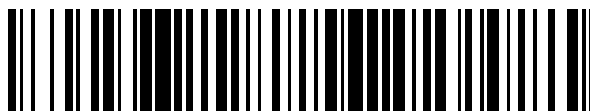


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 205**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2015** **PCT/US2015/025335**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015** **WO15157650**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2015** **E 15719064 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018** **EP 3129498**

54 Título: **Método de purificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

11.04.2014 US 201461978322 P

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

09.04.2019

73 Titular/es:

**FUJIFILM WAKO PURE CHEMICAL
CORPORATION (100.0%)
1-2, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-8605, JP**

72 Inventor/es:

**HAMADA, TAKATOSHI y
SWENSON, DAVID**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 708 205 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 de purificación de ácidos nucleicos

Campo de la invención

5 La invención se refiere a métodos para purificar ácidos nucleicos tales como ADN o ARN, que incluyen la purificación de tales ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas u otros tipos de muestras de sangre, células o tejidos.

Antecedentes de la invención

10 Las técnicas de biología molecular que emplean muestras de ADN y ARN se basan a menudo en la obtención de muestras purificadas de los ácidos nucleicos. Existen numerosas fuentes de ADN o ARN, tales como tejidos, células, sangre entera, plasma, suero, extractos, que se pueden obtener a partir de un organismo (p. ej., humano, animal, planta, bacteria, virus, etc.), además de tejidos o cultivos celulares desarrollados o mantenidos en un laboratorio. El uso adicional del ADN o ARN generalmente requiere aislar el ADN o ARN de los otros componentes en la fuente de la muestra, de modo que los ácidos polinucleicos estén libres de otras enzimas celulares, proteínas, compuestos y/o restos. El aislamiento del ADN o ARN de estos otros materiales permite el procesamiento posterior de los ácidos polinucleicos mediante, por ejemplo, PCR, RT-PCR, TMA, LAMP, LCR, secuenciación, análisis de hibridación de 15 ácidos nucleicos o cualquiera de las numerosas técnicas conocidas en la técnica basadas en reacciones enzimáticas o reacciones de hibridación que usan ácidos nucleicos.

20 Una de las técnicas más tempranas para aislar ADN o ARN fue lisar una muestra de célula o tejido usando, por ejemplo, proteinasa K, añadir un volumen igual de una solución de fenol/cloroformo al lisado para extraer materiales de ácido no nucleico (p. ej., proteínas, orgánulos, etc.), y eliminar la fase acuosa que contiene los ácidos nucleicos para su uso posterior. Normalmente, los ácidos nucleicos se recuperan de la fase acuosa por precipitación con etanol o isopropanol. Las modificaciones de la técnica incluyen añadir aún más a la fase orgánica una pequeña cantidad de alcohol isoamílico para ayudar a desactivar las RNasas y/o añadir un agente caotrópico tal como tiocianato de guanidinio para ayudar en la desnaturalización de proteínas y en la inactivación de enzimas. Si bien la extracción con fenol/cloroformo se considera el "método de referencia" para la purificación de ácidos nucleicos mediante la eliminación de materiales que no son ácidos nucleicos debido a la alta pureza y a la alta recuperación que proporciona, el método presenta inconvenientes, tales como ser laborioso, difícil de automatizar, y requiere el uso de disolventes orgánicos peligrosos. 25

30 Posteriormente, se han desarrollado técnicas basadas en la absorción de ácidos nucleicos en una fase sólida, el lavado de materiales no deseados, y la elución de ácidos nucleicos como se describe en los documentos WO 2012/028737 A1, US 7067287 B1, WO 95/06652 A1, WO 01/62976 A1. La fase sólida consiste a menudo en partículas de sílice, pero también se usan otros materiales tales como fibras de vidrio, perlas o polvo, hidroxiapatita, resinas de intercambio aniónico y diatomeas. Los ácidos polinucleicos se unen a la fase sólida en presencia de sales caotrópicas, los materiales no unidos se lavan usando soluciones que contienen alcohol y, finalmente, los ácidos polinucleicos se eluyen de la fase sólida usando una solución de baja fuerza iónica para obtener los ácidos polinucleicos en forma sustancialmente pura. 35

40 Varias compañías ofrecen kits para purificar ADN y ARN que presentan el uso de un material en fase sólida. Los kits proporcionan generalmente el material de fase sólida en forma de una columna, una membrana o como un recubrimiento sobre partículas paramagnéticas. Cuando se usan partículas paramagnéticas, se usa un imán para secuestrar las partículas, mientras que los tampones de lavado o elución se eliminan según lo descrito por Scott M. Berry y col. ("One-Step purification of nucleic acid for gene expression analysis via Immiscible Filtration Assisted by Surface Tension (IFAST)", Lab Chip, 2011, 11, 1747-1753), así como por Sur Kunal y col. ("Immiscible Phase Nucleic Acid Purification Eliminates PCR Inhibitors with a Single Pass of Paramagnetic Particles through a Hydrophobic Liquid", J Mol Diagn. 2010 Sep; 12(5): 620-628). Sin embargo, las partículas paramagnéticas son relativamente caras, y la manipulación de las partículas aumenta los costos de automatización. Cuando se usan columnas o membranas como la fase sólida, los tampones de lavado y elución se extraen bien mediante centrifugación o bien aplicando un vacío. Las columnas y las membranas deben diseñarse y procesarse de manera tal que las soluciones de lavado sean efectivas para pasar por todo el volumen vacío. La retención de líquido en la fase sólida, o de manera similar, el lavado inadecuado del espacio vacío en la fase sólida significa que las impurezas, inhibidores u otros compuestos que interfieran con o contaminan el producto de ácido nucleico no se eliminarán. La centrifugación se usa a menudo para intentar eliminar el líquido de manera uniforme, pero los sistemas automatizados son necesariamente más grandes, más complejos y costosos. En general, los métodos que han intentado mejorar la técnica aún experimentan uno o más de los siguientes problemas: (1) bajos rendimientos de producto de ácido nucleico, (2) mayores volúmenes de residuos de solución de lavado; (3) soluciones de productos de ácido nucleico que son más diluidas de lo que es deseable; (4) los inhibidores de la PCR permanecen; y (5) largo tiempo de procesamiento. 45 50 55

Por ende, aún se desea un método basado en etapas simples de manejo de líquidos que sean fáciles de automatizar.

Los inventores observaron que el uso de filtros de microfibras de vidrio como material en fase sólida para la purificación de ácidos nucleicos no produce un producto suficientemente puro para usar en el procesamiento posterior basado en enzimas usando protocolos estándar. Por ejemplo, una muestra de células se trató con un tampón de lisis y el lisado se pasó a través del filtro de microfibra de vidrio por presión para unir los ácidos nucleicos (ADN y ARN) a las fibras de vidrio. El filtro se lavó acto seguido dos veces con etanol acuoso a presión, y el ácido nucleico se eluyó usando agua sin nucleasa. Los intentos posteriores de realizar PCR usando el material obtenido como objetivo dieron como resultado reacciones de amplificación fallidas. La presencia de inhibidores en el material obtenido se confirmó mediante el uso de reacciones de control.

Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de métodos de purificación de ácido nucleico que sean compatibles con filtros de tamaño de poros gruesos y/o más grandes y/o variados a fin de lograr rendimientos totales rápidos elevados, rendimientos de pureza elevada de muestras de ácido nucleico, así como métodos que son susceptibles de automatización en un sistema compacto, pero que procesan volúmenes de muestra de aproximadamente 1 ml o más mientras disminuyen los costos operativos.

Compendio de la invención

Se proporcionan métodos para purificar ácidos polinucleicos que emplean filtros como una fase sólida y una operación impulsada por presión. Una primera realización comprende (1) adsorber ácidos polinucleicos en un filtro, (2) lavar el filtro con una solución de lavado con fluido inmiscible y (3) eluir los ácidos polinucleicos del filtro usando (i) una solución de elución con base acuosa y (ii) una solución de empuje de fluido inmiscible.

Una segunda realización comprende después de la etapa (1) y antes de la etapa (2), lavar el filtro con una solución de lavado a base de alcohol.

Una tercera realización comprende después de la etapa (1) y antes de la etapa (2), lavar el filtro con una solución de lavado con fluido inmiscible y luego lavar el filtro con una solución de lavado a base de alcohol.

Otras realizaciones incluyen lavar el filtro con dos o más composiciones diferentes de soluciones de lavado a base de alcohol, y/o dos o más composiciones diferentes de soluciones de lavado con fluido inmiscible.

En otra realización, la etapa de elución se realiza colocando la solución de elución con base acuosa en el lado de entrada del filtro, colocando una solución de lavado con fluido inmiscible encima o detrás de la solución de elución con base acuosa, y pasando las dos soluciones por el filtro para obtener una solución de ácidos polinucleicos purificados en la fase acuosa.

Los métodos de las diversas realizaciones se pueden usar para purificar cualquier tipo de ácido polinucleico, tal como ADN, ARN y/o mezclas de ADN y ARN. Los ácidos polinucleicos pueden ser de origen natural (por ejemplo, extraídos de cualquier tipo de célula) o sintéticos.

También se proporciona un sistema que comprende una fase sólida y un recipiente con un fondo poroso que puede retener la fase sólida dentro del recipiente, medios de administración de líquido para administrar al menos una solución de lavado inmiscible, una solución de elución con base acuosa y una solución de empuje de fluido inmiscible, en la fase sólida en el recipiente, que puede realizar los métodos de la invención. El sistema puede comprender además una fuente de presión que puede proporcionar un cabezal de presión para impulsar cualquiera de las soluciones a través de la fase sólida en el recipiente. El sistema también puede comprender además una fuente de vacío que puede inducir el flujo de cualquiera de las soluciones a través de la fase sólida en el recipiente. En otra realización, el sistema puede comprender además una centrifuga capaz de proporcionar una fuerza centrífuga para impulsar cualquiera de las soluciones a través de la fase sólida en el recipiente.

En algunas realizaciones, el aparato para realizar el método tiene un compartimento y un filtro para procesar una sola muestra, mientras que en otras realizaciones se proporcionan conjuntos de múltiples compartimentos y filtros para el procesamiento de múltiples muestras, que en algunos casos se pueden llevar a cabo de forma paralela. Como ejemplo de procesamiento de muestras múltiples, se pueden usar placas de microtitulación de pocillos múltiples con fondo de pocillos porosos como recipiente, y se puede colocar un filtro en cada pocillo. Se puede incorporar un aparato para el procesamiento de muestras individuales o muestras múltiples en el sistema para realizar los métodos de forma manual, semiautomática o automática.

Estos y otros objetos y características de la invención resultarán más evidentes tras la lectura de la siguiente descripción detallada de la invención junto con los dibujos anexos.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra una realización de un aparato útil para realizar realizaciones del método de purificación.

La Fig. 2A-2B muestra la curva de crecimiento para el análisis de RT-PCR en tiempo real de las muestras de ácidos nucleicos purificados obtenidas según una realización de la invención descrita en el Ejemplo 3 (referencia).

La Fig. 3A-3B muestra la curva de fusión para el producto del análisis de RT-PCR en tiempo real de las muestras de ácidos nucleicos purificados obtenidas según una realización de la invención descrita en el Ejemplo 3 (referencia).

La Fig. 4A-4B muestra los resultados de un análisis electroforético del producto de PCR obtenido de las muestras preparadas según una realización de la invención descrita en el Ejemplo 3 (referencia).

5 La Fig. 5 muestra la curva de crecimiento para el análisis de PCR en tiempo real de las muestras de ácidos nucleicos purificados obtenidas según una realización de la invención descrita en el Ejemplo 5 (referencia).

La Fig. 6 muestra la curva de fusión para el producto del análisis de PCR en tiempo real de las muestras de ácidos nucleicos purificados obtenidas según una realización de la invención descrita en el Ejemplo 5 (referencia).

10 La Fig. 7 muestra los resultados de un análisis electroforético del producto de PCR obtenido de las muestras preparadas según una realización de la invención descrita en el Ejemplo 5 (referencia).

Descripción detallada

15 El ADN o ARN de interés incluye el ADN o ARN de todos los organismos, tales como humanos, otros mamíferos, otros animales, plantas, bacterias, virus o cualquier otra forma de vida, viva o muerta. El ADN o ARN en algunas realizaciones son ácidos polinucleicos de origen natural, y los métodos pueden usarse como parte de un protocolo para extraer los ácidos polinucleicos de su fuente natural dentro de una célula, o para purificar los ácidos polinucleicos de un lisado. La fuente puede ser una muestra clínica, y los ácidos polinucleicos se están analizando como parte de un ensayo de diagnóstico. Los ácidos polinucleicos de origen natural se pueden derivar de cualquier tipo de muestra, tal como un cultivo celular, una muestra de tejido, una muestra de sangre y similares. El ADN o ARN en otras realizaciones puede ser el producto de una reacción biológica molecular. Por ejemplo, en algunas 20 realizaciones, una muestra de ADN puede derivarse de una fuente de ADN natural, tal como por amplificación del ADN genómico, o una fuente de ARN natural, tal como ADNc producido a partir de un producto de transcripción de ARN.

25 Los ácidos polinucleicos de ADN o ARN pueden ser de cualquier longitud, y el método puede aplicarse a una combinación de longitudes. Normalmente, los ácidos nucleicos pueden ser tan pequeños como 40 bases, y pueden ser tan largos como aproximadamente 50 kilobases. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, o cualquier otra forma multicaténaria. En algunas realizaciones, tanto el ADN como el ARN pueden, en conjunto, ser objeto del método de purificación. En otras realizaciones, las condiciones de lavado y elución están optimizadas para la purificación de ADN o ARN.

30 En los métodos, el ADN y/o el ARN se adsorben en una fase sólida, otros materiales se eliminan por lavado, y luego el ADN y/o el ARN se eluyen de la fase sólida. Para lavar las impurezas de los ácidos nucleicos absorbidos, la fase sólida se lava con una solución de lavado con fluido inmiscible como se describe la presente memoria. El lavado con un fluido inmiscible se puede realizar una o dos o más veces, y también se pueden realizar otros lavados, como se describe a continuación. Se pueden realizar múltiples lavados con un fluido inmiscible de forma consecutiva y/o pueden surgir lavados con otras soluciones.

35 La fase sólida también se puede denominar como filtro. En algunas realizaciones, la fase sólida es un material a base de vidrio, tal como vidrio de borosilicato. En algunas realizaciones, el filtro de vidrio de borosilicato está exento de aglomerantes. Por ejemplo, el filtro puede ser una microfibras exenta de aglomerantes de vidrio de borosilicato, que puede tener la forma de un filtro de cualquier aspecto. El espesor del filtro puede estar en el intervalo de 50 a 3.000 μm , y las realizaciones ejemplares incluyen 100 μm , 250 μm , 500 μm , 675 μm , 1.000 μm o 2.000 μm . El espesor particular puede depender del fabricante. Además, los filtros se pueden apilar para aumentar el espesor total de la fase sólida. Los filtros de apilamiento se pueden usar, por ejemplo, para aumentar la capacidad de unión del dispositivo. El filtro de microfibras puede formarse de tal manera que la estructura permita la retención de partículas en el intervalo de 0,5 a 3,0 μm , y las realizaciones ejemplares incluyen tamaños de 0,7 μm , 1,0 μm , 1,5 μm , 2,0 μm o 2,7 μm . De nuevo, el tamaño de partículas particular retenido puede depender del fabricante. Un filtro 45 puede tener múltiples capas, que contienen más de un tamaño de poro, o, cuando más de un filtro se apila en un recipiente, los filtros individuales pueden tener el mismo tamaño de poro o tamaños diferentes. En una realización, el filtro tiene las propiedades de un filtro exento de aglomerantes de microfibras de vidrio Whatman, calidad GF/B (675 μm de espesor, índice de retención de partículas de 1,0 μm). En otras realizaciones, el filtro tiene las propiedades de un filtro de microfibras Whatman, calidad GF/A (260 μm de espesor, índice de retención de partículas de 1,6 μm), GF/C (260 μm de espesor, índice de retención de partículas de 1,2 μm), GF/D (675 μm de espesor, índice de retención de partículas 2,7 μm , o GF/F (420 μm de espesor, índice de retención de partículas de 0,7 μm). 50

55 Solución de lavado con fluido inmiscible. Se usa una solución de lavado con fluido inmiscible para lavar el filtro, al menos una vez, después de que el material de ácido nucleico se haya adsorbido en el filtro. La solución de lavado con fluidos inmiscible comprende un fluido que, por separado y aparte de cuando se practican los métodos de la invención, (i) cuando se pone en contacto con agua forma una fase sustancialmente separada del agua, y en realizaciones preferidas forma un menisco entre el fluido y el agua. En realizaciones preferidas, el fluido también (ii) tiene una gravedad específica inferior a la del agua, (iii) no interfiere sustancialmente con o inhibe las reacciones enzimáticas que participan en el ácido nucleico que es el objeto del método de purificación, y (iv) es químicamente

compatible con los componentes del aparato del sistema de purificación, tal como el filtro y el recipiente que aloja el filtro.

La solución de lavado con fluido inmiscible, cuando se coloca en el lado de entrada del filtro y luego se mueve a través del filtro, funciona para empujar a través del espacio vacío del filtro, en la dirección del flujo, la solución que ocupaba el espacio vacío. En particular, la solución de lavado con fluido inmiscible funciona para empujar a través de cualquier solución acuosa o solución de lavado a base de alcohol que ocupaba el espacio vacío en el filtro. En otro aspecto, la solución de lavado con fluido inmiscible funciona para eliminar o reducir sustancialmente la cantidad de inhibidores de enzimas mantenidos en el filtro que de otro modo se eluiría con los materiales de ácido nucleico. En otro aspecto, la solución de lavado con fluido inmiscible funciona para eliminar o reducir sustancialmente la cantidad de componentes de las muestras que podrían interferir con los métodos para detectar los materiales de ácido nucleico. Por ejemplo, la bilirrubina, p. ej., en muestras de suero, puede eliminarse o reducirse lavándose con una solución de lavado con fluido inmiscible.

En algunas realizaciones, el fluido inmiscible es un polímero hidrófobo. El polímero puede ser un polímero inorgánico, y una realización preferida es aceite de silicona (también conocido como fluido de silicona). En algunas realizaciones, el polímero puede ser un polímero orgánico, tal como aceite mineral, aceite de parafina, tapón de vapor (Qiagen Inc., Valencia, CA), aceite para bebés o aceite blanco. El polímero puede ser un producto natural, sintético o semisintético. Otros ejemplos incluyen aceites de pescado o aceites vegetales derivados de, p. ej., soja, oliva, cacahuete, maíz o canola. La solución de lavado con fluido inmiscible puede comprender más de un tipo de polímeros hidrófobos. En algunas realizaciones, el fluido inmiscible es un compuesto orgánico no polimérico. En algunas realizaciones, la solución de lavado con fluido inmiscible puede comprender un polímero y un compuesto orgánico no polimérico. En algunas realizaciones preferidas, el fluido inmiscible tiene una viscosidad en el intervalo de 1 a 20 cSt, y en algunas realizaciones preferidas la viscosidad está en el intervalo de 1 a 10 cSt.

Además de cumplir con los cuatro criterios (i)-(iv) enumerados anteriormente para el fluido inmiscible, un compuesto no polimérico también debe ser físicamente compatible con cualquier procesamiento aguas abajo que participe en los ácidos nucleicos purificados. Por ejemplo, si los ácidos nucleicos se incuban a una temperatura alta o se calientan a una temperatura alta, entonces si el fluido inmiscible permanece presente en la muestra, debe tener una presión de vapor y un punto de ebullición que no interfiera con el proceso. Es decir, el punto de ebullición debería ser adecuadamente superior a la temperatura del proceso, y/o la presión de vapor debería ser adecuadamente baja a la temperatura del proceso, de modo que la volatilidad o la expansión del volumen no interfieran con el proceso. Por ejemplo, si los ácidos nucleicos purificados se van a usar en una reacción termociclada que tiene una etapa de desnaturalización, p. ej., a 95 °C, entonces el punto de ebullición de cualquier fluido inmiscible debe ser suficientemente mayor que esta temperatura.

La gravedad específica del fluido inmiscible es generalmente inferior a la del agua. Por consiguiente, la solución de lavado tenderá a permanecer por encima de cualquier solución acuosa dentro del filtro cuando la solución de lavado con fluido inmiscible se coloca sobre el filtro durante la ejecución del método. De esta manera, la solución de lavado con fluido inmiscible se puede mover a través del material del filtro y empujar a través de la solución acuosa que se había mantenido en los huecos del filtro.

Una función de la solución de lavado con fluido inmiscible es reducir o eliminar sustancias que interfieren con o inhiben reacciones enzimáticas. En algunas realizaciones del método de purificación, parte de la solución de lavado con fluido inmiscible puede permanecer en el producto eluido. Cuando la solución de lavado con fluido inmiscible permanece en el producto, el eluato y el fluido inmiscible se pueden usar juntos en una reacción posterior, donde el fluido inmiscible puede, al tener una menor gravedad específica que el agua, subir al límite superior de la muestra. En una realización, el fluido inmiscible puede funcionar como una barrera de vapor.

En algunas realizaciones del método de purificación, se puede evitar que la solución de lavado con fluido inmiscible se recoja con el producto eluido. En otras, la solución de lavado con fluido inmiscible se puede eliminar del producto eluido al separar las fases, la extracción y otras técnicas químicas o físicas. Ya sea que la solución de lavado con fluido inmiscible permanezca en el producto eluido o no, la solución de lavado con fluido inmiscible en sí misma también debe considerarse por su compatibilidad con cualquier reacción enzimática corriente abajo.

Los fluidos inmiscibles candidatos están disponibles en numerosas calidades y se pueden preparar polímeros similares a partir de varias fuentes, por lo que la compatibilidad del fluido inmiscible y la solución de lavado con fluido inmiscible con cualquier reacción aguas abajo prevista debe confirmarse al seleccionar el fluido o al formular la solución. Por ejemplo, si el material de ácido nucleico purificado se va a usar en una reacción de PCR, entonces el líquido y la solución de lavado se pueden añadir directamente a una muestra y se puede determinar el efecto inhibitorio, si lo hubiera.

Los expertos en la técnica están familiarizados con la necesidad y los métodos para confirmar la compatibilidad de un reactivo en una reacción enzimática. Los fluidos inmiscibles y las soluciones de lavado con fluidos inmiscibles adecuados para usar en los métodos de purificación descritos en la presente son aquellos que no interfieren sustancialmente con o inhiben las reacciones aguas abajo, incluidas las reacciones enzimáticas, que usan el producto purificado. Por ejemplo, los fluidos de solución de lavado preferidos no interfieren con o inhiben

sustancialmente las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. Las reacciones de amplificación ejemplares incluyen PCR, RT-PCR, TMA, LAMP, LCR y similares. Para interferir con o inhibir sustancialmente una reacción significa que la cantidad y el tipo de producto producido son diferentes de la cantidad y el tipo de producto producido en ausencia del (de los) fluido(s) inmiscible(s) o de la solución de lavado con fluido inmiscible. No es necesario que el(los) fluido(s) inmiscible(s) o la solución de lavado con fluido inmiscible no tenga(n) efecto en la reacción posterior, solo que cualquier efecto que pueda haber estado dentro de un nivel tolerable para la aplicación prevista.

El fluido inmiscible y la solución de lavado también deben ser químicamente compatibles con el aparato usado para realizar los métodos de purificación. Por ejemplo, los fluidos inmiscibles y las soluciones de lavado no deben disolver, lixiviar ni deformar los componentes del aparato. El aparato incluye al menos un filtro y un recipiente que aloja el filtro.

Solución de lavado a base de alcohol. En algunas realizaciones, se usa una solución de lavado a base de alcohol para lavar la fase sólida. En algunas realizaciones, se usan dos o más tipos de solución de lavado a base de alcohol. La solución de lavado a base de alcohol comprende un alcohol inferior, tal como un alcohol C1-C4. El grupo alquilo puede ser una cadena lineal o ramificada, y puede contener uno o más grupos hidroxilo. Los ejemplos incluyen metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol y terc-butanol. Otros ejemplos incluyen etilenglicol, propilenglicol, glicerol y otros polioles. En realizaciones preferidas, el alcohol es etanol. Más de un tipo de alcohol puede estar presente en la solución de lavado.

La solución de lavado a base de alcohol puede comprender aproximadamente 5 % hasta 100 % de alcohol. En algunas realizaciones preferidas, la solución de lavado a base de alcohol comprende 10 a 70 % de alcohol, y en otras realizaciones preferidas, 20 a 50 % de alcohol. Cuando la solución de lavado no tiene un 100 % de alcohol, otro componente líquido puede ser agua. En algunas realizaciones, la solución de lavado a base de alcohol es 24 % de etanol en agua, o 50 % de etanol en agua, o 70 % de etanol en agua, o 100 % de etanol. En algunas realizaciones, la solución puede contener además una o más sales, tampones, tensioactivos no iónicos y/o iónicos, polímeros hidrófilos, conservantes y/o agentes antimicrobianos. Cualquier componente de este tipo puede incluirse siempre que no cause una pérdida sustancial de ácidos nucleicos adsorbidos de la fase sólida o interfiera con cualquier procesamiento aguas abajo de los ácidos nucleicos una vez que se eluyan de la fase sólida. En general, cualquiera de estos componentes debe ser compatible con los ácidos nucleicos y su uso aguas abajo adicional, incluidas las reacciones enzimáticas dirigidas a los ácidos nucleicos.

En esta solución de lavado, así como en las otras soluciones de lavado y otros reactivos usados cuando se procesan los ácidos nucleicos, el agua usada en la solución es generalmente agua destilada, y generalmente no contiene DNasa y/o RNasa, según las necesidades y finalidad de realizar el método.

Los ejemplos preferidos de sales incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio y acetato de sodio, potasio o amonio, y ejemplos preferidos de tampones incluyen Tris-HCl, HEPES y otros tampones de Good. La concentración de sal es normalmente de 10 a 200 mM. La concentración de tampón es normalmente de 10 a 500 mM, preferiblemente de 20 a 200 mM, y el pH es de 6 a 11, preferiblemente de 7 a 10. Los ejemplos preferidos de tensioactivos no iónicos incluyen polisorbato 80 (un nombre comercial es Tween 80®), otros polisorbatos, Nonidet P-40®, Tritón X-100® y similares. Los tensioactivos no iónicos están presentes normalmente en una concentración de 1 a 10 %, preferiblemente de 1 a 5 %. Los ejemplos preferidos de polímeros hidrófilos incluyen polietilenglicol, tal como PEG 8000. Los ejemplos preferidos de conservantes incluyen azida sódica, ProClin 150, ProClin 200 y ProClin 300. Los conservantes están normalmente presentes en una concentración de 0,1 a 10 %. Estos ejemplos de sales, tampones, tensioactivos y conservantes no tienen por objeto ser exclusivos, sino representativos, y los sustitutos pueden ser encontrados fácilmente por un experto en la técnica.

En algunas realizaciones, la solución de lavado a base de alcohol es etanol al 50 % en solución acuosa de NaCl 100 mM, o etanol al 50 % en Tris-HCl 10 mM, solución acuosa de NaCl 100 mM, o etanol al 50 % en Solución acuosa de Tris-HCl 10 mM. En algunas realizaciones, la solución de lavado a base de alcohol es etanol al 24 % en una solución acuosa tamponada a pH 7,5, o etanol al 24 % en una solución acuosa de HEPES 25 mM (pH 7,5), o etanol al 24 % en HEPES 25 mM (pH 7,5), solución acuosa de NaCl 30 mM. En algunas realizaciones, la solución de lavado a base de alcohol comprende además un 8,5 % (p/v) de PEG 8000, y/o comprende además un 0,1 % (v/v) de ProClin 300. Estos ejemplos no tienen por objeto ser exclusivos, sino meramente ejemplares de los tipos de soluciones de lavado a base de alcohol que se pueden usar. Un experto en la técnica apreciaría que se pueden usar muchas soluciones, que varían en la elección de componentes, concentraciones, pH y similares, descritas en la presente memoria.

Solución de elución. Se usa una solución de elución con base acuosa para eluir los ácidos nucleicos adsorbidos de la fase sólida. La solución de elución comprende una solución acuosa, y puede componerse de hasta 100 % de agua. En algunas realizaciones, la solución de elución contiene además una sal y/o un tampón. Los ejemplos preferidos de sales incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio y acetato de sodio, potasio o amonio, y los ejemplos preferidos de tampones incluyen Tris-HCl, HEPES y otros tampones de Good. La concentración de sal es normalmente de hasta 50 mM. La concentración del tampón es normalmente de 10 a 500 mM, preferiblemente de 20 a 200 mM, y el pH es de 6 a 11, preferiblemente de 7 a 10. Estos ejemplos de sales y tampones no tienen por ejemplo ser exclusivos, sino representativos, y los sustitutos pueden ser fácilmente encontrados por un experto en la

técnica. El agua usada en la solución de elución es generalmente agua destilada y generalmente no contiene DNasa y/o RNasa, según las necesidades y el propósito de realizar el método. En una realización, una solución de elución para eluir el ADN es Tris-HCl 10 mM (pH 9,0). En una realización, una solución de elución para eluir ARN es agua destilada. En algunas realizaciones, se usan soluciones acuosas de baja fuerza iónica, por ejemplo, menos de 50 mM. Los expertos en la técnica pueden probar la idoneidad de una solución de elución evaluando el rendimiento del material de ácido nucleico liberado de la fase sólida. En general, el rendimiento del material liberado de la fase sólida es alto, y puede ser de al menos el 80 %, o al menos del 90 %, o puede ser casi cuantitativo. Los rendimientos más bajos pueden ser aceptables, siempre que la cantidad liberada sea adecuada para los objetivos de la solicitud.

Solución de empuje de fluido inmiscible. Se utiliza una solución de empuje de fluido inmiscible para ayudar a mover la solución de elución a través del filtro. La solución de empuje de fluido inmiscible comprende un fluido que, separado y aparte de cuando se practican los métodos de la invención, (i) cuando se pone en contacto con agua forma una fase sustancialmente separada del agua, y en realizaciones preferidas forma un menisco entre el fluido y el líquido. agua. En realizaciones preferidas, el fluido también (ii) tiene una gravedad específica menor que la del agua, (iii) no interfiere sustancialmente ni inhibe las reacciones enzimáticas que involucran el ácido nucleico que es el objeto del método de purificación, y (iv) es químicamente compatible con los componentes del aparato del sistema de purificación, como el filtro y el recipiente que aloja el filtro.

La solución de empuje de fluido inmiscible, cuando se coloca en el lado de entrada del filtro y luego se mueve a través del filtro, funciona para empujar a través del espacio vacío del filtro, en la dirección del flujo, la solución de elución con base acuosa que ocupó el espacio vacío. La solución de elución se puede recoger de manera eficiente mediante el uso de una solución de empuje de fluido inmiscible en la etapa de elución, como se describe a continuación.

La solución de empuje de fluido inmiscible puede ser un polímero hidrófobo o un compuesto orgánico no polimérico, o combinaciones de los mismos, como se describe anteriormente para la solución de lavado con fluido inmiscible. En algunas realizaciones preferidas, el fluido inmiscible tiene una viscosidad en el intervalo de 1 a 300 cSt, en algunas realizaciones preferidas el intervalo es de 10 a 100 cSt, y en otras realizaciones preferidas el intervalo es de 20 a 50 cSt. Las otras propiedades y consideraciones para seleccionar una solución de empuje de fluido inmiscible son las mismas que las descritas anteriormente para la solución de lavado con fluido inmiscible.

En los métodos de purificación descritos en la presente memoria, un material de ácido nucleico se adsorbe en una fase sólida, otros materiales se lavan usando una solución de lavado a base de fluido inmiscible en agua, y luego el material de ácido nucleico se eluye de la fase sólida.

La fase sólida, generalmente un filtro, se monta en un recipiente configurado de tal manera que la solución agregada a un compartimento en el recipiente puede hacerse pasar a través del filtro. El recipiente puede ser circular, cuadrado o poliédrico en sección transversal. El recipiente puede comprender una unidad independiente o parte de un sistema cerrado o parcialmente cerrado en el que los materiales se administran directamente en el lado de entrada del filtro por medio de tubos u otros medios de administración. En la Fig. 1 se muestra un ejemplo de una realización independiente. Se proporciona un recipiente 100 que tiene una primera apertura 130 y una segunda apertura 150, y un soporte poroso 110 que abarca la sección transversal del recipiente. Un primer compartimento 140 en el recipiente 100 existe en el espacio definido por las paredes del recipiente, el soporte poroso 110 y la primera apertura 130. Por conveniencia, el volumen del primer compartimento 140 puede configurarse para acomodar el volumen típico de una solución de lavado y una solución de elución a usar en el método. No obstante, también se contemplan las aplicaciones en serie del material de ácido nucleico y los lavados en serie. El compartimento no tiene que ser dimensionado para acomodar la solución de mayor volumen que se usará. En algunas realizaciones, el primer compartimento 140 puede acomodar 50 µl a 1.000 µl o más de solución, o puede acomodar al menos hasta 200 µl, o al menos hasta 400 µl, o al menos hasta 600 µl, o al menos hasta 800 µl de solución. Un volumen típico del primer compartimento 140 que es conveniente para procesar una muestra de ensayo de diagnóstico *in vitro* puede estar en el intervalo de 50-1.000 µl o más. En otras realizaciones, el recipiente puede configurarse para un flujo continuo de solución de lavado. En este caso, el volumen de la solución de lavado está determinado por el caudal y el tiempo.

Se proporciona un filtro 120 dentro del primer compartimento 140 y descansa sobre un soporte poroso 110, que proporciona soporte mecánico y determina la ubicación del filtro 120. El filtro 120 se extiende esencialmente a toda la sección transversal del recipiente. El área de filtro activo del filtro 120 no necesita ocupar toda el área de la sección transversal. Sin embargo, la forma y la estructura del filtro 120 deben llenar efectivamente el área de la sección transversal de tal manera que las soluciones colocadas en el compartimento 140 tengan que pasar a través del filtro 120 para salir del recipiente 100 a través de la segunda apertura 150.

En general, se usa un gradiente de presión para forzar que las soluciones colocadas en el compartimento 140 pasen a través del filtro 120. Se puede aplicar una presión positiva a través de la primera apertura 130 al compartimento 140. En otras realizaciones, se puede aplicar una presión negativa a través de la segunda apertura 150 para extraer la solución a través del filtro 120. En algunas realizaciones, el aparato puede prever la aplicación de una presión positiva en el lado de entrada o una presión negativa en el lado de salida del recipiente. En algunos casos, el procedimiento para pasar un líquido a través del filtro puede incluir aplicar a través de la primera apertura 130 una

presión positiva, luego una presión negativa y luego una presión positiva, en donde al menos parte del líquido se movería, luego volvería a pasar, y acto seguido por el filtro.

La cantidad de presión necesaria para impulsar las soluciones a través del filtro depende de muchos factores, tales como el tamaño de los poros y el volumen de vacío del filtro, la viscosidad de la solución y el tiempo de residencia deseado de la solución en el filtro mientras se pasa. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente intervalos operativos útiles de la presión dependiendo de estos factores. En algunas realizaciones, se usa la misma presión operativa en todas las etapas (p. ej., adsorción, lavado, elución). En algunas realizaciones, la presión aplicada a cada solución se adapta a las propiedades y/o al fin de cada solución. Por ejemplo, se puede usar un diferencial de presión más alto para pasar soluciones de mayor viscosidad a través del filtro. Y, el diferencial de presión se puede usar para ajustar el tiempo durante el cual la solución contacta con el filtro. Por ejemplo, el tiempo para la etapa de adsorción puede ajustarse para permitir un tiempo suficiente para que los materiales de ácido nucleico se adsorban en la fase sólida. El tiempo depende generalmente del tamaño de los poros, el volumen de vacío, la viscosidad de la solución, el tamaño de los ácidos nucleicos y similares, y se puede optimizar fácilmente para un filtro en particular. La presión y, por lo tanto, el tiempo para cada lavado se pueden optimizar fácilmente en función del rendimiento del material purificado obtenido, en vista de los requisitos de tiempo para el proceso, particularmente cuando el proceso es automatizado. Normalmente, en los métodos se usa una presión en el intervalo de hasta 300 kPa. En algunas realizaciones, se puede permitir que una solución pase a través del filtro bajo la fuerza de la gravedad y la acción capilar sin aplicar activamente un diferencial de presión.

En algunas realizaciones, el material de ácido nucleico es parte de una solución, que puede ser, por ejemplo, un lisado celular, un lisado de tejido, una muestra clínica procesada para poner a disposición el material de ácido nucleico relevante, u otra solución de reacción. La solución contiene, además, en algunas realizaciones, agentes para fomentar la adsorción de material de ácido nucleico en la fase sólida, tales como tampones de pH, sales, agentes desnaturizantes y/o caótopos, como son bien conocidos en la técnica. Normalmente, la concentración del material de ácido nucleico en la solución es de 1 a 10.000 copias/1 nl. Normalmente, la masa de material de ácido nucleico purificado de la solución es de 1 fg a 50 µg.

Para adsorber el material de ácido nucleico en el filtro, la solución que contiene el material de ácido nucleico se agrega al primer compartimento 140, y luego se pasa a través del filtro aplicando un gradiente de presión. Dependiendo del volumen de la solución y del volumen del primer compartimento 140, el proceso puede necesitar repetirse una o más veces para procesar todo el material de ácido nucleico. El caudal de la solución de muestra generalmente se optimiza para permitir un tiempo suficiente para que los ácidos nucleicos entren en contacto y se unan al material del filtro para maximizar la adsorción de los ácidos nucleicos.

Una vez que el material de ácido nucleico ha sido adsorbido, el filtro se lava. El filtro se lava con una solución de lavado con fluido inmiscible. El volumen de la solución de lavado se coloca en el primer compartimento 140, y se aplica un gradiente de presión para forzar la solución de lavado a través del filtro. El filtro se puede lavar una o más veces con la solución de lavado con fluido inmiscible.

En otra realización, después de la adsorción, el filtro se lava primero con una solución de lavado a base de alcohol y luego se lava con una solución de lavado con fluido inmiscible. Se debe desarrollar cualquier protocolo que use una etapa de lavado con alcohol para asegurar que el alcohol no esté presente en el eluato final si el alcohol inhibiera o interfiriera con cualquier proceso posterior que involucre a los ácidos nucleicos. Por ejemplo, se reconoce que el alcohol es un inhibidor de la transcriptasa inversa y la polimerasa, y puede ser preferible que la etapa de lavado entre el lavado con alcohol y la elución sean suficientes para eliminar el alcohol del sistema. El volumen de cada tipo de lavado varía independientemente. En algunas realizaciones, se pueden necesitar uno o más lotes para alcanzar el volumen deseado de solución de lavado con alcohol y solución de lavado con fluido inmiscible.

En otra realización, después de la adsorción, el filtro se lava primero con una solución de lavado con fluido inmiscible, luego con una solución de lavado a base de alcohol, y luego nuevamente con una solución de lavado con fluido inmiscible. El volumen de cada tipo de lavado varía independientemente. En algunas realizaciones, se pueden necesitar uno o más lotes para alcanzar el volumen deseado de solución de lavado.

Una vez completada la(s) etapa(s) de lavado, el material de ácido nucleico se eluye del filtro en una etapa de elución. Para eluir el material, se agrega un volumen de solución de elución al primer compartimento 140, se aplica un gradiente de presión y se recoge el material eluido cuando sale por la segunda apertura 150. En algunas realizaciones, se permite que la solución de elución entre en contacto con el filtro durante varios segundos, o decenas de segundos, o un minuto o más, tal como cinco o diez minutos o más, antes de que se aplique el gradiente de presión. En algunas realizaciones, el volumen de solución de elución usado es de aproximadamente 20-60 µl. Se puede usar un volumen mayor si una muestra de ácido nucleico más diluida es aceptable. En algunas realizaciones, por ejemplo, como se describe en los ejemplos, el volumen de solución de elución es de 30-50 µl. Después de pasar la solución de elución, se agrega una solución de empuje de fluido inmiscible al primer compartimento 140 y se pasa a través del filtro para empujar a través de cualquier solución de elución residual y se recoge. Este uso de una solución de empuje de fluido inmiscible para empujar a través de la solución de elución residual es útil en realizaciones en las que se debe maximizar la cantidad de ácido nucleico purificado recogida. Por ejemplo, si el volumen de la solución de elución es de 50 µl, y 10 µl del eluato es suficiente para las siguientes etapas de

procesamiento, entonces puede que no sea necesaria una solución de empuje de fluido inmiscible, pero si un volumen mayor, p. ej., 25 µL, del fluido es deseable, así pues, una solución de empuje de fluido inmiscible puede ser beneficiosa.

5 En otras realizaciones de la etapa de elución, para eluir el material, se agrega un volumen de solución de elución al primer compartimento 140, luego se coloca un volumen de solución de empuje de fluido inmiscible encima de la solución de elución, y luego se aplica un gradiente de presión. La solución de empuje de fluido inmiscible adicional ayuda a forzar la solución de elución con base acuosa a través del filtro y evita la retención de la solución de elución residual en el filtro. El volumen de la solución de empuje de fluido inmiscible es de 0,5 a 2 veces, preferiblemente de 1 a 1,5 veces el volumen de la solución de elución.

10 En una realización del método para purificar ADN o ARN, una solución que contiene el ADN o ARN se pasa a través de un filtro de microfibras de vidrio para adsorber el ADN o ARN en las microfibras, el filtro se lava con un volumen de una solución de lavado de fluido inmiscible (p. ej., aceite de silicona) y luego una solución de elución (p. ej., agua) se pasa a través del filtro para eluir el ADN o ARN en un tubo de recogida. También se usa una solución de empuje de fluido inmiscible en la etapa de elución según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

15 Una realización de un método de purificación de ADN comprende pasar una solución que contiene el ADN a través de un filtro de microfibras de vidrio para adsorber el ADN en las microfibras, lavar el filtro con una solución de lavado a base de alcohol (p. ej., etanol al 50 % en Tris 10 mM/solución de NaCl 100 mM), lavar el filtro con una solución de lavado con fluido inmiscible (p. ej., aceite de silicona) y luego eluir el ADN adsorbido con una solución de elución (p. ej., solución de Tris 10 mM (pH 9,0)) en un tubo de recogida. También se usa una solución de empuje de fluido inmiscible en la etapa de elución según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

20 Una realización de un método de purificación de ARN comprende pasar una solución que contiene el ARN a través de un filtro de microfibras de vidrio para adsorber el ARN en las microfibras, lavar el filtro con una solución de lavado con fluido inmiscible (p. ej., aceite de silicona), lavar el filtro con una solución de lavado a base de alcohol (p. ej., etanol al 50 % en Tris 10 mM/solución de NaCl 100 mM), lavar el filtro con una solución de lavado con fluido inmiscible (p. ej., aceite de silicona) y luego eluir el ARN adsorbido con una solución de elución (p. ej., agua sin RNasa) en un tubo de recogida. También se usa una solución de empuje de fluido inmiscible en la etapa de elución según cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

25 Las diversas soluciones se pueden proporcionar en conjunto, en su totalidad o en parte, como un kit, para la comodidad de un usuario. El kit comprende una solución de lavado con fluido inmiscible, una solución de elución y una solución de empuje de fluido inmiscible. En otra realización preferida, el kit comprende una solución de lavado de fluido inmiscible, una solución de lavado a base de alcohol, una solución de elución con base acuosa y una solución de empuje con fluido inmiscible. En otra realización preferida, el kit comprende una solución de lavado con fluido inmiscible, una solución de lavado a base de alcohol, una solución de elución y una solución de empuje de fluido inmiscible. En algunas realizaciones, el mismo reactivo se puede usar como solución de lavado con fluido inmiscible y como solución de empuje de fluido inmiscible. Los reactivos pueden proporcionarse en un volumen suficiente para realizar de 1 a 25 operaciones de purificación para un sistema y tipo de recipiente dados. Los volúmenes más grandes también se contemplan, y pueden ser deseables cuando los métodos son realizados por un equipo automatizado.

30 En algunas realizaciones, se puede proporcionar un reactivo como una solución concentrada, por ejemplo, como una solución 10x, para ser diluida antes de su uso. En algunas realizaciones, se puede proporcionar un reactivo como los componentes sólidos, por ejemplo, como un polvo liofilizado, para reconstituirse agregando el(los) componente(s) líquido(s) para la solución antes del uso. El componente líquido para diluir o reconstituir una solución también se puede proporcionar en el kit. Normalmente, el líquido para dilución o reconstitución es agua, que tiene una pureza adecuada para la aplicación, como se describió anteriormente.

35 El kit puede comprender además un documento con instrucciones para usar los reactivos según los métodos de la invención.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, el kit puede comprender además un recipiente equipado con un filtro.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Dispositivo de filtro.

50 Se preparó un dispositivo de filtro colocando un filtro de microfibras de vidrio Whatman, calidad GF/B (Whatman, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) en la parte superior de una estructura acanalada de soporte en un cartucho cilíndrico de polipropileno. El filtro Whatman se cortó para ser un poco más grande que el diámetro interno (6,0 mm) del cartucho y se ajustó a presión contra la estructura de soporte.

Ejemplo 2. (referencia) Purificación del ARN del VIH a partir de plasma humano.

55 En este ejemplo, se analizaron diez fluidos inmiscibles para su uso como una solución de lavado inmiscible para la

purificación de ARN a partir de plasma humano.

El plasma humano negativo para VIH se enriqueció con plasma humano positivo para VIH (Acrometrix OptiQual HIV-1 High Control) para proporcionar muestras de plasma humano que contienen 1.000 partículas de VIH por 1 ml. Se preparó un tampón de lisis de tioglicerol K4 inmediatamente antes del uso agregando 220 µl de 1-tioglicerol (10 µl/ml) a 21,8 ml de tampón de lisis K4 (tiocianato de guanidinio 4 M, acetato de potasio 770 mM, 0,78 % (p/v) N-lauril sarcosina, Bis-Tris 0,05 M (pH 6,4)).

Las muestras (1,0 ml) se dividieron en partes alícuotas en tubos de 5 ml, y a estas se añadieron 1,8 ml de tampón de lisis K4 tratado con tioglicerol, y la solución se mezcló mediante agitación con vórtex. Se añadió ARN portador (5 µl de 10 mg/ml de poliA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)) y la solución se mezcló mediante agitación con vórtex. Después de incubar la solución de muestra a 56 °C durante 10 minutos, se añadió isopropanol absoluto (1,9 ml) y la solución se mezcló mediante agitación con vórtex.

La solución se transfirió en porciones de 700 µl a un dispositivo de filtro preparado según el Ejemplo 1. Cada porción de la solución se pasó a través del filtro aplicando presión (-40 kPa) al líquido sobre el filtro, y el proceso se repitió hasta que toda la muestra se pasó a través del filtro para adsorber el ARN en el filtro.

Luego, cada filtro se lavó con una de las soluciones de lavado con fluido inmiscible que se muestran en la siguiente Tabla agregando 300 µl de la solución de lavado a la parte superior del filtro y aplicando presión sobre la solución para pasarla a través del filtro.

Tabla 1.

Solución de lavado inmiscible	Fuente
Fluido de silicona, 5 cSt	Clearco Products Co., Inc. (Bensalem, PA)
Fluido de silicona, 50 cSt	Clearco Products Co., Inc. (Bensalem, PA)
Fluido de silicona, 350 cSt	Clearco Products Co., Inc. (Bensalem, PA)
Aceite mineral	Sigma Aldrich (St. Louis, MO)
Tapón de vapor	Qiagen Inc., (Valencia, CA)
Aceite de olive virgen extra	Bertolli (Unilever, Englewood Cliffs, NJ)
Aceite de soja	Great Value (Walmart)
Aceite de pescado (One a day)	Bayer (Leverkusen, Al.)
Aceite para bebés (mom to mom®)	Safeway Inc. (Pleasanton, CA)
Aceite de cacahuete	Safeway Inc. (Pleasanton, CA)

El filtro se lavó luego con una solución de lavado a base de alcohol. Se añadió una solución acuosa de etanol (70 % de etanol, 700 µl) sobre el filtro y se pasó a través del filtro aplicando presión, y este proceso de lavado se repitió una vez más.

El filtro se lavó de nuevo usando la misma solución de lavado con fluido inmiscible, en la misma cantidad. Después de este segundo lavado con la solución de lavado con fluido inmiscible, el cartucho se colocó sobre un nuevo tubo de centrifuga de 0,5 ml. Se añadió una solución de elución de agua (50 µl) sobre el filtro, se dejó en contacto con el filtro durante 30 segundos y luego se pasó a través del filtro presionando el espacio sobre el agua para eluir los ácidos nucleicos adsorbidos en el tubo nuevo.

También se prepararon dos tipos de controles con fines comparativos. Primero, el plasma humano negativo para VIH se procesó como una muestra sin aumentar el plasma con VIH (sin control objetivo), y en segundo lugar, las muestras positivas para VIH se procesaron sin incluir lavados con una solución de lavado inmiscible (sin control de lavado inmiscible).

Ejemplo 3. (referencia) Análisis de muestras de VIH por RT-PCR.

Los cebadores para detectar el ARN del VIH se sintetizaron con las siguientes secuencias y se usaron en una reacción de RT-PCR de una sola etapa:

SEQ ID NO: 1 (cebador directo) 5'-AGTTGGAGACATCAAGCAGCCATGCAAAT

SEQ ID NO: 2 (cebador inverso) 5'-TGATATGTCAGTTCCCCTTGGTTCTCT.

El cebador directo ceba la formación de ADNc en función de la diana del ARN del VIH, y los cebadores directos e inversos funcionan como un par de cebadores para amplificar un producto de ADN basado en la cadena de ADNc. El producto de ADN esperado es de 155 pb.

Se preparó una solución de premezcla del cebador, que contiene: 1x SensiFAST™ SYBR No-ROX One-Step mix (Bioline USA, Taunton, MA), 0,6 µM de cebador directo, 0,346 µM de cebador inverso, 10 U/µl de inhibidor de RNasa, y 0,25 µl de solución de transcriptasa inversa por 25 µl de muestra. Las soluciones de reacción de RT-PCR se prepararon combinando la solución de premezcla de cebador (15 µl) con una muestra (10 µl) purificada según el Ejemplo 2. Cada muestra se analizó por RT-PCR por duplicado. La cantidad teórica de VIH en el análisis de RT-PCR es de 200 copias/muestra.

El análisis de RT-PCR se realizó en un SmartCycler® SC1000-1 (Sunnyvale, CA) de la siguiente manera.
Etapa RT: 45 °C durante 900 s, y 95 °C durante 120 s;
Etapa PCR: 40 ciclos de 95 °C durante 5 s, 61 °C durante 5 s y 72 °C durante 10 s.

Se midió una curva de fusión durante una rampa de temperatura de 0,2 ° C/s de 60 °C hasta 95 °C después de que se completara el termociclado.

El producto de RT-PCR de cada muestra también se analizó por electroforesis usando el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

La Fig. 2A-2B muestra la curva de crecimiento y la Fig. 3A-3B muestra el gráfico del pico de fusión medido en el SmartCycler® para la amplificación por RT-PCR de las diez muestras (purificadas por lavado con las diez soluciones de lavado inmiscibles diferentes) y los dos controles.

Como se muestra, las diez muestras (analizadas por duplicado) produjeron cada una el producto esperado. Se observó que el umbral del ciclo (Ct) para cada muestra era de aproximadamente 32 (véase la Tabla 2) para ocho de las muestras. El valor de Ct similar para los diversos lavados indica que cada solución de lavado inmiscible fue similarmente eficaz en eliminar los inhibidores de la PCR, y el protocolo de purificación en su conjunto fue capaz de administrar cantidades similares de diana de ARN purificado. Dos muestras (aceite de soja y aceite de oliva) mostraron valores más altos de Ct, lo que sugiere que estos fluidos causan cierta inhibición. Si este grado de inhibición es sustancial depende de las necesidades y los objetivos de la aplicación. El control de "lavado no inmiscible" fue negativo; no se observó ningún producto de amplificación, lo que indica que los inhibidores de la PCR no se eliminaron adecuadamente al adsorber los ácidos nucleicos en el filtro, al lavar con una solución de lavado con alcohol y al eluir con agua. El control "sin objetivo" fue negativo, lo que indica la ausencia de contaminación.

Tabla 2.

Muestra	Umbral del ciclo (Ct)
(1) Control sin objetivo	0, 0
(2) Lavado con fluido de silicona, 5 cSt	30,5, 32,4
(3) Lavado con fluido de silicona, 50 cSt	31,6, 31,3
(4) Lavado con fluido de silicona, 350 cSt	32,1, 33,0
(5) Lavado con aceite mineral	32,0, 31,5
(6) Lavado con tapón de vapor	32,6, 30,9
(7) Lavado con aceite de oliva	37,3, 0
(8) Lavado con aceite de soja	35,1, 34,6
(9) Lavado con aceite de pescado	33,1, 32,8
(10) Lavado con aceite para bebés (mom to mom®)	31,9, 32,2
(11) Lavado con aceite de cacahuete	32,9, 33,0
(12) Control de lavado no inmiscible	0

Las curvas de fusión mostradas en la Fig. 3A-3B muestran un pico a aproximadamente 83-84 °C para las diez

muestras, mientras que los dos controles no tienen pico, lo que indica que las muestras contienen un producto de amplificación de doble cadena, mientras que las reacciones de control no lo hacen.

La Fig. 4A-4B muestra los electroferogramas para las mismas muestras y controles. El pico a aproximadamente 58 segundos corresponde al producto de amplificación de 155 pb, y los picos a aproximadamente 41 segundos y 110 segundos son marcadores de tamaño molecular. La similitud de los resultados confirma que la reacción de RT-PCR produjo de manera reproducible el producto de amplificación esperado sin otras reacciones de amplificación no específicas en las muestras purificadas.

Ejemplo 4 (referencia). Purificación del ADN de VHB a partir de plasma humano.

En este ejemplo, se compararon cuatro volúmenes diferentes de solución de lavado con fluido inmiscible para purificar ADN de plasma humano junto con reactivos de un kit comercial, el kit de sangre completa S QuickGene DNA (Fujifilm Corp.) para la preparación de la muestra de ADN.

El plasma humano negativo para VHB se enriqueció con plasma humano positivo para VHB (Acrometrix OptiQual HBV High Positive Control) para proporcionar muestras de plasma humano que contienen 28.150 partículas de VHB por 1 ml.

Se colocó la solución de proteasa QuickGene DB-S (EDB) (150 µl) en el fondo de un tubo cónico de 5 ml, y luego la muestra enriquecida con VHB (1,0 ml) se dividió en partes alícuotas en el tubo. Se añadió tampón de lisis QuickGene DB-S (LDB) (1,25 ml) a cada tubo, y la mezcla se mezcló inmediatamente con una pipeta, se agitó en vórtex y se incubó a 56 °C durante 2 minutos. Se añadió etanol absoluto (1,25 ml) y la solución se mezcló mediante agitación con vórtex.

La solución se transfirió en porciones de 600 µl a un dispositivo de filtro preparado según el Ejemplo 1. Cada porción de la solución se pasó a través del filtro aplicando presión (~40 kPa) al líquido sobre el filtro, y el proceso se repitió hasta que toda la muestra se pasó a través del filtro, para adsorber el ADN en el mismo.

Cada filtro con ADN adsorbido se lavó luego tres veces con tampón de lavado a base de alcohol QuickGene DB-S (WDB) (750 µl). Luego, cada filtro se lavó una vez con una solución de lavado con fluido inmiscible, fluido de silicona (5 cSt), agregando 50 µl, 100 µl, 300 µl o 750 µl de la solución de lavado a la parte superior del filtro y aplicando una presión superior a la solución para pasarlo por el filtro.

Después de este lavado con la solución de lavado con fluido inmiscible, el cartucho se colocó sobre un tubo de centrifuga limpio de 0,5 ml. Se añadió tampón de elución de QuickGene DB-S (50 µl) en la parte superior del filtro, se dejó en contacto con el filtro durante 30 segundos y luego se pasó a través del filtro presionando el espacio sobre la solución para eluir los ácidos nucleicos adsorbidos en el tubo limpio.

También se prepararon dos tipos de controles con fines comparativos. Primero, el plasma humano negativo para VHB se procesó como una muestra sin enriquecer el plasma con VHB (control sin objetivo), y en segundo lugar, las muestras positivas para VHB se procesaron y se adsorbieron en el filtro, pero el filtro no se lavó con la solución de lavado con fluido inmiscible (control "lavado con fluido no inmiscible").

Ejemplo 5. (referencia) Análisis de muestras de VHB por PCR.

Los cebadores para detectar el ADN del VHB se sintetizaron con las siguientes secuencias y se usaron en una reacción de PCR:

SEQ ID NO: 3 (cebador directo) 5'-GACCACCAAATGCCCTAT

SEQ ID NO: 4 (cebador inverso) 5'-TGAGATCTTCTGCGACG.

Los cebadores directos e inversos funcionan como un par de cebadores para amplificar una secuencia de 132 pb de la diana del ADN del VHB.

Se preparó una solución de premezcla de cebador que contenía: 1x SensiFAST™ SYBR No-ROX kit (Bioline USA, Taunton, MA), 0,4 µM de cebador directo y 0,4 µM de cebador inverso por 25 µl de muestra. Las soluciones de reacción de PCR se prepararon combinando la solución de premezcla de cebador (15 µl) con una muestra (10 µl) purificada según el Ejemplo 4. Cada muestra se analizó por PCR por duplicado. La cantidad teórica de VHB en el análisis de RT-PCR es de 5.630 copias/muestra.

El análisis de PCR se realizó en un SmartCycler® SC1000-1 (Cepheid, Sunnyvale, CA) de la siguiente manera:

Desnaturalización inicial: 95 °C durante 120 s;

Etapas de PCR: 40 ciclos de 95 °C durante 5 s, 57 °C durante 10 s y 72 °C durante 15 s.

Se midió una curva de fusión durante una rampa de temperatura de 0,2 °C/s de 60 °C a 98 °C después de que se completara el termociclado.

El producto de PCR de cada muestra también se analizó por electroforesis usando el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

La Fig. 5 muestra la curva de crecimiento y la Fig. 6 muestra el gráfico del pico de fusión medido en el SmartCycler® para la amplificación por PCR de las cuatro muestras (purificadas por lavado con cuatro volúmenes diferentes de solución de lavado con fluido inmiscible) y los dos controles.

Como se muestra, las cuatro muestras (analizadas por duplicado) produjeron cada una el producto esperado. Se observó que el umbral de ciclo (Ct) para cada muestra era de aproximadamente 26 (véase la Tabla 2) para las cuatro muestras. El valor de Ct similar para los diversos lavados indica que cada solución de lavado inmiscible fue igualmente eficiente en la eliminación de los inhibidores de la PCR, y el protocolo de purificación en su conjunto fue capaz de administrar cantidades similares de diana de ADN purificado. La temperatura de fusión del producto de amplificación muestra un ligero aumento al aumentar el volumen de lavado con fluido inmiscible.

Cuando la muestra de ADN adsorbido no se lava con la solución de lavado con fluido inmiscible, sin embargo, no se obtiene ningún producto de amplificación. El control de "lavado de fluido no inmiscible" fue negativo, lo que indica que los inhibidores de la PCR no se eliminaron adecuadamente mediante el protocolo estándar de adsorción de los ácidos nucleicos en el filtro, al lavarse con la solución de lavado comercial y luego al eluirse con el tampón de elución. Uno de los controles "sin objetivo" mostró una pequeña cantidad de un producto de amplificación no específico, pero, por lo demás, los controles negativos fueron negativos.

Tabla 3.

Muestra	Umbral de ciclo (Ct)	Pico de fusión (°C)
(1) Control sin objetivo	0, 37	--, 79,1
(2) Control de lavado con fluido no inmiscible	0, 0	--, --,
(3) Lavado con 50 µl de fluido de silicona (5 cSt)	25,7 25,9	84,4, 84,1
(4) Lavado con 100 µl de fluido de silicona (5 cSt)	26,3, 26,2	85,1, 84,8
(5) Lavado con 300 µl de fluido de silicona (5 cSt)	25,7, 25,5	85,9, 85,8
(6) Lavado con 750 µl de fluido de silicona (5 cSt)	25,7, 26,1	86,2, 86,3

La Fig. 7 muestra los electroferogramas para las mismas muestras y controles. El pico a aproximadamente 58 segundos corresponde al producto de amplificación de 132 pb. La similitud de los resultados confirma que la reacción de PCR produjo de manera reproducible el producto de amplificación esperado sin reacciones de amplificación no específicas en las muestras purificadas.

Ejemplo 6. Eficiencia de la recogida de ADN genómico.

(1) Extracción de ADNg de BCG de *Mycobacterium bovis*.

Se recogieron colonias de BCG de *Mycobacterium bovis* (Sociedad Japonesa de Bacteriología) incubadas en medio Ogawa (S) al 2 % (Kyokuto Pharmaceutical Industries) durante 28 días, se suspendieron en agua esterilizada y se trataron en autoclave (121 °C durante 20 minutos). A continuación, el ADN se purificó usando el kit de purificación de extracción de punta genómica de ADN de Qiagen. El número de copias se determinó midiendo la absorbancia óptica del ADNg purificado obtenido.

(2) Método de purificación de ácido nucleico por cartucho de purificación de ácido nucleico.

Se prepararon muestras que contenían el ADNg de BCG de *Mycobacterium bovis* (número de copias de 3×10^3) y 2 µg de ADN de esperma de salmón (SIGMA) en 900 µl de solución acuosa de alcohol isopropílico al 40 % que contenía clorhidrato de guanidina 1,7 M (Wako Pure Chemical). La muestra se transfirió a un dispositivo de filtro preparado según el Ejemplo 1 y se pasó a través del filtro (6 kPa) para adsorber el ADN en el filtro.

El filtro se lavó primero pasando a través del filtro 700 µl de una primera solución de lavado que consiste en una solución acuosa de etanol al 50 % que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) (Wako Pure Chemical), cloruro de sodio 150 mM (Wako) y 1 % de Tween 80 (Wako).

El filtro se lavó luego con 700 µl de una segunda solución de lavado que consistía en una solución acuosa de etanol al 50 % que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) (Wako Pure Chemical) y cloruro de sodio 150 mM (Wako Pure Chemical). A continuación, se pasaron 300 µl de una primera solución de lavado con fluido inmiscible que consistía en aceite de silicona (viscosidad: 5 cs) (Shin-Etsu Chemical) a través del filtro aplicando una presión (~25-100 kPa) sobre la solución de lavado.

Para eluir el ADN, primero se añadieron 30 µl de solución de elución Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) (Wako Pure Chemical)

al cartucho y se dejó que entrara en contacto con el filtro de microfibra de vidrio durante uno a cinco minutos, y luego a se añadieron 30 µl de una solución de empuje de fluido inmiscible que consiste en aceite de silicona (viscosidad: 50 cs, Shin-Etsu Chemical) sobre el tampón de elución. La solución de elución y la solución de empuje de fluido inmiscible se pasaron a través del filtro aplicando una presión (~25-100 kPa) sobre las soluciones.

5 (3) Volumen de rendimiento de la muestra eluida

El método de purificación del cartucho descrito en la sección (2) de este Ejemplo se realizó para ocho muestras, y se midió el volumen de la muestra recogida por elución. Como comparación, el método de purificación de la sección (2) también se realizó omitiendo la solución de empuje de fluido inmiscible. Los resultados se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4

Método	Volumen eluido (µl)	Volumen medio (µl)
Método de sección (2)	25	25,6 ± 0,6
	26	
	25	
	26	
	25	
	26	
	26	
	26	
Método comparativo (sin usar una solución de empuje de fluido inmiscible)	5	7,7 ± 2,7
	10	
	8	

Como se muestra en la Tabla 4, el volumen de eluyente recogido es bajo y varía (de 5 a 10 µl) cuando se omite en el protocolo la solución de empuje de fluido inmiscible. Como lo ilustran los datos, usando solo una solución de elución con base acuosa al igual que en el método comparativo, no se obtuvo la cantidad deseada de eluyente, al menos 12,5 µl, para implementar la medición cuantitativa descrita en la sección (4) a continuación. El uso de las soluciones de lavado de fluido inmiscible proporciona al menos tres beneficios. El volumen recogido cumple con los requisitos de volumen de las etapas analíticas posteriores, los volúmenes eluidos son más consistentes, lo que ayuda en la automatización y el análisis de datos, y la cantidad de ácido nucleico en la muestra inicial se puede determinar con mayor precisión porque el volumen eluido es más casi cuantitativo.

(4) Análisis cuantitativo de muestras eluidas por PCR en tiempo real.

Se prepararon cuatro muestras (900 µl) que contenían 3 x 10³ copias de ADN_g de BCG de *Micobacterium bovis* y se purificaron según el protocolo de las secciones (1) y (2) de este Ejemplo, y la cantidad de ADN en el eluyente fue medida por PCR en tiempo real usando el SmartCycler® II (Cepheid).

Los cebadores para detectar la secuencia de inserción IS6110 en *M. bovis* se sintetizaron con las siguientes secuencias:

SEQ ID NO: 5 (cebador directo) 5'-TGGGTAGCAGACCTCACCTAT

SEQ ID N°: 6 (cebador inverso) 5'-AACGTCTTTTCAGGTCGAGTACG

SEQ ID NO: 7 (sonda) 5'-FAM-TGGCCATCGTGGAAGCGACCCGC-TAMRAFAM es el colorante fluorescente fluoresceína y TAMRA es el colorante fluorescente tetrametilrodamina. Los cebadores directo e inverso funcionan como un par de cebadores para amplificar una secuencia de 192 pb de la diana IS6110.

Las soluciones de reacción de PCR se prepararon con (concentración final): 1x tampón Taq (TaKaRa), MgCl₂ 3 mM (TaKaRa), dNTP 400 mM (TaKaRa), 1 unidad de TaKaRa Ex HS polimerasa, 500 nM de cebador directo, 500 nM de cebador inverso, y 280 nM de oligo sonda.

El análisis de PCR se realizó en un SmartCycler® II (Cepheid, Sunnyvale, CA) de la siguiente manera:

Desnaturalización inicial: 97 °C durante 60 s;

Etapas de PCR: 40 ciclos de 97 °C durante 6 s, 61 °C durante 6 s y 72 °C durante 6 s.

La fluorescencia generada por el colorante liberado de la oligo sonda se midió para cada una de las cuatro muestras. Los valores de Ct determinados en el SmartCycler® II se muestran en la Tabla 5. El rendimiento del ADNg obtenido en el eluyente en el protocolo de purificación también se determinó mediante la calibración del resultado cuantitativo contra una muestra de control preparada con la misma concentración de ADNg (3×10^3 copias/900 μ l) pero no fueron sometidas al protocolo de purificación de la sección (3). Los valores de Ct para las muestras de control duplicadas fueron 28,44 y 28,92. El promedio, Ct = 28,68, se toma para representar el rendimiento del 100 %. Como lo demuestra el rendimiento calculado de ADN, esencialmente todo el ADNg se adsorbió y luego se liberó en el proceso de purificación.

Tabla 5

Muestra	Valor Ct	Rendimiento del ADN eluido
1	28,45	117 %
2	28,52	112 %
3	28,71	98 %
4	28,59	106 %
Promedio	28,6	108 %

REIVINDICACIONES

Se reivindica:

1. Un método de purificación de ácidos polinucleicos, comprendiendo el método:

(a) absorción de los ácidos polinucleicos en un filtro encajado en un recipiente;

5 (b) lavado del filtro con una primera solución de lavado con fluido inmiscible; y

(c) elución de los ácidos polinucleicos del filtro usando (i) una solución de elución con base acuosa y (ii) una solución de empuje con fluido inmiscible,

en donde se obtiene una solución de ácidos polinucleicos purificados.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende, además:

10 después de la etapa (a) y antes de la etapa (b), lavado del filtro con una solución de lavado a base de alcohol.

3. El método de la reivindicación 1, que comprende, además:

después de la etapa (a) y antes de la etapa (b), lavado del filtro con una segunda solución de lavado con fluido inmiscible y acto seguido lavado del filtro con una solución de lavado a base de alcohol.

15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en donde los ácidos polinucleicos son ADN y/o ARN.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el filtro es un filtro de microfibras de vidrio.

6. El método de la reivindicación 2, en donde la primera solución de lavado con fluido inmiscible comprende un fluido que (i) cuando se pone en contacto con agua forma una fase sustancialmente separada del agua; y (ii) tiene una gravedad específica inferior a la del agua.

20 7. El método de la reivindicación 6, en donde la gravedad específica de la primera solución de lavado con fluido inmiscible es inferior a la de la solución de lavado a base de alcohol usada en el método.

8. El método de la reivindicación 2, en donde la solución de lavado a base de alcohol comprende etanol y agua.

25 9. El método de la reivindicación 8, en donde la solución de lavado a base de alcohol comprende además una sal y/o un tampón.

10. El método de la reivindicación 8, en donde la solución de lavado a base de alcohol comprende además un polímero hidrófilo.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el polímero hidrófilo es un polímero de polietilenglicol.

30 12. El método de la reivindicación 1, en donde la solución de elución con base acuosa comprende un tampón.

13. El método de la reivindicación 1, en donde la solución de elución con base acuosa comprende agua sin DNasa/RNasa.

Fig. 1

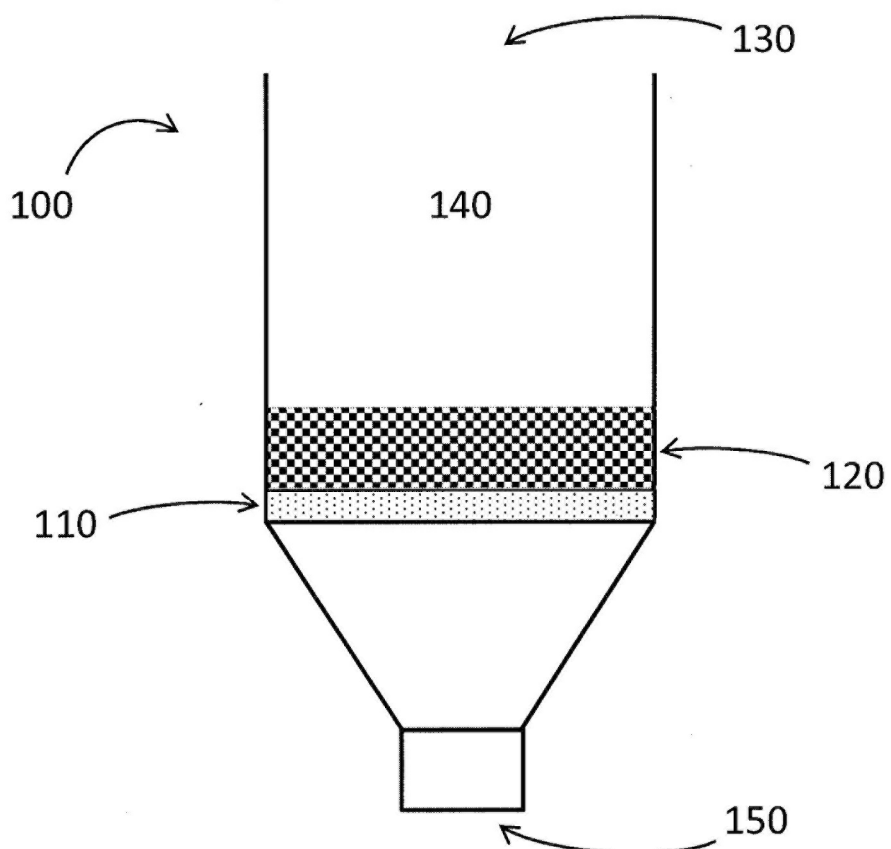


Fig. 2A

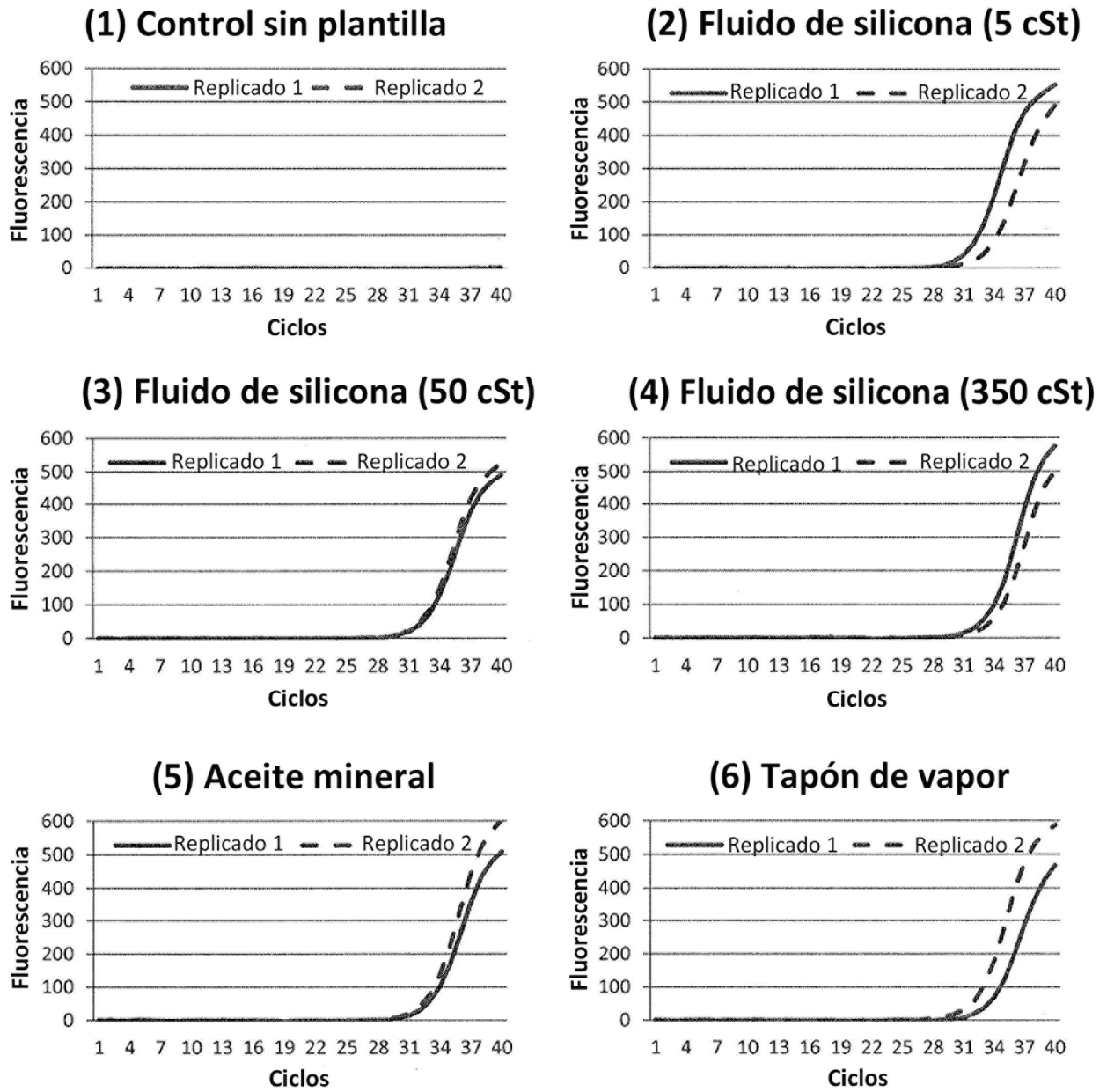


Fig. 2B

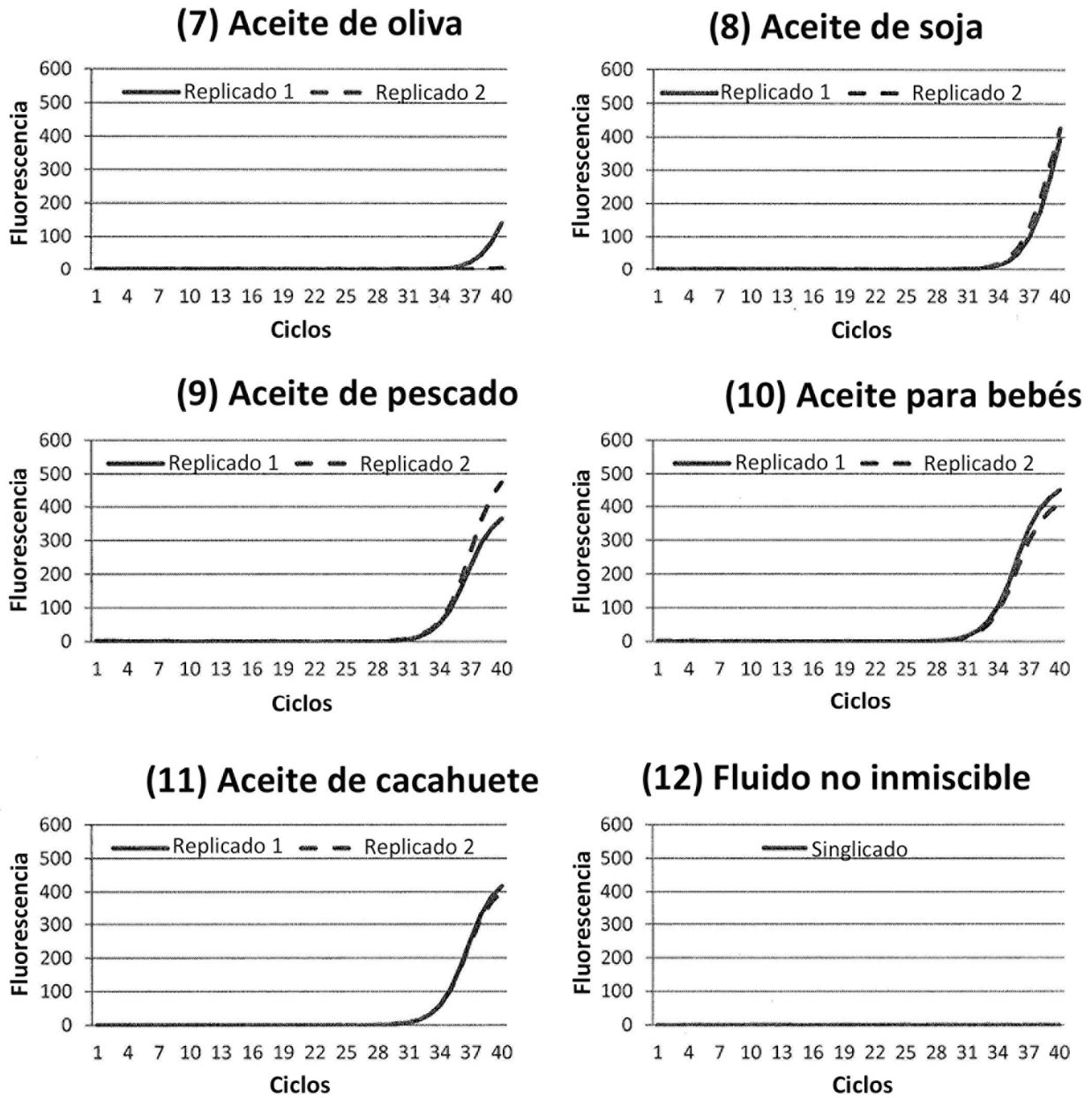


Fig. 3A

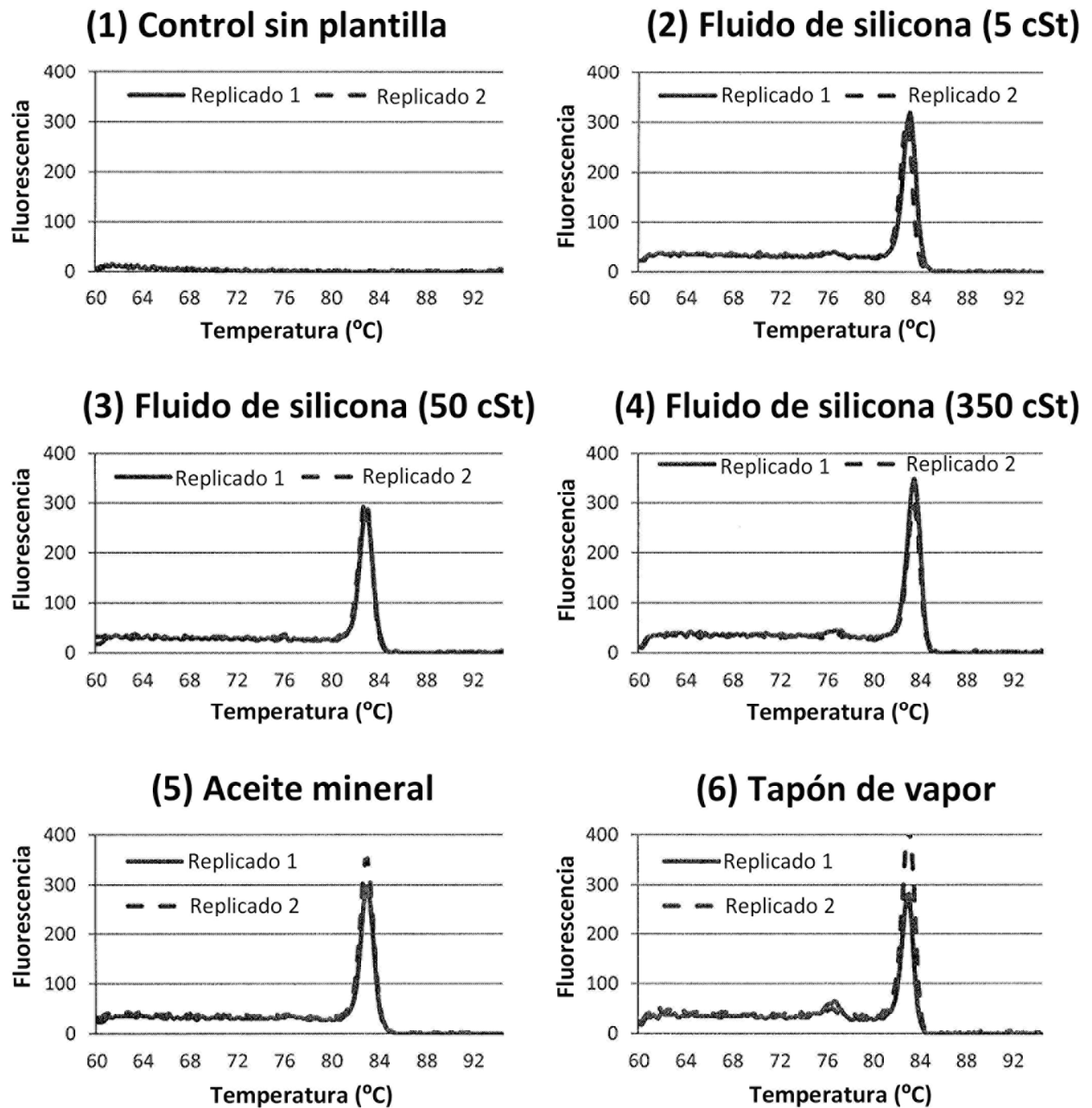


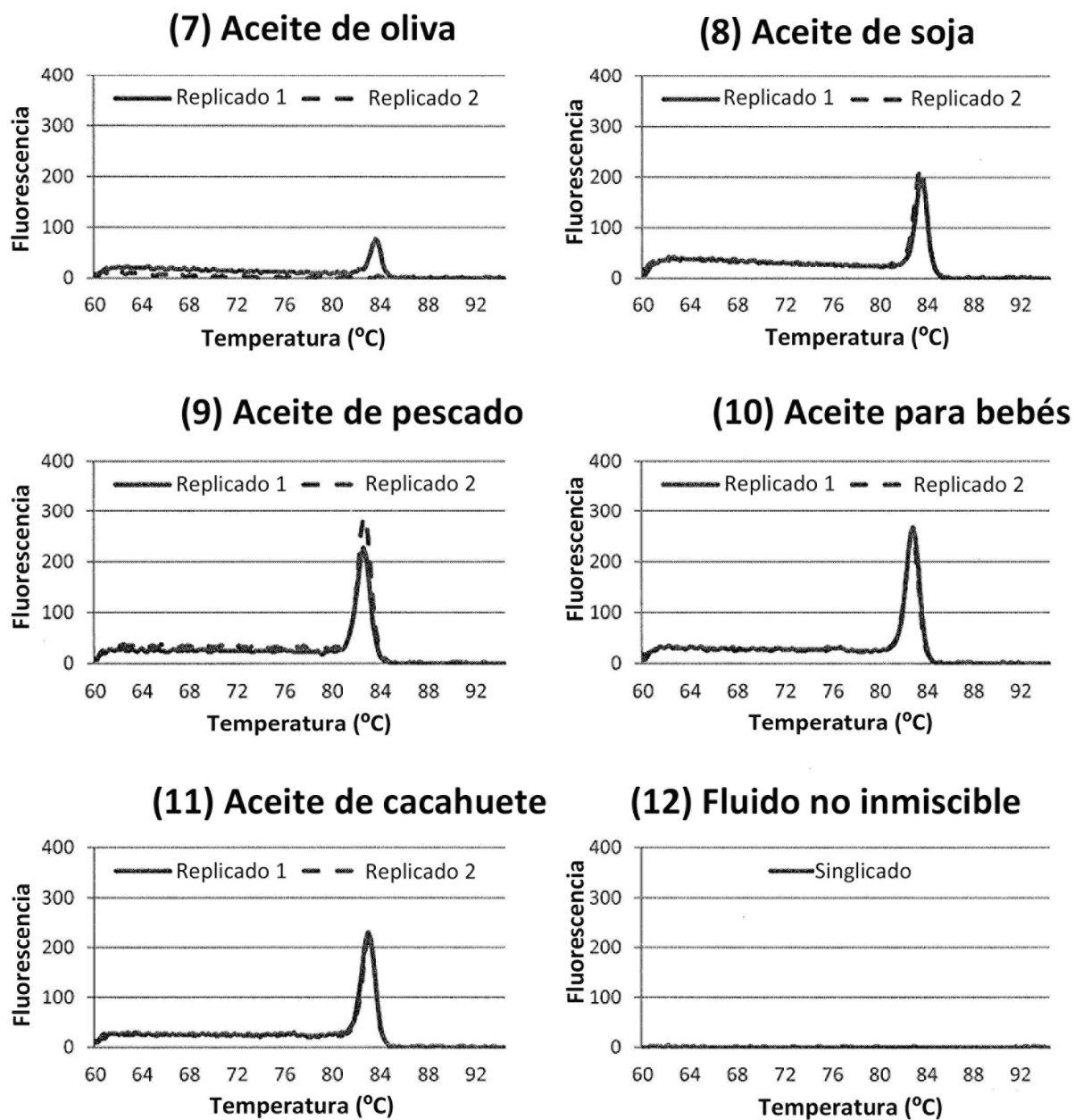
Fig. 3B

Fig. 4A

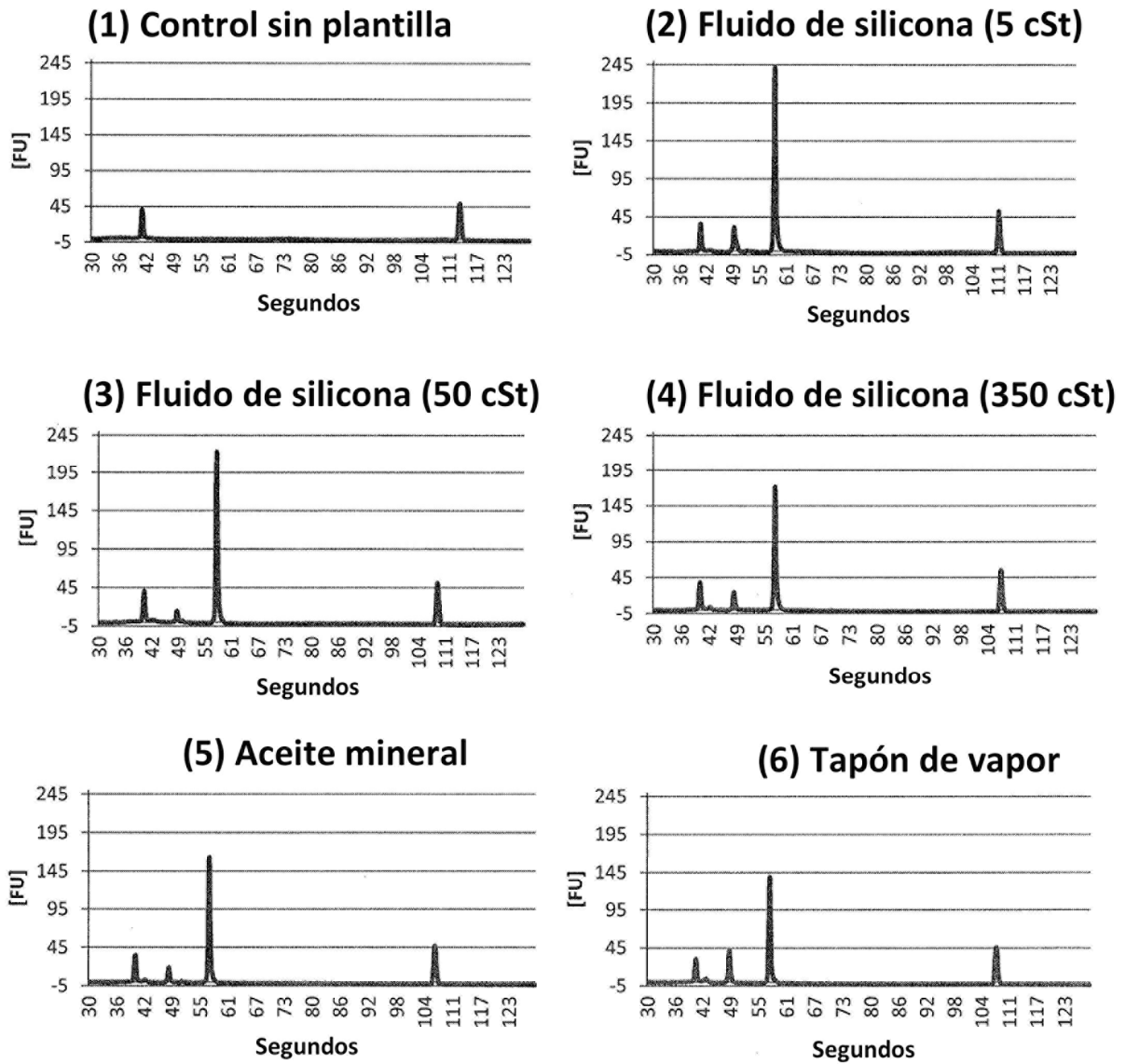


Fig. 4B

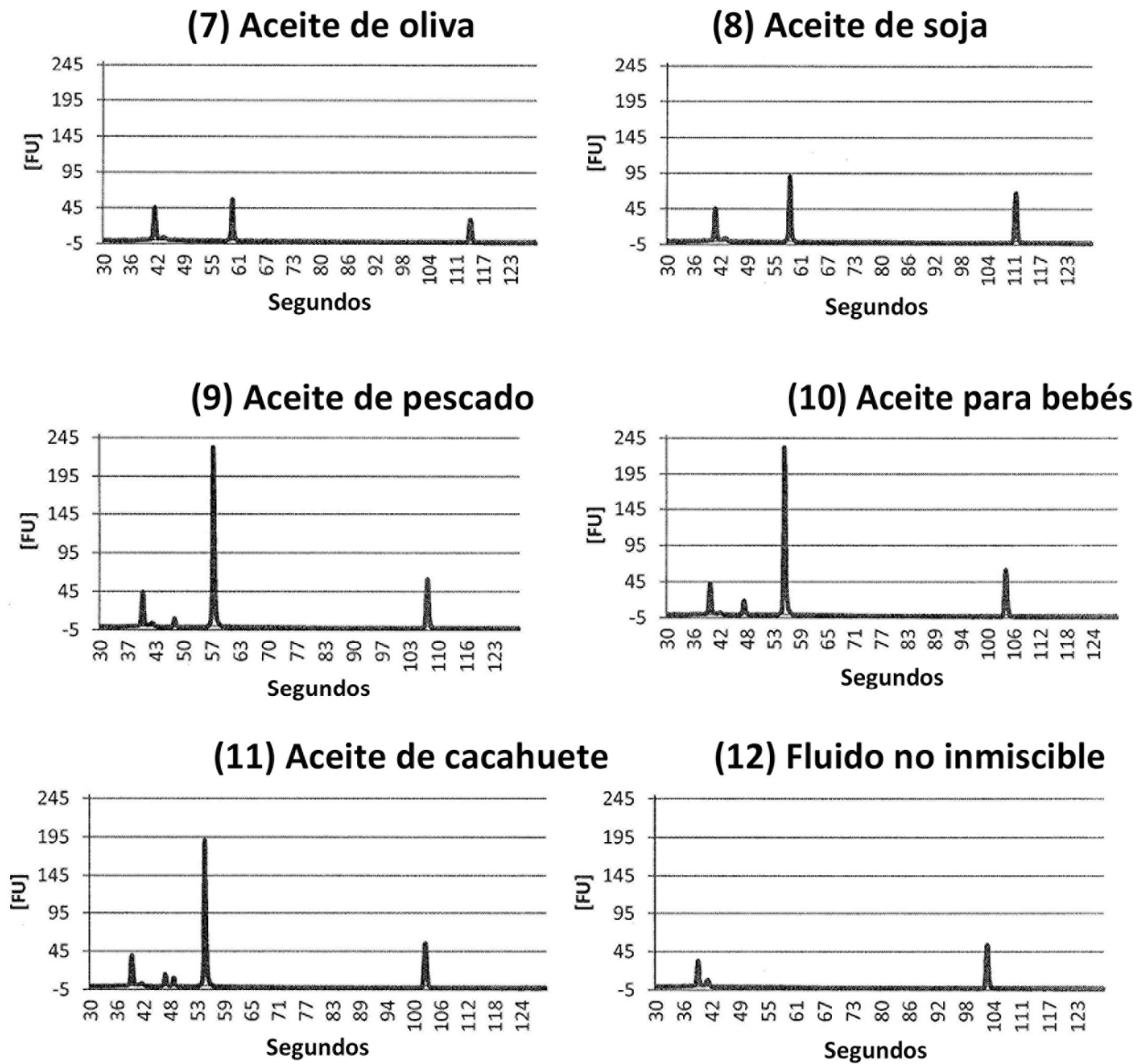


Fig. 5

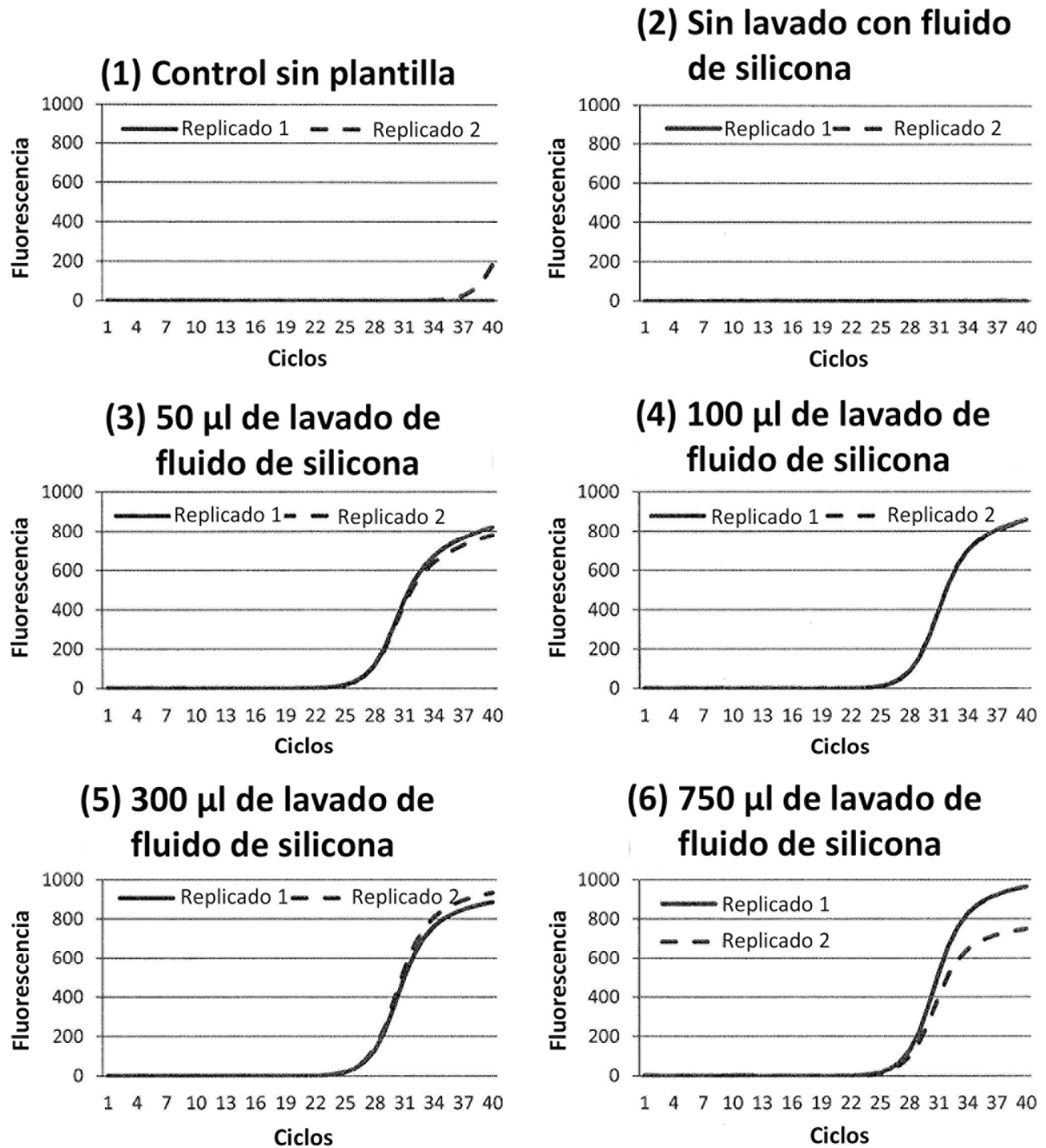


Fig. 6

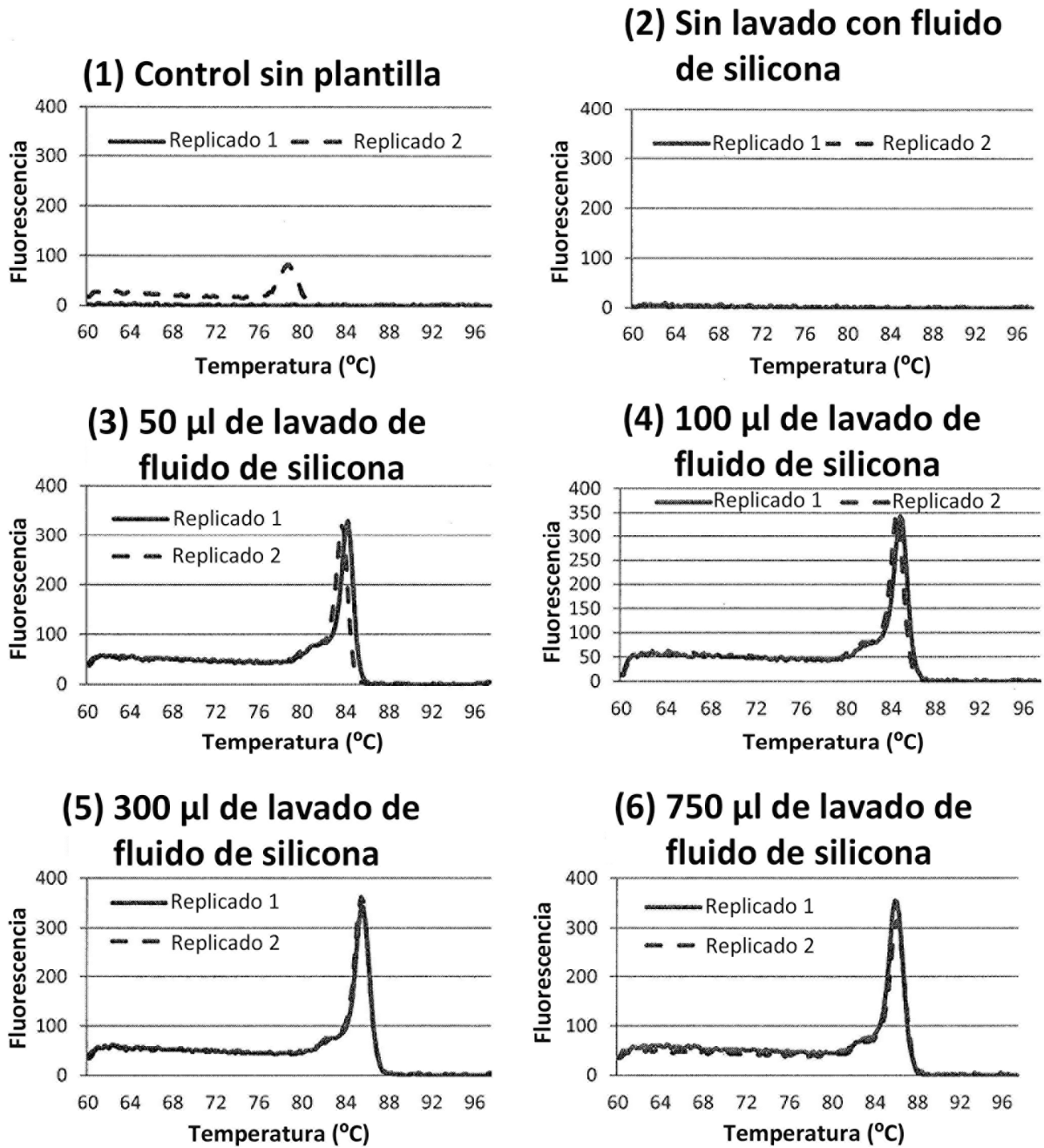


Fig. 7