

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 802 453**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2016** E 16162349 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020** EP 3222719

54 Título: **Uso de una composición acuosa para la disolución de biomoléculas de una muestra de tejido**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.01.2021

73 Titular/es:

ALLFLEX EUROPE SA (100.0%)
Route des Eaux, ZI de Plagué
35500 Vitré, FR

72 Inventor/es:

DE MEULEMEESTER, JOHAN y
LEMAIRE, EMMANUEL

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 802 453 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

Uso de una composición acuosa para la disolución de biomoléculas de una muestra de tejido

La presente invención se refiere al uso de una composición acuosa para la disolución de biomoléculas de una muestra de tejido y a un procedimiento de uso de una composición acuosa para la disolución de biomoléculas de una muestra de tejido. Además, la presente invención se refiere a un sistema para la preparación de una muestra de tejido de un animal.

Las etiquetas de muestreo de tejido se usan habitualmente en la actualidad para etiquetar animales de ganado y al mismo tiempo extraer una muestra de dicho animal. Tal muestra se analiza posteriormente en el laboratorio para detectar la presencia o ausencia de rasgos genéticos particulares, patógenos o para genotipificar dicho animal. Alternativamente, la muestra se mantiene y almacena simplemente para rastrear el origen del animal del que se ha tomado dicha muestra. Las muestras de tejido se pueden obtener utilizando una etiqueta de muestreo de tejido o una unidad de muestreo de tejido, tal como una aguja de biopsia. Las etiquetas de muestreo de tejido son comúnmente conocidas y también están disponibles en el mercado, por ejemplo, del presente solicitante de la patente, Allflex Europe S.A.

Para analizar adicionalmente la muestra, es necesario procesarla adicionalmente. Esto se realiza normalmente en un laboratorio al que se transporta la muestra después de obtenerla de un animal. El documento WO 99/12475 desvela una cápsula de muestra de una etiqueta de oreja que contiene reactivos no especificados para el procesamiento adicional de la muestra. El documento EP 1 088 212 desvela una etiqueta de oreja que comprende un recipiente de recepción de muestras en el que está contenido material para la inactivación de una parte proteica de una muestra de tejido. Como ejemplos de tal material para la inactivación de la parte proteica de una muestra de tejido se mencionan los siguientes: proteinasa K, una solución fuertemente alcalina, un tamiz molecular y otros componentes que sustentan una inactivación de la parte proteica en una muestra. De acuerdo con este enfoque, la muestra de tejido está contenida en el recipiente de recepción de muestra de tejido donde su parte proteica se inactiva. La muestra se transporta a un laboratorio donde tiene lugar el análisis real de la muestra. El procedimiento como se desvela en la técnica anterior es laborioso y lleva mucho tiempo. Precisa múltiples etapas de pruebas en el laboratorio y finalmente puede llevar a una pérdida total de la muestra.

La presente invención se ha realizado para mejorar el procedimiento de acuerdo con la técnica anterior. Por consiguiente, era un objeto de la presente invención proporcionar una metodología que permita un procesamiento más rápido de las muestras de tejido. Adicionalmente, era un objeto de la presente invención proporcionar una metodología que permita almacenar la muestra de tejido durante periodos más largos, mientras que, al mismo tiempo, se pueda realizar un análisis rápido de la muestra en términos de intercambios genéticos particulares, su genotipo, la presencia o ausencia de determinados patógenos, tal como el VDVB.

Todos estos objetos se resuelven mediante el uso de una composición acuosa para la disolución de biomoléculas seleccionadas de ácidos nucleicos, preferentemente ADN, y proteínas, de una muestra de tejido de un animal y para posteriormente

- a) conservar dichas biomoléculas o
- b) procesar adicionalmente dichas biomoléculas,

en el que dicho uso comprende las etapas de:

- muestrear un tejido de un animal para producir una muestra de tejido de dicho animal e
- inmediatamente después del muestreo, exponer dicha muestra de tejido a una composición acuosa poniendo en contacto dicha muestra con dicha composición durante un período definido, comprendiendo dicha composición un tampón capaz de tamponar a un intervalo de pH de 7 a 9 a 25 °C, que incluye opcionalmente un agente de ajuste del pH, tal como un agente acidificante o agente alcalinizante,
- un detergente
- una sal a una concentración del 5-10 % en peso
- un agente quelante, y agua,

en el que dicho tejido de un animal se muestrea utilizando una etiqueta de muestreo de tejido, preferentemente una etiqueta de oreja, o una aguja de biopsia de muestreo de tejido, y en el que dicha muestra se pone en contacto con dicha composición mediante la introducción de dicha muestra en dicha composición, y en el que mediante la exposición de dicha muestra a dicha composición, las biomoléculas seleccionadas de ácidos nucleicos y proteínas, de dicha muestra de tejido, se disuelven en dicha composición acuosa para producir una solución de biomoléculas,

- utilizar dicha solución de biomoléculas para la conservación de dichas biomoléculas o para el procesamiento adicional de dichas biomoléculas, tal como detección de patógeno (0 patógenos), por ejemplo, VDVB, o genotipado, secuenciación, análisis de hibridación, o PCR cuantitativa en tiempo real, o utilizar dicha solución de biomoléculas para la detección de proteínas marcadoras o ácidos nucleicos marcadores, fármacos, hormonas o metabolitos,
- opcionalmente utilizar parte de dicha composición acuosa para almacenar dicha muestra de tejido para el uso

posterior, en la que dicha composición acuosa no contiene una proteinasa.

En una realización, dicha composición acuosa también comprende un agente alcalinizante, tal como un hidróxido alcalino, más preferentemente NaOH o KOH.

5 En una realización, dicha sal es NaCl que está presente a una concentración de 1 M a 2 M, preferentemente de 1 M a 1,5 M, más preferentemente de 1,3 M a 1,5 M, aún más preferentemente de 1,4 M.

En una realización, dicho detergente en dicha composición es N-lauroilsarcosina, preferentemente sal sódica de N-lauroilsarcosina.

En una realización, dicho tampón es Tris y/o dicho agente quelante es EDTA, preferentemente EDTA disódico dihidrato.

10 En una realización, dicha composición acuosa comprende, preferentemente consiste en, los siguientes componentes:

	Tris	5-20 mM, preferentemente 10-15 mM
	NaOH	5-20 mM, preferentemente 8-10 mM
	Sal sódica de N-lauroilsarcosina	2-15 mM, preferentemente 5-8 mM, más preferentemente 6-7 mM
15	EDTA · 2 Na·2H ₂ O	1-5 mM, preferentemente 1-3 mM
	NaCl	1-3 M, preferentemente 1-2 M, más preferentemente 1-1,5 M, más preferentemente 1,3-1,5 M, agua,

y, opcionalmente, un colorante que indica la presencia de biomoléculas, preferentemente ácidos nucleicos.

En una realización, dicha composición acuosa comprende, preferentemente consiste en, los siguientes compuestos:

20	Tris	13 mM
	NaOH	8,5-8,6 mM, preferentemente 8,55 mM
	EDTA · 2 Na·2H ₂ O	1,9-2,1 mM, preferentemente 1,99-2 mM
	Sal sódica de N-lauroilsarcosina	6-7 mM, preferentemente 6,7-6,9 mM, más preferentemente 6,8 mM
25	NaCl	1,35-1,45 M, preferentemente 1,38-1,42 M, y agua.

30 En una realización, dicha solución de biomoléculas se utiliza para el procesamiento adicional de dichas biomoléculas, en el que dicho procesamiento adicional es una detección de VDVB en dicha solución de biomoléculas y, por lo tanto, en dicha muestra de tejido, en la que, preferentemente, dicha detección de VDVB se realiza por medio de amplificación de ácidos nucleicos y detección de dichos ácidos nucleicos amplificados o por medio de detección de proteínas del VDVB basada en anticuerpos, tal como ELISA de proteínas del VDVB.

Los objetos de la presente invención también se resuelven por un sistema para la preparación de una muestra de tejido de un animal para el posterior

- 35 a) genotipado de dicho tejido,
 b) detección de un patógeno en dicho tejido, o
 c) almacenamiento y conservación de dicha muestra de tejido para el uso posterior,

comprendiendo dicho sistema una etiqueta de muestreo de tejido, preferentemente una etiqueta de oreja de muestreo de tejido, o a aguja de biopsia de muestreo de tejido, y una composición acuosa para la disolución de biomoléculas de una muestra de tejido de un animal, estando contenida dicha composición en el recipiente, siendo dicha composición como se define anteriormente.

40 La expresión "sistema para la preparación de una muestra de tejido de un animal", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una combinación de productos que están unidos operativamente entre sí. Los productos que están incluidos en tal sistema son una etiqueta de muestreo de tejido, preferentemente una etiqueta de oreja de muestreo de tejido o, en lugar de la etiqueta de muestreo de tejido, una aguja de biopsia de muestreo de tejido y, unida operativamente con la misma, una composición acuosa para la disolución de biomoléculas de una muestra de tejido en conformidad con la presente invención. La expresión "unido operativamente", como se usa en el presente documento, se puede referir a una conexión física entre la etiqueta de muestreo de tejido o la aguja de biopsia de muestreo de tejido, por una parte, y la composición acuosa por otra parte, o se puede referir a una disposición, en la que la composición acuosa en conformidad con la presente invención se proporciona de tal manera que, después de muestrear una muestra de tejido, tal muestra de tejido se puede poner inmediatamente en contacto con la composición acuosa en conformidad con la presente invención, sin que tal composición esté en contacto físico con la etiqueta de muestreo de tejido o partes de la misma. La expresión "poner en contacto con", como se usa en el presente documento en el contexto de poner en contacto la muestra con la composición, se puede referir a una actividad mediante la cual la muestra de tejido se pone en conexión física con la composición acuosa. Dicha actividad puede ser enjuagar, sumergir, embeber, empapar, bañar, remojar, mojar o cubrir total o parcialmente la muestra de tejido

con dicha composición acuosa. La expresión "etiqueta de muestreo de tejido", como se usa en el presente documento, se refiere a un dispositivo que es capaz de proporcionar a un animal una etiqueta o marca (que permanece con, en, sobre o unida de cualquier otra forma al animal) mientras que simultáneamente a ello se obtiene una muestra de tejido del animal para uso posterior. Una "unidad de muestreo de tejido" o, de forma sinónima, una "aguja de biopsia de muestreo de tejido", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un instrumento mediante el cual, por ejemplo a través de raspado, perforación, rasgado u otra acción, se puede obtener una muestra de tejido de un animal, sin embargo, sin unir una etiqueta o marca, tal como una etiqueta fabricada con plástico, metal o madera, a dicho animal.

Los objetos de la presente invención también se resuelven mediante un procedimiento de uso de una composición acuosa para la disolución de biomoléculas seleccionadas de ácidos nucleicos, preferentemente ADN, y proteínas, de una muestra de tejido de un animal y para posteriormente

- a) conservar dichas biomoléculas o
- b) procesar adicionalmente dichas biomoléculas,

en el que dicho procedimiento comprende las etapas:

- muestrear un tejido de un animal para producir una muestra de tejido de dicho animal e
- inmediatamente después del muestreo, exponer dicha muestra de tejido a una composición acuosa poniendo en contacto dicha muestra con dicha composición durante un periodo de tiempo definido, comprendiendo dicha composición
- un tampón capaz de tamponar a un intervalo de pH de 7 a 9 a 25 °C, que incluye opcionalmente un agente de ajuste del pH, tal como un agente acidificante o un agente alcalinizante.
- un detergente,
- una sal a una concentración del 5-10 % en peso,
- un agente quelante, y agua,
- en el que dicho tejido de un animal se muestrea utilizando una etiqueta de muestreo de tejido, preferentemente una etiqueta de oreja, o una aguja de biopsia de muestreo de tejido, y en el que dicha muestra se pone en contacto con dicha composición acuosa mediante la introducción de dicha muestra en dicha composición, y en el que mediante la exposición de dicha muestra a dicha composición acuosa, las biomoléculas seleccionadas de ácidos nucleicos y proteínas de dicha muestra de tejido se disuelven en dicha composición acuosa para producir una solución de biomoléculas,
- utilizar dicha solución de biomoléculas para la conservación de dichas biomoléculas o para el procesamiento adicional de dichas biomoléculas, tal como detección de un patógeno (o patógenos), por ejemplo, VDVB, o genotipado, secuenciación, análisis de hibridación, o PCR cuantitativa en tiempo real, o utilizar dicha solución de biomoléculas para la detección de proteínas marcadoras o ácidos nucleicos marcadores, fármacos, hormonas o metabolitos,
- opcionalmente utilizar dicha composición acuosa para almacenar dicha muestra de tejido para el uso posterior, en la que dicha composición acuosa no contiene una proteinasa.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que es posible iniciar un procesamiento de una muestra de tejido inmediatamente después de haberla obtenido de un animal, mediante su exposición inmediata a una composición acuosa adecuada de acuerdo con la presente invención. En conformidad con realizaciones de la presente invención, tal composición acuosa adecuada se caracteriza por altas concentraciones de sal de al menos el 5-10 % en peso o de al menos 1 M, la presencia de un detergente, un agente quelante y un tampón. Después de que se ha tomado una muestra de tejido de un animal, se expone inmediatamente a una composición acuosa en conformidad con la presente invención. El término "inmediatamente", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un periodo que varía de 0,5 segundos a 2 minutos, preferentemente de 0,5 segundos a 20 segundos, más preferentemente de 0,5 segundos a 5 segundos. El tiempo de exposición posterior durante el cual la muestra se expone a dicha composición acuosa puede ser cualquier periodo de 5 minutos a varias horas, por ejemplo, 1, 2, 3, ... 12, ... 24, ... 48, ... 72, ... 120, ... 168, ..., 336, ..., 720 horas. La composición acuosa en conformidad con realizaciones de la presente invención no solo ayuda a almacenar y/o conservar la muestra, sino también a disolver biomoléculas seleccionadas de ácidos nucleicos y proteínas de tal muestra en la composición que, por lo tanto, posteriormente se puede usar directamente sin etapas de pruebas adicionales. En conformidad con las realizaciones de la presente invención, la composición acuosa comprende un tampón que es capaz de tamponar a un intervalo de pH de 7 a 9 a 25 °C, un detergente, una sal a una concentración de al menos el 5-10 % en peso o de al menos 1 M, un agente quelante y agua y, opcionalmente, un agente de ajuste del pH, tal como un agente acidificante o un agente alcalinizante. En una realización, la concentración de dicha sal está en el intervalo del 5-10 % en peso o de 1 M-3 M, preferentemente de 1-2 M, más preferentemente de 1-1,5 M. Los tampones adecuados son diversos. Un buen ejemplo es Tris.

El término "tampón", como se usa en el presente documento, se refiere al concepto de un tampón tal como entiende un experto en la técnica. Más específicamente, se refiere a una combinación de un ácido débil y su base conjugada o de una base débil y su ácido conjugado, combinación que, cuando se disuelve en agua, es capaz de mantener el valor del pH en un intervalo definido. Tal "tampón" también se puede denominar un "sistema de tampón". Los tampones adecuados que se pueden usar en las realizaciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, TAPS,

Bicina, Tris, Tricina, TAPSO, HEPES, TES y MOPS.

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los presentes inventores creen haber descubierto que una composición acuosa en conformidad con la presente invención es capaz de captar biomoléculas procedentes de una muestra de tejido de un animal, después de la exposición de dicha muestra de tejido a dicha composición acuosa. Puede ser que estas biomoléculas se filtren de la muestra de tejido debido a la lisis/ruptura mecánica de algunas células en la muestra de tejido, debido a la acción del muestreo de tejido, tal como perforación, rasgado o raspado, o puede ser que algunas de las biomoléculas se liberen de la muestra de tejido debido a la presencia de un detergente en la composición acuosa de acuerdo con la presente invención. Las "biomoléculas", que se incorporan en la composición acuosa de acuerdo con la presente invención, preferentemente disueltas en ella, pueden ser ácidos nucleicos, proteínas o ambos de dicha muestra de tejido. Pueden ser también o como alternativa metabolitos o sustancias extrañas, tales como fármacos, que estaban contenidas en la muestra de tejido. Las "biomoléculas" pueden ser biomoléculas del animal del que se ha tomado la muestra de tejido o pueden ser biomoléculas que proceden de un patógeno que afecta al animal. En una realización preferida, las biomoléculas captadas en la composición acuosa de acuerdo con la presente invención son ácidos nucleicos. En otra realización, tales biomoléculas son proteínas. En aún otra realización, tales biomoléculas son una combinación de ácidos nucleicos y proteínas.

"Ácidos nucleicos", como se usa en el presente documento, son ADN, ARN, o una mezcla de ambos.

Como detergente de dicha composición, se pueden usar detergentes diferentes. Los ejemplos adecuados incluyen SDS o N-lauroilsarcosina, preferentemente su sal sódica. También hay muchos ejemplos de agentes quelantes, siendo uno adecuado el EDTA, preferentemente EDTA · 2 Na·2H₂O. Los inventores han descubierto sorprendentemente que la composición acuosa permite mantener el tejido intacto en la medida de lo posible para su posible uso futuro, mientras que al mismo tiempo que facilita un trabajo de análisis adicional con la misma en el laboratorio, ya que la composición disuelve biomoléculas originarias de la muestra. Estas biomoléculas están presentes en la composición acuosa a concentraciones suficientemente altas para permitir un procesamiento adicional de tal solución (líquida) de biomoléculas en la composición acuosa. Así, por ejemplo, los ácidos nucleicos y/o proteínas del animal, así como un patógeno que afecta a dicho animal, tal como un virus, por ejemplo, VDVB, se pueden absorberse del tejido tras la exposición de la muestra a la composición acuosa. Esto puede producirse tan rápidamente como durante un período de algunos minutos, es decir, cuando la muestra está en camino durante el transporte de la explotación agrícola al laboratorio. Como se usa en el presente documento, el término "animal" pretende referirse a cualquier ganado o animales de granja, preferentemente ganado bovino, ovejas, cerdos, caballos y otros animales de ganado adecuados.

La composición acuosa en conformidad con las realizaciones de la presente invención es también adecuada para la conservación de las biomoléculas disueltas en ella. Por lo tanto, la composición acuosa de acuerdo con las realizaciones de la presente invención no sólo puede servir para el procesamiento adicional inmediato de la biomolécula (o biomoléculas) disuelta en ella, sino también durante el almacenamiento a largo plazo, sea de la muestra de tejido que se está remojando en ella, o de las biomoléculas que se han disuelto en la composición acuosa. Los inventores han descubierto sorprendentemente que las biomoléculas disueltas en dicha composición acuosa se pueden almacenar en ella durante períodos prolongados, tal como de varias semanas a meses. Asimismo, una muestra de tejido se puede almacenar en la composición acuosa de acuerdo con la presente invención durante períodos prolongados, tal como de varias semanas a meses. Un ejemplo de período de tal almacenamiento de biomoléculas o de una muestra de tejido es de 1 semana a 12 meses, por ejemplo, 2, 3, 4 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses.

En una realización, la composición acuosa no contiene proteinasa en absoluto. Los inventores han descubierto sorprendentemente que, a pesar de la ausencia de proteinasa K o, incluso, de cualquier proteinasa, todavía es posible obtener concentraciones de ácido nucleico suficientemente altas y lo suficientemente puras para su procesamiento adicional, tal como el genotipado o la detección de patógenos, tales como el VDVB.

En una realización, la sal en la composición acuosa de acuerdo con las realizaciones de la presente invención está presente a concentraciones altas, preferentemente a concentraciones en el intervalo de 1 M a 3 M, preferentemente 1 M a 2 M, más preferentemente 1-1,5 M, más preferentemente 1,3 M a 1,5 M, incluso más preferentemente alrededor de 1,4 M. En una realización tal sal es NaCl.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que el uso de altas concentraciones de sal en una composición acuosa en combinación con una etiqueta de muestreo de tejido o una aguja de biopsia de muestreo de tejido, permite un procesamiento y, si se desea, almacenamiento/conservación a largo plazo de una muestra de tejido, sin grandes dificultades. En particular, la composición acuosa que contiene altas concentraciones de sal en conformidad con la presente invención puede utilizarse por sí misma para análisis adicionales una vez que se ha expuesto una muestra de tejido a ella. Para muchas aplicaciones de procesamiento corriente abajo, la presencia de altas concentraciones de sal no interfiere en el análisis adicional de las biomoléculas contenidas en tal composición acuosa de alto contenido en sales. En los casos en que la presencia de altas concentraciones de sal en la composición acuosa interfiriera con las aplicaciones posteriores, tales concentraciones de alto contenido de sal pueden eliminarse fácilmente mediante una simple etapa de desalinización o etapa de diálisis, sin afectar al contenido biomolecular de la composición. Por ejemplo, la desalinización se puede lograr fácilmente mediante columnas de desalinización adecuadas que están disponibles en el mercado, por ejemplo, las columnas de desalinización PD-10 de GE Healthcare.

Muchos detergentes diferentes pueden estar presentes en una composición acuosa de acuerdo con la presente invención. Un detergente preferido es N-lauroilsarcosina, preferentemente su sal sódica. N-lauroilsarcosina parece ser particularmente adecuada para una alta concentración de sal que está presente en dicha composición acuosa. En conformidad con realizaciones de la presente invención, un tampón preferido es Tris y un agente quelante preferido es EDTA, preferentemente su dihidrato disódico.

En conformidad con la presente invención, la composición acuosa en conformidad con la invención se puede usar para la conservación de biomoléculas o muestras de tejido durante períodos prolongados, y/o para procesamiento adicional de dichas biomoléculas y/o muestras de tejido. Dicho procesamiento adicional puede ser una prueba de diagnóstico con respecto al ADN genómico de una muestra de tejido de un animal que puede implicar el genotipado de dicha muestra de tejido, es decir, una detección de la presencia o ausencia de rasgos genéticos particulares. Dicho genotipado puede incluir la identificación de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, forma siglada de *restriction fragment length polymorphisms*), detección polimórfica amplificada aleatoria (RAPD, forma siglada de *random amplified polymorphic detection*) de ADN genómico, detección de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLPD, forma siglada de *amplified fragment length polymorphism detection*), reacción en cadena de polimerasa (PCR), secuenciación de ADN, oligonucleótido específico de alelo (ASO, forma siglada de *allele specific oligonucleotide*), hibridación con micromatrices de ácido nucleico o perlas. El procesamiento adicional puede, en algunas realizaciones, incluir también o como alternativa la detección de patógenos. Dichos patógenos pueden ser virus, bacterias u organismos eucariotas unicelulares o multicelulares, tales como parásitos. La detección de tales patógenos puede ser a través de los ácidos nucleicos o proteínas de los mismos. La detección de ácidos nucleicos se realiza como ya se ha descrito, utilizando tecnología de ácido nucleico apropiada, por ejemplo, una metodología de amplificación/detección adecuada, tal como experimentos de hibridación, PCR en tiempo real, hibridación en una micromatriz o chip o perla, en que se inmovilizan sondas de ácido nucleico apropiadas, etc. La detección de proteínas puede producirse, por ejemplo, mediante ensayos inmunoabsorbentes, que implican anticuerpos apropiados. Un ejemplo típico de tal ensayo inmunoabsorbente es un ELISA. Tomando el VDVB como un ejemplo, es posible detectar el mismo mediante la detección de su respectivo ácido nucleico (o ácidos nucleicos) o proteínas específicas que sean típicos del mismo. En una realización, la detección de las proteínas del VDVB es a través de cualquier proteína adecuada para tal fin, que aparezca en el VDVB, por ejemplo, una proteína seleccionada de Npor, la proteína de la cápside, una glicoproteína de la envoltura, tal como ERNS, E1 o E2, proteínas no estructurales, tales como p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, etc.

En una realización adicional, la solución de biomoléculas en la composición acuosa de acuerdo con la presente invención también se puede usar adicionalmente para la detección de otros agentes, tal como la presencia o ausencia de marcadores específicos, la presencia o ausencia de fármacos previamente o supuestamente administrados al animal, la presencia o ausencia de hormonas particulares y/o la presencia o ausencia de metabolitos en la muestra de tejido y, por tanto, en el animal.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el uso de dicha composición acuosa es para la detección de patógenos, en particular del VDVB, en una muestra de tejido de un animal. Dicha detección puede realizarse utilizando cualquier medio adecuado sobre la solución de biomoléculas obtenida de dicha muestra de tejido y realizando cualquier metodología de amplificación/detección adecuada sobre ella, tal como experimentos de hibridación, PCR cuantitativa en tiempo real, hibridación sobre una micromatriz o chip o perla, sobre los cuales las sondas de ácido nucleico apropiadas están inmovilizadas, citometría de flujo, inmunohistoquímica y otras metodologías adecuadas. Las etiquetas de muestreo de tejido adecuadas o unidades/aguja de biopsia para muestreo de tejidos están disponibles en el mercado a partir de una diversidad de fabricantes, que incluyen al presente solicitante de la patente, Allflex Europe S.A. La composición acuosa en conformidad con la presente invención se puede incluir en un recipiente adecuado y cualquier muestra de tejido obtenida se expondrá a tal composición acuosa en tal recipiente adecuado. Durante el uso de la composición acuosa, la muestra de tejido se expone a dicha composición acuosa inmediatamente después del muestreo, como se ha indicado anteriormente.

Adicionalmente, se hace referencia a las figuras, en las que

La Figura 1 muestra los resultados de una exposición de muestras de tejido obtenidas de ganado a una composición acuosa en conformidad con la presente invención y el posterior análisis de las mismas en electroforesis en gel.

La Figura 2 muestra los resultados de una extracción de muestras de tejido obtenidas de ganado bovino que se habían mantenido en una composición acuosa de acuerdo con la presente invención durante dos semanas (es decir, archivado de muestra), en la que las muestras se reexpusieron utilizando composición acuosa recién preparada en conformidad con el ejemplo 1 de la presente invención, y después se analizó la solución resultante de esta reexposición.

Como en la figura 1, los resultados de la figura 2 se presentan como una fotografía de un gel de los ácidos nucleicos disueltos.

La Figura 3 muestra los resultados de una separación electroforética en gel de ADN genómico de muestras almacenadas durante 12 meses en una composición preparada en conformidad con el Ejemplo 1.

Adicionalmente, se hace referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan para ilustrar, no para limitar la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Composición acuosa em conformidad con realizaciones de la presente invención

5 Un litro de composición acuosa en conformidad con las realizaciones de la presente invención se produce mediante el mezclado de lo siguiente:

- 1,576 gramos de TRIS
- 0,342 gramos de gránulos de NaOH
- 0,744 gramos de EDTA.2Na.2H₂O
- 10 2 gramos de sal sódica de N-Lauroilsarcosina
- 81,82 gramos de NaCl
- llenar hasta 1 litro con agua ultrapura

en concentraciones molares:

- 15 Tris MS 121,14 - 1,576 g/l = 13 mM
- NaOH PM 39,997 - 0,342 g/l = 8,55 mM
- EDTA 2 Na 2H₂O PM 372,24 - 0,744 g/l = 1,999 mM
- Sal sódica de N-Lauroilsarcosina PM 293,38 - 2 g/l = 6,81 mM
- NaCl PM 58,44 81,82 g/l = 1,4 M
- llevar a 1 l con agua ultrapura

20 **Ejemplo 2: Análisis de la composición acuosa de acuerdo con el ejemplo 1 con etiqueta de muestra de tejido (TST, forma siglada de *tissue sample tag*) y unidad de muestra de tejido (TSU, forma siglada de *tissue sample unit*) de Allflex**

Las etiquetas de muestreo de tejido (TST) y las unidades de muestreo de tejido (TSU) están disponibles en el mercado del presente solicitante de la patente, Allflex Europe S.A.

25 El objetivo del estudio en este ejemplo es probar si la etiqueta de muestra de tejido (TST) y la unidad de muestra de tejido (TSU) (= aguja de biopsia de muestreo de tejido) de Allflex son capaces de producir suficiente ADN para el análisis de BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA, EE.UU.) utilizando únicamente la composición acuosa del ejemplo 1 en la que se conserva la muestra en lugar de la propia muestra de tejido.

Material y procedimientos

30 Se recibieron del matadero seis orejas intactas para su análisis. Todas las muestras se perforaron varias veces y se incluyeron controles positivos y negativos para confirmar los resultados de la prueba. Tanto la TST como la TSU formaron parte del estudio y se sometieron a pruebas de forma independiente.

35 Se tomaron alícuotas de la composición de acuerdo con la presente invención (Ejemplo 1) de las muestras después de 0, 3, 19, 24, 48, 72, 168, 336, 720 horas. Para probar la estabilidad de la composición, se realizó un estudio de reposición donde durante cinco semanas consecutivas se añadió nueva composición acuosa a 6 muestras, descartando el tampón restante del tubo.

Todas las muestras se analizaron el GGP LD Bovine BeadChip (GeneSeek, Lincoln, NE, EE.UU.). Las tasas de identificación generadas se usaron para determinar la calidad de los datos. Se acepta una tasa de éxito > 0,85 como un resultado válido de la prueba.

40 Resultados

En total, se genotificaron satisfactoriamente 156 muestras. Tres muestras no cumplieron con el criterio de producir una tasa de éxito > 0,85. Las muestras no se volvieron a analizar. En promedio, la tasa de identificación observada, que deja fuera las muestras fallidas, fue de 0,985.

45 Los resultados del estudio de estabilidad proporcionan una tasa de éxito promedio de 0,993 para el sistema TSU y de 0,953 para las muestras de TST. El estudio de reposición reveló una ligera caída en la tasa de éxito después de reponer la composición por cuarta vez para la TSU, así como para las muestras de TST. Sin embargo, todas las muestras aún cumplen los criterios de inclusión de una tasa de éxito de > 0,85.

Conclusión

50 Este estudio muestra que el uso de una composición acuosa en conformidad con la presente invención en la tecnología de muestreo de tejido de muestreo (TSU y TST) de Allflex como fuente de ADN se puede usar en la práctica para el genotipado satisfactorio por Illumina BeadChip. Ambos sistemas, TSU así como TST, producen tasas de éxito

comparables cuando se usan para el análisis de Illumina.

No se pudieron apreciar diferencias significativas entre las muestras analizadas después de 0 - 720 horas. Directamente después de muestrear las orejas, la composición acuosa de la presente invención se puede usar para aplicaciones corriente abajo. Esto hace que el sistema sea muy aplicable para análisis directo de rasgos genéticos y de enfermedades.

5

Ejemplo 3: Experimento de extracción, archivado y genotipado de ácido nucleico

10

La composición acuosa en conformidad con la presente invención se evaluó en términos de su idoneidad para la disolución y/o extracción y/o conservación de ácidos nucleicos a partir de muestras de tejido. Se expuso una selección de muestras de tejido obtenidas de ganado bovino utilizando una unidad de muestreo de tejido de Allflex (= aguja de biopsia de muestreo de tejido) (TSU) a la composición acuosa en conformidad con el ejemplo 1 ("tampón TSU") mediante la colocación de la respectiva muestra de tejido en tal composición inmediatamente después del muestreo. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Número de caso	Muestra	Tratamiento	Conc. QUBIT ng/pl	Conc. Nanodrop ng/pl	Nanodrop A260/280
470003	3954	Solo tampón TSU	5,09	22,66	1,87
470004	3970	Solo tampón TSU	6,7	34	2,06
470005	3971	Solo tampón TSU	6,81	32,31	1,92
470006	3995	Solo tampón TSU	7,99	58,99	1,67
470007	4208	Solo tampón TSU	6,24	33,93	1,82
470008	4214	Solo tampón TSU	9,44	54,02	1,79
470009	4247	Solo tampón TSU	12,4	53,11	1,85
		Promedio	7,81	41,29	1,85

15

Se puede observar a partir de la tabla y de la figura 1 que se obtienen concentraciones suficientemente altas de ácido nucleico. "Conc. QUBIT" se refiere a una concentración de ácido nucleico según se determina mediante el uso de la cuantificación Qubit® (Thermo Fisher Scientific). Los resultados de la exposición también se pueden observar en la figura 1 adjunta, que muestra claramente en un gel una banda de ácido nucleico (genómica) para las muestras. (M = ADN marcador). Los números por encima de los carriles indican números de muestra.

20

Adicionalmente, se almacenó durante un período de dos semanas una selección de muestras de tejido obtenidas utilizando en una unidad de muestreo de tejido (TSU) en una composición acuosa de acuerdo con el ejemplo 1. Después de eso, se cambió la composición y estos tejidos se reexpusieron a una composición recién preparada de acuerdo con el ejemplo 1. Los resultados de tal reexposición se pueden resumir en la siguiente tabla y en la figura 2:

Número de caso	Muestra	Tratamiento	Conc QUBIT ng/pl	Conc Nanodrop. ng/pl	Nanodrop A260/280
470010	3954	Solo tampón TSU		15,59	1,72
470011	3970	Solo tampón TSU		15,75	2,25
470012	3971	Solo tampón TSU		24,72	2,05
470013	3995	Solo tampón TSU		94,9	1,47
470014	4208	Solo tampón TSU		37,57	1,79
470015	4214	Solo tampón FSU		45,3	1,59
470016	4247	Solo tampón TSU		17,27	1,72
		Promedio		35,87	1,80

25

Por lo tanto, es claro a partir de estos datos que la composición acuosa en conformidad con la presente invención no solo es adecuada para la disolución de los ácidos nucleicos de una muestra inmediatamente después del muestreo, sino también para almacenar una muestra de tejido en ella y posteriormente usar tal muestra para la reexposición en una composición acuosa recién preparada de la presente invención.

Ejemplo 4: Almacenamiento a largo plazo de muestras de tejido en la composición acuosa de acuerdo con la presente invención

Se recolectaron 100 muestras de punción de ambas orejas de ganado bovino recién sacrificado, utilizando un sistema de pinzas Allflex y una aguja de biopsia de muestreo de tejido (TSU) Allflex. Las muestras se estamparon en recipientes de plástico rellenos con una composición acuosa de acuerdo con el Ejemplo 1. Dicha composición acuosa en conformidad con la presente invención, en ocasiones en este Ejemplo 4 también se denomina "Líquido D" o "agente conservante Líquido D" (ver más adelante). Allflex llevó a cabo la recolección de las muestras, el etiquetado de los recipientes de muestras y el envío inmediato por servicio de mensajería. Un día después, las muestras llegaron al Laboratorio en condiciones ópticamente impecables. Tras la recepción, estas muestras se clasificaron según se reflejó mediante el etiquetado de la muestra y la información de la Tabla 1, y se almacenaron en oscuridad en la composición acuosa del Ejemplo 1.

Tabla 1: Panorama general del etiquetado de muestras y del almacenamiento de muestras

Conservación		Duración del almacenamiento				
		0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Líquido D	24 °C	D101-D105	D201-D205	D301-D305	D401-D405	D501-D505
	4 °C	D106-D110	D206-D210	D306-D310	D406-D410	D506-D510
	-20 °C	D111-D115	D211-D215	D311-D315	D411-D415	D511-D515

Como refleja la Tabla 1, la primera ronda de preparación y examen de 5 muestras se procesó el día después de la recepción de las muestras (Programa "0 Meses"), todos los exámenes posteriores se realizaron después de intervalos de 3 meses (Programa "3, 6, 9 y 12 Meses").

Extracción del ADN de las muestras de tejido y determinación de la calidad y cantidad

Todas las rutinas de laboratorio y los exámenes se realizaron de acuerdo con protocolos uniformados.

Se retiraron cinco muestras de los recipientes de almacenamiento (24 °C, 4 °C, -20 °C) aproximadamente 30 minutos antes de extraer el ADN y se equilibraron a temperatura ambiente. En general, se utilizó una fracción de cada muestra de punción de oreja (aproximadamente 1/3) para la extracción de ADN.

El aislamiento del ADN genómico de las muestras de tejido siguió un protocolo tradicional en condiciones moderadas utilizando NaOH y/o lisis con proteinasa. El ADN aislado se solubilizó en 100 µl de tampón Tris (10 mM).

Cantidad de material de muestra aplicado

Al comienzo del proyecto, se compararon dos variantes de la cantidad de muestra para la rutina de laboratorio.

La Variante 1 utilizó muestras de punción de oreja completas, la Variante 2 se basó en una fracción de la muestra de punción de oreja (aproximadamente un tercio de las muestras de punción de oreja). Esta comparación parecía importante, debido al imperativo de que el procesamiento de las muestras durante los procedimientos de rutina sea indefectiblemente continuo y reproducible. Es concebible que la totalidad de las muestras de punción de orejas se puedan implementar de una vez y se procesen más rápidamente, manteniendo de manera simultánea la concentración de ADN dentro de un intervalo de concentración más estrecho, excluyendo de este modo efectos subjetivos. En contraste con esto, durante el procedimiento de rutina usado en este ejemplo, solo se utilizó una fracción de la sonda original para mantener una parte de respaldo.

Evaluación fotométrica de la concentración y la pureza del ADN

Todas las muestras se midieron mediante fotometría Nanodrop. Cada muestra mostró un espectro claro de ADN, con un máximo de absorción a 260 nm y una escasa impureza inducida por proteína, disolvente y sal (230 nm, 280 nm). La Tabla 2 proporciona un panorama general de los valores de Nanodrop para la cantidad de la Variante 2, el programa "0 meses" en las dos condiciones de variedad de almacenamiento.

ES 2 802 453 T3

Tabla 2: Determinación fotométrica de la concentración y pureza del ADN - Almacenamiento de 0 meses

Agente conservante Liq. D				
	ID de la muestra	ng/ul	260/280	260/230
24 °C	D101	181,9	2,21	2,35
	D102	240,9	2,10	2,10
	D103	179,1	2,16	1,40
	D104	320,6	1,98	1,44
	D105	323,1	1,99	1,49
	PM	249,1	2,09	1,76
	DT	70,8	0,10	0,44
4 °C	D106	282,3	2,03	1,97
	D107	83,3	2,62	0,69
	D108	238,7	2,01	1,07
	D109	295,7	2,03	2,03
	D110	288,6	2,03	1,88
	PM	237,7	2,14	1,53
	DT	89,1	0,27	0,61
-20 °C	D111	288,7	1,98	1,80
	D112	287,0	2,58	2,22
	D113	315,8	2,00	1,62
	D114	55,5	4,12	1,76
	D115	280,7	1,86	L76
	PM	245,5	2,51	1,83
	DT	107,1	0,94	0,23

5 La concentración de ADN para la cantidad de la Variante 1 que utilizaba muestras de punción de oreja completas varió de 191 – 829 ng/μl (datos no mostrados) y para la cantidad de la Variante 2 que utilizaba aproximadamente 1/3 de las muestras de punción de oreja varió de 55 - 323 ng/μl. Esto muestra un rendimiento significativamente mayor en ADN utilizando todas las muestras, pero también una mayor dispersión de los valores de medición. Por lo tanto, se decidió utilizar solo una fracción de muestra (1/3) para todos los análisis posteriores.

10 Las Tablas 3 a 6 muestran los datos correspondientes después de 3, 6, 9 y 12 meses de almacenamiento de las muestras de tejido. Cada muestra generó una cantidad suficiente de ADN genómico. La concentración de ADN mostró los siguientes intervalos: 59 - 213 ng/μl (3 meses), 204 – 663 ng/μl (6 meses), 98 - 524 ng/μl (9 meses) y 70 - 654 ng/μl (12 meses), respectivamente.

Tabla 3: Determinación fotométrica de la concentración y pureza del ADN - 3 meses de almacenamiento

Agente conservante Liq. D				
	ID de la muestra	ng/ul	260/280	260/230
24 °C	D201	109,65	1,87	1,19
	D202	118,36	1,85	0,81
	D203	58,9	1,9	1,58
	D204	182,7	1,86	1,2
	D205	204,0	1,86	1,16
	PM	134,7	1,87	1,19
	DT	58,6	0,02	0,27

ES 2 802 453 T3

Agente conservante Liq. D				
	ID de la muestra	ng/ul	260/280	260/230
4 °C	D206	185,2	1,84	0,98
	D207	213,4	1,77	1,03
	D208	133,1	1,88	0,96
	D209	117,38	1,52	0,86
	D210	142,5	1,85	0,89
	PM	158,3	1,83	0,94
	DT	3,9,7	0,04	0,07
	-20°C	D211	173,7	1,87
D212		174,3	1,85	1
D213		107,74	1,84	0,86
D214		127,19	1,85	0,88
D215		177,2	1,9	1,4
PM		152,0	1,86	1,04
DT		32,3	0,02	0,22

Tabla 4: Determinación fotométrica de la concentración y pureza del ADN - 6 meses de almacenamiento

Agente conservante Liq. D				
	ID de la muestra	ng/ul	260/280	260/230
24 °C	D301	259,9	1,80	1,80
	D302	594,6	1,80	1,92
	D303	472,6	1,71	1,50
	D304	508,2	1,80	1,77
	D305	398,2	1,79	1,83
	PM	446,7	1,78	1,76
	DT	126,1	0,04	0,16
4 °C	D306	592,7	1,76	1,63
	D307	662,7	1,78	1,47
	DSOS	549,2	1,77	1,76
	D309	271,1	1,68	1,33
	D310	21,3,0	1,66	1,16
	PM	457,7	1,73	1,47
	DT	202,0	0,06	0,24
-20°C	D311	271,4	1,76	1,44
	D312	334,5	1,76	1,53
	DS13	204,3	1,75	1,31
	D314	655,3	1,88	1,73
	D315	272,4	1,84	1,47
	PM	347,6	1,80	1,50
	DT	178,1	0,06	0,15

ES 2 802 453 T3

Tabla 5: Determinación fotométrica de la concentración y pureza del ADN - 9 meses de almacenamiento

Agente conservante Liq. D				
	ID de la muestra	ng/ul	260/280	260/230
24 °C	D401	152,8	1,98	2,39
	D402	324,6	1,89	2,21
	D403	445,8	1,86	2,08
	D404	330,7	1,90	2,26
	D405	98,4	2,01	1,40
	PM	270,5	1,93	2,07
	DT	142,1	0,06	0,39
4 °C	D406	505,9	1,83	2,01
	D407	363,0	1,79	1,42
	D40S	283,3	1,83	1,87
	D409	150,2	1,97	2,20
	D410	125,3	1,97	1,80
	PM	285,6	1,88	1,86
	DT	157,0	0,09	0,29
-20 °C	D411	248,1	1,96	2,13
	D412	320,3	1,88	2,04
	D413	312,7	1,84	1,49
	D414	311,3	1,87	2,02
	D415	524,3	1,84	1,98
	PM	343,4	1,88	1,93
	DT	105,3	0,05	0,25

Tabla 6: Determinación fotométrica de la concentración y pureza del ADN - 12 meses de almacenamiento

Agente conservante Liq. D				
	ID de la muestra	Ng/ul	260/280	260/230
24 °C	D501	234,3	1,84	1,75
	D502	164,0	1,81	1,86
	D503	212,9	1,66	1,32
	D504	239,1	1,^8	1,84
	D505	202,6	1,77	1,73
	PM	210,6	1,77	1,70
	DT	30,1	0,07	0,22
4 °C	D506	245,7	1,69	1,24
	D507	653,5	1,75	1,39
	D508	82,5	1,76	1,20
	D509	70,1	1,84	1,24
	D510	276,1	1,72	1,40
	PM	265,6	1,75	1,29
	DT	236,0	0,06	0,09

(continuación)

Agente conservante Liq. D				
	ID de la muestra	Ng/ul	260/280	260/230
-20 °C	D511	479,6	1,78	1,87
	D512	649,0	1,73	1,40
	D513	203,9	1,75	1,54
	D514	567,9	1,72	1,51
	D515	437,4	1,74	1,58
	PM	467,6	1,74	1,58
	DT	168,5	0,02	0,18

5 Las muestras obtenidas, después de 0,3, 6, 9 y 12 meses se procesaron (es decir, se lisaron) como se describe anteriormente, y se separaron y analizaron electroforéticamente en gel. Los resultados ejemplares de tal análisis electroforético en gel se muestran en la figura 3, que muestra la separación electroforética en gel de ADN genómico para muestras que se habían almacenado durante 12 meses en una composición acuosa de la presente invención. Se pone de manifiesto que estas muestras presentan una banda de ADN de alto peso molecular claramente observable, indicando ADN genómico, lo que lleva a la conclusión de que el almacenamiento de muestras en cualquiera de las variantes de almacenamiento analizadas produjo una calidad de ADN muy buena para diagnósticos moleculares-genéticos posteriores, incluso después de una duración de almacenamiento de 12 meses. Por lo tanto, la composición acuosa de acuerdo con la presente invención es también adecuada para el almacenamiento a largo plazo de muestras de tejido, que luego se pueden usar, después del almacenamiento, para su posterior procesamiento y análisis adicionales.

10

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición acuosa para la disolución de biomoléculas seleccionadas de ácidos nucleicos, preferentemente ADN, y proteínas, de una muestra de tejido de un animal y para posteriormente

- 5 a) conservar dichas biomoléculas o
b) procesar adicionalmente dichas biomoléculas,

en el que dicho uso comprende las etapas de:

- muestrear un tejido de un animal para producir una muestra de tejido de dicho animal e
- inmediatamente después del muestreo, exponer dicha muestra de tejido a una composición acuosa poniendo en contacto dicha muestra con dicha composición durante un período definido, comprendiendo dicha composición

- 10 - un tampón capaz de tamponar a un intervalo de pH de 7 a 9 a 25 °C, que incluye opcionalmente un agente de ajuste del pH, tal como un agente acidificante o un agente alcalinizante,
- un detergente
- una sal a una concentración del 5-10 % en peso
- un agente quelante, y agua,

- 15 - en el que dicho tejido de un animal se muestrea utilizando una etiqueta de muestreo de tejido, preferentemente una etiqueta de oreja, o una aguja de biopsia de muestreo de tejido, y en la que dicha muestra se pone en contacto con dicha composición mediante la introducción de dicha muestra en dicha composición, y en el que mediante la exposición de dicha muestra a dicha composición, las biomoléculas seleccionadas de ácidos nucleicos y proteínas de dicha muestra de tejido se disuelven en dicha composición acuosa para producir una solución de biomoléculas,

- 20 - utilizar dicha solución de biomoléculas para la conservación de dichas biomoléculas o para el procesamiento adicional de dichas biomoléculas, tal como la detección de un patógeno (o patógenos), por ejemplo, el VDVB, o genotipado, secuenciación, análisis de hibridación o PCR cuantitativa en tiempo real, o utilizar dicha solución de biomoléculas para la detección de proteínas marcadoras o ácidos nucleicos marcadores, fármacos, hormonas o metabolitos,

- 25 - utilizar opcionalmente dicha composición acuosa para almacenar dicha muestra de tejido para el uso posterior,

en la que dicha composición acuosa no contiene una proteinasa.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha sal es NaCl que está presente a una concentración de 1 M a 2 M, preferentemente de 1 M a 1,5 M, más preferentemente de 1,3 M a 1,5 M, aún más preferentemente de 1,4 M.

30 3. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho detergente en dicha composición es N-lauroilsarcosina, preferentemente sal sódica de N-lauroilsarcosina.

4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho tampón es Tris, y/o dicho agente quelante es EDTA, preferentemente EDTA disódico dihidrato, y/o dicho agente de ajuste del pH es un hidróxido alcalino, por ejemplo, NaOH o KOH.

35 5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición acuosa comprende, preferentemente consiste en, los siguientes componentes:

40	Tris	5-20 mM, preferentemente 10-15 mM
	NaOH	5-20 mM, preferentemente 8-10 mM
	Sal sódica de N-lauroilsarcosina	2-15 mM, preferentemente 5-8 mM, más preferentemente 6-7 mM
	EDTA · 2 Na·2H ₂ O	1-5 mM, preferentemente 1-3 mM
	NaCl	1-3 M, preferentemente 1-2 M, más preferentemente 1-1,5 M, más preferentemente 1,3-1,5 M, agua,

y, opcionalmente, un colorante que indique la presencia de biomoléculas, preferentemente de ácidos nucleicos.

6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición acuosa comprende, preferentemente consiste en, los siguientes componentes:

45	Tris	13 mM
	NaOH	8,5-8,6 mM, preferentemente 8,55 mM
	EDTA · 2 Na·2H ₂ O	1,9-2,1 mM, preferentemente 1,99-2 mM
	Sal sódica de N-lauroilsarcosina	6-7 mM, preferentemente 6,7-6,9 mM, más preferentemente 6,8 mM
	NaCl	1,35-1,45 M, preferentemente 1,38-1,42 M, y agua.

50 7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha solución de biomoléculas se utiliza para el procesamiento adicional de dichas biomoléculas, en el que dicho procesamiento adicional es una detección de VDVB en dicha solución de biomoléculas y, por lo tanto, en dicha muestra de tejido, en el que, preferentemente, dicha detección de VDVB se realiza a través de amplificación de ácidos nucleicos y detección de

dichos ácidos nucleicos amplificados o a través de detección basada en anticuerpos de proteínas del VDVB, tal como ELISA de proteínas del VDVB.

8. Un sistema para la preparación de una muestra de tejido de un animal para posteriormente

- 5 a) genotipar dicho tejido,
 - b) detectar un patógeno en dicho tejido, o
 - 10 c) almacenar y conservar dicha muestra de tejido para el uso posterior,
- comprendiendo dicho sistema una etiqueta de muestreo de tejido, preferentemente una etiqueta de oreja de muestreo de tejido, o una aguja de biopsia de muestreo de tejido, y una composición acuosa para la disolución de biomoléculas de una muestra de tejido de un animal, estando contenida dicha composición en un recipiente, siendo dicha composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

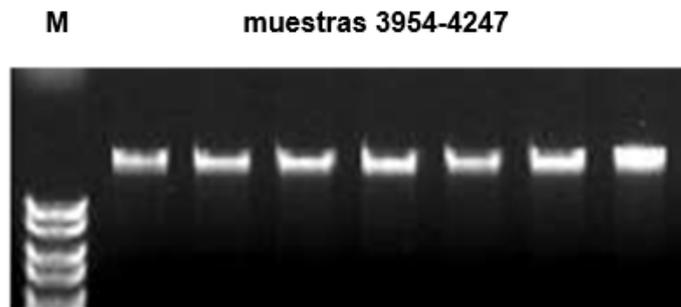


Figura 1

muestras 3954-4247

M

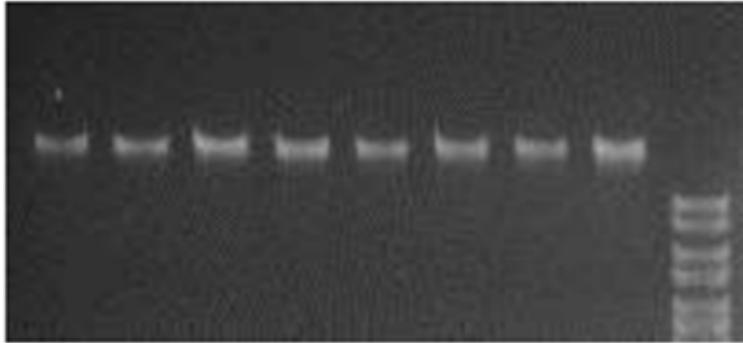


Figura 2

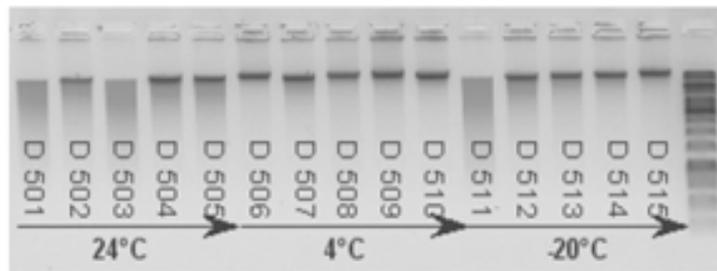


Figura 3