los virus de VDVB se realizó con un sistema de ensayo en tiempo real comercial. Se analizaron dos muestras por dilución. Los valores de CT listados en la tabla son los valores medios de las dos muestras. El enriquecimiento de los virus se llevó a cabo de la siguiente manera.

20

1. Transferir 1,8 ml de la muestra de cultivo celular que contiene los virus a un tubo de reacción de 2,0 ml. Añadirle al medio de cultivo celular (2 ml) 25 µl de una solución acuosa de alginato (1 %) y 200 µl de ácido clorhídrico al 1 %. Mezclar con un agitador de vórtice e incubar durante 10 min a temperatura ambiente.

25

2. Centrifugación a 14.000 rpm durante 2 min. Eliminar el sobrenadante por completo.

3. Resuspender la pieza de gel con 500 µl de una solución salina caotrópica (isotiocianato de guanidina 4 M)

El posterior aislamiento de los ácidos nucleicos víricos se llevó a cabo en un sistema de extracción automatizado (InnuPURE C12; Analytik Jena AG). Esto se hace mediante un kit comercial (innuPREP Virus RNA Kit; Analytik Jena AG). El procesamiento directo de muestras de 200 µl también se llevó a cabo con el kit comercial en un sistema de extracción automatizado (InnuPURE C12; innuPREP RNA Kit C12; analytik Jena AG).

30

Posteriormente, se usó el ácido nucleico aislado para la detección de virus mediante PCR en tiempo real.

35

Los resultados de la PCR en tiempo real se especifican a continuación.

Resultados de PCR en tiempo real. Comparación del "procedimiento estándar" con el procedimiento de enriquecimiento según la invención

40

	Procedimiento "directo" utilizando una muestra de 200 µl	Procedimiento de enriquecimiento utilizando una muestra de 1,8 ml
Dilución 1	CT 32,8	CT 31,4
Dilución 2	CT 36,2	CT 33,5
Dilución 3	CT 39,7	CT 37,7

De esta manera queda claro que con el procedimiento de enriquecimiento según la invención se puede procesar una mayor cantidad de muestra. Esto tiene la ventaja de una mayor sensibilidad, especialmente cuando la cantidad de los virus detectados es baja. Esto demuestra que el procedimiento según la invención ofrece la posibilidad de procesar volúmenes de muestra más grandes y de lograr de esa manera una mayor sensibilidad de detección.

45

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para enriquecer y aislar ácidos nucleicos y/o virus de una muestra, caracterizado por las siguientes etapas:
- 5 a) adición de una solución acuosa de una sal de un ácido poliurónico a la muestra
- b) adición de una sustancia que induce la formación de un gel/formación de un pellet del ácidopoliurónico
- 10 c) mezclar la muestra e incubación
- d) centrifugación de la muestra y eliminación del sobrenadante
- 15 e) disolver el pellet o la pieza de gel
- f) aislar los ácidos nucleicos y/o el ácido nucleico vírico de una manera conocida.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se usan alginatos como sales de un ácido poliurónico.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque se usan ácidos y/o soluciones que contienen iones de calcio como una sustancia que induce la formación de un gel/la formación de un pellet de ácido poliurónico.
- 25 4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la concentración de la solución de iones de calcio es de 1 mol/l.
- 30 5. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque se usa un ácido al 1 % como ácido.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque para disolver el pellet o la pieza de gel, se usan agentes alcalinos, agentes quelantes o sales caotrópicas.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque se usan EDTA, sales de guanidinio o citratos.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque antes del comienzo del procedimiento o después de la finalización del procedimiento, se lleva a cabo una lisis de la muestra.
- 40

Figura 1

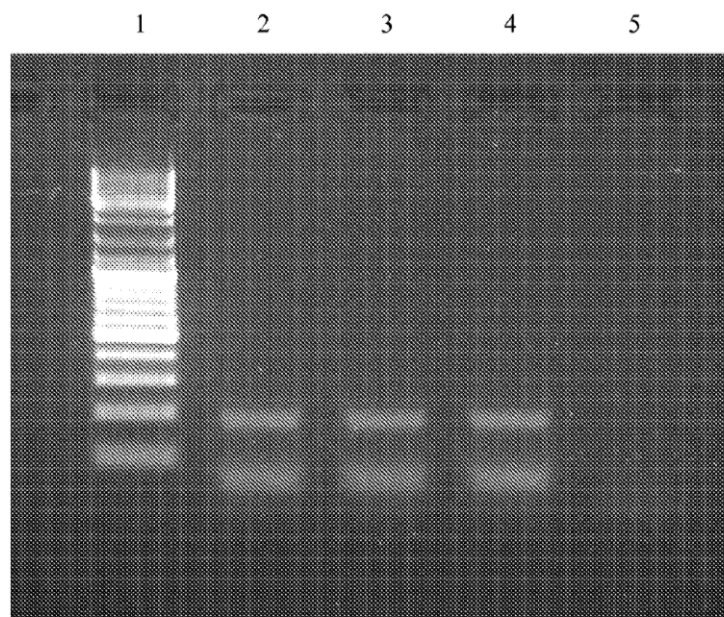


Figura 2

