

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 280**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2008 PCT/US2008/068807**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2009 WO09006417**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2008 E 08781182 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2171098**

54 Título: **Métodos para la extracción y purificación de componentes de muestras biológicas**

30 Prioridad:

29.06.2007 US 929512 P
02.07.2007 US 929544 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2018

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US

72 Inventor/es:

COLLIS, MATTHEW P. y
LIZZI, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 665 280 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

Métodos para la extracción y purificación de componentes de muestras biológicas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere generalmente a composiciones y métodos útiles para la extracción de materiales biológicos, en particular de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas. Más específicamente, la presente invención se refiere a la separación de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas.

Antecedentes de la invención

10 En la discusión siguiente se describirán determinados artículos y métodos con propósitos informativos e introductorios. Nada de lo que contiene la presente memoria se interpreta como una "admisión" de la técnica anterior. Los solicitantes se reservan expresamente el derecho de demostrar, cuando sea apropiado, que los artículos y métodos a los que se hace referencia en la presente memoria no constituyen la técnica anterior bajo las disposiciones legales aplicables.

15 En metodologías diagnósticas y bioquímicas, es imprescindible el acceso a la extracción o a la purificación de componentes celulares, tales como los ácidos nucleicos, y el acceso a la extracción o purificación de formas proteicas. El acceso a los ácidos nucleicos se requiere en metodologías tales como la secuenciación de ácidos nucleicos, la detección directa de secuencias de ácidos nucleicos particulares mediante la hibridación de ácidos nucleicos, y técnicas de amplificación de secuencias de ácidos nucleicos. Por lo tanto, un método para extraer y purificar ácidos nucleicos deberá ser simple, rápido y requerir, si la hubiera, una escasa manipulación adicional de la muestra para obtener el acceso al ácido nucleico deseado. Un método con todas estas características será extremadamente atractivo en la automatización de la preparación de muestras, un objetivo de los laboratorios de investigación y diagnóstico. El acceso a formas de proteínas purificadas se consigue a través de técnicas tales como la cromatografía de exclusión, cromatografía de intercambio iónico, precipitación diferencial, y similares. Estas metodologías, sin embargo, son problemáticas por varias razones. Por ejemplo, las técnicas de precipitación son aún rudimentarias y difíciles de automatizar, y a menudo dan como resultado una pérdida inaceptable de la muestra, mientras que la cromatografía es cara y requiere mucho tiempo.

25 Se describen métodos eficaces para la purificación y la manipulación de ácidos nucleicos empleando partículas paramagnéticas en las Patentes U.S. 5.973.138 ("138") y 6.433.160 ("160"). Las partículas paramagnéticas empleadas en las mismas, se unen de manera reversible a los ácidos nucleicos en las muestras biológicas y permiten la separación de ácidos nucleicos a partir de algunos de los demás componentes en las muestras biológicas. Una vez extraídos, los ácidos nucleicos unidos se eliminan de las partículas paramagnéticas a través de un tampón de elución/neutralización. Las partículas paramagnéticas se eliminan a continuación del tampón de elución/neutralización que contiene los ácidos nucleicos. El tampón que contienen los ácidos nucleicos se puede emplear en una manipulación adicional de los ácidos nucleicos extraídos, tal como la hibridación, restricción, marcaje, transcripción inversa y amplificación.

35 La purificación proteica mediante fraccionamiento rápido a partir de muestras biológicas se divulga en la Publicación de la concesión anterior 2006-0030056 ("0056"). Las proteínas en las muestras biológicas se separan mediante la unión de manera reversible de una molécula proteica a una partícula paramagnética en una muestra biológica. La muestra se puede someter a un proceso adicional para obtener una muestra proteica en una forma más pura o una muestra más reducida de proteínas seleccionadas. Un método que incrementa la separación y el aislamiento de los componentes o de las muestras biológicas, tal como ácidos nucleicos y proteínas a partir de una muestra, mejoraría el producto disponible para las metodologías diagnósticas y bioquímicas.

45 La Patente US 2007/031880 divulga un método para extraer componentes de una muestra biológica, que comprende una etapa de extraer el componente de la partícula paramagnética mediante la adición de un tampón de elución y un tampón de neutralización. Describe la adición de un tampón de elución y un tampón de neutralización en la misma etapa.

La Patente US 2007/092403 divulga métodos similares para aislar el ARN o ADN a partir de muestras biológicas.

Compendio de la invención

La presente invención se dirige a un método de extracción de componentes de muestras biológicas.

50 En particular, la presente invención se refiere a un método para extraer componentes de ácidos nucleicos de una muestra biológica, que comprende:

- (i) en un recipiente, unir de manera reversible al menos un componente de un ácido nucleico de la muestra biológica a al menos una partícula paramagnética, siendo dicha partícula paramagnética una partícula de óxido de hierro en un entorno ácido;
- (ii) separar al menos una partícula paramagnética unida al componente del ácido nucleico de los componentes

sin unir de la muestras biológica;

(iii) lavar al menos una partícula paramagnética unida al componente de ácido nucleico;

(iv) separar al menos una partícula paramagnética unida al componente de ácido nucleico de lavado;

5 (v) eliminar al menos un componente de ácido nucleico a partir de al menos una partícula paramagnética mediante elución en dos etapas y un proceso de neutralización que comprende

- extraer al menos una partícula paramagnética unida al componente de ácido nucleico con una disolución tampón de elución de pH básico que consiste en hidróxido potásico o hidróxido sódico, produciendo así una muestra eluida; y

10 - seguido de neutralización de la muestra eluida mediante la adición subsecuente de un tampón de neutralización seleccionado de bicina, Tris, ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico (CHES), N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetano sulfónico (BES), ácido 4-morfolinopropanosulfónico (MOPS) o fosfato, produciendo así un tampón optimizado;

15 (vi) seguido de la separación y eliminación de las partículas paramagnéticas tras la neutralización de la muestra mientras que la disolución de pH optimizado que contiene el ácido nucleico sin unir se transfiere para una manipulación adicional, en donde la etapa de eliminación se separa de la etapa de neutralización.

Las realizaciones preferidas de la presente invención son evidentes a partir de las reivindicaciones dependientes.

La presente invención proporciona un método para extraer componentes de ácidos nucleicos de muestras biológicas, que es simple, rápido y que requiere, si la hubiera, una escasa manipulación adicional de la muestra.

20 La presente invención proporciona un método que aumentaría la eficacia de la separación y del aislamiento de componentes de ácidos nucleicos de una muestra biológica.

La presente invención proporciona procesos mejorados para optimizar la extracción de componentes de ácidos nucleicos de muestras biológicas. Estos procesos de extracción optimizada aumentan significativamente la capacidad de separar y recuperar componentes de ácidos nucleicos, para metodologías diagnósticas y bioquímicas adicionales.

25 Las realizaciones de la presente invención proporcionan un método para extraer componentes de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas empleando el ajuste de pH de tampones para elución y neutralización de componentes biológicos diana.

Se dan también a conocer kits para llevar a cabo el método de extracción y purificación de componentes de una muestra biológica, tal como moléculas biológicas, orgánulos, y células a partir de las muestras biológicas.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es una representación gráfica de los resultados del Ejemplo 7.

La Figura 2 es una representación gráfica de los resultados del Ejemplo 7.

La Figura 3 es una representación gráfica de los resultados del Ejemplo 7.

La Figura 4 es una representación gráfica de los resultados del Ejemplo 7.

35 La Figura 5 es una representación gráfica de los resultados del Ejemplo 7.

La Figura 6 es una representación gráfica de los resultados del Ejemplo 7.

La Figura 7 es una representación gráfica de los resultados del Ejemplo 7.

La Figura 8 es una representación gráfica de los resultados del Ejemplo 7.

La Figura 9 es una representación gráfica de los resultados del Ejemplo 8.

40 La Figura 10 es una representación gráfica de los resultados del Ejemplo 8.

La Figura 11 es una representación gráfica de los resultados del Ejemplo 8.

La Figura 12 es una representación gráfica de los resultados del Ejemplo 8.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se dirige generalmente a métodos para la extracción de componentes de muestras biológicas.

En particular, la presente invención describe un método de extracción de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica, en donde el ácido nucleico extraído se puede manipular adicionalmente mediante medios tales como metodologías de hibridación, restricción, marcaje, transcripción inversa y amplificación. Los métodos descritos en la presente memoria presentan procesos mejorados para optimizar la extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas. Estos procesos de extracción optimizados incrementan significativamente la separación y recuperación de ácidos nucleicos para metodologías diagnósticas y bioquímicas adicionales.

Como se emplea en la presente memoria, los términos “purificar” y “purificación” incluyen también extraer/extracción, aislar/aislamiento y concentrar/concentración y no requiere pureza absoluta, sino que sólo requiere eliminar al menos alguno o todos los componentes de la muestra biológica. En la práctica se supone que los profesionales purificarán aproximadamente al 80% de pureza o más, preferiblemente 80%, 90%, 95% o más.

Las muestras biológicas empleadas según la presente invención, por ejemplo, muestras clínicas, forenses o medioambientales, pueden ser cualquier material biológico, preferiblemente que contiene ácido nucleico. Estas muestras pueden contener cualquier material viral o celular, incluyendo células procariotas o eucariotas, virus, bacteriófagos, micoplasmas, protoplastos y orgánulos, o cualquier parte de los mismos. Un componente de una muestra biológica como se emplea en la presente memoria puede ser cualquier parte de la muestra, que incluye material biológico y moléculas biológicas. Tales materiales biológicos pueden comprender todos los tipos de células de animales mamíferos o no mamíferos, células vegetales, algas (incluyendo las algas verde-azuladas), hongos, bacterias, levaduras, protozoos y virus. Las realizaciones de esta invención se emplean para extraer ácidos nucleicos de estas composiciones. Ejemplos representativos de materiales biológicos incluyen la sangre y productos derivados de la sangre, tales como sangre entera, plasma y suero; muestras clínicas, tales como semen, orina, heces, esputos, tejidos, cultivos celulares y suspensiones celulares, aspiraciones nasofaríngeas y frotis, incluyendo los frotis endocervical, vaginal, ocular, de garganta y bucal; y otros materiales biológicos, tales como uñas de las manos y los pies, piel, pelo, y fluido cerebroespinal u otro fluido corporal. Las muestras medioambientales incluyen tierra, agua, aire, efluentes en suspensión, polvos y otras fuentes de material que contienen ácido nucleico.

Las muestras biológicas de la presente invención se pueden pre-tratar para asegurar la liberación de los ácidos nucleicos en la muestra biológica de extracción. El pre-tratamiento de las muestras biológicas con este propósito se describe en la Publicación de la concesión anterior U.S. 2004-0157218 (“7218”). Como se divulga en la publicación 7218, se puede emplear preferiblemente una proteína desnaturalizada en el proceso de pre-tratamiento. Una proteína desnaturalizada que es útil en la presente invención incluye un agente o agentes que causan un incremento en el pH, tal como hidróxido potásico (KOH).

Los ácidos nucleicos de la presente invención se unen preferiblemente de forma reversible a las partículas paramagnéticas como se divulga mediante los métodos de las publicaciones 138 y 160. En las publicaciones 138 y 160, se encontró que cuando las partículas paramagnéticas de la invención estaban en un medio ácido, se unirían de manera reversible a las moléculas de ácido nucleico sin necesidad de un detergente aniónico, como se enseña en la Publicación Internacional N° WO 96/18731. Como se emplea en la presente memoria, el término de partícula o partículas paramagnéticas significa partícula o partículas como se describen en las publicaciones 138 y 160.

Dentro del significado de la presente invención, las etapas del método para la separación de la partícula paramagnética unida a los ácidos nucleicos de los demás componentes de la muestra biológica son preferiblemente las etapas del método descritas en las publicaciones 138 y 160.

En una realización preferida, la partícula paramagnética unida a las moléculas de ácido nucleico se pueden extraer con un tampón de elución adecuado obtenido aumentando el pH de tal medio. En métodos anteriores, la etapa de elución comprendía la adición de un tampón diseñado para eliminar los ácidos nucleicos en general de las partículas paramagnéticas y para neutralizar la disolución al mismo tiempo para la manipulación adicional, tal como hibridación, restricción, marcaje, transcripción inversa y amplificación. La extracción de los ácidos nucleicos de las partículas paramagnéticas en una etapa separada de la neutralización permite la optimización del pH del tampón de elución para extraer el ácido nucleico, logrando así de forma inesperada una mayor capacidad para separar y recuperar el ácido nucleico no unido en relación a la que se consigue con una sola etapa de elución/neutralización anterior con tampones modelo. Como se describe en la presente memoria, las partículas paramagnéticas, tales como óxido de hierro, se unen a ácidos nucleicos cargados negativamente en un pH ácido con una carga neta positiva. En un pH neutro a básico, las partículas paramagnéticas, tales como óxido de hierro, no están lo suficientemente cargadas positivamente y extraen los ácidos nucleicos. Agentes que emplean para ayudar en la elución del ácido nucleico de las partículas paramagnéticas, son disoluciones básicas que consisten en hidróxido potásico (KOH), o hidróxido sódico (NaOH) que incrementarán el pH del medio hasta un nivel suficiente como para que el ácido nucleico electronegativo se desplace de las partículas paramagnéticas.

La condición para la elución de ácidos nucleicos aparece a valores de pH de 8 a 14. Se desea una elución a un pH lo más alto posible sin degradación para prevenir la auto re-asociación no específica de la hebra de ácido nucleico y para optimizar la liberación de los ácidos nucleicos de las partículas paramagnéticas. Una elución a pH alto y la desnaturalización de híbridos de ADN:ADN, ADN:ARN o ARN:ARN también es beneficioso para aplicaciones subsiguientes que requieren una diana monocatenaria, tal como la hibridación, en particular la hibridación de una sonda, o la amplificación, en particular la amplificación de ácido nucleico isotérmico. El mantenimiento del ácido

nucleico diana en forma monocatenaria evita la necesidad de una desnaturalización con calor posterior antes de la hibridación de los cebadores o sondas complementarios. La auto re-asociación podría favorecer el enredo del ácido nucleico con la propia partícula paramagnética y evitar la separación del ácido nucleico de la partícula paramagnética en la etapa de elución. Otros tipos de partículas podrían emplear el concepto de elución seguido de neutralización.

Los ácidos nucleicos unidos a la partícula se eluyen con el tampón de elución hasta que se alcanza el resultado deseado. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden eluir de las partículas paramagnéticas con la adición de un tampón de elución de compuesto de KOH y mezclando, por ejemplo, por aspirado y dispensado de un volumen dado, hasta que se alcance el resultado deseado. Aunque este método es eficaz para la separación de ADN y ARN, se debe tener cuidado para evitar valores de pH y/o tiempos de exposición que puedan conducir a la degradación del ácido nucleico.

Eliminando de esta manera los ácidos nucleicos, el pH se optimiza para alcanzar la liberación máxima de los ácidos nucleicos unidos. De manera sorprendente, se encontró que realizando la etapa de elución de manera separada y permitiendo el uso de valores de pH altos, se daba como resultado un incremento de la reproducibilidad de la generación de la señal en ensayos de amplificación de ácido nucleico de las fases posteriores, en relación a la alcanzada usando un tampón de elución/neutralización combinado. La capacidad mejorada de recuperar y/o detectar los ácidos nucleicos fue inesperada. Por lo tanto, separando la etapa de elución de la etapa de neutralización se proporciona una ventaja significativa sobre los planteamientos anteriores.

Según la invención, se añade un tampón de neutralización después de la etapa de elución. El tampón de neutralización ajusta el valor del pH de la disolución de elución que contiene los ácidos nucleicos sin unir hasta un rango de pH preferido de 6 a 9, dependiendo de la aplicación posterior, más preferiblemente de 8 a 8,5, y lo más preferiblemente de 8,4. Neutralizando de esta manera la disolución que contiene los ácidos nucleicos sin unir, el pH del medio se optimiza para la manipulación adicional del ácido nucleico, tal como la hibridación, restricción, marcaje, transcripción inversa y amplificación. Esto se puede conseguir usando cualquier tampón de neutralización adecuado para alcanzar el valor de pH optimizado para la manipulación adicional. Un tampón de neutralización preferido es bicina, como se emplea en los ejemplos de a continuación. Tampones de neutralización alternativos incluyen, pero no se limitan a, Tris, CHES [ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico], BES (N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetano sulfónico), MOPS (ácido 4-morfolinopropanosulfónico) y fosfato. Otros tampones de neutralización útiles en el método de la presente invención se pueden determinar fácilmente por el experto en la técnica empleando métodos de cribado rutinarios que no requieren excesiva experimentación.

Después de la neutralización de la muestra, las partículas paramagnéticas se eliminan mientras la disolución de pH optimizado que contiene los ácidos nucleicos sin unir se transfieren para la manipulación adicional, tal como, por ejemplo, hibridación, restricción, marcaje, transcripción inversa y amplificación. Se emplea preferiblemente una fuerza magnética para separar las partículas paramagnéticas, como se describe en la presente memoria.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona kits para tratar una muestra biológica para la extracción de materiales biológicos de los mismos. Los kits pueden comprender al menos una proteína desnaturalizada como se describe en la presente memoria. Los kits pueden contener agua y disoluciones tampón como se describe en la presente memoria, así como partículas paramagnéticas u otros soportes sólidos para la extracción y/o purificación, que se describen en más detalle en otra parte. Los kits pueden contener también uno o más de los siguientes elementos para procesar y ensayar las muestras biológicas: dispositivos de recogida, tales como torundas, tubos y pipetas; controles; indicadores de pH; y termómetros. Los kits pueden incluir recipientes de reactivos mezclados juntos en las proporciones adecuadas para realizar el método de acuerdo con la presente invención. Los recipientes de reactivos contienen preferiblemente reactivos en cantidades unitarias que evitan etapas de medición cuando se realiza el método sujeto. Los kits de la presente divulgación pueden incluir tampones de elución optimizados para liberar los ácidos nucleicos de las partículas paramagnéticas, como se describe en la presente memoria. Los kits pueden incluir tampones de neutralización para aplicaciones de optimización posterior, tales como la hibridación, restricción, marcaje, transcripción inversa y amplificación de ácido nucleico, como se describe en la presente memoria.

Los kits de la presente divulgación pueden incluir también las mezclas de reacción, así como métodos para la extracción del ácido nucleico desde las mezclas de reacción. Las mezclas de reacción pueden comprender al menos una proteína desnaturalizada para realizaciones particulares cuando sea necesario. Las mezclas de reacción pueden incluir en algunas realizaciones varios reactivos empleados con las mezclas de reacción en cuestión, para purificar y detectar ácidos nucleicos, tal como tampones y óxido de hierro u otros soportes sólidos para la purificación de ácido nucleico.

Ejemplos

La invención se describirá a continuación con mayor detalle por medio de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se presentan con propósitos ilustrativos. Los siguientes ejemplos ilustran la eficacia de las composiciones y métodos de la presente invención para pre-tratar muestras de sangre entera y plasma para la extracción optimizada de ácido nucleico y la manipulación optimizada. La sangre entera y el plasma están entre las muestras más

complicadas para la extracción de ácido nucleico debido a su elevado contenido proteínico; por lo tanto, se espera que los métodos de la presente invención sean también eficaces para otras muestras biológicas. En estos ejemplos, la unión reversible de las moléculas de ácido nucleico a las partículas paramagnéticas en un medio ácido se emplea para el aislamiento del ácido nucleico a partir de la mezcla de reacción resultante de tratar las muestras para la extracción de ácido nucleico intacto según la presente invención. El pH de unión es preferiblemente de 1 a 6,5, más preferiblemente de 1 a 4, y lo más preferiblemente de 2. El pH de elución es preferiblemente de 8 a 14. Un experto en la técnica apreciará que el pH de elución se optimiza preferiblemente mediante el empleo de un pH que sea lo más alto posible sin causar la degradación de los ácidos nucleicos de la muestra. La tecnología de la partícula paramagnética captura los ácidos nucleicos de manera no específica, o independiente de la secuencia. Después de la neutralización, el pH es preferiblemente de 6,0-9,0 dependiendo de la aplicación posterior. Más preferiblemente el pH es de 8 a 8,5, y lo más preferiblemente de 8,4.

Ejemplo 1: El tratamiento alcalino extrae el ADN a partir del óxido de hierro mejor que sólo con calor

Este ejemplo se realizó para determinar si el tratamiento de las muestras con KOH 150 mM extrae el ADN a partir del óxido de hierro mejor que sólo con calor.

15 Los materiales que se emplearon fueron como sigue:

Tampón Bicina 2X 300 mM

Tampón de muestra

Pocillos de cebador *Chlamydia*

Pocillos de amplificación *Chlamydia*

20 Pocillos de cebador de la Amplificación Control (AC)

Pocillos de Amplificación AC

KOH 150 mM

Muestras de plasma

Óxido de hierro

25 Tubos de Pre-tratamiento de Plasma (PPT)

El plasma se preparó a partir de sangre entera mediante la centrifugación de la sangre entera en Tubos de Pre-tratamiento de Plasma (PPT) en 1.100 g durante 10 minutos. Se preparó un volumen de 6 ml de plasma. Se añadieron por mililitro diez mil estructuras elementales (EB) de *Chlamydia trachomatis* (CT) al plasma original, que se dispensó en volúmenes iguales en seis tubos de centrifugación de 2 ml. Se prepararon otros 10 ml de la suspensión bacteriana en agua desionizada (H₂ODi) con 10.000 CT EB/ml y se repartieron en volúmenes de 10 x 1 ml. Se preparó otra suspensión que contiene 10.000 CT EB/ml en tampón de muestra que contiene Bicina 2X 300 mM.

Se repartieron cuarenta miligramos de óxido de hierro en cuatro tubos de plasma; se repartieron 80 µl de ácido acético en dos de los tubos, y se añadieron 300 µl de ácido acético a dos tubos que contienen plasma pero no óxido de hierro. Los seis tubos se colocaron en un aparato de lisis durante 30 minutos a 105°C. Se añadieron cuarenta miligramos de óxido de hierro a los dos tubos que no contienen óxido de hierro después de la lisis; se añadieron 80 µl de ácido acético a los dos tubos que no contienen ácido. Después del mezclado, de la recuperación del óxido de hierro y de la eliminación de la matriz de la muestra, las partículas se lavaron dos veces con 1 ml/tubo de agua desionizada. Se trató un tubo de cada condición con 500 µl de KOH 150 mM durante 15 minutos antes de la adición de tampón de muestra de Bicina 2X 300 mM. Como controles, se añadió a un tubo de cada condición un tampón de muestra que contiene KOH 75 mM/Bicina 2X 150 mM.

Se añadieron cuarenta miligramos de óxido de hierro en dos de los 10 tubos con 10.000 CT EB/ml en agua desionizada. Se añadieron 80 µl de ácido acético a los dos tubos que no contienen óxido de hierro y 300 µl de ácido acético a los dos tubos que contienen óxido de hierro. Se lisaron estos tubos y cuatro tubos sin tratamiento ácido previo a 105°C durante 30 minutos. Los tubos que contienen óxido de hierro antes de la lisis tenían 80 µl repartidos en cada uno. Al resto de tubos se añadieron 40 mg de óxido de hierro y todos los tubos se colocaron en un dispositivo rotatorio de extremo sobre extremo durante 30 minutos. Después de la recuperación del óxido de hierro, las partículas se lavaron dos veces con 1 ml/tubo de agua desionizada. Se trató un tubo de cada condición con 500 µl de KOH 150 mM durante 15 minutos antes de la adición del tampón de muestra de Bicina 2X 300 mM. Como controles, se añadió a un tubo de cada tipo un tampón de muestra que contiene KOH 75 mM/Bicina 2X 150 mM.

Los eluidos de todos los tubos se hirvieron durante 5 minutos y los lisados se ensayaron empleando micropocillos para el Ensayo de ADN Amplificado de *Chlamydia trachomatis* BD ProbeTec™ (Little *et al.*, Clin Chem 1999; 45:777-

784).

Tabla 1

Muestra	Óxido de Hierro en el lisador	Ácido Acético en el lisador	Tratamiento Alcalino	CT MOTA	AC MOTA*
Plasma	SÍ	NO 80µl	SÍ	12988	9978
Plasma	SÍ	NO 80µl	NO	3937	18449
Lavar	SÍ	NO 80µl	SÍ	13664	9869
Lavar	SÍ	NO 80µl	NO	116	5129
Lavar	NO	NO 80µl	SÍ	11727	8207
Lavar	NO	NO 80µl	NO	234	10788
Plasma	SÍ	SÍ 80µl	SÍ	84	4014
Plasma	SÍ	SÍ 80µl	NO	158	10916
Lavar	NO	SÍ 80µl	SÍ	160	7765
Lavar	NO	SÍ 80µl	NO	194	8481
Plasma	NO	SÍ 300µl	SÍ	77	9817
Plasma	NO	SÍ 300µl	NO	244	3541
Lavar	NO	SÍ 300µl	SÍ	5	4670
Lavar	NO	SÍ 300µl	NO	97	1931
Lavar	NO	NO 300µl	SÍ	1360	42
Lavar	NO	NO 300µl	NO	176	610
Control SB	Tampón de muestra			33912	12048
Control SB	Tampón de muestra			23450	9601

* AC –Amplificación Control

- 5 El valor MOTA (suma de unidades individuales de medición a lo largo del tiempo) representa el área bajo la curva de la fluorescencia relativa a lo largo del tiempo. El punto de corte establecido para una reacción positiva con el ensayo CT es de 2.000 MOTA. Es evidente que, en la mayoría de los casos, se obtuvieron valores MOTA superiores a partir de los lisados expuestos al proceso de las dos etapas de elución (KOH seguido de neutralización con Bicina).

Ejemplo 2: Menor volumen de elución empleado en la elución en dos etapas

Este ejemplo demuestra la recuperación de ARN empleando un proceso de elución en dos etapas.

Los materiales que se emplearon fueron como sigue:

Óxido de hierro

5 Tubos de pre-tratamiento de Plasma (PPT)

KPO₄ 30 mM

KPO₄ 500 mM

Transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT)

Enzima de restricción BsoBI

10 Proteína GP32

Albúmina de Suero Bovino (BSA)

Polimerasa Bst

Glicerol 55%

Magnesio 200 mM

15 Dimetilsulfóxido (DMSO)

Sonda Detectora Fluorescente

Cebadores de la Amplificación por Desplazamiento de la Hebra (SDA)

Cebadores Bumper

Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)

20 Proteinasa K

Formamida

Ácido de fijación

KOH

Bicina

25 Transcritos del gen *gag* del VIH

El plasma se pre-trató con formamida 44% y 5U de Proteinasa K durante 20 minutos a 65°C y 10 minutos a 70°C. Se añadió al plasma óxido de hierro y 180 µl de ácido de fijación. A las mezclas se añadieron 10.000 copias/ml del transcrito del gen *gag* del VIH. Después de la unión al óxido de hierro y del lavado, el ARN se extrajo con 120 µl bien de un tampón de elución de KOH 80 mM o bien 100 mM durante 20 minutos a 65°C. El eluido restante se neutralizó con 60 µl de bicina bien de 192 mM o bien de 230 mM, y se mezcló durante 2 minutos. El ARN se transcribió de forma inversa con AMV-RT y se amplificó mediante SDA empleando cebadores específicos de *gag*. (Nycz *et al.*, *Anal Biochem*, 1998; 259:226-234). La detección ocurrió a tiempo real empleando una sonda detectora fluorescente. (Nadeau *et al.*, *Anal Biochem*, 1999; 276:177-187).

30

Tabla 2

Elución con KOH	Neutralización con Bicina	Concentración del transcrito de VIH/ml	VIH/MOTA	Media
80	230	4000	4108	
80	230	4000	2098	
80	230	4000	6550	4252

ES 2 665 280 T3

80	230	8000	37915	
80	230	8000	1501	
80	230	8000	9832	16416
80	192	4000	2	
80	192	4000	13	
80	192	4000	863	299
80	192	8000	24648	
80	192	8000	24957	
80	192	8000	41701	30435
100	230	4000	0	
100	230	4000	0	
100	230	4000	6	3
100	230	8000	0	
100	230	8000	4	
100	230	8000	1	2
100	192	4000	0	
100	192	4000	0	
100	192	4000	0	0
100	192	8000	0	
100	192	8000	0	
100	192	8000	3	1

Las muestras en las que se empleó para la elución una menor concentración de KOH 80 mM produjeron mayores valores MOTA, indicando una detección/amplificación más fuerte del ARN diana. Esto es probablemente porque la exposición a la mayor concentración de KOH (100 mM) causó la hidrólisis y degradación de los transcritos de ARN. Este experimento demuestra, por lo tanto, la capacidad de extracción del óxido de hierro con el proceso de elución en dos etapas para recuperar el ARN a partir de una matriz biológica compleja. Sorprendentemente, la exposición del ARN a un mayor pH durante la etapa de elución no causó la degradación del ácido nucleico diana.

Ejemplo 3: Efecto del calor durante la elución en dos etapas

El ejemplo se realizó para determinar si el calor durante la elución a diferentes concentraciones de KOH afectaba a la estabilidad y/o recuperación y/amplificación/detección del ARN.

ES 2 665 280 T3

Los materiales que se emplearon en este ejemplo fueron los siguientes:

- Óxido de hierro
- Tubos de Preparación de Plasma (PPT)
- KPO₄ 30 mM
- 5 KPO₄ 500 mM
- AMV RT
- Enzima de restricción BsoBI
- Proteína GP32
- Albúmina de Suero Bovino (BSA)
- 10 Polimerasa Bst
- Glicerol 55%
- Magnesio 200 mM
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Sonda Detectora Fluorescente
- 15 Cebadores de la Amplificación por Desplazamiento de la Hebra (SDA)
- Cebadores Bumper
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)
- Proteinasa K
- Formamida
- 20 Ácido de fijación
- KOH
- Bicina
- Transcritos del gen *gag* del VIH
- 25 El plasma se pre-trató con formamida 44% y 5U de Proteinasa K durante 20 minutos a 65°C y 10 minutos a 70°C. Se añadió al plasma óxido de hierro y 180 µl de ácido de fijación. A las mezclas se añadieron 5.000 copias/ml del transcrito del gen *gag* del VIH. Después de la unión al óxido de hierro y del lavado, el ARN se extrajo con 120 µl bien de un tampón de elución de KOH 60 mM, 70 mM, o bien 80 mM durante 2 minutos sin calor o bien durante 20 minutos a 65°C. Las muestras se neutralizaron inmediatamente mediante mezclado con 60 µl de bicina 230 mM durante 2 minutos. El ARN se transcribió de forma inversa con AMV-RT y se amplificó mediante SDA empleando cebadores específicos de *gag*. (Nycz *et al.*, *Anal Biochem*, 1998; 259:226-234). La detección ocurrió a tiempo real empleando una sonda detectora fluorescente. (Nadeau *et al.*, *Anal Biochem*, 1999; 276:177-187).
- 30

Tabla 3

Elución con KOH (mM)		MOTA	Media
60	SIN CALOR	20256	
60	SIN CALOR	14841	
60	SIN CALOR	13690	
60	SIN CALOR	3821	13152

ES 2 665 280 T3

70	SIN CALOR	23759	
70	SIN CALOR	5870	
70	SIN CALOR	1923	
70	SIN CALOR	11908	10865
80	SIN CALOR	6006	
80	SIN CALOR	21826	
80	SIN CALOR	4887	
80	SIN CALOR	17973	12623
60	CON CALOR	34805	
60	CON CALOR	25907	
60	CON CALOR	18274	
60	CON CALOR	6884	21467
70	CON CALOR	14220	
70	CON CALOR	18591	
70	CON CALOR	3872	
70	CON CALOR	2297	9745
80	CON CALOR	3220	
80	CON CALOR	3930	
80	CON CALOR	75	
80	CON CALOR	0	1806

5 Se obtuvieron valores MOTA positivos (>2000) bajo todas las condiciones. Estos datos indican, por lo tanto, que es posible extraer ARN a partir del óxido de hierro sin emplear calor usando un método de elución en dos etapas que implica la exposición al KOH tras la neutralización con bicina. El procedimiento sin calor tiene la ventaja de requerir una instrumentación menos sofisticada.

Ejemplo 4: Optimización de las condiciones de elución

Este experimento se realizó para optimizar las condiciones de elución.

Los materiales que se emplearon en este ejemplo fueron los siguientes:

Óxido de hierro

10 Tubos de Preparación de Plasma (PPT)

KPO₄ 30 mM

KPO₄ 500 mM

AMV RT

- Enzima de restricción BsoBI
- Proteína GP32
- Albúmina de Suero Bovino (BSA)
- Polimerasa Bst
- 5 Glicerol 55%
- Magnesio 200 mM
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Sonda Detectora Fluorescente
- Cebadores de la Amplificación por Desplazamiento de la Hebra (SDA)
- 10 Cebadores Bumper
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)
- Proteinasa K
- Formamida
- Ácido de fijación
- 15 KOH
- Bicina
- Transcritos del gen *gag* del VIH

20 El plasma se pre-trató con formamida 44% y 5U de Proteinasa K durante 20 minutos a 65°C y 10 minutos a 70°C. Se añadió al plasma óxido de hierro y 180 µl de ácido de fijación. A las mezclas se añadieron 10.000 copias/ml del transcrito del gen *gag* del VIH. Después de la unión al óxido de hierro y del lavado, el ARN se extrajo con 120 µl bien de un tampón de elución de KOH 46 mM, 55 mM, 63 mM o bien 80 mM durante 20 minutos a 65°C. Las muestras se neutralizaron entonces con 60 µl de bicina 109 mM y se mezclaron durante 2 minutos. El ARN se transcribió de forma inversa con AMV-RT y se amplificó mediante SDA empleando cebadores específicos de *gag*. (Nycz *et al.*, *Anal Biochem*, 1998; 259:226-234). La detección ocurrió a tiempo real empleando una sonda detectora fluorescente.

25 (Nadeau *et al.*, *Anal Biochem*, 1999; 276:177-187).

Tabla 4

Condición		MOTA	Media
KOH 80 mM, bicina 109 mM, KPO ₄ 24 mM	CON CALOR	5887	
KOH 80 mM, bicina 109 mM, KPO ₄ 24 mM	CON CALOR	5648	
KOH 80 mM, bicina 109 mM, KPO ₄ 24 mM	CON CALOR	7377	6304
KOH 63 mM, bicina 109 mM, KPO ₄ 50 mM	CON CALOR	5339	
KOH 63 mM, bicina 109 mM, KPO ₄ 50 mM	CON CALOR	4586	
KOH 63 mM, bicina 109 mM, KPO ₄ 50 mM	CON CALOR	1648	3857

ES 2 665 280 T3

KOH 46 mM, bicina 46 mM, KPO ₄ 36 mM	CON CALOR	4731	
KOH 46 mM, bicina 46 mM, KPO ₄ 36 mM	CON CALOR	6466	
KOH 46 mM, bicina 46 mM, KPO ₄ 36 mM	CON CALOR	6147	5781
KOH 55 mM, bicina 56 mM, KPO ₄ 43 mM	CON CALOR	5656	
KOH 55 mM, bicina 56 mM, KPO ₄ 43 mM	CON CALOR	10620	
KOH 55 mM, bicina 56 mM, KPO ₄ 43 mM	CON CALOR	9606	8627
KOH 80 mM, bicina 109 mM, KPO ₄ 24 mM	SIN CALOR	5430	
KOH 80 mM, bicina 109 mM, KPO ₄ 24 mM	SIN CALOR	3559	
KOH 80 mM, bicina 109 mM, KPO ₄ 24 mM	SIN CALOR	1566	3518
KOH 63 mM, bicina 109 mM, KPO ₄ 50 mM	SIN CALOR	72	
KOH 63 mM, bicina 109 mM, KPO ₄ 50 mM	SIN CALOR	91	
KOH 63 mM, bicina 109 mM, KPO ₄ 50 mM	SIN CALOR	107	90
KOH 46 mM, bicina 46 mM, KPO ₄ 36 mM	SIN CALOR	2087	
KOH 46 mM, bicina 46 mM, KPO ₄ 36 mM	SIN CALOR	2581	
KOH 46 mM, bicina 46 mM, KPO ₄ 36 mM	SIN CALOR	2004	2224

ES 2 665 280 T3

KOH 55 mM, bicina 56 mM, KPO ₄ 43 mM	SIN CALOR	1122	
KOH 55 mM, bicina 56 mM, KPO ₄ 43 mM	SIN CALOR	1608	
KOH 55 mM, bicina 56 mM, KPO ₄ 43 mM	SIN CALOR	2782	1838

El ARN se recuperó eficazmente a partir del plasma empleando el procedimiento de elución en dos etapas. Estos datos muestran, sin embargo, que se obtuvieron mayores valores MOTA cuando el ARN se extrajo en presencia de calor, independientemente de las condiciones del tampón empleado para la amplificación/detección.

Ejemplo 5: Volumen de elución menor con elución en dos etapas

- 5 El ejemplo evaluó un volumen de elución menor con el proceso de elución en dos etapas.

Los materiales que se emplearon en este ejemplo fueron los siguientes:

Óxido de hierro

Tubos de Preparación de Plasma (PPT)

KPO₄ 30 mM

- 10 KPO₄ 500 mM

AMV RT

Enzima de restricción BsoBI

Proteína GP32

Albúmina de Suero Bovino (BSA)

- 15 Polimerasa Bst

Glicerol 55%

Magnesio 200 mM

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Sonda Detectora Fluorescente

- 20 Cebadores de la Amplificación por Desplazamiento de la Hebra (SDA)

Cebadores Bumper

Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)

Proteinasa K

Formamida

- 25 Ácido de fijación

KOH

Bicina

Transcritos del gen *gag* del VIH

- 30 El plasma se pre-trató con formamida 44% y 5U de Proteinasa K durante 20 minutos a 65°C y 10 minutos a 70°C. Se añadió al plasma óxido de hierro y 180 µl de ácido de fijación. A las mezclas se añadieron 10.000 copias/ml del transcrito del gen *gag* del VIH. Después de la unión al óxido de hierro y del lavado, el ARN se extrajo con 120 µl bien de un tampón de elución de KOH 50 mM, 65 mM, o bien 80 mM durante 20 minutos a 65°C. Las muestras se

ES 2 665 280 T3

neutralizaron entonces con 60 µl de bicina bien 154 mM, 192 mM, o bien 230 mM, y se mezclaron durante 2 minutos. El ARN se transcribió de forma inversa con AMV-RT y se amplificó mediante SDA empleando cebadores específicos de gag. (Nycz *et al.*, *Anal Biochem*, 1998; 259:226-234). La detección ocurrió a tiempo real empleando una sonda detectora fluorescente. (Nadeau *et al.*, *Anal Biochem*, 1999; 276:177-187).

5 Tabla 5

Elución con KOH (mM)	Neutralización con Bicina (mM)	KOH Final	Bicina Final	MOTA	Media
80	230	42	86	74494	
80	230	42	86	73007	
80	230	42	86	59702	69068
80	192	42	76	59816	
80	192	42	76	67597	
80	192	42	76	70179	65864
80	154	42	66	64613	
80	154	42	66	62096	
80	154	42	66	64866	53858
65	192	34	76	72410	
65	192	34	76	87738	70074
65	154	34	86	57300	
65	154	34	86	37732	47516
50	230	26	86	65206	
50	230	26	86	30787	47997
50	192	26	76	68328	
50	192	26	76	54644	81486
50	154	26	66	60811	
50	154	26	66	57274	59043
50	control	50	90	58761	
50	control	50	90	65975	62358

Se consiguió una fuerte amplificación del ARN diana bajo cada una de las condiciones ensayadas, como se determina por los altos valores MOTA. Estos datos demuestran la utilidad de extracción del óxido de hierro tras el proceso de elución en dos etapas para la recuperación del ARN amplificable a partir de la matriz biológica compleja. No había evidencia de hidrólisis de ARN por la exposición a diferentes concentraciones de KOH durante 20 minutos a 65°C.

5

Ejemplo 6: Elución en dos etapas y Neutralización

Este ejemplo detalla la separación de las etapas de elución y neutralización en comparación al método de una sola etapa y el efecto sobre los valores MOTA.

Los materiales que se emplearon en este ejemplo fueron los siguientes:

10

Óxido de hierro

Tubos de Preparación de Plasma (PPT)

KPO₄ 30 mM

KPO₄ 500 mM

AMV RT

15

Enzima de restricción BsoBI

Proteína GP32

Albúmina de Suero Bovino (BSA)

Polimerasa Bst

Glicerol 55%

20

Magnesio 200 mM

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Sonda Detectora Fluorescente

Cebadores de la Amplificación por Desplazamiento de la Hebra (SDA)

Cebadores Bumper

25

Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)

Proteinasa K

Formamida

Ácido de fijación

KOH

30

Bicina

Transcritos del gen *gag* del VIH

El plasma se pre-trató con formamida 44% y 5U de Proteinasa K durante 20 minutos a 65°C y 10 minutos a 70°C. Se añadió al plasma óxido de hierro y 180 µl de ácido de fijación. A las mezclas se añadieron 10.000 copias/ml del transcrito del gen *gag* del VIH. Después de la unión al óxido de hierro y del lavado, el ARN se extrajo con 400 µl bien de un tampón de elución de KOH 50 mM, 65 mM, o bien 80 mM durante 20 minutos a 65°C. Los eluidos se dividieron en volúmenes de 100 µl y 300 µl, cada uno de los cuales se neutralizó con un tampón de neutralización diferente que contiene bicina (Tabla 6). El ARN se transcribió de forma inversa con AMV-RT y se amplificó mediante SDA empleando cebadores específicos de *gag*. (Nycz *et al.*, *Anal Biochem*, 1998; 259:226-234). La detección ocurrió a tiempo real empleando una sonda detectora fluorescente. (Nadeau *et al.*, *Anal Biochem*, 1999; 276:177-187).

35

40

ES 2 665 280 T3

Tabla 6

Elución con KOH (mM)	Neutralización con Bicina (mM)	MOTA	MOTA Media		KOH Final (mM)	Bicina Final (mM)
80	0/160	49050			40	110
80	0/160	45345			40	110
80	0/160	34158	42851		40	110
80	0/130	36091			40	90
80	0/130	39036			40	90
80	0/130	46476	40534		40	90
80	0/100	64709			40	75
80	0/100	65277			40	75
80	0/100	40217	50058		40	75
65	0/160	54037			32,5	110
65	0/160	60464			32,5	110
65	0/160	56883	57061		32,5	110
65	0/130	56187			32,5	90
65	0/130	55621	65904		32,5	90
65	0/100	52745			32,5	75
65	0/100	54458	53602		32,5	75
50	0/160	70757			25	110
50	0/160	60795	65776		25	110
50	0/130	72728			25	90
50	0/130	67532	70130		25	90
50	0/100	69772			25	75
50	0/100	66012	67892		25	75
UNA ETAPA	CONTROL	84066			50	90
UNA ETAPA	CONTROL	69863	71965		50	90

ES 2 665 280 T3

80	20/160	34865			50	110
80	20/160	6098			50	110
80	20/160	2670	14544		50	110
80	20/130	34874		AMPLIFICACIÓN CONTROL	50	90
80	20/130	8710			50	90
80	20/130	29190	24258		50	90
80	20/100	47498			50	75
80	20/100	20794			50	75
80	20/100	44890	37727		50	75
65	35/160	45072			50	110
65	35/160	50814			50	110
65	35/160	41113	45686		50	110
65	35/130	33511		AMPLIFICACIÓN CONTROL	50	90
65	35/130	22663	28087		50	90
65	35/100	64496			50	75
65	35/100	68245	61370		50	75
50	50/160	6536			50	110
50	50/160	14936	10736		50	110
50	50/130	55468		AMPLIFICACIÓN CONTROL	50	90
50	50/130	15955	35711		50	90
50	50/100	44669			50	75
50	50/100	56643	55656		50	75
UNA ETAPA	CONTROL	70602			CONTROL	CONTROL
UNA ETAPA	CONTROL	76028	73315		CONTROL	CONTROL

Los valores MOTA mejoraron con el descenso de la concentración de KOH durante la elución, sugiriendo que el ARN diana se podría degradar parcialmente mediante la exposición prolongada a un álcali fuerte. La elución con menores concentraciones de KOH mejoraron los valores MOTA indicando una amplificación/detección más sólida.

Ejemplo 7: Eficacia de extracción del ADN diana

El propósito de este experimento era determinar la eficacia de extracción del ADN a partir de óxido de hierro empleando el Sistema BD Viper™ en el modo de extracción. Este estudio se diseñó para evaluar si aún había ADN diana amplificable unido al óxido de hierro después de la etapa de elución final en el proceso de extracción de óxido de hierro realizado empleando un tampón compatible con SDA (pH de aproximadamente 8,4). En un experimento previo se determinó que si el óxido de hierro se volvía a exponer al tampón de elución de este pH, el segundo eluido ensayado daría como resultado señales fluorescentes positivas en la reacción SDA. Una de las posibles razones para esto era la presencia de cantidades traza del tampón de elución después de la extracción original. Para mitigar esta posibilidad, a todos los tubos de extracción de este experimento se les eliminó la forma del tampón de elución remanente de la extracción inicial antes de volver a extraer con un tampón adicional compatible con SDA. Esto se completó con el lavado del óxido de hierro con agua desionizada (pH 4-5) para prevenir otra elución de cualquier ADN unido. En este experimento no se empleó la matriz clínica.

Los materiales que se emplearon en este ejemplo fueron los siguientes:

Fosfato potásico-DMSO-glicerol (KPDG) Diluyente muestra (tampón compatible con SDA)

15 Tubos de extracción

Tampón de lisis

Tampón de unión

Tampón de lavado

Tampón de elución

20 Micropocillos de cebado y amplificación para Ensayos de ADN Amplificado BD ProbeTec™ CT/GC Q^x para organismos de *Chlamydia trachomatis* (CT)/*Neisseria gonorrhoea* (GC) (1x10⁵/ml de evaluación).

El procedimiento fue como sigue:

1	Se utilizaron para el ensayo instrumentos Viper SP (PP001 – V3.00H+).
2	Mover el botón NUM_WASH_MIXES= 2, y ELUT_VOL_400, NO_LIQUID=1
3	Se reinicia cada instrumento con el disco de diagnóstico adecuado.
4	Preparar 70 mL de cada organismo/mL (CT y GC) mediante la adición de 35 µL de 10 ⁹ /mL CT/GC de evaluación en 70 mL del diluyente de muestra CT/GC.
5	Tomar una alícuota de 1 mL del diluyente positivo en 48 tubos de diluyente de muestra.
6	Establecer el instrumento Viper para una ejecución de extracción media con placas CTQ ^x /GCQ ^x .
7	PP01, Rejilla #14 – ejecución de extracción de control primaria
8	Después de la primera ejecución, eliminar los tubos de extracción del bloque de extracción del Viper.
9	Insertar todos los tubos en el bloque de extracción manual del Viper.
10	Encajar los imanes para bloquear el óxido de hierro.
11	Con un pipeteador Matrix, eliminar todo el fluido de tampón de elución de fosfato potásico DMSO-glicerol (KPDG) de los tubos de extracción adecuados.
12	Desencajar los imanes.
13	Añadir 1 mL de DiH ₂ O a los 24 tubos de extracción empleados. Mezclar.
14	Encajar los imanes para bloquear el óxido de hierro.
15	Eliminar los eluidos de lavado y distribuirlo en nuevos tubos de diluyente de muestra.
16	Repetir el proceso para 12 de los 24 tubos de extracción empleados.
17	Añadir las muestras de eluido de lavado de la muestra a la rejilla de muestra del Viper.
18	Añadir el tampón de elución KPDG 2X a cada uno de los eluidos de lavado.
19	Añadir de nuevo todos los tubos de extracción empleados en la rejilla de extracción del Viper.

Los resultados, mostrados en las Figuras 1 – 8, indican que aún había ADN diana CT/GC amplificable unido al óxido de hierro después de la etapa de elución inicial con tampón KPDG a un pH de aproximadamente 8,4. El lavado del óxido de hierro con agua desionizada eliminó las trazas del primer eluido sin extraer el resto del ADN diana a partir del óxido de hierro. Otro tratamiento del óxido de hierro con un tampón de elución de KPDG adicional permitió la recuperación de más ADN diana que era detectable por SDA. Para hacer un seguimiento este experimento se ensayó con un tampón de elución a un pH mayor para recuperar el ADN diana restante a partir del óxido de hierro. Un experto en la técnica tendrá la capacidad de evaluar varias condiciones de tales tampones sin demasiada experimentación.

Ejemplo 8: MSA de la elución en 2 etapas

- 10 El propósito de este experimento es completar el Análisis del Sistema de Medición (MSA, de sus siglas en inglés) para el proceso de elución en dos etapas empleando el Sistema BD Viper™ en el modo de extracción para determinar la reproducibilidad de los resultados entre las ejecuciones y los instrumentos Viper.

- 15 La segunda etapa de elución significa la adición de la disolución KOH 2X (142 mM) a los tubos de extracción seguido de la disolución de neutralización 2X para formar el tampón de ensayo SDA (disolución de neutralización 2X es Bicina 251 mM, DMSO 21,8%, Glicerol 19%, con Tween 20 0,1% y Proclin 300 0,03%).

Los materiales que se emplearon en este experimento fueron como sigue:

5,9 L de Diluyente de muestra CT/GC

15 cubetas para tubos de extracción

250 ml de tampón de neutralización 2X

- 20 250 ml de KOH 2X (tampón de elución de pH alto)

Tampón de lavado (agua y Tween)

Ácido de fijación

Tampón de lisis KOH

Micropocillos de cebado y amplificación para Ensayos de ADN Amplificado BD ProbeTec™ CT/GC Q^x

- 25 2 alícuotas de *Chlamydia trachomatis* (CT) 10⁵.

4 alícuotas de *Neisseria gonorrhoea* (GC) 10⁵.

Las muestras CT/GC positiva y negativa se prepararon en diluyente de muestra. El conjunto diana mínimo era óptimo con CT a 15 EB (estructuras elementales)/ml y GC a 50 células/ml. El conjunto diana máximo era óptimo con CT a 30 EB/ml y GC a 100 células/ml. Los cálculos de los picos fueron como sigue:

- 30 Mínimo: CT 15 EB/ml: 10⁵/ml (xmls) = 15 EB/ml (2450 ml) → pico CT 367,5 µl;

GC 50 células/ml: 10⁵/ml (xmls) = 50 células/ml (2450 ml) → pico GC 1225 µl;

Máximo: CT 30 EB/ml: 10⁵/ml (xmls) = 30 EB/ml (2450 ml) → pico CT 735 µl;

GC 100 células/ml: 10⁵/ml (xmls) = 100 células/ml (2450 ml) → pico GC 2450 µl;

- 35 Las muestras de CT/GC negativas tienen menores picos. Las muestras se repartieron en alícuotas de 3,5 ml/tubo en 5 rejillas Viper separadas para 3 extracciones para cada tubo. Se emplearon las mismas muestras para las tres ejecuciones en cada instrumento. Las muestras se extrajeron empleando bien el protocolo de elución en una etapa o bien el de dos etapas. En resumen, se añadió KOH a las muestras para lisar las células y liberar su ácido nucleico en la disolución. A continuación se añadió el ácido de fijación para disminuir el pH y producir una carga positiva en la superficie del óxido de hierro, que se une al ADN cargado negativamente. El óxido de hierro y el ADN unidos se lavaron, y el ADN se extrajo bien mediante un proceso de dos etapas que implica la exposición a KOH seguido de la neutralización con tampón bicina, o bien mediante un proceso de una etapa que implica la exposición a una disolución de bicina y KOH a un pH de aproximadamente 8,4. Después el ADN extraído se detectó empleando Ensayos de ADN Amplificado BD ProbeTec™ CT/GC Q^x.

- 45 Estos resultados se muestran en las Figuras 9-12, que representan las Unidades de Fluorescencia Relativa Máxima (MaxRFU) obtenidas con cada muestra extraída. Una MaxRFU elevada es indicativa de una amplificación/detección más eficaz. La concentración más estricta de las puntuaciones MaxRFU, es el sistema más sólido. En las Figuras 9 y 11, el tipo de muestra CT inferior en dos etapas (15 EB/ml) proporcionó un CpK que era 1,46 veces más alto que el del método de elución en una sola etapa. En las Figuras 10 y 12, el tipo de muestra GC inferior en dos etapas (50 células/ml) proporcionó un CpK que era 0,94 veces más alto que el del método de elución en una sola etapa. El CpK

es el índice de capacidad del proceso, una medida de la variación de datos a largo plazo o en grandes muestras, que incluyen no sólo la variación sobre la media sino también del desplazamiento de la misma media. El CpK es una métrica común que se emplea durante el estado estable de producción para medir la reproducibilidad del resultado.

- 5 El proceso de elución en dos etapas se realizó mejor y proporcionó valores CpK más altos que el programa de elución en una sola etapa tanto para CT como para GC.

REIVINDICACIONES

1. Un método para extraer componentes de ácidos nucleicos de una muestra biológica, que comprende:
 - (i) en un recipiente, unir de manera reversible al menos un componente de un ácido nucleico de la muestra biológica a al menos una partícula paramagnética, siendo dicha partícula paramagnética una partícula de óxido de hierro en un entorno ácido;
 - (ii) separar al menos una partícula paramagnética unida al componente del ácido nucleico, de los componentes sin unir de las muestras biológicas;
 - (iii) lavar al menos una partícula paramagnética unida al componente de ácido nucleico;
 - (iv) separar al menos una partícula paramagnética unida al componente de ácido nucleico de lavado;
 - (v) eliminar al menos un componente de ácido nucleico a partir de al menos una partícula paramagnética mediante elución en dos etapas y un proceso de neutralización que comprende
 - extraer al menos una partícula paramagnética unida al componente de ácido nucleico con una disolución tampón de elución de pH básico que consiste en hidróxido potásico o hidróxido sódico, produciendo así una muestra eluida; y
 - seguido de la neutralización de la muestra eluida mediante la adición posterior de un tampón de neutralización seleccionado de bicina, Tris, ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico (CHES), N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetano sulfónico (BES), ácido 4-morfolinopropanosulfónico (MOPS) o fosfato, produciendo así un tampón optimizado;
 - (vi) seguido de la separación y eliminación de las partículas paramagnéticas tras la neutralización de la muestra mientras que la disolución de pH optimizado que contiene el ácido nucleico sin unir se transfiere para una manipulación adicional, en donde la etapa de eliminación se separa de la etapa de neutralización.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra biológica es clínica, forense o medioambiental.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la muestra biológica medioambiental comprende tierra, agua, aire, efluentes en suspensión o polvo.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra biológica se pre-trata para lisar las células.
5. El método de la reivindicación 1, en donde dicha elución comprende elevar el pH con el tampón de elución de pH.
6. El método de la reivindicación 1, en donde el tampón de elución tiene un pH de 8 a 14.
7. El método de la reivindicación 1, en donde dicho tampón de neutralización desciende el pH.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el pH es de 6 a 9, preferiblemente en donde el pH es de 8 a 8,5, más preferiblemente en donde el pH es 8,4, después de la adición del tampón de neutralización.

FIGURA 1

Datos CT Diplex PAT RFU

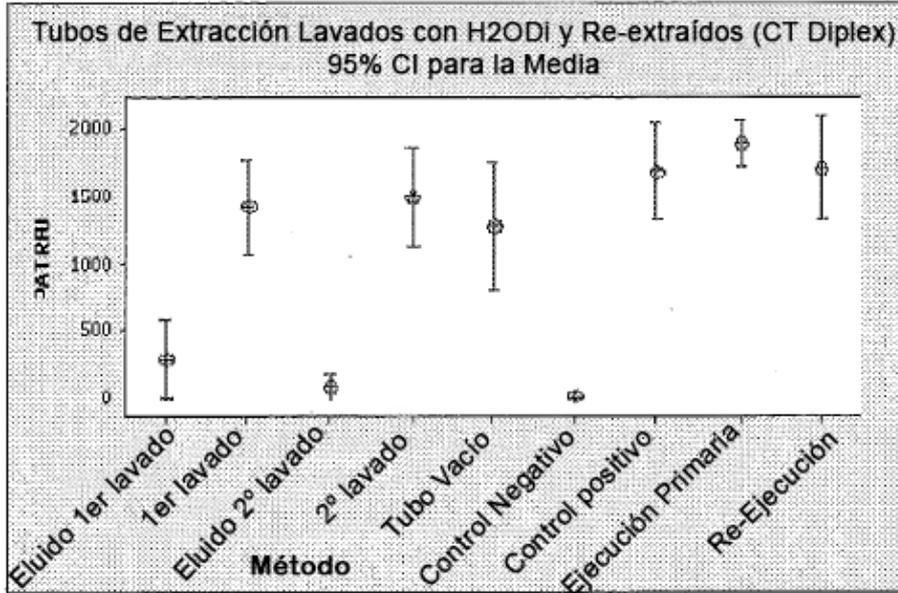


FIGURA 2

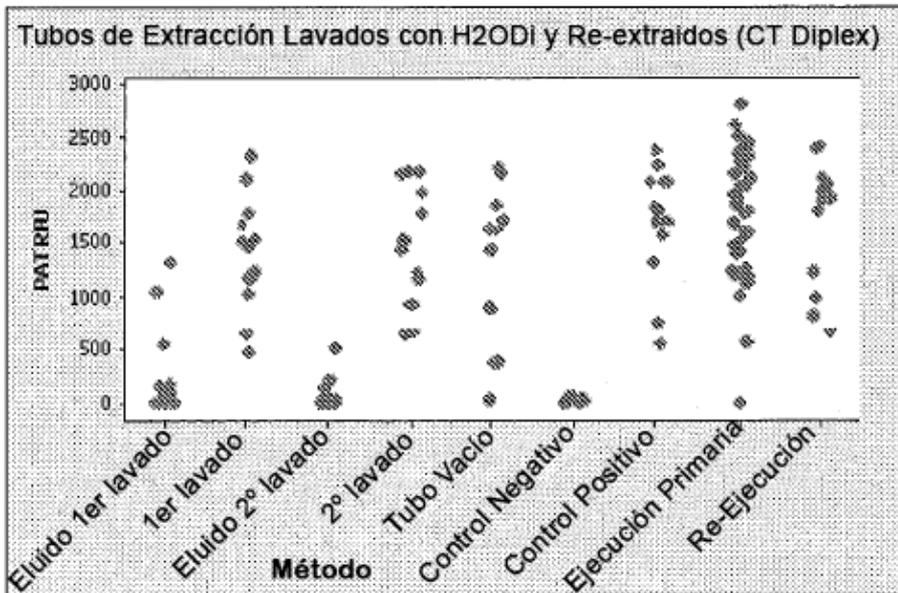


FIGURA 3

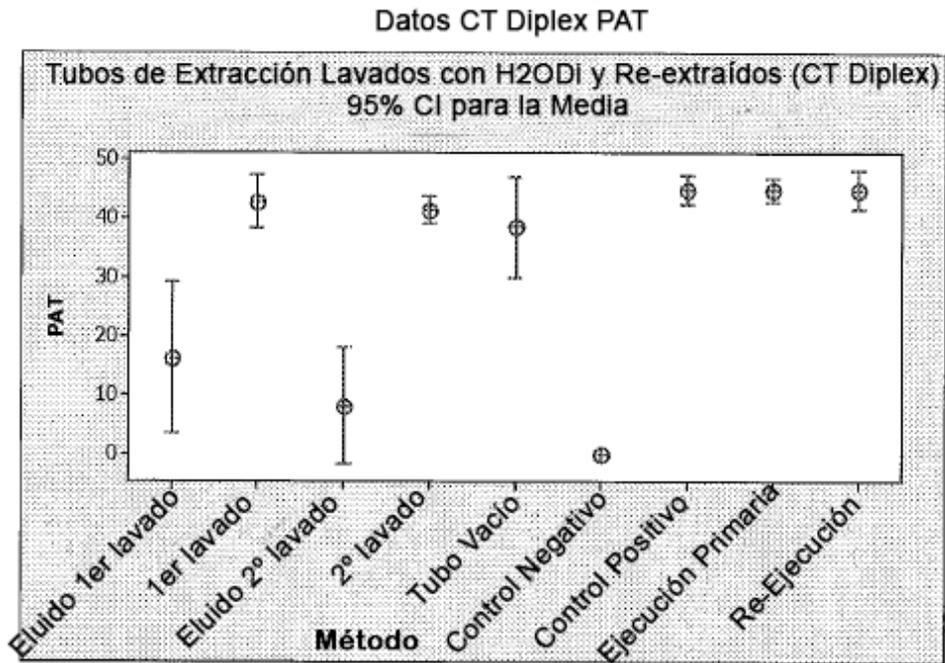


FIGURA 4

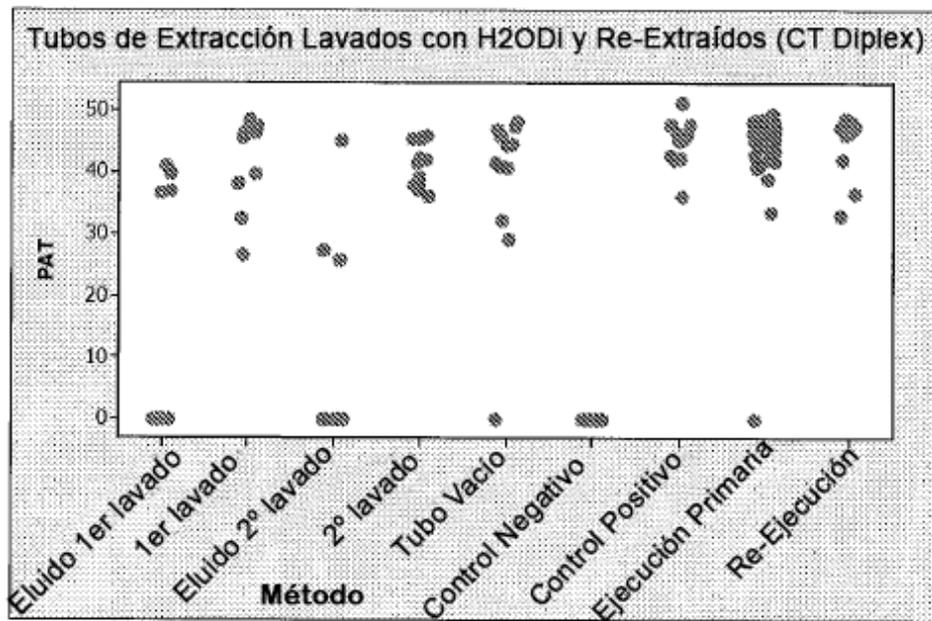


FIGURA 5

Datos GC Diplex PAT RFU

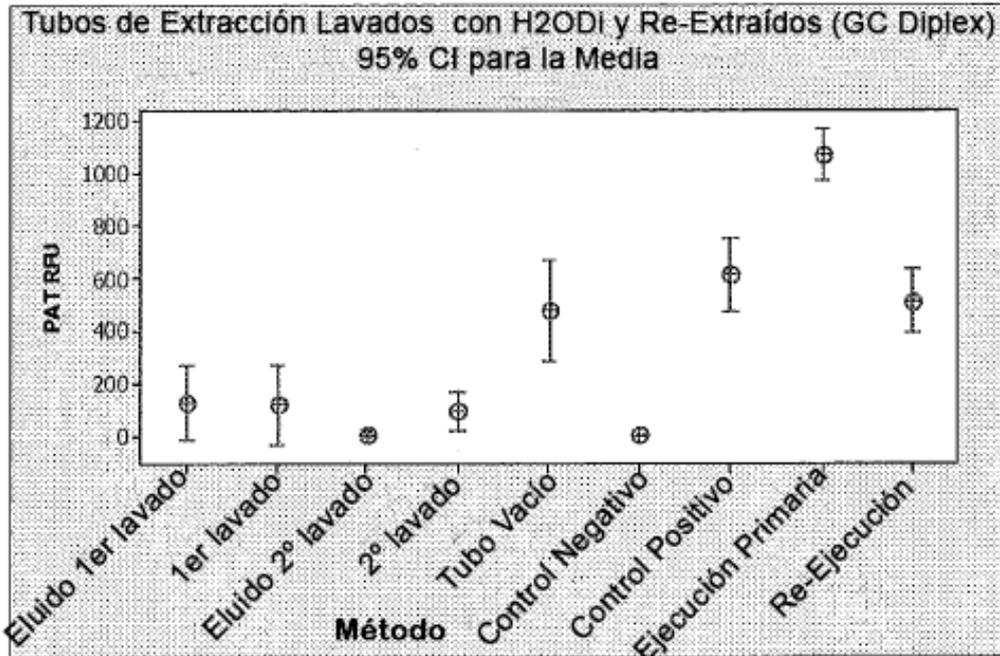


FIGURA 6

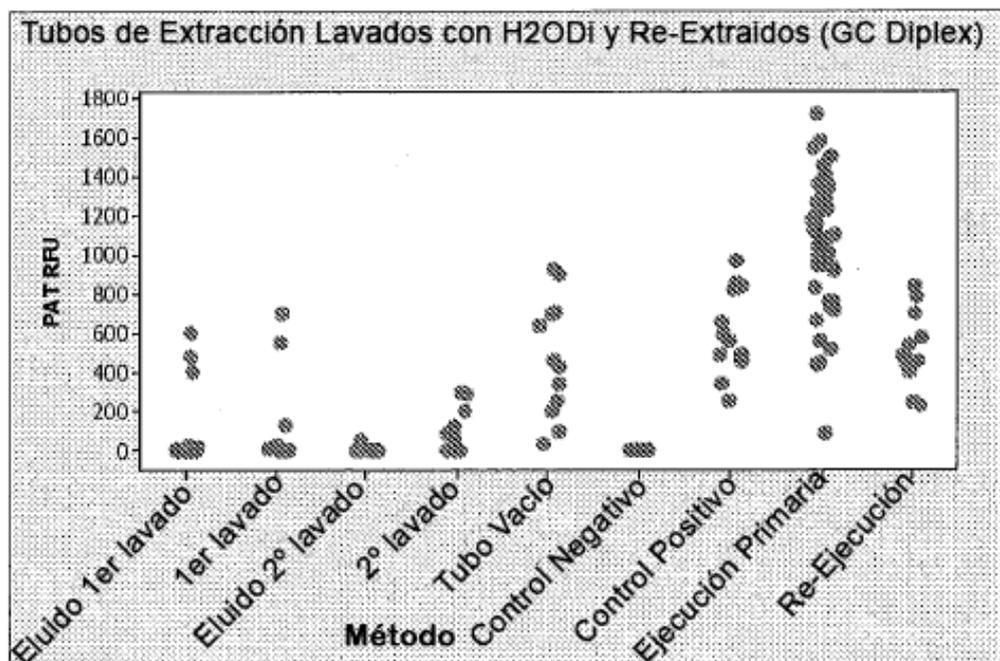


FIGURA 7

Datos GC Diplex PAT

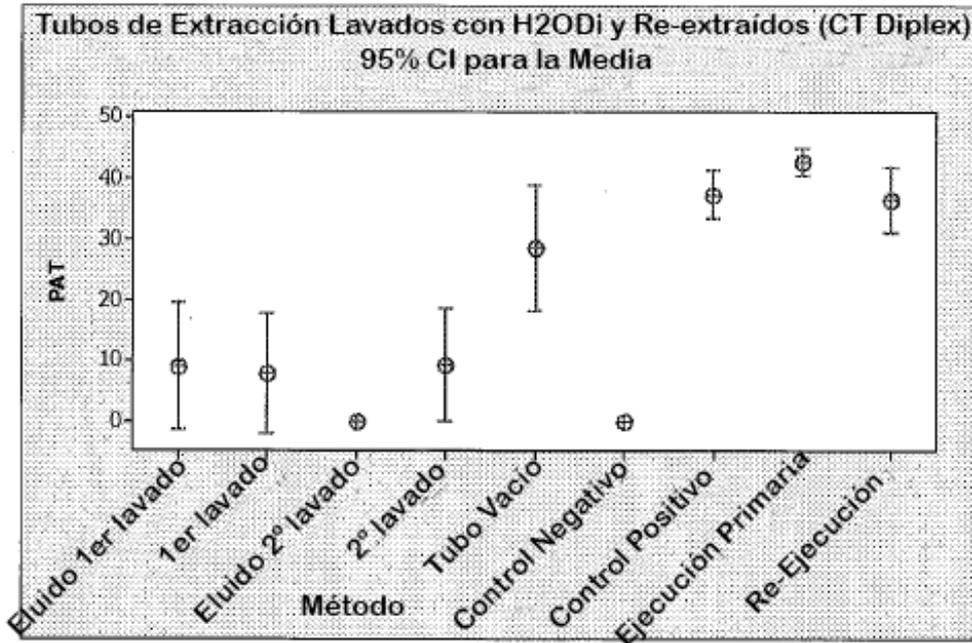


FIGURA 8

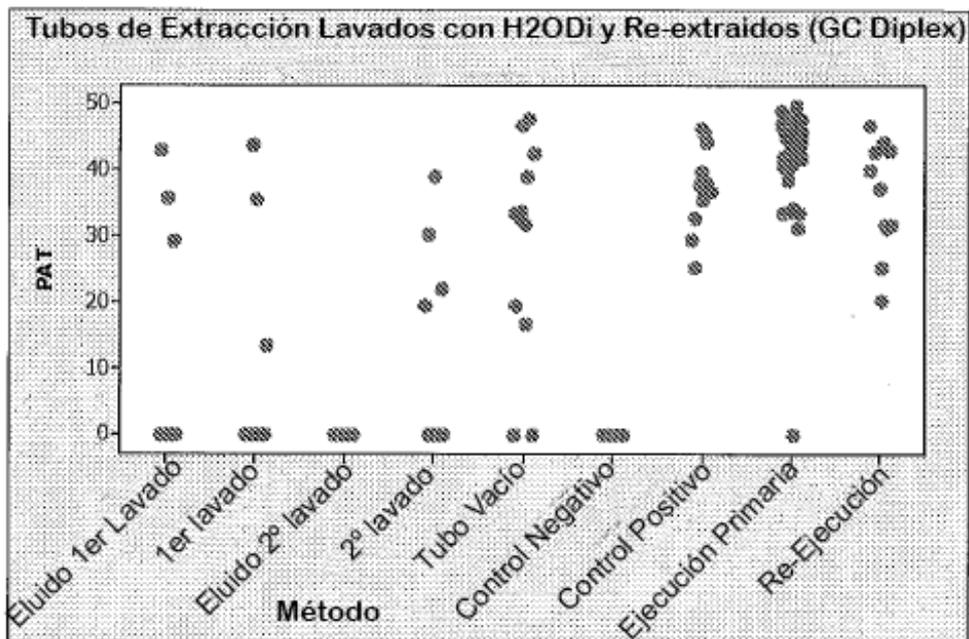


FIGURA 9

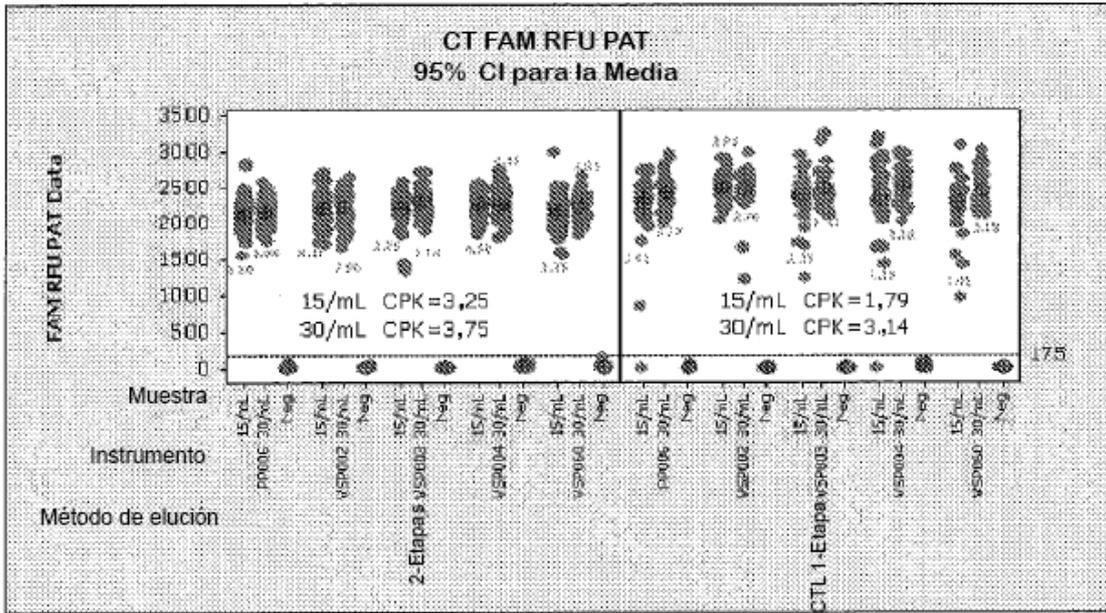


FIGURA 10

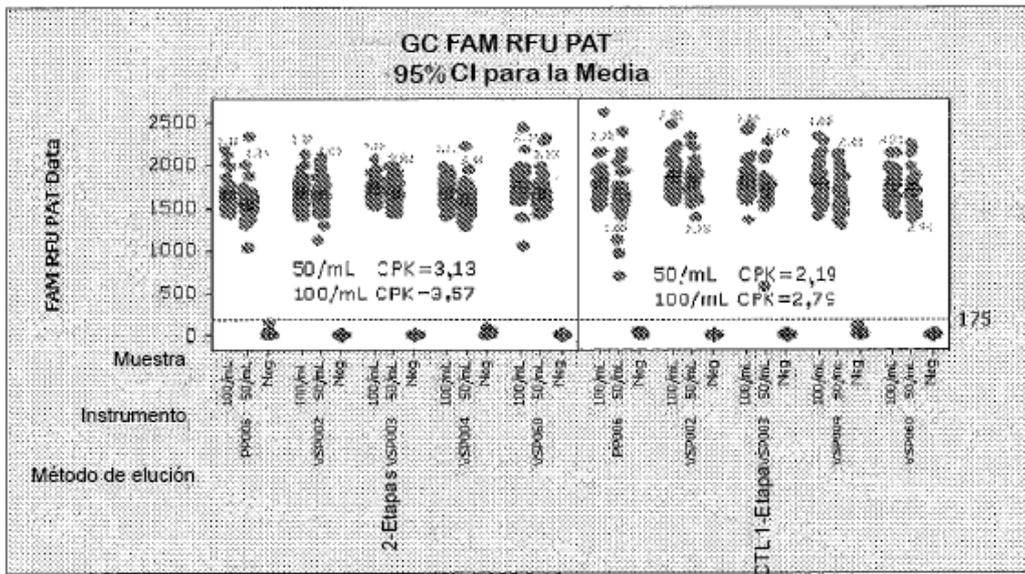


FIGURA 11

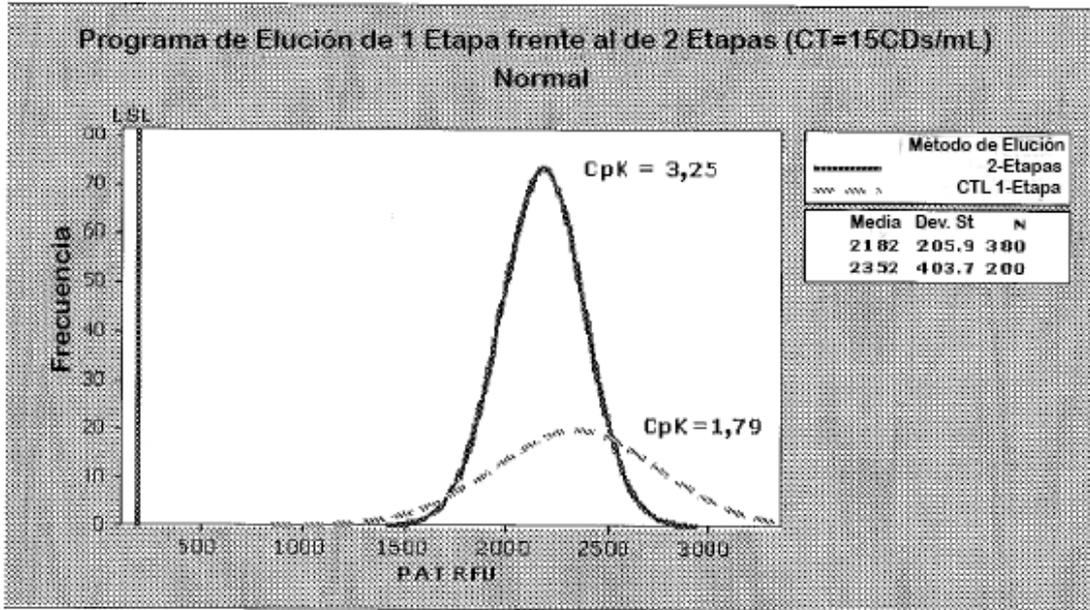


FIGURA 12

