

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 068**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2015 PCT/JP2015/074927**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2016 WO16035812**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2015 E 15837848 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3190184**

54 Título: **Método de pretratamiento y kit de extracción de ácido nucleico utilizado en el citado método**

30 Prioridad:

03.09.2014 JP 2014179111

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

04.12.2019

73 Titular/es:

**MIZUHO MEDY CO., LTD. (100.0%)
5-4, Fujinoki-chou, Tosu-shi
Saga 841-0048, JP**

72 Inventor/es:

**YAMAKAWA, KAZUTOMI y
NAGANO, TAKASHI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 734 068 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 pretratamiento y kit de extracción de ácido nucleico utilizado en el citado método

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la Invención

La presente invención se refiere a un método de pretratamiento para, antes de un proceso de amplificación de ácido nucleico, extraer el ácido nucleico por medio de un método de extracción en fase sólida.

10 En la presente memoria descriptiva, el proceso de amplificación de ácido nucleico se realiza para detectar y / o identificar la secuencia de base del ácido nucleico objetivo.

15 Más en particular, la presente invención es capaz de realizar procesos de acuerdo con un modo de POCT sin ningunos instrumentos especiales físicos y químicos.

La palabra "POCT" significa "Prueba en el Punto de Atención" y significa una inspección realizada cerca de un sujeto y / o por el propio sujeto.

20 La sociedad japonesa para la automatización de laboratorios clínicos ha definido, en las directrices de la POCT de la misma, que la POCT es "una inspección para contribuir a mejorar los ítems que incluyen: tratamiento médico y enfermería puntuales y apropiados; prevención de enfermedades; calidad de los cuidados médicos, tales como la administración de cuidados de la salud ; Calidad de Vida (QOL) y satisfacción de los cuidados".

25 2. Descripción de la técnica relacionada

En los últimos años, el campo de las ciencias de la vida se ha desarrollado notablemente, y las técnicas de exploración de ácido nucleico (tales como el DNA y el RNA) se han utilizado ampliamente.

30 Las técnicas de exploración de ácido nucleico se han utilizado ampliamente, por ejemplo, en: campos biológicos (identificación de especies, estudios de los orígenes de las mismas o similares); campos médicos (diagnóstico de enfermedades, o similares); y otros campos cercanos a la vida cotidiana (confirmación de la seguridad de los alimentos, u otros similares).

35 El ácido nucleico objetivo puede incluir, por ejemplo, secuencias de genes específicos de genes extraños que no existen en un propietario de la muestra y otras secuencias de bases específicas. La "exploración genética" es una técnica que amplifica y analiza el ácido nucleico objetivo mediante un método de PCR y / o un método de amplificación isotérmica del ácido nucleico entre las técnicas de análisis de ácido nucleico.

40 Mientras que las pruebas de cultivo y los exámenes inmunológicos de las inspecciones por medio de antígenos y / o anticuerpos pertenecen a técnicas convencionales de diagnóstico de enfermedades infecciosas.

45 En el diagnóstico de enfermedades en los campos médicos, en particular en el diagnóstico temprano de enfermedades infecciosas, la exploración genética tiene una sensibilidad más alta que las técnicas de diagnóstico de enfermedades infecciosas convencionales o similares.

La utilización de la exploración genética permite detectar y / o identificar casi todos los microorganismos patógenos, entre ellos: bacterias; hongos protozoos; y virus, que pueden ser responsables de causar enfermedades infecciosas en los seres humanos.

50 En consecuencia, la exploración genética se considera un método de inspección útil para el diagnóstico temprano de las enfermedades infecciosas, y se ha utilizado con frecuencia en instalaciones con salas de inspección exclusivas y / o laboratorios, hospitales grandes (por ejemplo, hospitales de base), laboratorios de salud, establecimientos de investigación (por ejemplo, universidades y empresas), otras instituciones con muchos empleados, o similares.

55 En el documento "2012 - Mercado número 3 - Examen - Clínico / bacterias / genes / POC / biopsia", la Fuji Keizai Co., LTD. ha señalado "Se espera que el mercado de la exploración genética se expanda en una proporción anual del 2 al 3% también después de 2013". Se espera que el mercado de la exploración genética incremente su importancia con respecto no solo al diagnóstico temprano de enfermedades infecciosas sino también a las actividades económicas.

60 Sin embargo, la exploración genética apenas se utiliza en instalaciones médicas pequeñas a menudo visitadas por personas comunes (por ejemplo, hospitales privados y / o clínicas urbanas).

La razón para ello es como sigue.

5 En primer lugar, la exploración genética requiere una operación complicada y que precisa mucho tiempo antes de realizar la misma, tal como la preparación de reactivos, la extracción de ácido nucleico o similares, lo que impone una pesada carga en las instalaciones médicas pequeñas.

10 En segundo lugar, realizar la exploración genética también requiere equipos físicos y químicos y equipos de automatización. Los equipos físicos y químicos incluyen una máquina centrífuga y una micro - pipeta para extraer el ácido nucleico. Por lo tanto, los costos iniciales de inversión así como los costos de mantenimiento tienen que ser más altos.

En tercer lugar, no se puede decir que los médicos, enfermeras o personas similares en las pequeñas instalaciones médicas estén totalmente familiarizados con la exploración genética.

15 Mientras tanto, los kits de prueba no relacionados con la exploración genética pero que corresponden a la POCT (por ejemplo, los kits de acuerdo con un método de anticuerpos etiquetado, un método inmunturbidimétrico, un método de aglutinación de látex, un método de inmunocromatografía u otros similares) también se usan ampliamente en las instalaciones médicas pequeñas.

20 De acuerdo con el sumario anunciado por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar Social de Japón en diciembre de 2009, la producción real enviada de kits de examen rápido contra el antígeno de la influenza en la temporada anterior ha alcanzado aproximadamente 13 millones de pruebas.

25 La exploración genética que usa ácido nucleico objetivo tiene más sensibilidad que un examen inmunológico y es muy efectiva en el diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas tempranas.

Desafortunadamente, en la actualidad no existe un kit de POCT aplicable para la exploración genética ni otro kit conforme con la misma.

30 Por esta razón, en las instalaciones médicas pequeñas, no se puede realizar la exploración genética. Alternativamente, las muestras se recogen para ser inspeccionadas por una de las instalaciones externas. Por lo tanto, los resultados de la exploración genética no se pueden obtener rápidamente.

35 Si se desarrollan kits de las POCT aplicables para la exploración genética y un método para las mismas, también en las instalaciones médicas pequeñas, se puede realizar la exploración genética, obteniendo de esta manera una utilidad extremadamente alta.

40 En la presente memoria descriptiva, el presente método de exploración genética se puede dividir aproximadamente en los tres procesos que siguen.

45 Un primer proceso (pretratamiento) realiza: después de haber recogido una muestra, exponer el ácido nucleico conjugado por las vainas y / o las membranas de la proteína en la muestra de la misma; y lavar y separar contaminantes, tales como proteínas, por medio de un disolvente orgánico, un portador en fase sólida o similar para aislar el ácido nucleico solamente.

Un segundo proceso (amplificación del ácido nucleico objetivo) realiza: utilizar un modelo del ácido nucleico separado; y amplificar el ácido nucleico objetivo de acuerdo con un método de reacción de amplificación de ácido nucleico, tal como el PCR, reacción de LAMP, o similares.

50 Un tercer proceso (detección y exploración) realiza: durante y / o después de la reacción de amplificación, utilizar el ácido nucleico objetivo amplificado y / o los marcadores que conjugan con el mismo para llevar a cabo un paso cualitativo y / o un paso cuantitativo relacionado con el mismo.

55 Hay equipos de automatización para realizar fácilmente el primer proceso.

Sin embargo, los equipos de automatización para el primer proceso son demasiado caros y, en la actualidad, apenas se han extendido.

60 Prácticamente en muchos casos, el pretratamiento tiende a realizarse por medio de un método manual que puede ser realizado más barato que los equipos de automatización.

Sin embargo, puesto que el método manual requiere un dominio de las técnicas, tales como la forma de manejar los equipos (por ejemplo, una máquina centrífuga y / o una micro - pipeta), la muestra, o similar, la carga operativa sobre el operador debe ser pesada.

No se conoce ni un método ni un kit que pueda simplificar el método manual para ser utilizado en el modo de POCT.

5 En cuanto a un método representativo de extracción en fase sólida utilizado en los equipos de automatización, hay un método que se describe por Boom et al (en la presente memoria descriptiva y en lo que sigue, denominado "método BOOM". Ver la Referencia 1 y la Referencia 5).

10 El método BOOM es el método de extracción en fase sólida para aislar ácido nucleico de una muestra biológica de acuerdo con un principio basado en los efectos caotrópicos (ver Referencia 6) causados por un fenómeno en el que el ácido nucleico absorbe perlas de sílice en presencia de un agente caotrópico.

15 De acuerdo con el método BOOM, sin hacer una elución del ácido nucleico a partir de un portador en fase sólida, el ácido nucleico se puede añadir a la solución de PCR junto con el portador en fase sólida (ver Referencia 2), y una parte del proceso de elución también se puede simplificar. Sin embargo, el método BOOM supone que se ha preparado el entorno para realizar la extracción de ácido nucleico, tal como una sala de inspección.

20 La referencia 3 menciona lo que sigue. A saber, *"Un objeto de acuerdo con la presente invención es proporcionar un método de extraer ácido ribonucleico del material biológico, sin usar disolvente orgánico, simplemente, en un corto espacio de tiempo, de manera más segura, y con alta reproducibilidad; y un reactivo para el método. A diferencia del ácido desoxirribonucleico, después de lavar con una solución tampón de baja concentración salina que no contiene un solvente orgánico (por ejemplo, etanol o similar) después de haber hecho que el ácido ribonucleico absorba un portador en fase sólida, el ácido ribonucleico apenas se eluye del portador en fase sólida. Sin embargo, una vez bien calentado, se promueve que el ácido ribonucleico se eluya de allí. Un segundo proceso en la presente invención es un proceso de lavado de un portador en fase sólida en el que el ácido ribonucleico se ha absorbido debido a un primer proceso de absorción por medio de un líquido de lavado compuesto por una solución tampón de baja concentración de sal para eliminar el material caotrópico, o similar, de allí. En la presente memoria descriptiva, el <líquido de lavado compuesto por la solución tampón de baja concentración de sal> significa una solución tampón que no contiene un solvente orgánico (por ejemplo, etanol o similar) ni material caotrópico. Es preferible que la solución tampón sea la solución tampón del sistema Tris. Sin embargo, la presente invención nunca está limitada a la solución tampón del sistema Tris. La <concentración de sal baja> significa un nivel de concentración de sal que no afecte a la reacción de la enzima (por ejemplo, RT - PCR, o similar) incluso cuando esta solución tampón permanece en el tercer proceso de elución, y también incluye agua únicamente por sí misma. Preferiblemente en la presente invención, se pueden usar 100 o menos [mM] de solución tampón. Esta solución puede contener un agente tensioactivo y su pH no está limitado en particular. En la presente invención, es necesario promover la elución por calentamiento. La temperatura de calentamiento no está limitada en particular, siempre y cuando la dosis no cause efectos adversos en el ácido ribonucleico, pero puede ser preferiblemente de 50 a 70 [grados centígrados]. El tiempo de calentamiento es de aproximadamente 30 [s] a 10 [min]. El ácido ribonucleico eluido de esta manera se puede usar directamente para la reacción enzimática por medio de transcriptasa inversa u otros productos similares sin realizar: diálisis; desalinización (por ejemplo, de acuerdo con un método de precipitación con etanol, o similar); u operación de concentración (omitido parcialmente)".*

30

35

40

45 La referencia 4 menciona: *"Sin embargo, los presentes inventores han encontrado que, en el proceso de elución (3), producir el ácido nucleico eluido con agua y/o una solución de baja concentración de sal a 80 o más [grados centígrados] permite extraer DNA, completando de esta manera la presente invención".*

50 Los métodos que se mencionan en estas Referencias tienen las desventajas que siguen y son difíciles de convertir al modo de POCT.

55 En primer lugar, requieren una operación complicada con alta dificultad, ya que se deben recoger y añadir de unos pocos a algunos cientos [µl] de solución, se debe prevenir la contaminación de acuerdo con la operación precisa de las pipetas y se debe tratar el reactivo peligroso.

En segundo lugar, también se requiere: lavar el objetivo varias veces con un líquido de lavado que contenga sal y / o disolvente orgánico; y eliminar de forma segura el disolvente orgánico de acuerdo con el proceso de secado del mismo.

60 Además, se requiere: realizar el proceso de secado mientras se cuida la fijación entre el ácido nucleico y el portador de adsorción causado por un secado excesivo. En consecuencia, se precisa mucho tiempo y un gran esfuerzo.

En tercer lugar, los costos iniciales para preparar el entorno de operación deben ser altos, ya que requieren: operación con la máquina centrífuga y la micro - pipeta; y un sitio de instalación y / o un espacio de trabajo para los equipos usados.

- 5 Referencia 1: Patente japonesa registrada número 2680462
Referencia 2: Solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público número 10 - 72485
Referencia 3: Patente japonesa registrada número 3812696
Referencia 4: Solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público número 2014 - 30364
10 Referencia 5: R Boom et al, J. Clinic Microbiol, 28 (3), 495 - 503 (1990)
Referencia 6: B Vogelstein y D Gillespie, PNAS, 76 (2), 615 - 619 (1979)

OBJETOS Y RESUMEN DE LA INVENCION

15 En vista de los antecedentes que se han indicado más arriba, un objeto de acuerdo con la presente invención es proporcionar un método capaz de realizar un proceso de pretratamiento de exploración genética de acuerdo con un modo de POCT.

20 Un primer aspecto de la presente invención proporciona: un método de pretratamiento, que comprende: hacer que una muestra, líquido de extracción para extraer el ácido nucleico contenido en la muestra, partículas de sílice y un material filtrante se encuentren en contacto unos con los otros; haciendo que el material filtrante mantenga el material compuesto del ácido nucleico y las partículas de sílice sobre el mismo; y a continuación proporcionar el material filtrante a un proceso de amplificación de ácido nucleico por medio de una solución de reacción para amplificar el ácido nucleico, en el que se establecen los diámetros de partículas de las partículas de sílice y la concentración de las partículas de sílice en la solución de reacción para amplificar el ácido nucleico dentro de un rango predeterminado, permitiendo de ese modo, antes del proceso de amplificación del ácido nucleico, omitir tanto un proceso de secado como un proceso de elución.

30 El método de pretratamiento que se ha definido más arriba en el que el rango predeterminado se define de la siguiente manera: la concentración de las partículas de sílice es de 0,0625 a 4 [$\mu\text{g} / \mu\text{l}$]; el diámetro promedio de partícula de las partículas de sílice es de 0,01 a 100 [μm]; y un área superficial calculada en base al diámetro de partícula promedio es de 1×10^4 a 1×10^8 [μm^2].

35 Un segundo aspecto de la presente invención proporciona: además del primer aspecto, el método de pretratamiento en el que el rango predeterminado se define de la siguiente manera: la concentración de las partículas de sílice es de 0,0625 a 1 [$\mu\text{g} / \mu\text{l}$]; el diámetro de partícula promedio de las partículas de sílice es de 0,01 a 10 [μm]; y un área superficial calculada en base al diámetro de partícula promedio es de 1×10^5 a 5×10^7 [μm^2].

40 Un tercer aspecto de la presente invención proporciona: además del primer aspecto, el método de pretratamiento comprende adicionalmente: un primer proceso de extracción de añadir la muestra al líquido de extracción para extraer el ácido nucleico contenido en la muestra; un primer proceso de absorción de: hacer que las partículas de sílice entren en contacto con el ácido nucleico extraído para obtener el material compuesto del ácido nucleico y las partículas de sílice; y hacer que el material compuesto entre en contacto con el material filtrante; y un primer proceso de lavado de: lavar el material compuesto y el material filtrante con agua purificada; y entregar el material compuesto lavado y el material filtrado lavado al proceso de amplificación de ácido nucleico.

50 Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona: además del primer aspecto, el método de pretratamiento en el que, antes de entregar el material filtrante al proceso de amplificación de ácido nucleico, el material compuesto se separa del material filtrante y a continuación el material compuesto separado se entrega al proceso de amplificación de ácido nucleico.

55 Un quinto aspecto de la presente invención proporciona: además del tercer aspecto, el método de pretratamiento en el que el primer proceso de absorción y el primer proceso de lavado se realizan al mismo tiempo.

Un sexto aspecto de la presente invención proporciona: además del tercer aspecto, el método de pretratamiento en el que el primer proceso de extracción y el primer proceso de absorción se realizan al mismo tiempo.

60 Un séptimo aspecto de la presente invención proporciona: además del tercer aspecto, el método de pretratamiento en el que el primer proceso de extracción, el primer proceso de absorción y el primer proceso de lavado se realizan al mismo tiempo.

5 Un octavo aspecto de la presente invención proporciona: además del primer aspecto, el método de pretratamiento comprende adicionalmente: un segundo proceso de extracción para añadir la muestra al líquido de extracción para extraer el ácido nucleico contenido en la muestra; un segundo proceso de absorción de: hacer que el ácido nucleico extraído entre en contacto con el material de filtración que mantiene las partículas de sílice sobre el mismo para obtener el material compuesto del ácido nucleico y de las partículas de sílice; y hacer que el material filtrante mantenga el material compuesto obtenido sobre el mismo; y un segundo proceso de lavado de: lavar el material compuesto mantenido y el material de filtración con agua purificada; y entregar el material compuesto lavado y el material filtrado lavado al proceso de amplificación de ácido nucleico.

10 Un noveno aspecto de la presente invención proporciona: además del octavo aspecto, el método de pretratamiento en el que, antes de entregar el material filtrante al proceso de amplificación de ácido nucleico, el material compuesto se separa del material filtrante y a continuación el material compuesto separado se entrega al proceso de amplificación de ácido nucleico.

15 Un décimo aspecto de la presente invención proporciona: además del octavo aspecto, el método de pretratamiento en el que el segundo proceso de absorción y el segundo proceso de lavado se realizan al mismo tiempo.

[Efecto de la Invención]

20 Con los métodos de acuerdo con la presente invención, se pueden obtener los siguientes efectos.

En primer lugar, el proceso de extracción de ácido nucleico en la exploración genética puede ser simple, fácil, seguro, rápido y menos costoso, y puede realizar el proceso de acuerdo con el modo de POCT.

25 En segundo lugar, la combinación de una operación segura, simple y fácil permite acortar notablemente el tiempo de operación en comparación con los métodos convencionales, y además la extracción de ácido nucleico se puede realizar a un bajo costo.

30 Esto se debe a que el agua purificada se utiliza como líquido de lavado. Por consiguiente, no es necesario preparar una pluralidad de tipos de disolventes orgánicos. Tampoco es necesario utilizar la pluralidad de tipos de disolventes orgánicos mientras se distingue unos de los otros. Además, el solvente orgánico en sí mismo es innecesario, y la operación es fácil y segura.

35 En tercer lugar, puesto que el propio disolvente orgánico es innecesario, pueden omitirse tanto la operación de secado sobre el portador en fase sólida como el proceso de elución del ácido nucleico.

En resumen, inmediatamente después del proceso de lavado, el objetivo se puede administrar a la reacción de amplificación del ácido nucleico.

40 Además, puesto que el tiempo de transferencia de la solución se puede reducir notablemente, también se pueden reducir los riesgos ambientales, tales como salpicaduras de ácido nucleico y / o contaminación cruzada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 La figura 1 es un gráfico que muestra un rango predeterminado de acuerdo con la presente invención; la figura 2 muestra procesos de un método de pretratamiento en la realización 1 de acuerdo con la presente invención; la figura 3 muestra procesos de un método de pretratamiento en la realización 2 de acuerdo con la presente invención;

50 la figura 4 muestra procesos de un método de pretratamiento en la realización 3 de acuerdo con la presente invención; la figura 5 muestra procesos de un método de pretratamiento en la realización 4 de acuerdo con la presente invención; la figura 6 muestra procesos de un método de pretratamiento en la realización 5 de acuerdo con la presente invención; y

55 la figura 7 muestra procesos de un método de pretratamiento en la realización 6 de acuerdo con la presente invención.

[Breve descripción de los símbolos]

60 2: Porción de embudo
3: Material filtrante
4: Primer material de absorción de agua.
5: Segundo material de absorción de agua.
6: Miembro de ajuste

- 7: Alojamiento
- 10: Tubo
- 11: Líquido de extracción
- 12: Muestra
- 5 13: Ácido nucleico
- 14: Partícula de sílice
- 15: Material compuesto
- 16: Agua purificada

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

(Principales puntos de la invención)

En primer lugar, antes de la descripción concreta de las realizaciones, a continuación se describirán los puntos principales de la presente invención.

15 Con el fin de resolver los problemas que se han mencionado más arriba, los presentes inventores se han separado de un "método de recogida tanta como sea posible de ácido nucleico de una muestra que se utiliza para extraer ácido nucleico", que a menudo se ve en los métodos convencionales, y han estudiado afanosamente cómo resolver los problemas enfocándose en cómo asegurar una cantidad mínima necesaria de ácido nucleico en una prueba para la reacción de amplificación de ácido nucleico.

20 Como resultado de la consideración anterior, los presentes inventores han encontrado el método de pretratamiento de ácido nucleico que sigue para completar la presente invención, resolviendo así los problemas que se han mencionado más arriba.

25 Es decir, el método de pretratamiento incluye:

30 un primer paso (a) (en la presente memoria descriptiva y en lo que sigue, denominado "proceso de extracción") de extracción de ácido nucleico de una muestra con medios que los expertos en la técnica puede idear, entre ellos: un agente caotrópico; sal; ácido; álcali; un agente tensioactivo; disolvente orgánico; enzima; prensa francesa; calentamiento y una onda ultrasónica;

35 un segundo paso (b) (en la presente memoria descriptiva y en lo que sigue, denominado "proceso de absorción") de hacer, después del paso (a), que un portador en fase sólida absorba el ácido nucleico extraído;

un tercer paso (c) (en la presente memoria descriptiva y en lo que sigue, denominado "proceso de lavado") de lavado y eliminación del contaminante absorbido en el portador en fase sólida con agua purificada; y

un cuarto paso (d) de añadir, inmediatamente después del proceso de lavado, el ácido nucleico junto con el portador en fase sólida, a la solución de reacción. De esta manera, la reacción de amplificación de ácido nucleico se puede realizar sin ningún problema.

40 Además, los presentes inventores, al aplicar el método de pretratamiento inventado, han encontrado que la utilización de una combinación de: un dispositivo de filtro que incluye el material de filtración y el material de absorción de agua en el mismo; y un portador en fase sólida, permite realizar la extracción de ácido nucleico incluso en un lugar en el que se realizan pruebas en la POCT.

45 En conclusión, los presentes inventores han logrado un kit de extracción de ácido nucleico aplicable para el método que incluye: el proceso de lavado con agua purificada; y el proceso anterior de añadir el ácido nucleico junto con el material filtrante en la solución de reacción.

(Realizaciones de la presente invención)

50 En la presente memoria descriptiva y en lo que sigue, antes de mostrar una consideración detallada, se describirá a continuación la conclusión de la presente invención.

El método de pretratamiento de acuerdo con la presente invención permite llevar a cabo la reacción de amplificación de ácido nucleico inmediatamente después del proceso de lavado.

55 Como un método de separación del líquido, tal como el líquido de lavado, del portador en fase sólida en el que se ha absorbido el ácido nucleico, se puede usar un método de separación por medio de separación por centrifugación y / o una columna centrífuga, un método de separación por filtración u otros similares..

60 Con el uso de partículas de sílice que contienen material magnético, por supuesto también puede ser posible un método de separación que use fuerza magnética.

En la presente invención, el portador en fase sólida puede estar compuesto de partículas de sílice.

De acuerdo con la presente invención, las partículas de ácido nucleico y de sílice (en la presente memoria descriptiva y en lo que sigue, "material compuesto de ácido nucleico + partículas de sílice") que se han absorbido unos con las otras en el proceso de absorción, se pueden poner en contacto con la solución de reactivo de reacción de amplificación de ácido nucleico inmediatamente después del proceso de lavado para iniciar la reacción de amplificación de ácido nucleico.

La figura 1 es un gráfico que muestra un rango predeterminado de acuerdo con la presente invención.

Para indicar en primer lugar las conclusiones, es preferible que existan partículas de sílice en la solución de reacción para amplificar el ácido nucleico dentro de un rango incluido con líneas de puntos en la figura 1,

En la figura 1, un eje horizontal de la misma muestra la concentración de partículas de sílice en la solución de reacción para amplificar el ácido nucleico, y un eje vertical de la misma indica un diámetro de partícula promedio de las partículas de sílice, respectivamente.

Más concretamente, un rango predeterminado preferible (un rango encerrado con líneas de puntos en la figura 1) es como sigue: la concentración de las partículas de sílice es de 0,0625 a 4 [$\mu\text{g} / \mu\text{l}$]; el diámetro promedio de partícula de las partículas de sílice es de 0,01 a 100 [μm]; y un área superficial calculada en base al diámetro de partícula promedio es de 1×10^4 a 1×10^8 [μm^2].

Un rango predeterminado adicional preferible (otro rango encerrado con líneas continuas en la figura 1) es el siguiente: la concentración de las partículas de sílice es de 0,0625 a 1 [$\mu\text{g} / \mu\text{l}$]; el diámetro promedio de partícula de las partículas de sílice es de 0,01 a 10 [μm]; y el área superficial calculada en base al diámetro de partícula promedio es de 1×10^5 a 5×10^7 [μm^2].

Es suficiente que la muestra en la presente invención sea un material que pueda contener ácido nucleico, por ejemplo, que pueda ser una muestra de espécimen extraída cuando se realiza el diagnóstico de una enfermedad infecciosa.

La muestra de espécimen con respecto a la enfermedad infecciosa puede ser una de las muestras extraídas cuando se sospecha de una enfermedad infecciosa, que incluye: líquido de limpieza de la faringe; líquido de limpieza de la cavidad nasal; material urológico (diversos tipos de muestras de orina); material reproductivo; heces; sangre; o similar.

El ácido nucleico puede incluir ácido nucleico derivado de microorganismos patógenos que la persona experta en la técnica puede idear como un modelo para la reacción de amplificación de ácido nucleico, tal como el DNA (dsDNA, ssDNA) y el RNA (dsRNA, ssRNA); y ácido nucleico endógeno derivado de microorganismos que producen la muestra de espécimen.

Además, las muestras con respecto al ácido nucleico también pueden incluir no solo las muestras de especímenes extraídas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, sino también muestras que pueden contener ácido nucleico recogidos en otros lugares.

Por ejemplo, es posible utilizar las muestras para la evaluación de alimentos (detección de bacterias causantes de intoxicación alimentaria, genes recombinantes o similares), inspección de enfermedades infecciosas de productos agrícolas, inspección de calidad del agua del agua potable, inspección de calidad del agua en fábricas, u otros similares.

Sin embargo, los anteriores son meros ejemplos, y la presente invención no se limita a ellos.

Se supone que una muestra de ácido nucleico de la presente invención trata 1 o menos [μg] de cantidad de ácido nucleico, y se supone que de 1 [ag] a 100 [ng], preferiblemente una cantidad de alrededor de 1 [pg] a 10 [ng] de ácido nucleico se administra a la solución de reacción para amplificar el ácido nucleico.

En la presente invención, el proceso de extracción se realiza como sigue:

obtener una solución que contiene ácido nucleico de acuerdo con un método de extracción de ácido nucleico usando un agente caotrópico, sal, ácido, álcali, un agente tensioactivo, disolvente orgánico, enzima, prensa francesa, calentamiento, una onda ultrasónica, o similares; y añadir partículas de sílice en la solución que contiene ácido nucleico obtenida, directamente, después de haber diluido la misma, o después de haber reemplazado la misma.

En el pretratamiento, el proceso de absorción y el proceso de extracción también se pueden llevar a cabo al mismo tiempo.

En la presente invención, el fluido de lavado usado para el proceso de lavado puede ser agua purificada.

5 El agua purificada puede ser agua purificada por uno de varios métodos, e incluye agua aplicable a la preparación de reactivos que los expertos en la técnica puede idear normalmente al realizar la reacción de amplificación de ácido nucleico.

10 El agua purificada es agua que no contiene ni solvente orgánico ni material de inhibición de la reacción de amplificación de ácido nucleico, tal como sal a elevada concentración.

En la presente invención, el proceso de lavado se mantiene a cabo lavando el objetivo con una cantidad adecuada de agua purificada después del proceso de absorción.

15 La cantidad de veces que se debe realizar el proceso de lavado no está limitada, y se puede realizar normalmente una vez o varias veces.

Inmediatamente después del proceso de lavado, el material compuesto de partículas de ácido nucleico + sílice se agrega a la solución de reactivo de reacción de amplificación de ácido nucleico.

20 Sin embargo, el proceso de lavado se puede omitir en el caso de que el agua purificada se use como solvente en el proceso de absorción, o en otro caso en el que la solución que contiene ácido nucleico obtenida después del proceso de absorción se diluya o se reemplace con agua purificada.

25 En la presente invención, el material filtrante para la separación por filtrado puede tener un tamaño de poro que absorba menos ácido nucleico y además pueda filtrar las partículas de sílice anteriores entre las seleccionadas normalmente por los expertos en la técnica, tal como un filtro de membrana, o dispositivo similar.

30 Por ejemplo, se puede aducir una película, un filtro de membrana, un producto textil, una tela no tejida o similar, cada uno de los cuales está hecho de ácido poliláctico, celulosa, PTFE o similares.

Una forma del material filtrante no se limita a una película, puede ser cualquiera aplicable para filtrar, por ejemplo, una bolsa, un tubo, o similar.

35 Por ejemplo, es preferible el filtro de membrana "Omnipore (marca registrada)" (JCWP) producido por la corporación Merck "Japan Millipore" o similar.

40 En la presente invención, puesto que la separación por filtración utiliza el dispositivo de filtración que incluye el material de absorción de agua en su interior, se puede realizar la extracción de ácido nucleico en el modo de POCT.

Con respecto al dispositivo de filtración que incluye el material de absorción de agua en su interior, la solución, tal como el líquido de lavado, fluye en una dirección unidireccional, y el material de absorción de agua provisto con su interior absorbe la solución usada con el fin de evitar salpicaduras del líquido al exterior del mismo.

45 La presente invención se mantiene a cabo de acuerdo con una técnica estándar para los expertos en la técnica con respecto a puntos sin explicación especial en las realizaciones y ejemplos.

50 Por ejemplo, la presente invención está configurada con referencia a los métodos que se describen en las publicaciones "Clonación molecular UN LABORATORIO MANUAL CUARTA EDICIÓN (Green y Sambrook, Prensa del Laboratorio de Cold Spring Harbor)", "Series ilustradas del bio - experimento de volumen separado de tecnologías celulares "(Gakken Medical Shujunsha Co., Ltd.), o "Nota revisada del experimento de ingeniería genética, tercera edición "(Takaaki TAMURA / editor, volumen superior e inferior, YODOSHA CO., LTD.), o similares.

55 Además, los reactivos y dispositivos comerciales se utilizan de acuerdo con el protocolo adjunto a los mismos con respecto a los puntos, si no se explican especialmente.

60 Los ejemplos que se muestran a continuación son meras ilustraciones de una realización de la presente invención para explicar la presente invención en detalle, y la presente invención no está limitada a los mismos.

(Ejemplo 1)

<Material y método>

(Agua purificada)

Agua ultra - pura obtenida usando el "Sistema de agua ultra - pura de 5UV Direct - Q (marca registrada)" (Merck KGaA) se ha utilizado para el agua purificada en el Ejemplo 1,

5

[Tabla 1]

Núm.	Partículas de sílice (Nombre, Núm. PD, Núm. Catálogo.)	fabricante / vendedor
1	: 30925 - 12	Nacalai Tesque, INC.
2	: Microsilica (®) Grado 971	Elkem Japón Kabusiki Kaisya
3	: S1007PB	Kojundo Chemical Lab. Co., Ltd.
4	: s5631	Sigma - Aldrich Co. LLC.
5	: HS - 301	Nippon Steel & Sumikin Materials (Micron)
6	: S1014PB	Kojundo Chemical Lab. Co., Ltd.
7	: S1008PB	Kojundo Chemical Lab. Co., Ltd.
8	: NanoSilica Powder Grade 999	Elkem Japón Kabusiki Kaisya
9	: SR - NP (200p)	Mtec - chem Kabusiki Kaisya
10	: SR - NP1 (200P1)	Mtec - chem Kabusiki Kaisya
11	: TECNAPOW - SIO2 - 100G	ARBROWN Co., LTD. (TECNAN)
12	: dióxido de silicio, 99,9%	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

10 (Portador en fase sólida)

El portador en fase sólida en este Ejemplo ha sido compuesto por partículas de sílice.

La Tabla 1 muestra la información de identificación del producto (tal como el nombre de las partículas de sílice usadas, el número del producto, el número de catálogo, etc.) y la información de la compañía (fabricante y proveedor).

15

Los ítems se muestran dando los números en orden desde el mayor valor de los diámetros de partículas promedio de acuerdo con la información adjunta al catálogo y / o el producto del mismo, tal como un certificado de análisis.

20

Sin embargo, la Tabla 1 simplemente muestra las partículas de sílice utilizadas en el Ejemplo 1, y no limita las partículas de sílice en la presente invención.

(Muestra de ácido nucleico)

25 Con respecto a la muestra de ácido nucleico en este Ejemplo, se ha determinado que un objetivo de detección es un gen "p1" derivado de *Mycoplasma pneumoniae* que es una causa de la *Neumonía por micoplasma*.

La muestra de ácido nucleico se ha producido mediante la incorporación de un fragmento del gen "p1" derivado del *Mycoplasma pneumoniae* en el DNA plasmídico pUC57 utilizando un método convencional para obtener el DNA incorporado, clonándolo de esta manera.

30

La muestra de ácido nucleico producida se preparó en una concentración de 3 [pg / µl] con solución tampón TE.

35 Después de la preparación, la muestra de ácido nucleico se ha utilizado como una muestra estándar para generar una curva de calibración al realizar una PCR cuantitativa en tiempo real, o similar.

Después de haber dispensado una parte de la muestra de ácido nucleico preparada, la parte se diluyó adicionalmente con la solución tampón TE que se preparó en 3 [pg] / 50 [µl] de concentración, y se usó como material de partida al extraer el ácido nucleico.

40

ES 2 734 068 T3

(Iniciador y sonda)

Como iniciadores se han utilizado "conjuntos de iniciadores para un gen de *adhisin* "P1" incluyendo cada uno:

5 5' - GCCACCCTCGGGGGCAGTCAG - 3'; y
 5' - GAGTCGGGATTCCCCGCGGAGG - 3"

que se han descrito en el informe ("The Journal of Infectious Diseases", 1996; 173; 1445 - 52) por Leven et al.

10 Después de haber seleccionado una región específica de productos amplificados por medio de los conjuntos de iniciadores que se han mencionado más arriba, las sondas se han producido de acuerdo con un método normalmente utilizado por los expertos en la técnica.

15 La producción de la sonda se realizó solicitando una síntesis personalizada de QProbe (marca registrada) al centro J - BIO21 de NIPPON STEEL & SUMIKIN Eco - Tech Corporation.

(Preparación de otros reactivos)

En lo que se refiere a otros reactivos, se han usado reactivos comerciales para prepararse de acuerdo con un método normalmente usado por los expertos en la técnica.

20 El "tampón lisis L6" se ha utilizado para la lisis líquida al reproducir al menos una parte del método BOOM.

La "solución lisis L6" se ha preparado de acuerdo con el método que se describe en la Referencia 1,

(Reacción de amplificación de ácido nucleico y método de análisis para la misma)

25 Para la reacción de amplificación de ácido nucleico, la PCR cuantitativa en tiempo real se realizó con 20 [µl / tubo] de solución de reacción.

El nano - sistema "LightCycler (marca registrada)" (Roche Diagnostics K.K.) se ha utilizado para un instrumento.

30 El perfil de reacción se realizó, incluyendo: a 95 [grados centígrados] y 120 [s] de un programa inicial de desnaturalización; a 95 [grados centígrados] y 10 [s] de un primer programa de amplificación; a 68 [grados centígrados] y 10 [s] de un segundo programa de amplificación; y a 72 [grados centígrados] y 10 [s] de un tercer programa de amplificación. El conjunto de los programas de amplificación primero, segundo y tercero se ha repetido 40 [ciclos].

El programa de análisis de la curva de fusión se ha establecido en un rango de 68 a 95 [grados centígrados].

40 La PCR cuantitativa en tiempo real se ha llevado a cabo utilizando el método intercalador y el método de sonda.

El método intercalador se realizó utilizando el pigmento "20 x EvaGreen Dye" (marca registrada, The Biotium inc.), y el método de la sonda se realizó utilizando "QProbe" (marca registrada de NIPPON STEEL & SUMIKIN Eco - Tech Corporation).

45 Una vez completada la reacción, se confirmó si la curva de amplificación obtenida correspondía, o no, a los productos objetivo derivados del DNA bajo control, de acuerdo con los resultados del programa de análisis de la curva de fusión.

50 En el Ejemplo, la reacción de amplificación de ácido nucleico se ha llevado a cabo utilizando el método intercalador, si no se indica especialmente.

El método intercalador se ha realizado de la siguiente manera:

55 se selecciona "Cuantificación Automática", que es un software de análisis exclusivo del dispositivo; se verifica, en base a la curva de calibración, si la eficiencia de la PCR y el valor de R^2 están dentro de un rango normal de acuerdo con un método convencional; y se analiza a continuación la curva de amplificación en base a los valores de Ct y de los valores cuantitativos obtenidos.

60 Por otro lado, un método de análisis provisto con el nano sistema "LightCycler" no puede analizar un método de sonda que pertenezca a un tipo de luz que se extingue, tal como la "QProbe". Por lo tanto, con respecto a este tipo, los datos en bruto se han procesado directamente de acuerdo con los métodos que se describen en

la patente japonesa registrada número 4724380 para obtener los valores Ct y los valores cuantitativos. Después de eso, el análisis se ha realizado como se ha descrito más arriba.

5 Como datos para el análisis, se ha utilizado un promedio de una pluralidad de datos, cada uno de los cuales se ha obtenido bajo la misma condición.

En la presente memoria descriptiva y en lo que sigue, los detalles de los Ítems 1 a 5 se explicarán a continuación de manera concreta.

10 En cada uno de los siguientes Ítems, se mostrarán los temas técnicos, las contramedidas, los resultados y las consideraciones relacionadas con los mismos.

Ítem 1: Influencia práctica al cambiar el líquido de lavado a agua purificada

15 Ítem 2: Influencia en la reacción de amplificación de ácido nucleico causada por la adición de partículas de sílice

Ítem 3: Influencia en la reacción de amplificación de ácido nucleico cuando cambia la cantidad de partículas de sílice agregadas

Ítem 4: Influencia en la capacidad de absorción y reacción de amplificación de ácido nucleico causada por la cantidad de partículas de sílice utilizadas

20 Ítem 5: Influencia causada por el agente caotrópico en el proceso de absorción y operación con un dispositivo de filtración simple

(Ítem 1)

25 En el ítem 1, se ha examinado si es posible o no cambiar todos los "L2", "etanol al 70%" y "acetona" en agua purificada. En la presente memoria descriptiva, el "L2", el "70% de etanol" y la "acetona" se utilizan como líquido de lavado en el proceso de lavado en proporción con el protocolo "Y" que se menciona en la Referencia 1 (en la presente memoria descriptiva y en lo que sigue, llamado "el protocolo Y") en el método BOOM. Y también se ha examinado si se pueden realizar, o no, otras condiciones de conformidad con el protocolo Y.

30 Como "material de partida" en el protocolo Y, se ha utilizado una concentración de 3 [pg] / 50 [µl] de muestra de ácido nucleico preparada.

35 Las partículas de sílice del número 4 en la Tabla 1 se han utilizado como partículas de sílice, y se han preparado de acuerdo con la "Preparación en suspensión del material bruto de sílice (SC)" que se menciona en el "Material y Métodos" de la Referencia 1,

Después de la extracción, se dispensaron 2 [µl] del efluente obtenido para añadirse a 18 [µl] de la solución de reactivo de PCR, preparando así una cantidad total de solución de PCR de 20 [µl].

40 La PCR cuantitativa en tiempo real se ha aplicado en la solución de PCR preparada para obtener valores cuantitativos.

45 Los valores cuantitativos obtenidos se han multiplicado por 25 para obtener las cantidades de ácido nucleico recogidas por un tubo, varias veces. Y se ha calculado una media de las mismas.

Sobre la base del 100% de la cantidad de 3 [pg] de ácido nucleico contenido en el material de partida, se calculó el porcentaje de lo anterior para obtener el porcentaje de recuperación (%).

50 [Tabla 2]

	Recuperación de DNA (%)	
	Media por tubo (%)	por 10µl (%) de efluente
Ítem 1	1,99	0,40
Técnica anterior	78,59	15,72
+ referencia	100,00	20,00

La Tabla 2 muestra el porcentaje de recuperación promedio por tubo (%) y el porcentaje de recuperación (%) por 10 [µl] de efluente.

55

En la referencia positiva de la Tabla 2, se muestra un valor cuando se ha recopilado el 100% de 3 [pg] contenido en el material de partida por referencia.

5 Como ejemplo convencional (técnica anterior), se ha llevado a cabo el método BOOM de acuerdo con el protocolo Y.

Sobre la base de los valores cuantitativos obtenidos, el porcentaje de recuperación (%) se ha calculado de la misma manera que el Ítem 1.

10 La Tabla 2 muestra el porcentaje de recuperación promedio por tubo (%) y el porcentaje de recuperación (%) por 10 [µl] de efluente, junto con los resultados del Ítem 1.

15 Como se ve en la Tabla 2, cuando el líquido de lavado se cambia completamente a agua purificada, el porcentaje de recuperación de ácido nucleico cae notablemente (78,59%: el Ejemplo convencional, 1,99%: Ítem 1).

20 Se ha entendido recientemente que simplemente cambiando el líquido de lavado a agua purificada tiene el mismo significado que la operación de elución general, eliminando así incluso el ácido nucleico absorbido sobre las partículas de sílice.

Aunque no se muestran los datos, el porcentaje de recuperación tiende a disminuir en un caso en que el material de partida sea menor (por ejemplo, 3 [pg]) en comparación con otro caso en el que el material de partida es mayor (por ejemplo, manejado en una unidad [µg]).

25 Se puede suponer que se pueden añadir un máximo de 10 [µl] de efluente a la solución de PCR en el ítem 1, Incluso en este caso, se considera que 0,40% de 3 [pg], es decir, solo alrededor de 12 [fg] se puede entregar en la solución de reacción para amplificar el ácido nucleico.

30 Por otro lado, considerando de la misma manera en el Ejemplo convencional, se puede entregar un 15,72% de 3 [pg], es decir, alrededor de 470 [fg].

Como se puede ver de lo anterior, cuando el líquido de lavado en el protocolo Y del método BOOM simplemente se cambia a agua solamente, no se puede obtener una cantidad suficiente de ácido nucleico.

35 De acuerdo con lo revelado por los resultados del Ejemplo convencional en la Tabla 2, si se puede recuperar aproximadamente del 5 al 15% del material de inicio que contiene 3 [pg] de ácido nucleico, se puede obtener una cantidad suficiente que se pueda detectar en la reacción de amplificación de ácido nucleico para una prueba.

40 En la presente invención, en el caso de que se haya obtenido una baja concentración de efluente de ácido nucleico, es difícil seleccionar la operación de concentración y / o el reemplazo de la solución por medio de un método de precipitación con etanol, columnas de concentración o similares. Esto se debe a que tal selección hace que la operación sea más complicada y trabajosa.

45 Con referencia a los resultados que se han mencionado más arriba, se puede considerar que el método de simplemente cambiar el líquido de lavado en el proceso de lavado del método BOOM a agua purificada es insuficiente en el caso de que una cantidad de ácido nucleico del material de partida sea menor, y / o en otro caso en el que se ha obtenido una baja concentración de efluente de ácido nucleico.

50 Mientras que, si está disponible el lavado del objetivo con agua purificada, se pueden obtener varios tipos de ventajas.

55 De acuerdo con el método BOOM, o el similar que se ha descrito más arriba como el Ejemplo convencional, es necesaria una operación complicada y lenta. La operación necesaria puede incluir: eliminar el contaminante para obtener una solución de ácido nucleico puro; lavar el objetivo varias veces utilizando una pluralidad de tipos de líquido de lavado, y a continuación secar el objetivo lavado, eliminando así la sal utilizada para la adsorción; u otro similar.

60 Si está disponible el lavado del objetivo con agua purificada, se puede omitir casi toda la operación necesaria.

Además, el material compuesto de partículas de ácido nucleico + sílice se puede suministrar a la reacción de amplificación de ácido nucleico siguiente en condiciones húmedas. Por consiguiente, no es necesario preocuparse de que el ácido nucleico se fije demasiado fuertemente sobre las partículas de sílice debido a una condición seca.

5 Además, puesto que el ácido nucleico se puede extraer con una simple operación, se puede presentar una operación fácil también a los operadores que no están familiarizados con la operación, tal como la exploración genética. Y no es necesario preocuparse de que el ácido nucleico se fije fuertemente a las partículas de sílice en condiciones secas, las partículas pequeñas de sílice con una alta capacidad de absorción de ácido nucleico también se pueden usar de manera efectiva.

10 El uso de partículas de sílice, teniendo cada una de ellas un pequeño diámetro de partícula, permite reducir notablemente la cantidad de partículas de sílice que se utilizarán para el portador en fase sólida.

(Ítem 2)

15 En el ítem 2, se ha examinado cómo la adición de partículas de sílice afecta a la reacción de amplificación de ácido nucleico. Esto se realizó en un sistema de reacción usando 20 [μl] de cantidad total de solución de PCR cuantitativa en tiempo real, con 5 [μg / tubo] de partículas de sílice y 3 [pg / tubo] de muestra de ácido nucleico para obtener el valor Ct.

20 Para la comparación de los valores de Ct, se prepararon una referencia positiva ((0 [μg / tubo] de partículas de sílice), una muestra de ácido nucleico positiva (3 [pg / tubo])), una referencia negativa ((0 [μg / tubo] de partículas de sílice), y 0 [pg / tubo] de una muestra de ácido nucleico negativa).

25 Con respecto a la referencia positiva, con el fin de obtener el estándar de los valores de Ct, se ha calculado un primer valor promedio basado en los valores de Ct obtenidos, y el primer valor promedio se ha definido como 100%. De manera similar a lo anterior, se ha calculado un segundo valor promedio basado en los valores de Ct obtenidos en proporción con la partícula de sílice respectiva. Y a continuación, la proporción cambiante (%) de los valores de Ct se ha calculado de la siguiente manera:

dividiendo el segundo valor promedio por el primer valor promedio para obtener un cociente; y multiplicando el cociente por 100,

30 En el Ítem 2, diferente al Ítem 1, todas las partículas de sílice en venta se han utilizado tal como están, es decir, sin realizar una operación de reforma en las partículas, tal como regular los rangos de los diámetros de partículas usando partículas de sílice o modificando sus superficies.

35 La cantidad determinada de partículas de sílice para su uso se ha preparado con una preparación en suspensión de partículas de sílice en la concentración adecuada que se puede dispensar fácilmente.

(Ítem 3)

40 En el Ítem 3, de conformidad con el Ítem 2, se ha examinado la influencia en la reacción de amplificación de ácido nucleico causada por cantidades añadidas de la partícula de sílice respectiva.

Se añadieron cantidades de 10 [μg], 20 [μg] y 40 [μg] por tubo de PCR de las partículas de sílice para preparar 20 [μl] de la cantidad total de solución de PCR cuantitativa en tiempo real, y a continuación se llevó a cabo el examen.

45

[Tabla 3]

Núm.	proporción cambiante de valores Ct (%)			
	5 µg / tubo	10 µg / tubo	20 µg / tubo	40 µg / tubo
	0,25 µsol/µl ^{※1}	0,50 µsol/µl ^{※1}	1,00 µsol/µl ^{※1}	2,00 µsol/µl ^{※1}
1	101,3	100,8	100,8	100,7
2	101,2	101,0	100,8	100,9
3	101,2	100,9	99,5	102,0
4	102,6	113,3	n / a	n / a
5	102,2	102,2	102,7	105,6
6	102,1	102,5	102,3	103,5
7	101,9	107,7	116,4	155,3
8	105,2	111,3	133,6	n / a
9	106,3	119,2	154,1	n / a
10	101,3	102,1	104,2	113,5
11	110,4	147,5	n / a	n / a
12	104,3	115,6	132,4	n / a
+ ref	100,0	100,0	100,0	100,0
- ref	150,9	134,0	132,4	130,0

La tabla 3 muestra los resultados del ítem 2 y el ítem 3 juntos.

5 Con respecto al ítem 2, la comparación de las celdas de la Tabla 3 en una dirección vertical permite reconocer las diferencias causadas por la partícula de sílice respectiva usada en la misma condición de cantidad utilizada.

10 Con respecto al ítem 3, la comparación de las celdas de la Tabla 3 en una dirección horizontal permite reconocer la influencia en la PCR cuantitativa en tiempo real cuando cambia la cantidad de partículas de sílice existentes en la solución de la PCR cuantitativa en tiempo real.

15 En la Tabla 3, un símbolo de "n/a" significa que no existen datos, y otro símbolo de "※1" significa una cantidad ([µg]) de partículas de sílice por 1 [µl] de solución de PCR cuantitativa en tiempo real, respectivamente.

20 Los resultados del ítem 2 (5 [µg / tubo]) revelan que, incluso cuando 0,25 [µg] de partículas de sílice están contenidas en una unidad de 1 [µl] de la solución de PCR cuantitativa en tiempo real, hay un caso con influencia grave (la proporción de cambio de los valores de Ct supera el 10%) en la PCR cuantitativa en tiempo real.

Hay algunas condiciones utilizadas que se pueden estimar casi dentro de la dispersión de los valores de Ct (por ejemplo, 2% o menos de la proporción de cambio de los valores de Ct) entre todas las condiciones utilizadas.

25 Los presentes inventores, haciendo referencia a los resultados, han iniciado estudios del ítem 3.

En el ítem 3, en respuesta a los resultados del ítem 2, se realizó una comparación mientras se cambiaban las cantidades usadas de partículas de sílice.

30 Los resultados del ítem 3 revelan lo siguiente. Es decir, cuanto más pequeños sean los diámetros de partícula promedio con mayor capacidad de absorción de ácido nucleico, mayor será la proporción cambiante de los

valores de Ct, a medida que aumentan las cantidades utilizadas. En otras palabras, cuanto mayores sean los diámetros de partícula promedio, se tiende a observar menos el cambio.

5 En el caso de la "preparación en suspensión de sílice en bruto (SC) para reproducir el protocolo Y en el método BOOM, la cantidad de partículas de sílice usadas en el Ejemplo convencional del Ítem 1 corresponde a aproximadamente de 30% a 50% de la preparación de la suspensión de partículas de sílice.

10 Por consiguiente, se estima que la cantidad de partículas de sílice existentes en un tubo, al realizar la extracción, es de aproximadamente 12 a 20 [mg].

Incluso si se toma en consideración la diferencia con respecto a las partículas de sílice usadas para estimar el volumen necesario de partículas de sílice que se usará tan poco como sea posible, se considera que se requiere aproximadamente uno o más [mg] de partículas de sílice para reproducir el método BOOM..

15 En la Referencia 2, después de haber aplicado un portador en fase sólida absorbido por ácido nucleico en la preparación de la suspensión, se agrega directamente una cantidad de 2/5 de la misma, y a continuación se mantiene a cabo la PCR.

20 En ese momento, en cuanto a las partículas de sílice existentes en la solución de PCR, existen aproximadamente al menos 200 [µg] de partículas de sílice en los 50 [µl] de la solución de PCR (es decir, 4,00 [µg / µl]) de acuerdo con el método BOOM.

25 Mientras que en el Ítem 2 y el Ítem 3 existen como máximo 40 [µg] de partículas de sílice en los 20 [µl] de la solución de PCR cuantitativa en tiempo real (es decir, 2,00 [µg / µl]).

30 Con referencia a los resultados del Ítem 2 y del Ítem 3, los siguientes puntos se consideran de acuerdo con el método BOOM. Puesto que que la cantidad de partículas de sílice usadas es excesiva, se considera que la reacción de amplificación de ácido nucleico tiene la posibilidad de ser fuertemente inhibida cuando se han entregado todos los portadores en fase sólida usados a la siguiente operación.

35 El método BOOM asume la gran cantidad de portadores en fase sólida, y puede ser derrochador en el manejo del material de inicio que contiene uno o menos [µg] de ácido nucleico. Esto se debe a que el método requiere ya sea eluir el ácido nucleico o dispensar, sin eluir el mismo, una parte de los portadores en fase sólida para preparar la cantidad de partículas de sílice utilizadas.

La operación de dispensación es esencial y complicada. El método obliga a la operación difícil incluso en operadores que no están familiarizados con el manejo del ácido nucleico (por ejemplo, la extracción del ácido nucleico).

40 Se considera que el método BOOM no está disponible en casos que incluyen : un primer caso en el que una muestra que contiene de 1 [ag] a 500 [ng] de ácido nucleico (por ejemplo, diagnóstico rápido de enfermedad infecciosa); un segundo caso en el que se requiere una operación simple y rápida; y un tercer caso en el que se necesita una operación simple y sencilla.

45 Haciendo referencia a los resultados del Ítem 2 y del Ítem 3, se considera lo siguiente. Es decir, la extracción del ácido nucleico se puede realizar rápidamente solo con una operación simple y sencilla si una condición:

50 en la que se ajusta una cantidad de partículas de sílice para asegurar una cantidad necesaria del ácido nucleico; y además, en la que un rango usado está limitado de modo que se cumple la reacción de amplificación de ácido nucleico que nunca o difícilmente está inhibida.

(Ítem 4)

55 En el ítem 4, las partículas de sílice ilustradas a continuación serán examinadas para determinar si se pueden usar en la práctica para el pretratamiento.

Procesos hasta que el proceso de lavado se haya llevado a cabo de acuerdo con el punto 1,

60 La suspensión de sílice se ha ajustado de modo que, en 40 [µl] del agua purificada, 1,25 [µg], 2,5 [µg], 5 [µg], 10 [µg], 20 [µg], 40 [µg] y 80 [µg] de partículas de sílice han sido contenidas, respectivamente.

Inmediatamente después del proceso de lavado, el material compuesto de partículas de ácido nucleico + sílice se suspendió en 5 [µl] de agua purificada para obtener una preparación de suspensión que contiene el material compuesto de partículas de ácido nucleico + sílice.

ES 2 734 068 T3

Toda la preparación de suspensión de material compuesto de ácido nucleico + sílice se ha añadido a 15 [µl] de reactivo de PCR cuantitativo en tiempo real para realizar la PCR cuantitativa en tiempo real.

- 5 Después de haber completado la reacción, como valores cuantitativos de partículas de sílice bajo la condición de cantidad utilizada respectiva, se calcularon los promedios relacionados con las mismas.

Como otro valor cuantitativo con respecto a los promedios obtenidos, los porcentajes de recuperación se han calculado al definir un promedio de los valores cuantitativos calculados directamente con base en el material de partida como 100%.

10

[Tabla 4]

Núm	Diam, medio (µm) ^{**2}	porcentaje de recuperación después del pretratamiento						
		1,25 µg /tubo	2,5 µg /tubo	5µg /tubo	10µg //tubo	20µg /tubo	40µg //tubo	80µg //tubo
		0,0625 (µm) ^{**1}	0,125 (µm) ^{**1}	0,25 (µm) ^{**1}	0,50 (µm) ^{**1}	1,00 (µm) ^{**1}	2,00 (µm) ^{**1}	4,00 (µm) ^{**1}
1	74,000	n / a	n / a	-	-	-	-	-
3	5,266	n / a	n / a	+	-	++	+	-
4	3,450	+	n / a	++	+	-	-	n / a
5	2,550	n / a	+	+++	++	+++	+	-
6	1,900	n / a	+	++	++	+++	++	+
7	0,670	-	n / a	++	+	+	-	n / a
8	0,400	-	-	+	+	-	-	n / a
9	0,286	++	+++	++	+	-	-	n / a
10	0,229	++	n / a	++	-	-	-	n / a
11	0,014	+++	+	++	-	-	-	n / a
12	0,012	++	n / a	+	-	-	-	n / a
+++	: 20% o más							
++	: 10%~20%							
+	: 5%~10%							
-	: 5% o menos							

- 15 Los porcentajes de recuperación se han evaluado de acuerdo con el criterio de que los objetos, que tienen un 5% o más de porcentaje de recuperación, se han considerado como objetos a evaluar y se han registrado en la Tabla 4 junto con el criterio.

20 En la Tabla 4, un símbolo de "n/a" significa que no existen datos, y otro símbolo de "**1" significa una cantidad [µg] de partículas de sílice por 1 [µl] de solución de PCR cuantitativa en tiempo real, respectivamente.

Y un símbolo de "**2" significa un diámetro de partícula promedio, que puede basarse en los informes de inspección adjuntos a los productos comprados, o puede estar basado, sin ningunos informes de inspección adjuntos, en un diámetro de partícula promedio que se describe en catálogos, páginas de inicio o similares.

25 Los porcentajes de recuperación en el Ítem 4 son para evaluar sintéticamente la propiedad de las partículas de sílice en el método de pretratamiento para realizar el proceso de lavado por medio del agua purificada, y mostrar la influencia de las partículas de sílice del pretratamiento a través de un proceso de reacción de amplificación.

30

Con respecto al método de pretratamiento, los porcentajes muestran, por ejemplo, la capacidad de absorción de las partículas de sílice en el proceso de absorción, la capacidad de retener el ácido nucleico en el proceso de lavado al exponerse al agua purificada, u otros similares, respectivamente.

5 Los porcentajes en la reacción de amplificación de ácido nucleico son los que se han evaluado sintéticamente con respecto a: una relación de inhibición de la PCR cuantitativa en tiempo real; una relación de inhibición de la detección de fluorescencia en la PCR cuantitativa en tiempo real; o similar.

En la Tabla 4, cuantos más símbolos "+" están unidos, mejor es el porcentaje de recuperación.

10 10% o más de los resultados (los símbolos unidos de "++" o "+++") se han reconocido dentro de los siguientes rangos, que incluyen: un primer rango dentro de cerca de 0,3 [µm] o menos de diámetro de partícula bajo una primera condición de 1,25 a 2,5 [µg / tubo]; un segundo rango dentro de 0,01 a 3 [µm] de diámetro de partícula bajo una segunda condición de 5 [µg / tubo]; un tercer rango dentro de 1 a 5,3 [µm] de diámetro de partícula bajo una tercera condición de 10 a 20 [µg / tubo]; y un cuarto rango cerca de 1,9 [µm] de diámetro de partícula bajo una cuarta condición de 40 [µg / tubo].

15 Mientras que, desafortunadamente, bajo una quinta condición de 80 [µg / tubo], no se ha reconocido ningún buen resultado dentro de los rangos examinados.

20 De acuerdo con el Ítem 4, se ha demostrado que la proporción entre las cantidades usadas de partículas de sílice (el portador en fase sólida) y los diámetros de partículas de las mismas puede causar que los resultados difieran en gran manera.

25 En otras palabras, se ha sugerido que la preparación adecuada de las cantidades de partículas de sílice que se van a utilizar permite asegurar una cantidad suficiente de ácido nucleico con respecto a una prueba para la reacción de amplificación de ácido nucleico sin influencia desfavorable, tal como la inhibición de la reacción de amplificación de ácido nucleico, o similares. Esto se establece incluso cuando el agua purificada se ha utilizado como líquido de lavado y, además, cuando todo el material compuesto usado de partículas de ácido nucleico + sílice se ha agregado al reactivo de reacción de amplificación de ácido nucleico.

30 En el ítem 4, muchos de los diámetros de partículas que muestran buenos resultados se encuentran en un rango de 1 a 10 [µm], lo cual se ha señalado como una condición preferible en muchos métodos, tales como el método BOOM.

35 En la presente memoria descriptiva, los métodos convencionales (ver las Referencias 1 a 4), tales como el método BOOM, mencionan que se pueden usar partículas de sílice dentro de un rango de 0,05 a 500 [µm].

40 Sin embargo, la referencia 1 menciona *"En la práctica, cuanto más pequeñas son las partículas, mayores son las cantidades que contienen NA. Especialmente, en el caso de que el material de inicio tenga una elevada cantidad que contiene NA, en el que las moléculas de NA son comparativamente largas, y en el que se utilizan partículas de sílice demasiado pequeñas, el material compuesto formado de NA - sílice no puede volver a dispersarse más. En otras palabras, el NA conjugado no se puede recuperar en su forma del material compuesto (Se hace notar que la palabra "NA" significa ácido nucleico)."* La referencia 1 parece ser de la opinión de que se deben evitar los diámetros de partículas pequeñas. Adicionalmente, los métodos convencionales suponen además que la eliminación de partículas con un diámetro de 1 o inferior [µm] también se debe realizar tanto como sea posible al preparar la "preparación de suspensión de sílice en bruto (SC)".

45 Contrariamente a la suposición de los métodos convencionales, como queda claro en el Ítem 4, también se pueden obtener buenos resultados incluso cuando se usan partículas de sílice con un diámetro de partícula promedio de 1 o menos [µm].

50 Los presentes inventores han repetido, con respecto a los Ítems 2, 3 y 4, las pruebas de reproducción usando el método intercalador y las pruebas de reproducción usando el método de sonda para investigar la proporción entre los diámetros de partículas de sílice y la cantidad utilizada, en las cuales:

55 las relaciones cambiantes de los valores de Ct son menores;
la influencia a la PCR cuantitativa en tiempo real es menor;
se pueden obtener altos porcentajes de recuperación; y
60 se muestran buenos resultados.

Como resultado, como se muestra en la figura 1, los presentes inventores finalmente han logrado especificar un rango para utilizar (el rango predeterminado) de las partículas de sílice en las que el proceso de

amplificación del ácido nucleico no se ve afectado; y se pueden asegurar cantidades suficientes de ácido nucleico.

5 Aunque lo que sigue es una repetición de lo anterior, como se muestra con las líneas de puntos de la figura 1, el rango predeterminado preferible se define de la siguiente manera:

la concentración de las partículas de sílice es de 0,0625 a 4 [$\mu\text{g} / \mu\text{l}$];
el diámetro promedio de partícula de las partículas de sílice es de 0,01 a 100 [μm]; y
un área superficial calculada en base al diámetro promedio es de 1×10^4 a 1×10^8 [μm^2].

10 Como se muestra con las líneas continuas de la figura 1, el rango predeterminado adicional preferible que se define es el siguiente:

15 la concentración de las partículas de sílice es de 0,0625 a 1 [$\mu\text{g} / \mu\text{l}$];
el diámetro promedio de partícula de las partículas de sílice es de 0,01 a 10 [μm]; y
el área superficial calculada en base al diámetro de partícula promedio es de 1×10^5 a 5×10^7 [μm^2].

20 Después de haber obtenido los resultados anteriores, los presentes inventores han asumido que no solo el fenómeno de adsorción entre el ácido nucleico y las partículas de sílice de acuerdo con los efectos caotrópicos, sino también fenómenos distintos a los anteriores, tales como la fuerza electrostática, la fuerza intermolecular o similares causados por la estructura de las partículas de sílice son efectivos.

25 Con el fin de confirmar si la suposición es verdadera o falsa, los presentes inventores han investigado, si la extracción se pueda realizar efectivamente o no sin contener nada de: sal (por ejemplo, un agente caotrópico u otra fuerza electrostática que aumente la sal); y solvente orgánico,.

30 De acuerdo con la investigación, los presentes inventores han obtenido un resultado de que la extracción se puede realizar de manera efectiva sin contener nada de: sal (por ejemplo, el agente caotrópico, o la otra sal que aumenta la fuerza electrostática); y el disolvente orgánico.

Aunque los porcentajes de recuperación han disminuido ligeramente en comparación con un caso en el que se usa sal caotrópica, se ha obtenido un resultado prácticamente suficiente. Además, se ha comprobado que el uso de la separación por filtración en conjunto permite que la extracción sea más efectiva.

35 (Ítem 5)

En el ítem 5, se ha investigado la influencia del agente caotrópico en el proceso de absorción. Y utilizando un simple dispositivo de filtración que se muestra en la figura 2 (e), se ha estudiado si el dispositivo se puede utilizar o no en el modo de POCT.

40 Como se muestra en la figura 2 (e), este dispositivo de filtración incluye: un alojamiento 7 en forma de caja rectangular; y una parte de embudo 2 fijada a un centro superior del alojamiento 7. Y en el interior del alojamiento 7, se proporciona una estructura laminada que incluye: un material filtrante 3; un primer material de absorción de agua 4; un segundo material de absorción de agua 5; y un miembro de ajuste 6.

45 Como alojamiento 7 se puede usar un miembro capaz de ser fácilmente procesado, tal como una caja de plástico comercial.

50 En este ejemplo, una "caja de jabón pequeña de PP" (número de producto: 47697681, tamaño: aproximadamente 64 [mm] x 52 [mm] x 20 [mm]) producida por Ryohin Keikaku Co., Ltd. se ha utilizado como el alojamiento 7. No hace falta decir que este es un mero ejemplo. El alcance de protección de acuerdo con la presente invención incluye la modificación y / o variación de la misma.

55 La parte de embudo 2 es un elemento para el líquido que gotea que puede contener una muestra de manera que pueda conducir completamente el líquido goteado al material de filtración 3. Sin embargo, si el goteo puede llevarse a cabo fácilmente, la parte de embudo 2 puede ser omitida.

Como la parte de embudo 2, una parte de la boquilla en una forma con la que a menudo está formada, por ejemplo, con una porción de una micro - pipeta, una botella de medicamento o similar puede ser apropiada.

60 En este Ejemplo, un orificio con aproximadamente 5 [mm] de diámetro se abre a través de una superficie superior del alojamiento 7, un extremo inferior de la parte de embudo 2 se rosca a través del orificio abierto, fijando de esta manera la parte de embudo 2 en el alojamiento 7.

ES 2 734 068 T3

La estructura laminada en este Ejemplo incluye: el material filtrante 3; el primer material de absorción de agua 4; el segundo material de absorción de agua 5; y el miembro de ajuste 6, como se describe a continuación.

5 En este Ejemplo, como material de filtrado 3, se utiliza una pieza de membrana en círculo hecha perforando el "Filtro de membrana Omnipore (JCWP)" producido por Merck "Japan Millipore" por un medio punzón (7 [mm] de diámetro del orificio) producido por el Carl Jimuki Co., LTD.

10 Es preferible que el diámetro del material filtrante 3 sea de aproximadamente 5 a 7 [mm], y que el tamaño de los poros del material filtrante 3 sea de aproximadamente 1 a 10 [μ m].

Es necesario instalar el material filtrante 3 para que se adhiera completamente al primer material 4 de absorción de agua para que la solución 1 no fugue del extremo inferior de la parte 2 del embudo, o de manera similar.

15 En este Ejemplo, como primer material de absorción de agua 4, el papel de filtro productivo producido por Toyo Roshi Kaisha, Ltd. (Núm. 60) se corta en un rectángulo de 25,0 [mm] x 25,0 [mm], y una hoja del papel cortado está dispuesta inmediatamente debajo del material filtrante 3.

20 Como segundo material de absorción de agua 5, el "papel de filtro de fibra de vidrio Whatman de grado GF / D" producido por GE Healthcare Japan se corta en el rectángulo de 25,0 [mm] x 25,0 [mm], y dos hojas del papel de filtro cortado se encuentran dispuestas debajo del primer material de absorción de agua 4.

Además, como miembro de ajuste 6, se coloca una tabla de plástico debajo del segundo material de absorción de agua 5. El miembro de ajuste 6 puede omitirse en algunos casos.

25 En el proceso de absorción del Ítem 5, se lleva a cabo lo siguiente:

se añaden los 50 [μ l] de material de partida a 600 [μ l] de agua purificada dispensada en un tubo de 1,5 [ml];

30 se añaden además 40 [μ l] de suspensión de partículas de sílice a la misma; inmediatamente después de eso, se voltea el tubo para mezclarlo (5 [s]); se deja el tubo durante 5 [min] a temperatura ambiente; y se voltea nuevamente el tubo para mezclarse (5 [s]).

35 Y a continuación, se llevan a cabo los siguientes pasos: se gotean todas las cantidades de solución que contiene ácido nucleico homogeneizado y partículas de sílice en la parte 2 del embudo del dispositivo de filtración que se muestra en la figura 2 (e); y se realiza la separación de filtrado en el mismo (aproximadamente 1 a 2 [min]).

40 Después de la separación por filtración, se obtiene el material compuesto de partículas de ácido nucleico + sílice.

La preparación de suspensión de partículas de sílice utilizada en el Ítem 5 se prepara por medio de:

45 añadir partículas de sílice del Núm. 6 que se muestran en la Tabla 1 al agua purificada; y preparar su concentración a 1,75 [μ g / μ l].

El proceso de lavado se realizó agregando 600 [μ l] de agua purificada al material compuesto obtenido de partículas de ácido nucleico + sílice.

50 Después del proceso de lavado, el material compuesto de partículas de ácido nucleico + sílice se recoge con unas pinzas junto con el material filtrante, inmediatamente después de esto se agrega lo que se ha recogido en 68 [μ l] de reactivo de PCR cuantitativo en tiempo real para preparar 70 [μ l] de la cantidad total de solución de PCR cuantitativa en tiempo real que incluye aproximadamente 2 [μ l] de la cantidad del material compuesto de partículas de ácido nucleico + sílice con el material filtrante; y usando lo que se ha preparado para la reacción de amplificación de ácido nucleico.

De manera similar, como referencia positiva, se preparan 70 [μ l] de la cantidad de solución de PCR cuantitativa en tiempo real por medio de:

60 cambiar el material de partida a 50 [μ l] de agua purificada para realizar el ítem 5; después de la extracción, añadir las partículas de sílice obtenidas y el material de filtración en el reactivo de reacción de amplificación de ácido nucleico; y añadir además directamente 3 [pg] de muestra de ácido nucleico a la misma.

Las referencias negativas se componen de: una primera referencia negativa 1 (sin el portador en fase sólida) en la que las partículas de sílice se han excluido del Ítem 5; y una segunda referencia negativa 2 (sin muestra de ácido nucleico) en la que la muestra de ácido nucleico se ha excluido de la referencia positiva.

5

[Tabla 5]

	Porcentaje de recuperación (%)	
		Promedio
Ítem 5	37,76	26,00
	34,13	
	21,32	
	10,80	
- ref 1	2,13	1,28
	0,43	
- ref 2	0,99	0,52
	0,05	
+ ref		100,00

10 Sobre la base de los resultados anteriores, los porcentajes de recuperación se calcularon del mismo modo que en el Elemento 4, y los porcentajes de recuperación calculados y un promedio de los mismos se muestran en la Tabla 5.

15 El promedio de los porcentajes de recuperación en el Ítem 5 ha alcanzado el 26%, que ha sido más alto de lo que esperaban los presentes inventores.

20 En "Clonación molecular UN MANUAL DE LABORATORIO CUARTA EDICIÓN (Green y Sambrook, Prensa del Laboratorio de Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, Nueva York, Vol. 1, ver página 4 de la misma), "se considera que 5 a 10% de cantidades de ácido nucleico permanecen en una mini - columna comercial que contiene sustrato de sílice para el pretratamiento incluso después del proceso de elución.

25 Como una sorpresa agradable, el resultado del 26%, que es el promedio de los porcentajes de recuperación en el Ítem 5, es mayor que el doble de las cantidades de 5 a 10%, que son las cantidades de ácido nucleico que el manual considera que permanece y no debe ser eluido.

30 En la primera referencia negativa 1, el promedio de los porcentajes de recuperación ha sido tan bajo como 1,28%, lo que corresponde a las cantidades de ácido nucleico remanentes sin ser eluidas, y al promedio de los porcentajes de recuperación en el Ítem 5. Debido a esto, se ha revelado que ha sido difícil obtener una cantidad suficiente de ácido nucleico como modelos para la reacción de amplificación de ácido nucleico sin ninguna partícula de sílice.

35 Con referencia a los resultados anteriores, se puede entender que se puede retener una cantidad suficiente de ácido nucleico, ya que el presente método posee el carácter de que el ácido nucleico apenas se eluye, incluso si el objetivo está expuesto a una solución que tiene la función de eluir el ácido nucleico del portador en fase sólida, tal como agua purificada.

40 Se ha mostrado que el presente método puede configurarse como una forma de utilizar, en una solución de reacción para amplificar ácido nucleico en una prueba, el ácido nucleico retenido para la reacción de amplificación de ácido nucleico.

45 Puesto que el presente método no necesita el proceso de absorción que se basa en los efectos caotrópicos, se pueden seleccionar varios tipos de métodos de pretratamiento de acuerdo con el estado de una muestra de espécimen.

De acuerdo con el protocolo Y del método BOOM, se necesitan aproximadamente 30 minutos para procesar solo una muestra. Ventajosamente, de acuerdo con el presente método, el tiempo necesario puede reducirse a solo unos 17 minutos.

En vista de los resultados anteriores, es evidente que el presente método es simple, fácil, seguro, rápido y menos costoso, y es capaz de realizar el proceso de pretratamiento de la exploración genética de acuerdo con el modo de la POCT, que no puede realizarse como consecuencia de los métodos convencionales.

5 Sin casi ninguno de los equipos físicos y químicos que se ha considerado esenciales, los procesos necesarios se pueden realizar por medio del dispositivo de filtración de acuerdo con la presente invención.

10 Los equipos físicos y químicos incluye: dispositivos utilizados para la operación de secado (por ejemplo, un bloque de calor); equipos físicos y químicos fundamentales (por ejemplo, un dispositivo centrífugo, una micro - pipeta o similar). En otras palabras, la presente invención puede eliminar la limitación ambiental de tener los equipos físicos y químicos.

15 Los equipos físicos y químicos que se ha considerado esenciales son muy costosos, y los costos iniciales de inversión (por ejemplo, para comprar los equipos) deben ser mucho más altos que los de los kits de las POCT para el examen inmunológico.

20 Debido a que el uso de los equipos muy costosos se puede evitar de acuerdo con la presente invención, los costos de extracción de ácido nucleico pueden ser reducidos notablemente.

Desde otro punto de vista, la presente invención puede simplificar los procedimientos operativos al facilitar el proceso de lavado y permitir omitir el proceso de elución. Es fácil incluso para una persona que no está familiarizada con la extracción de ácido nucleico realizar los procedimientos de la operación.

25 Sobre la base del estudio anterior, se puede entender que se pueden llevar a cabo métodos de pretratamiento en las siguientes realizaciones.

No hace falta decir que, como se ha descrito repetidamente más arriba, se supone que se cumple la condición del rango predeterminado.

30 (Realización 1)

La figura 2 muestra los procesos de un método de pretratamiento en la realización 1 de acuerdo con la presente invención. La realización 1 es una forma básica de las realizaciones que siguen a continuación.

35 <Proceso de extracción>

En primer lugar, como se muestra en la figura 2 (a), se agrega una muestra 12 a un tubo 10 que almacena el líquido de extracción 11 en su interior.

40 Cuando el tubo se coloca inmóvil brevemente, los componentes (por ejemplo, membranas celulares, paredes celulares o similares) que cubren el ácido nucleico de la muestra son destruidos por el líquido de extracción 11. Por lo tanto, como se muestra en la figura 2 (b), el líquido de extracción 11 se convierte en una solución que contiene ácido nucleico, de modo que el ácido nucleico 13 y el contaminante (por ejemplo, fragmentos rotos de membranas celulares o similares) existen en un modo mezclado.

45 <Proceso de absorción>

A continuación, como se muestra en la figura 2 (c), las partículas de sílice 14 se agregan en la solución que contiene ácido nucleico dentro del tubo 10 para hacer que el ácido nucleico 13 y las partículas de sílice 14 se absorban unos con las otras.

50 Como resultado, se forma el material compuesto 15 del ácido nucleico 13 y las partículas de sílice 14.

55 Como se muestra en la figura 2 (d), se hace gotear esta solución sobre la parte de embudo 2 del dispositivo de filtración que se filtra con el material de filtración 3, o similar, recogiendo así los materiales compuestos 15 sobre el material de filtración 3 como se muestra en la figura 2 (e).

<Proceso de lavado>

Como se muestra en la figura 2 (f), el agua purificada 16 gotea sobre el material compuesto 15 que se ha recogido sobre el material filtrante 3 para lavarlo.

60 Como se muestra en la figura 2 (g), al retirar el material filtrante 3 del dispositivo de filtración, como se muestra en la figura 2 (h), lo que se ha retirado se entrega al siguiente proceso de amplificación de ácido nucleico, ya sea tal como esté o el material compuesto 15 por sí mismo separando el material compuesto 15 del material filtrante 3.

(Realización 2)

La figura 3 muestra los procesos de un método de pretratamiento en la realización 2 de acuerdo con la presente invención.

5 La realización 2 es una modificación de la realización 1, y realiza tanto el proceso de absorción como el proceso de lavado al mismo tiempo.

Es concebible utilizar la realización 2 para muestras que incluyen líquido de gárgaras, saliva, lagrima o similares.

10 Esto se debe a que se puede usar líquido de extracción de agua purificada para estas muestras, y las cantidades que contienen material que inhibe la reacción de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, proteínas, lípidos, sal, solventes orgánicos o similares) se consideran comparativamente menores.

15 <Proceso de extracción>

El proceso de extracción que se muestra en la figura 3 (a) y en la figura 3 (b) es el mismo que el de la realización 1,

<Proceso de absorción + proceso de lavado>

20 A diferencia de la realización 1, el lavado con el agua purificada 16 no se realiza en el proceso de lavado.

Alternativamente, como se muestra en la figura 3 (d), al gotear la solución sobre la parte de embudo 2 del dispositivo de filtración para filtrar el objetivo por medio del material de filtrado 3, también se realiza el lavado del objetivo con el mismo líquido de extracción 10.

25 Los puntos distintos a los anteriores son los mismos que los de la realización 1,

(Realización 3)

30 La figura 4 muestra los procesos de un método de pretratamiento en la realización 3 de acuerdo con la presente invención.

La realización 3 es una modificación de la realización 1, y realiza tanto el proceso de extracción como el proceso de absorción al mismo tiempo.

35 Es decir, como se muestra en la figura 4 (a'), no solo el líquido de extracción 11 sino también las partículas de sílice 14 se agregan de antemano al tubo 10 de manera que se satisfaga el rango predeterminado.

40 La muestra 12 se agrega al mismo, el material compuesto 15 se forma en el tubo 10 no solo extrayendo el ácido nucleico 13 sino también haciendo que el ácido nucleico 13 y las partículas de sílice 14 se absorban unos a las otras.

Los puntos distintos a los anteriores son los mismos que los de la realización 1,

(Realización 4)

45 La figura 5 muestra los procesos de un método de pretratamiento en la realización 4 de acuerdo con la presente invención.

La realización 4 es una modificación de la realización 1, y realiza el proceso de extracción, el proceso de absorción y el proceso de lavado al mismo tiempo.

50 La realización 4 es similar a la realización 2 con respecto a realizar el proceso de absorción y el proceso de lavado al mismo tiempo. Por lo tanto, es concebible utilizar la realización 4 para muestras que incluyen líquido de gárgaras, saliva, lagrima o similares.

55 Esto se debe a que se puede usar líquido de extracción de agua purificada para estas muestras, y las cantidades que contienen material que inhibe la reacción de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, proteínas, lípidos, sal, solventes orgánicos o similares) se consideran comparativamente menores.

60 En primer lugar, como se muestra en la figura 5 (a'), no solo el líquido de extracción 11, sino también las partículas de sílice 14 se agregan de antemano al tubo 10 de manera que se satisfaga el rango predeterminado.

La muestra 12 se agrega a la misma, en el tubo 10, se hace que no solo la extracción del ácido nucleico 13 sino también el ácido nucleico 13 y las partículas de sílice 14 que se han extraído se absorban unas con las otras, y a continuación se forma el material compuesto 15.

5 A diferencia de la realización 1, el lavado con el agua purificada 16 no se realiza en el proceso de lavado.

Alternativamente, como se muestra en la figura 5 (d), al gotear la solución sobre la parte de embudo 2 del dispositivo de filtración para filtrar el objetivo por medio del material de filtrado 3, también se realiza el lavado del objetivo con el mismo líquido de extracción 10.

10 Los puntos distintos a los anteriores son los mismos que los de la realización 1,

(Realización 5)

15 La figura 6 muestra los procesos de un método de pretratamiento en la realización 5 de acuerdo con la presente invención.

La realización 5 se puede realizar preferiblemente usando un kit de extracción de ácido nucleico que incluye los siguientes elementos.

20 El líquido de extracción 11 extrae el ácido nucleico contenido en la muestra 12.

Las partículas de sílice 14 están dispuestas sobre el material de filtración 3.

25 El primer material de absorción de agua 4 está dispuesto para colocarse sobre el material de filtración 3, y absorbe agua del líquido de extracción goteado sobre el material de filtración 3.

30 En la presente memoria descriptiva, los diámetros de partícula de las partículas de sílice 14 y la concentración de las partículas de sílice 14 en la solución de reacción para amplificar el ácido nucleico se establecen dentro del rango predeterminado que se ha mencionado más arriba, de manera que inmediatamente después de que el material filtrante 3 se haya lavado se permite que el material filtrante 3 se entregue al proceso de amplificación de ácido nucleico que no pasa por un proceso de secado ni por un proceso de elución.

<Proceso de extracción>

35 En primer lugar, como se muestra en la figura 6 (a), la muestra 12 se agrega en el tubo 10 que almacena el líquido de extracción 11 en su interior.

40 Cuando el tubo se mantiene inmóvil brevemente, los componentes (por ejemplo, membranas celulares, paredes celulares o similares) que cubren el ácido nucleico de la muestra son destruidos por el líquido de extracción 11. Por lo tanto, como se muestra en la figura 6 (b), el líquido de extracción 11 se convierte en una solución que contiene ácido nucleico, de modo que el ácido nucleico 13 y el contaminante (por ejemplo, fragmentos rotos de membranas celulares o similares) existen en un modo mezclado.

<Proceso de absorción>

45 En la realización 5, diferente a la realización 1, como se muestra en la figura 6 (e'), las partículas de sílice 14 no se agregan a la solución, sino que están dispuestas sobre el material filtrante 3 del dispositivo de filtración.

Sin embargo, al gotear la solución que contiene ácido nucleico en el tubo 10 sobre la parte de embudo 2, el ácido nucleico 13 y las partículas de sílice 14 se adsorben unos con las otras.

50 Como resultado, se forma el material compuesto 15 del ácido nucleico 13 y las partículas de sílice 14.

Los puntos distintos a los anteriores son los mismos que los de la realización 1,

(Realización 6)

55 La figura 7 muestra los procesos de un método de pretratamiento en la realización 6 de acuerdo con la presente invención.

La realización 6 es la modificación de la realización 5, y realiza tanto el proceso de absorción como el proceso de lavado al mismo tiempo.

60 La realización 6 es similar a la realización 2 con respecto a realizar el proceso de absorción y el proceso de lavado al mismo tiempo. Por lo tanto, es concebible utilizar la realización 6 para muestras que incluyen líquido de gárgaras, saliva, lagrime o similares.

Esto se debe a que se puede usar líquido de extracción de agua purificada para estas muestras, y las cantidades que contienen material que inhibe la reacción de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, proteínas, lípidos, sal, solventes orgánicos o similares) se consideran comparativamente menores.

- 5 Los puntos distintos a los anteriores son los mismos que los de la realización 5.

REIVINDICACIONES

1. Un método de pretratamiento para extraer ácido nucleico por medio de un método de extracción en fase sólida antes de un proceso de amplificación de ácido nucleico, comprendiendo el método de pretratamiento:

5 hacer que una muestra, el líquido de extracción para extraer el ácido nucleico contenido en la muestra, las partículas de sílice y un material filtrante entren en contacto unos con las otras; hacer que el material filtrante mantenga material compuesto del ácido nucleico y las partículas de sílice sobre el mismo; y
 10 a continuación entregar el material filtrante a un proceso de amplificación de ácido nucleico por medio de una solución de reacción para amplificar el ácido nucleico, en el que los diámetros de las partículas de sílice y la concentración de las partículas de sílice en la solución de reacción para amplificar el ácido nucleico se establecen dentro de un rango predeterminado, permitiendo de esta manera, antes del proceso de amplificación del ácido nucleico, evitar tanto un proceso de secado como un proceso de elución;
 15 el rango predeterminado se define como sigue, de manera que, en base al 100% del ácido nucleico contenido en la muestra, se recupera de la muestra del 5 al 38% del ácido nucleico:

20 la concentración de las partículas de sílice es de 0,0625 a 4 [$\mu\text{g} / \mu\text{l}$];
 el diámetro promedio de partícula de las partículas de sílice es de 0,01 a 100 [μm]; y
 un área superficial calculada en base al diámetro promedio de las partículas es de 1×10^4 a 1×10^8 [μm^2]; y
 el método de pretratamiento comprende además:

25 un primer proceso de extracción de añadir la muestra al líquido de extracción para extraer el ácido nucleico contenido en la muestra;
 un primer proceso de absorción de: hacer que las partículas de sílice entren en contacto con el ácido nucleico extraído para obtener el material compuesto del ácido nucleico y las partículas de sílice; y hacer que el material compuesto entre en contacto con el material filtrante; y
 30 un primer proceso de lavado de: lavar el material compuesto y el material filtrante con agua purificada; y entregar el material compuesto lavado y el material filtrado lavado al proceso de amplificación de ácido nucleico.

2. Un método de pretratamiento para extraer ácido nucleico por medio de un método de extracción en fase sólida antes de un proceso de amplificación de ácido nucleico, comprendiendo el método de pretratamiento:

35 hacer que una muestra, el líquido de extracción para extraer el ácido nucleico contenido en la muestra, las partículas de sílice y un material filtrante entren en contacto unos con las otras; hacer que el material filtrante mantenga el material compuesto del ácido nucleico y las partículas de sílice sobre el mismo; y
 40 a continuación entregar el material filtrante a un proceso de amplificación de ácido nucleico por medio de una solución de reacción para amplificar ácido nucleico, en el que: los diámetros de partícula de las partículas de sílice y la concentración de las partículas de sílice en la solución de reacción para amplificar el ácido nucleico se establecen dentro de un rango predeterminado, permitiendo así, antes del proceso de amplificación del ácido nucleico, omitir tanto un proceso de secado como un proceso de elución;
 45 el rango predeterminado se define como sigue, de manera que, en base al 100% del ácido nucleico contenido en la muestra, se recupera de la muestra del 5 al 38% del ácido nucleico:

50 la concentración de las partículas de sílice es de 0,0625 a 1 [$\mu\text{g} / \mu\text{l}$];
 el diámetro promedio de partícula de las partículas de sílice es de 0,01 a 10 [μm]; y
 un área superficial calculada en base al diámetro promedio de partícula es de 1×10^5 a 5×10^7 [μm^2]; y
 el método de pretratamiento comprende además:

55 un primer proceso de extracción de añadir la muestra al líquido de extracción para extraer el ácido nucleico contenido en la muestra;
 un primer proceso de absorción de: hacer que las partículas de sílice entren en contacto con el ácido nucleico extraído para obtener el material compuesto del ácido nucleico y las partículas de sílice; y hacer que el material compuesto entre en contacto con el material filtrante; y
 60 un primer proceso de lavado de: lavar el material compuesto y el material filtrante con agua purificada; y entregar el material compuesto lavado y el material filtrado lavado bajo una condición húmeda al proceso de amplificación de ácido nucleico.

3. El método de pretratamiento como se define en la reivindicación 1 o 2, en el que, antes de entregar el material filtrante al proceso de amplificación de ácido nucleico, el material compuesto se separa del material filtrante, y a continuación el material compuesto separado se entrega al proceso de amplificación de ácido nucleico.
- 5 4. El método de pretratamiento como se ha definido en la reivindicación 1 o 2, en el que el primer proceso de absorción y el primer proceso de lavado se realizan al mismo tiempo.
5. El método de pretratamiento como se ha definido en la reivindicación 1 o 2, en el que el primer proceso de extracción y el primer proceso de absorción se realizan al mismo tiempo.
- 10 6. El método de pretratamiento como se ha definido en la reivindicación 1 o 2, en el que el primer proceso de extracción, el primer proceso de absorción y el primer proceso de lavado se realizan al mismo tiempo.
- 15 7. Un kit de extracción de ácido nucleico, que comprende:
- un material filtrante sobre el que se disponen las partículas de sílice y se gotea una muestra;
líquido de extracción que extrae el ácido nucleico contenido en la muestra goteada; y
material de absorción de agua dispuesto sobre el material de filtración, absorbiendo el material de absorción de agua el agua del líquido de extracción que se ha extraído del ácido nucleico contenido en la muestra,
20 en el que:
- los diámetros de partículas de las partículas de sílice y la concentración de las partículas de sílice en la solución de reacción para amplificar el ácido nucleico se establecen dentro de un rango predeterminado, de manera que inmediatamente después de que el material filtrante se haya lavado,
25 el material filtrante lavado pueda suministrarse a un proceso de amplificación de ácido nucleico que no pasa por un proceso de secado ni por un proceso de elución; y
el rango predeterminado se define de la siguiente manera:
- 30 la concentración de las partículas de sílice es de 0,0625 a 4 [$\mu\text{g} / \mu\text{l}$];
el diámetro promedio de partícula de las partículas de sílice es de 0,01 a 100 [μm]; y
un área superficial calculada en base al diámetro promedio de partícula es de 1×10^4 a 1×10^8 [μm^2].

Fig. 1

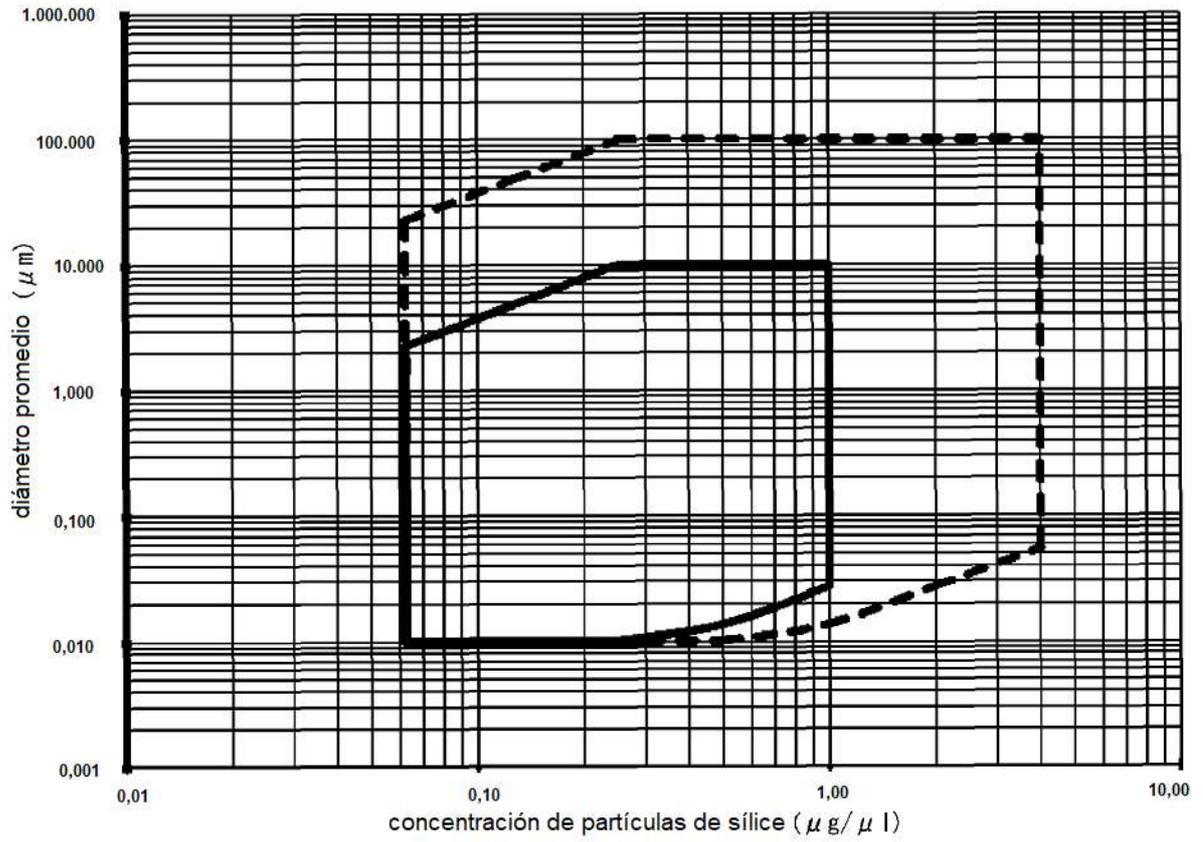


Fig. 2

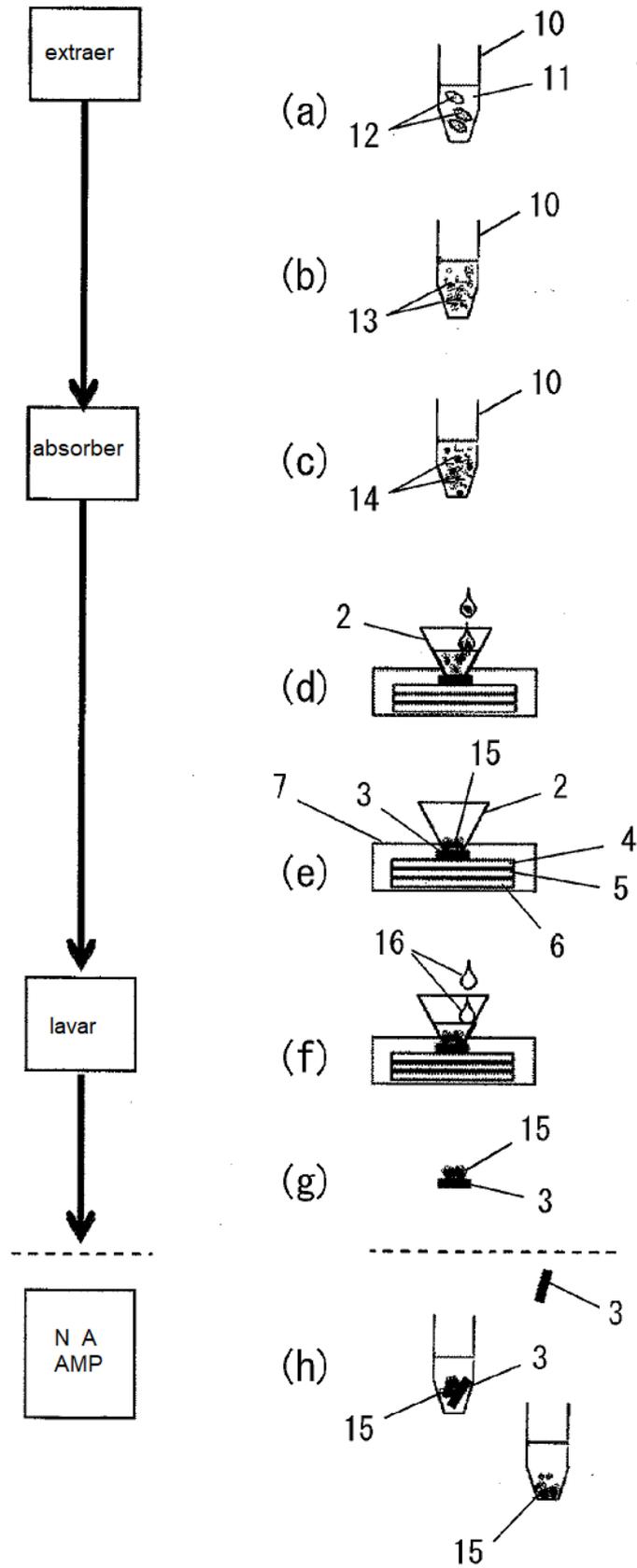


Fig. 3

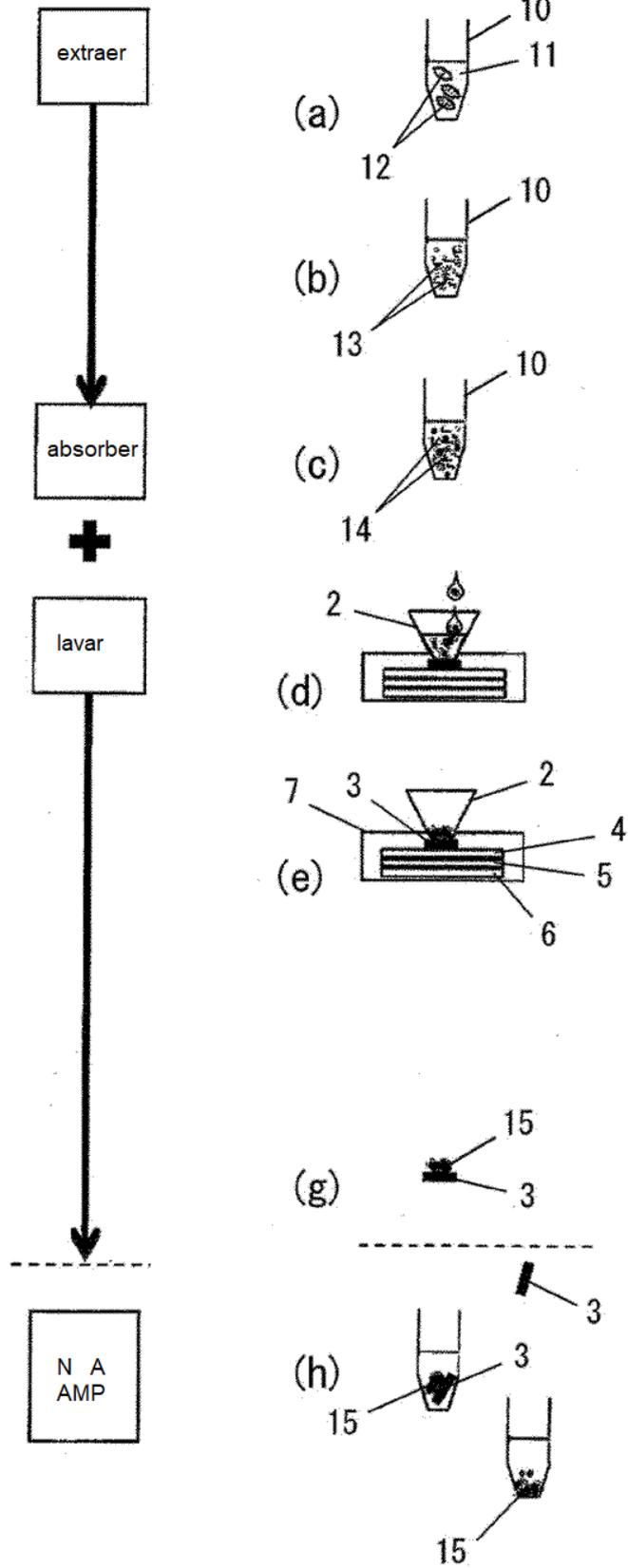


Fig. 4

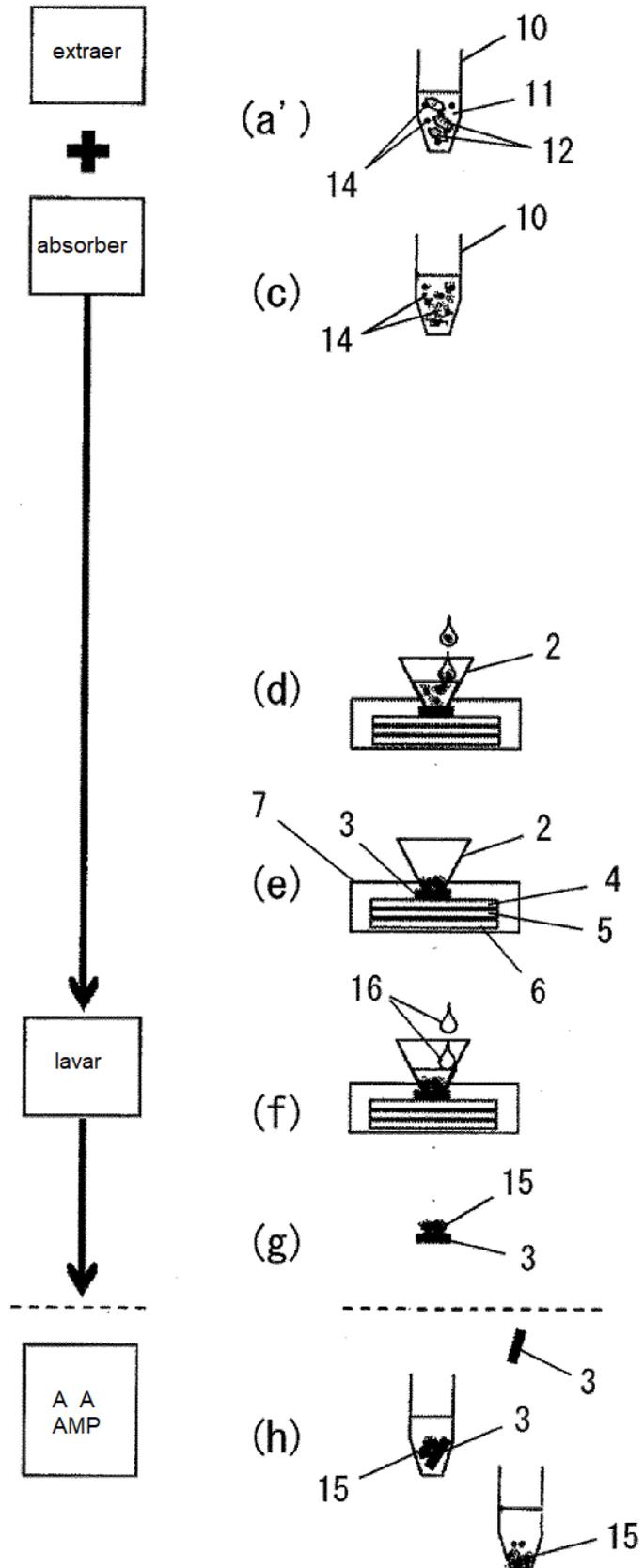


Fig. 5

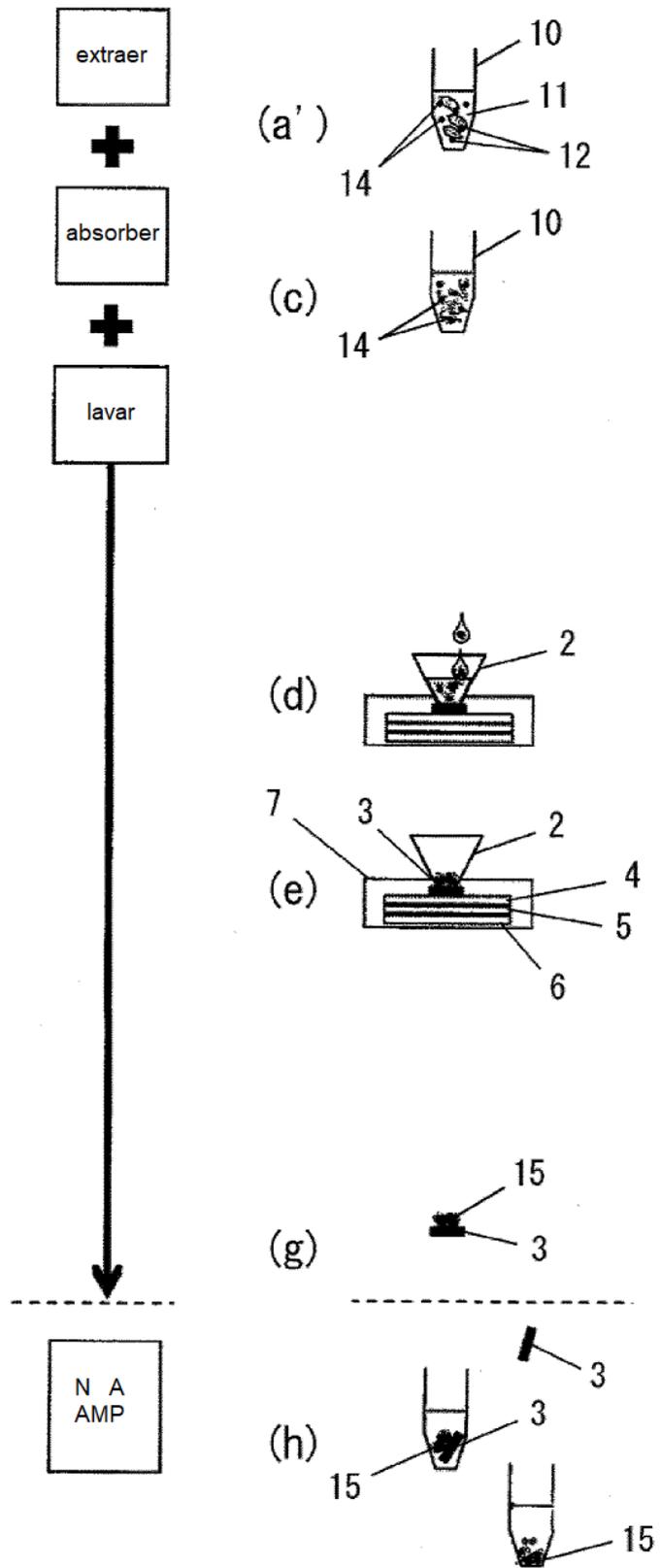


Fig. 6

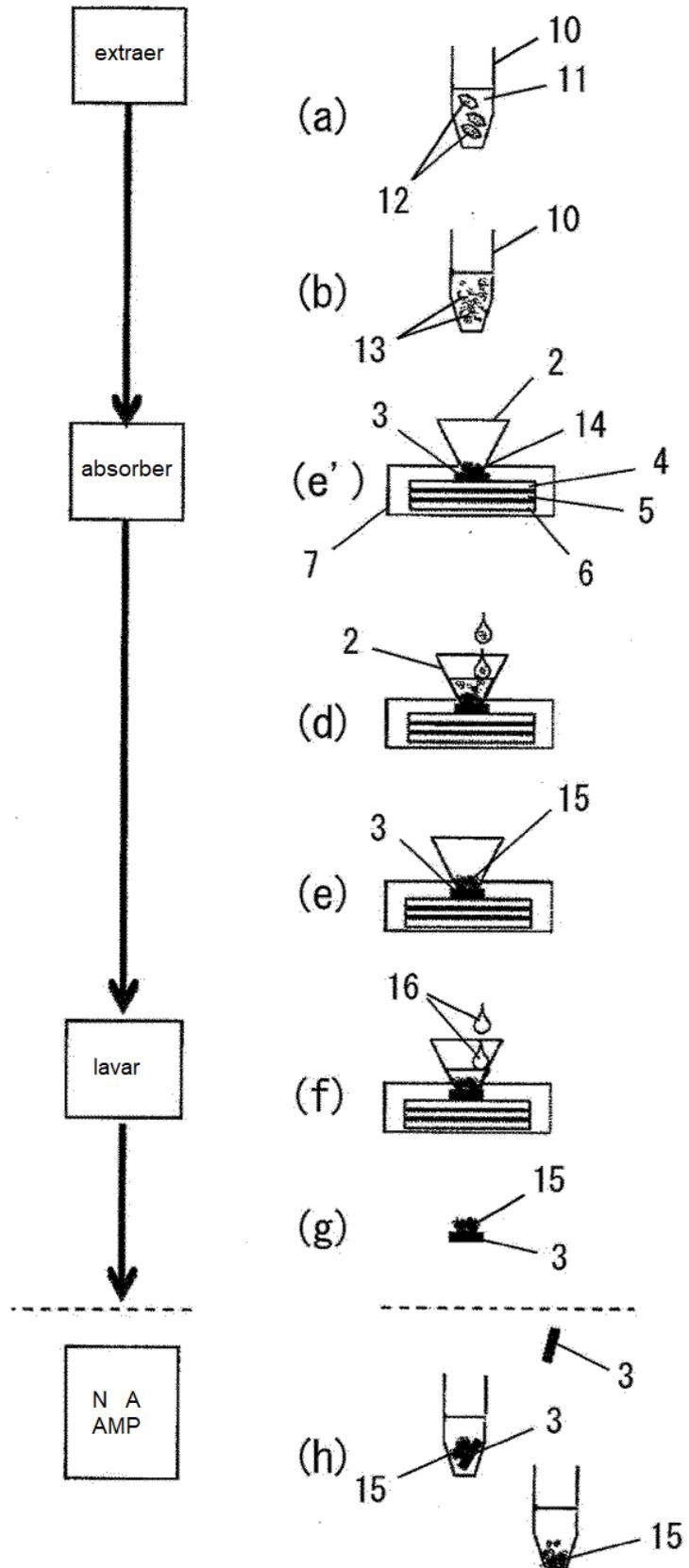


Fig. 7

