



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 717**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 27/26 (2006.01)

C12Q 1/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01907845 .0**

86 Fecha de presentación : **20.02.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1257667**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.11.2002**

54

Título: **Procedimiento electroquímico de detección de ácidos nucleicos.**

30

Prioridad: **24.02.2000 FR 00 02323**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73

Titular/es: **ARGENE**
Parc Technologique Delta Sud, B.P. 24
09120 Varilhes, FR

72

Inventor/es: **Azek, Fatima;**
Brossier, Pierre;
Joannes, Martine y
Limoges, Benoît

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 267 717 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento electroquímico de detección de ácidos nucleicos.

5 La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento por electroquímica de detección y/o de dosificación de moléculas de ácidos nucleicos en una muestra biológica, así como a un estuche de reactivos que permite realizar este procedimiento. Un modo particular de realización de este procedimiento permite detectar la presencia de contaminación por un agente patógeno en una muestra biológica.

10 Hoy en día se puede detectar la presencia de agentes patógenos en un organismo mediante varios métodos. La mayoría realizan una etapa previa de amplificación, generalmente mediante una reacción de polimerización en cadena (PCR), que permite amplificar de manera específica unos fragmentos de ADN del genoma viral. Este método extremadamente sensible permite detectar un número muy bajo de moléculas en el organismo y, bajo ciertas condiciones, cuantificar el número de copias del genoma del agente presentes inicialmente.

15 Esta técnica es *a priori* fácil de utilizar y permite obtener unos resultados fiables.

Los métodos utilizados tradicionalmente para analizar los productos de PCR son la electroforesis, con coloración del ADN con bromuro de etidio (BET), o unas pruebas de hibridación, utilizando unas sondas marcadas por ejemplo con unos compuestos radioactivos, luminiscentes o también detectables por colorimetría. Estas técnicas de hibridación son ampliamente utilizadas en los diagnósticos médicos.

25 Se han desarrollado recientemente otros métodos para la obtención de productos de PCR que sean directamente susceptibles de análisis. Por ejemplo, se pueden utilizar unos iniciadores marcados de forma específica. La señal emitida por los fragmentos amplificados es seguidamente analizada utilizando unos sistemas relativamente pesados. En particular, los iniciadores que sirven para la amplificación pueden llevar un fluoróforo cuya medida de la emisión de fluorescencia permitirá determinar la cantidad de ADN amplificada. Por otra parte, una limitación de estos métodos es que no son fáciles de realizar, en la medida en que necesitan la utilización de equipos pesados. Por otra parte, el riesgo de interferencias limita todavía más estos métodos.

30 Como el ADN posee unas bases nucleicas electroactivas, se han desarrollado también unos sistemas electroquímicos de detección sacando partido de esta propiedad para detectar directamente el ADN hibridado, sin tener que hacer intervenir un marcador. De manera general, el ADN es inmovilizado sobre un electrodo, y la diferencia de corriente eléctrica mediada antes y después de la hibridación está relacionada con la cantidad de ADN fijado sobre el electrodo. Se describe en el documento WO 93/20230 la realización de un procedimiento de este tipo. De todas formas, esta detección directa sin marcador no es muy sensible.

40 Con la finalidad de mejorar también la sensibilidad, se han desarrollado otras aproximaciones que hacen intervenir una molécula sonda electroactiva o un marcador electroactivo. Así, Palanti *et al.* (1996, *Analytical Letters*, 29, págs. 2309-31) describen diferentes compuestos electroactivos, que pueden asociarse con el ADN y así ser detectados por oxidación o reducción aplicando un potencial al electrodo. Así se han empleado unos complejos de metales de transición, unos antibióticos, unos colorantes de acridina o de benzamida y otros intercalados del ADN. Como estas sondas o marcadores electroactivos poseen mejores propiedades de oxirreducción que el ADN, su utilización permite obtener una relación señal/ruido superior y una mejor sensibilidad. El umbral de detección del ADN de un virus de la inmunodeficiencia adquirida humano del tipo I, obtenido con unos métodos de este tipo, era del orden del nanomol (Wang *et al.*, 1996 *Analytical Chemistry*, 68, 2699-34).

50 El documento WO86/03837 describe un procedimiento de detección y/o de dosificación de ácidos nucleicos en una muestra, que comprende las etapas de fijación de un ácido nucleico sobre unos electrodos, la hibridación específica de un ácido nucleico complementario con el ácido nucleico fijado acoplado a una enzima, y adición de un sustrato de dicha enzima de tal manera que la acción de dicha enzima sobre dicho sustrato lleve a la formación de un compuesto electroactivo que pueda ser detectado mediante la medición de la variación de la corriente farádica después de aplicar un potencial al electrodo.

55 La presente invención permite mejorar la sensibilidad de una detección electroquímica del ADN gracias a la utilización de un marcador enzimático capaz de transformar rápidamente un sustrato inactivo en la superficie del electrodo en un compuesto detectable electroquímicamente.

60 Así, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de detección y/o de dosificación de ácidos nucleicos en una muestra que comprende las siguientes etapas en pequeños volúmenes comprendidos entre 5 y 50 μ l:

- a. la fijación de un ácido nucleico por adsorción específica sobre unos electrodos serigrafiados con una tinta a base de carbono,
- 65 b. la hibridación específica de un ácido nucleico complementario del ácido nucleico fijado, conteniendo dicho ácido nucleico complementario un agente de reconocimiento,

- c. la adición de un agente complementario del agente de reconocimiento de (b), estando acoplado dicho agente complementario a una enzima,
- d. la adición de un sustrato de dicha enzima de tal manera que la acción de dicha enzima sobre dicho sustrato lleve a la formación de un compuesto electroactivo que pueda ser detectado mediante la medición de la variación de la corriente farádica después de la aplicación de un potencial al electrodo.

Cuando tiene lugar la etapa d, se puede tener una sucesión en cascada de reacciones enzimáticas antes de la formación del compuesto electroactivo. Si unas enzimas diferentes son acopladas al agente complementario definido en la etapa c, el compuesto obtenido después de la acción de la primera enzima sobre el sustrato añadido puede, a su vez, ser el sustrato de otra enzima, y así sucesivamente, hasta obtener finalmente el compuesto electroactivo.

La medición de la corriente puede ser realizada a partir de técnicas electroquímicas tales como la voltametría lineal, cíclica, de impulsos, de impulso diferencial, de onda cuadrada, o también la amperometría. La cronoamperometría, la coulometría, cronocoulometría voltamétrica, la potenciometría por redisolución anódica o catódica.

El ácido nucleico fijado sobre el electrodo puede ser el ácido que se está buscando detectar (diana) o puede ser una sonda. En este caso, el ácido nucleico diana es añadido posteriormente. Es marcado con el agente de reconocimiento. Se puede realizar un marcado de este tipo, por ejemplo durante una amplificación en particular por PCR, utilizando unos iniciadores marcados.

Como se ha precisado anteriormente, el ácido nucleico diana puede ser amplificado, en particular por PCR. El ácido nucleico que se adsorbe en la superficie del electrodo es preferentemente de rama simple, o bien porque lo es naturalmente, o bien porque es un ácido nucleico de doble rama desnaturalizado, con la finalidad de permitir la hibridación del ácido nucleico complementario. Un ácido de este tipo de doble rama desnaturalizado es también considerado como de rama simple en el sentido de la invención. Si el ácido nucleico diana es de doble rama, la hibridación es entendida como la formación de un complejo de un ácido nucleico de triple hélice.

Una “sonda” se define, en el sentido de la invención, como un fragmento de ácido nucleico de rama simple o un fragmento de doble rama desnaturalizado que comprende por ejemplo de 12 a algunas kilobases, en particular de 15 a algunos centenares de bases, preferentemente de 15 a 50 ó 100 bases, que poseen una especificidad de hibridación en unas condiciones determinadas para formar un complejo de hibridación con un ácido nucleico diana.

Por “ácido nucleico”, se entiende en particular el ADN, el ARN, o unos PNA. Este ácido nucleico puede ser de la forma rama simple o doble rama. Puede también ser modificado, en particular a nivel de los enlaces entre los diferentes elementos. En particular, se puede pensar en unos enlaces fosforioatos, más que en unos enlaces fosfodiésteres. Puede también ser marcado radiactivamente, o por unos compuestos fluorescentes, luminiscentes o por unos organometálicos.

Por “agente de reconocimiento”, se entiende un compuesto susceptible de ser acoplado a los ácidos nucleicos y ser reconocido específicamente para otro compuesto, que se denomina agente complementario. Unos ejemplos de agentes de reconocimiento y complementario que pueden ser utilizados comprenden en particular los complejos antígeno-anticuerpo, hapteno-anticuerpo o biotina-estreptavidina o avidina. Estos últimos agentes serán los preferidos para la realización del procedimiento según la invención.

Por “muestra biológica”, se entiende cualquier muestra que contiene material biológico. El material comprende en particular cultivos celulares mantenidos *in vitro*, o las muestras que pueden ser obtenidas a partir de un animal o de un ser humano (biopsias, muestras sanguíneas).

El solicitante ha demostrado que el procedimiento según la invención permite obtener un umbral de sensibilidad de detección de ácidos nucleicos, en particular del ADN amplificado, extremadamente bajo, del orden del attomol. En efecto, este método tiene la ventaja respecto a los métodos descritos anteriormente de poseer varias etapas de amplificación:

- la etapa de amplificación del ADN por PCR cuando ésta es realizada.
- una etapa denominada de amplificación enzimática, durante la adición del sustrato de la peroxidasa. En efecto, la variación de corriente farádica medida se deberá a la concentración del compuesto electroactivo presente en la solución, pudiendo ser modificada dicha concentración actuando sobre el tiempo de incubación sustrato/enzima,
- la eventual etapa de cascada enzimática tal como se ha descrito más arriba.

Por otra parte, una molécula de agente complementario puede ser acoplada a varias moléculas de enzimas, lo que es una fuente suplementaria de amplificación de la señal.

La detección del ácido nucleico por el procedimiento según la invención se realiza en efecto por la detección de un compuesto electroquímico más que por la detección del ácido nucleico, y está más bien basado en la amplificación de una señal que en la amplificación de la diana.

Por otra parte, el procedimiento según la invención puede ser fácilmente miniaturizado y/o automatizado, lo que reduce los riesgos de contaminación de las muestras, y permite realizar unos análisis a un coste reducido. Es incluso ventajoso realizar una miniaturización de este tipo.

5 El solicitante ha demostrado en efecto que, de manera sorprendente, se mejora la sensibilidad del sistema cuando se trabaja con pequeños volúmenes. Por pequeños volúmenes, se entienden unos volúmenes comprendidos entre algunos microlitros y algunas decenas de microlitros, en particular de 5 a 50 μl , de manera preferida 10 μl .

10 En efecto, en la medida en que se detecta la variación de la corriente farádica en la superficie del electrodo, es ventajoso aumentar la relación S/V (superficie del electrodo/volumen de la solución), con la finalidad de obtener una mejor señal.

Los electrodos serán unos electrodos serigrafiados con una tinta a base de carbono, modificados o no. En el estado de la técnica se han descrito anteriormente electrodos de este tipo, por ejemplo en el documento WO 93/20230 o en 15 *Bagel et al.* (1997, *Analytical Chemistry*, 69, págs. 4688-94). En particular, se utilizan unos electrodos serigrafiados, con una tinta que contiene carbono y unos derivados estirénicos. Un derivado preferido es el poliestireno. La proporción (en peso) grafito/poliestireno está comprendida entre 1/10 y 10/1, preferentemente 1/5 y 5/1, y aún de forma más preferida entre 1/2 y 2/1. Se prefiere, muy en particular, una proporción entre 5/4 y 7/4, en particular 3/2. El solvente utilizado debe permitir una buena homogeneización de los compuestos presentes en la tinta y poder "secarse" rápidamente (aproximadamente de 30 minutos a 3 horas), en particular por evaporación. Se prefiere que la evaporación 20 se realice a temperatura ambiente. Se realiza preferentemente la serigrafía sobre unas hojas flexibles de poliéster o de PVC. Estas descripciones corresponden a unos ejemplos particulares de electrodos, pero se entiende que el experto en la materia sabrá optimizarlos en función del uso buscado.

25 La invención se caracteriza en particular por el hecho de que los ácidos nucleicos presentes en la solución que se analiza (que puede ser una muestra biológica) son adsorbidos de manera específica sobre el electrodo.

Para realizar lo anteriormente mencionado, se utiliza un tampón de fijación, que se caracteriza por contener 1,5 M de acetato de amonio. Dicho tampón puede en particular ser realizado a base de PBS (4,3 mM NaH_2PO_4 ; 15,1 mM 30 Na_2HPO_4 ; 50 mM NaCl, pH 7,4) o de Tris (50 mM Tris; 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 50 mM NaCl, pH 7,4).

En el momento de añadir la sonda marcada con el agente de reconocimiento, es preferible que ésta sólo se fije al ADN diana, y que no se fije de manera no específica a los electrodos. En efecto, una fijación de este tipo produciría posteriormente al enlace del agente complementario y la formación del compuesto electroactivo, después de añadir el 35 sustrato de la enzima. Se obtendría entonces una reacción falsamente positiva.

El tampón de hibridación debe permitir por lo tanto la hibridación específica de la sonda marcada con el ADN diana. Se utilizan unos tampones de hibridación clásicos, tales como los descritos en Sambrook *et al.* (Molecular cloning: a laboratory manual, 1989, 2ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY.USA. 40 ver en particular p 9.54). Un tampón de hibridación utilizable en el procedimiento según la invención contiene 6 X SSC, 0,1% SDS.

Preferentemente, si se utiliza una enzima solamente, esta posee la actividad de una oxidasa. Por ejemplo, puede ser una peroxidasa, una glucosa oxidasa, pero también puede ser otro tipo de enzima del tipo hidrolasa como la fosfatasa 45 alcalina. De forma preferida, se utiliza la peroxidasa, en particular la peroxidasa de rábano blanco (Horseradish peroxidase, HRP). Un sustrato preferido de la peroxidasa unida a la estreptavidina será la ortofenilendiamina (OPD). La peroxidasa cataliza la interacción de la OPD con H_2O_2 para dar un compuesto coloreado electroactivo soluble en agua: el 2,2'-diaminoazobenzene (DAA). De todas formas se pueden utilizar otros sustratos de la peroxidasa, por ejemplo la tetrametilbencidina (TMB), los derivados de la o-fenilendiamina y diaminobencenos, la hidroquinona y 50 sus derivados, el ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), las fenoxacinas y sus análogos, los sistemas 4-aminoantipirina/fenol ó 4-aminoantipirina/anilina, los ferrocenos y sus análogos.

Cuando se realiza la detección después de una cascada enzimática, es importante que la última enzima en juego transforme el último sustrato en un compuesto electroactivo. Las enzimas anteriores, que sirven para la amplificación 55 de la señal pueden ser unas enzimas clásicas utilizadas en biología, y activas en las condiciones experimentales. Unas enzimas ventajosas son por ejemplo las enzimas que permiten la hidrólisis de los azúcares, como las glucosidasas y las emparentadas.

La invención se refiere también a un estuche de reactivos, para la realización del procedimiento según la invención 60 que contiene:

- a. un tampón de fijación que contiene 1,5 M de acetato de amonio que permite la fijación del ácido nucleico sobre unos electrodos serigrafiados con una tinta a base de carbono,
- 65 b. un tampón de hibridación que permite la hibridación específica del ácido nucleico complementario sobre el ácido nucleico fijado sobre los electrodos,
- c. un agente de reconocimiento con la finalidad de marcar el ácido nucleico complementario,

- d. un agente complementario del agente de reconocimiento (c), acoplado a una enzima, y
- e. un sustrato de dicha enzima, que lleva a la formación de un compuesto electroactivo que permite una medición de la variación de la corriente farádica de la solución.

Se pueden añadir otros elementos, en particular unos iniciadores para la amplificación del ácido nucleico diana, o un tampón que permita la desnaturalización del ácido nucleico de doble rama en el caso en que el ácido nucleico de partida sea de doble rama y se fija un ácido nucleico de rama simple sobre los electrodos.

El procedimiento según la invención puede realizarse para la detección y/o la dosificación del ADN proveniente de fuentes diversas. En particular, se pueden citar la detección del ADN de origen bacteriano, viral o celular.

En efecto se puede utilizar el procedimiento según la invención para detectar la sobreexpresión o la subexpresión de ciertos genes implicados en fenómenos cancerosos, por ejemplo después de las etapas de transcripción inversa-amplificación a partir del ARN mensajero que puede ser preparado a partir de una biopsia. En efecto, el procedimiento según la invención permite la cuantificación del ácido nucleico diana, a condición de disponer de un patrón interno.

Se puede también realizar el procedimiento según la invención para detectar y/o cuantificar eventuales contaminaciones bacterianas, sea en muestras alimenticias (en particular las contaminaciones de *Salmonella*, *Listeria*, *E. coli*, enterohemorragicas O157 y/o O11...). El procedimiento según la invención es también de gran utilidad para la detección y el diagnóstico de infecciones bacterianas en el hombre o en la medicina veterinaria. Se pueden citar las infecciones de *M. Tuberculosis* que podrán ser detectadas a partir de *sputum* humano, o la caracterización de otras infecciones para las que se quiere un resultado rápido y fiable.

El procedimiento según la invención es particularmente útil para la detección de virus en el organismo, lo que permite obtener una excelente sensibilidad, y por lo tanto detectar un número muy reducido de copias de ADN viral. En particular, se puede detectar la presencia de un virus en una muestra biológica siguiendo el protocolo que comprende las siguientes etapas:

- a. una amplificación específica del ADN de la muestra biológica, preferentemente por PCR utilizando unos iniciadores específicos del virus buscado,
- b. el aislamiento y el análisis del ADN obtenido después de la amplificación mediante un procedimiento según la invención o utilizando un estuche según la invención.

El procedimiento según la invención permite también detectar al mismo tiempo la presencia en una muestra de ácidos nucleicos provenientes de fuentes u organismos variados. En efecto, el principio del procedimiento según la invención es la detección de una corriente farádica específica del compuesto electroquímico formado por la acción de la enzima sobre el sustrato.

Cuando se quiere detectar la presencia de ácido nucleico proveniente de diferentes fuentes en una muestra, se puede seguir el siguiente procedimiento:

- a. se realiza la amplificación opcional y la fijación de los ácidos nucleicos diana de dichos organismos diferentes sobre los electrodos serigrafiados con una tinta a base de carbono,
- b. se realiza la hibridación con los ácidos nucleicos complementarios de las dianas, estando unido cada uno de ellos a un agente de reconocimiento diferente,
- c. se añaden los agentes complementarios a los agentes de reconocimiento acoplados a unos marcadores diferentes,
- d. se añaden los diferentes sustratos de las enzimas con la finalidad de generar los diferentes compuestos electroactivos,
- e. se mide la corriente farádica correspondiente a los diferentes compuestos electroactivos, en la superficie del electrodo, aplicando el potencial específico de cada compuesto.

Los marcadores diferentes de la etapa c son unos marcadores enzimáticos u otros. Los sustratos de las enzimas generan diferentes compuestos electroactivos, siendo los otros marcadores unos marcadores redox específicos. Los ácidos nucleicos diana fijados sobre los electrodos son preferentemente de rama simple.

Como la generación de corriente farádica va unida a la presencia del compuesto electroactivo específico, se puede por lo tanto deducir la presencia o la ausencia de ácidos nucleicos en las muestras de partida.

Se entiende que el ejemplo de procedimiento dado anteriormente puede ser modificado, por ejemplo fijando las sondas específicas de diferentes ácidos nucleicos sobre los electrodos, y acoplando los ácidos nucleicos diana con los diferentes agentes de reconocimiento, por ejemplo durante una etapa de amplificación por PCR.

Este procedimiento permite por lo tanto identificar rápidamente y fácilmente los contaminantes microbianos o virales en unas muestras alimenticias, o en una muestra biológica.

Para la realización del procedimiento según la invención cuando tiene lugar el análisis de una muestra biológica, se aconseja en general efectuar una amplificación previa del ADN que se quiere detectar. Se puede realizar la reacción PCR directamente sobre la muestra, o después de una purificación previa del ADN de la muestra. Se escoge una u otra técnica en función de la cantidad de muestra de la que se dispone y de los objetivos buscados por la persona que realiza el procedimiento según la invención. El experto en la materia conoce las técnicas a emplear para aislar el ADN de una muestra biológica.

En el caso en que el procedimiento es realizado en un sistema automatizado y/o miniaturizado, se puede realizar el aislamiento del ADN directamente sobre los electrodos, por ejemplo utilizando las enseñanzas de la patente WO 97/41219. El ADN aislado de esta forma puede ser posteriormente amplificado por PCR.

Descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática del procedimiento de detección según la invención sobre electrodo serigrafado.

Figura 2: Voltammogramas obtenidos con el procedimiento según la invención sobre unos electrodos revestidos de (a) el ADN del HCMV ($4 \cdot 10^9$ copias en la solución) y (b) del ADN amplificado del gen ETS2.

Figura 3: Curvas de calibración (S/B, Señal/Ruido) del ADN amplificado del HCMV por varios métodos. Se utiliza una escala logarítmica.

- a-c: hibridación sobre electrodo, con detección colorimétrica (a), o electroquímica (b, c),
- d: hibridación y detección convencional colorimétrica sobre placa de microtitulación
- e: cuantificación del ADN por fluorescencia del BET a partir de una electroforesis sobre gel de agarosa.

Figura 4: Estudio comparativo de la especificidad del procedimiento según la invención, por detección electroquímica (negro), espectrofotométrica (blanco) sobre electrodos, o por el método colorimétrico convencional (gris). Se utilizan unos fragmentos amplificados del gen ETS2, del virus EBV y HCV, y un control positivo y un control negativo del ADN amplificado del HCMV. Escala logarítmica.

Figura 5: Estudio comparativo de la capacidad de detección del ADN amplificado del HCMV en unas muestras humanas (1-10), por el método convencional colorimétrico sobre unas microplacas (blanco) o el procedimiento según la invención (negro). Se ha incluido un control positivo (+) y dos controles negativos (-). Escala logarítmica.

Ejemplos

Ejemplo 1

Extracción del ADN

El ADN del HCMV es extraído a partir de una descendencia celular embrionaria humana de fibroblastos del pulmón MRC5 infectada por la cepa viral AD169, con un estuche comercial de extracción del ADN, según las recomendaciones del fabricante. El experto en la materia conoce esta técnica, y diversos fabricantes proponen unos estuches que permiten una extracción de este tipo. Se ha observado, en particular, que los estuches Invisorb de Invitex o QiaAmpBlood de Qiagen, permiten obtener unos buenos resultados.

Las células son lisadas, adsorbidas sobre sílice y seguidamente lavadas por centrifugación. El ADN es eluido en un tampón apropiado y el soporte es eliminado. El ADN puede ser seguidamente amplificado.

Ejemplo 2

Amplificación del ADN del HCMV por PCR

Se utilizan los iniciadores AC1 (SEC ID nº 1) y AC2 (SEC ID nº 2) que amplifican un fragmento de 406 pares de bases de una región conservada situada en la región HIND III X del genoma US del citomegalovirus (Drouet *et al.* 1993/*Viral Methods*, 45, 259-76).

Se realizan las reacciones de PCR según las técnicas habituales conocidas por el experto en la materia, sobre una matriz de ADN del tipo preparado en el ejemplo 1. Se realizan 35 ciclos que poseen las siguientes características: desnaturalización a 92°C-15 seg. hibridación a 55°C-30 seg., extensión a 72°C-30 seg. La etapa de desnaturalización es de 7 min para el primer ciclo, y se continúa la etapa de extensión del último ciclo con un mantenimiento de la temperatura de 72°C durante 2 minutos adicionales.

ES 2 267 717 T3

Se incluye un control negativo para cada serie de experiencias, que no contiene matriz de ADN.

Ejemplo 3

5 *Cuantificación del ADN y preparación de una gama de concentración del ADN del HCMV amplificado*

Se realizan unas diluciones en serie del ADN amplificado según el ejemplo 2, y se las estudia sobre gel de agarosa con BET, en presencia de una cantidad de ADN calibrada. Se observa por lo tanto que la concentración de ADN amplificado es de 10,5 pmol/ml, lo que corresponde a $6,3 \cdot 10^{12}$ copias/ml.

10

Se prepara una gama (de $6,3 \cdot 10^4$ a $6,3 \cdot 10^{12}$ copias/ml) mediante unas diluciones en serie de la solución concentrada del ADN amplificado, en el control negativo de la PCR.

Ejemplo 4

15

Hibridación sobre unos electrodos y detección electroquímica o colorimétrica

La detección el ADN por el procedimiento según la invención se realiza en cuatro etapas:

20

a. inmovilización del ADN diana

b. hibridación de la sonda marcada

25

c. incubación del conjugado enzimático

d. aporte del sustrato de detección

e. detección voltamétrica o colorimétrica del producto generado por la enzima.

30

Se desnaturalizan 2 μ l de ADN amplificado en un medio alcalino (sosa 0,4 M) a temperatura ambiente, durante 10 min.

35

Se añaden seguidamente 300 μ l de tampón de fijación que contienen 1,5 M de acetato de amonio y se sumergen los electrodos. Se deja incubar a 37°C durante una noche.

Seguidamente se lavan los electrodos con agua destilada, y se les incuba durante 30 min a 37°C en un tampón de hibridación (6 X SSC, 0,1% SDS) que contiene 100 ng/ml de sonda AC3 específica de la secuencia amplificada del HCMV (SEC ID nº 3), biotinilada.

40

Seguidamente se procede a un ciclo de lavado, que consiste en 5 incubaciones de 1 minuto en 500 μ l de solución de lavado preparada en frío (6 X SSC, 1% SDS).

45

Seguidamente se incuban los electrodos durante 15 min a temperatura ambiente, en 100 μ l de tampón (100 mM Tris HCL pH 7,5-50 mM NaCl-5 g/l de leche desnatada) que contiene el conjugado estreptavidina-peroxidasa (1,6 unidades/ml), inmediatamente después se realiza un ciclo de lavado, del tipo descrito anteriormente.

50

Se sumerge entonces el electrodo en 50 μ l de una solución de sustrato OPD (40 mM de ácido cítrico, 150 mM de Na_2HPO_4 , 5 mM, NaCl, 0,02% H_2O_2 , una pastilla de OPD (Argène-Biosoft) en 10 ml de tampón), y se incuba a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min.

El producto hidrosoluble de la reacción, coloreado y electroactivo, 2,2'-diaminoazobenceno es detectado por espectrofotometría de absorción y por voltametría diferencial de impulso (DPV) con la finalidad de comparar los dos métodos.

55

Para la lectura espectrofotométrica, se retiran los electrodos y se realiza la lectura de los pocillos a 492 nm.

60

Para la lectura por DVP, se utiliza un electrodo de Pt como contra electrodo y un electrodo de Ag/AgCl como pseudoelectrodo de referencia. Se utiliza un potencioestado μ -Autolab (de EcoChemie) conectado a una interfase sobre PC, utilizando un sistema lógico GPSE 3 (EcoChemie). Se realiza la DPV con una altura de impulso de 25 mV, una marca de potencial de 5 mV, una duración del impulso de 0,05 seg. y un intervalo entre dos impulsos de 0,5 seg.

65

Para cada serie de experiencias, se incluyen 2 controles negativos (todos los reactivos, pero sin ADN). Así, se dividen los valores ópticos o de corriente por los valores obtenidos para este control, y se considera que las muestras son positivas cuando la relación respuesta/blanco es superior a 2.

Se obtiene los siguientes resultados:

a. *Utilización del procedimiento según la invención para la detección de ADN*

La figura 2 muestra los picos registrados por DPV obtenidos para un electrodo puesto en contacto con el ADN del HCMV amplificado (figura 2a) o por el control negativo (figura 2b). Esta figura muestra sin ambigüedades que el procedimiento según la invención permite detectar el ADN presente en solución, por DPV.

b. *Especificidad y reproductibilidad del procedimiento según la invención*

Con la finalidad de medir la especificidad y la reproductibilidad del procedimiento según la invención, se han comparado los picos obtenidos con 30 electrodos recubiertos, o bien por ADN amplificado del HCMV, o bien por el ADN amplificado de un gen humano ETS2. Siendo la sonda AC3 específica del HCMV, no debe unirse al ADN del gen ETS2. Por lo tanto no habrá reacción enzimática, y por lo tanto, no se deberían observar picos de corriente para el gen ETS2.

Se obtienen los siguientes valores de corriente:

HCMV:	3300 ± 100 nA	(desviación tipo 3%)
ETS2:	61 ± 12 nA	(desviación tipo 19%)

Esto demuestra que el procedimiento es reproducible y que, en el tampón específico de hibridación utilizado, la sonda no se une de forma pasiva a los electrodos, pero se une a las secuencias complementarias ya adsorbidas sobre los electrodos.

c. *Límites de detección del procedimiento según la invención. Comparación con el método colorimétrico*

Se hace variar la concentración del ADN amplificado del HCMV en la gama de 0,1 a 10^6 atomoles ($6,3 \cdot 10^4$ a $6,3 \cdot 10^{11}$ copias/ml). Se utilizan las propiedades del producto generado por la reacción enzimática para comparar los métodos voltamétrico y colorimétrico.

Las figuras 3a y 3b muestran respectivamente las curvas obtenidas con los métodos colorimétrico y electroquímico.

Se realiza también una comparación con otros métodos: colorimetría según el estuche comercial Hybridowl™ (Argène Biosoft) (3d), o densitometría de fluorescencia sobre gel de agarosa (3e).

Se observa que la curva de calibración (3b) del ADN amplificado del HCMV es lineal, en el marco de 50-2000 atomoles ($3 \cdot 10^7$ moléculas de ADN amplificado) lo que permite una detección de aproximadamente 10 veces menos moléculas de ADN que por el método colorimétrico en las mismas condiciones (3a). La sensibilidad del método es de todas maneras muy superior a la fluorescencia sobre gel de agarosa (figura 3e, límite de detección de 14 femtomoles) y es equivalente a los sistemas colorimétricos sobre placas de microtitulación (figura 3d).

Con la finalidad de aumentar la sensibilidad del procedimiento según la invención, se ha reducido el volumen del sustrato OPD aportado para la detección (10 μ l en vez de 50 μ l). La curva obtenida está indicada en la figura 3c, y se observa que el límite de detección es entonces llevado a 0,6 atomoles ($3 \cdot 6 \cdot 10^5$ moléculas de ADN amplificado). Esto es 83 veces más sensible que la técnica colorimétrica sobre placas de microtitulación.

De todas formas en los experimentos siguientes, se conserva el volumen de 50 μ l para la solución de sustrato.

d. *Selectividad, especificidad del procedimiento según la invención*

Se han utilizado diferentes ADN para juzgar la especificidad del procedimiento según la invención. Los resultados son presentados en la figura 4. Se ha realizado una comparación con los otros dos métodos colorimétricos, el descrito en la presente invención, y el método sobre placas de microtitulación. Los ADN utilizados son el ADN amplificado del HCMV y el ADN del gen humano ETS2 y los ADN virales del virus de Epstein-Barr (EBV) o de la hepatitis C (HCV).

Se observa que el método permite una detección específica y selectiva del ADN del HCMV, cuando la sonda específica del ADN es utilizada, lo que confirma que esta sonda no es adsorbida de forma pasiva sobre los electrodos durante la etapa de hibridación.

e. *Caracterización de muestras clínicas*

Se aplica el procedimiento según la invención a 10 muestras de suero humano (4 negativos, 6 positivos, tal como se ha determinado anteriormente por PCR cuantitativo que poseen de 2 a 99 copias/ μ l de ADN del HCMV antes de la amplificación) sobre las que se ha procedido a la amplificación tal como se ha descrito en el ejemplo 2.

Se comparan los resultados obtenidos con el procedimiento según la invención con los obtenidos por el método colorimétrico convencional en unas placas de microtitulación.

ES 2 267 717 T3

La figura 5 muestra que el procedimiento según la invención no da falsos positivos o falsos negativos, los resultados obtenidos para todas las muestras examinadas son conformes a lo esperado.

5 Se observa por otra parte que el procedimiento según la invención es al menos tan sensible como el método colorimétrico convencional, y que, en el caso en que el número de copias iniciales sea bajo, el procedimiento según la invención permite obtener una mejor relación señal/ruido (muestras 5 y 6).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección y/o de dosificación de ácidos nucleicos en una muestra, que comprende las siguientes etapas realizadas en unos pequeños volúmenes comprendidos entre 5 y 50 μ l:
 - a. la fijación de un ácido nucleico por adsorción específica sobre unos electrodos serigrafiados con una tinta a base de carbono,
 - b. la hibridación específica de un ácido nucleico complementario al ácido nucleico fijado, conteniendo dicho ácido nucleico complementario un agente de reconocimiento,
 - c. la adición de un agente complementario al agente de reconocimiento de (b), estando acoplado dicho agente complementario a una enzima,
 - d. la adición de un sustrato de dicha enzima de tal manera que la acción de dicha enzima sobre dicho sustrato lleva a la formación de un compuesto electroactivo que puede ser detectado mediante la medición de la variación de la corriente farádica después de la aplicación de un potencial al electrodo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende una cascada de las reacciones enzimáticas durante la etapa d), antes de la formación del compuesto electroactivo.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque el ácido nucleico de rama simple fijado sobre los electrodos es el ácido nucleico diana.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque comprende además una etapa de amplificación antes de la etapa de fijación del ácido nucleico sobre los electrodos.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la etapa a) de fijación es realizada con un tampón de fijación que contiene 1,5 M de acetato de amonio.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la tinta para la serigrafía contiene una mezcla de carbono y derivados estirénicos.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque la enzima que permite la formación del compuesto electroactivo es una oxidasa.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque la oxidasa es una peroxidasa.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la peroxidasa es la peroxidasa de rábano blanco.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, **caracterizado** porque el sustrato de la peroxidasa es la ortofenilendiamina OPD.
11. Estuche de reactivos para la realización de un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque contiene:
 - a. un tampón de fijación que contiene 1,5 M de acetato de amonio que permite la fijación específica del ácido nucleico sobre unos electrodos serigrafiados con una tinta a base de carbono,
 - b. un tampón de hibridación que permite la hibridación específica del ácido nucleico complementario sobre el ácido nucleico fijado sobre unos electrodos,
 - c. un agente de reconocimiento con la finalidad de marcar el ácido nucleico complementario,
 - d. un agente complementario del agente de reconocimiento (c), acoplado a una enzima, y
 - e. un sustrato de dicha enzima, que lleva a la formación de un compuesto electroactivo que permite una medición de la variación de la corriente farádica de la solución.
12. Procedimiento para la detección de virus en una muestra biológica, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
 - a. una amplificación específica del ADN de la muestra biológica, preferentemente por PCR utilizando unos iniciadores específicos del virus buscado,
 - b. el aislamiento y el análisis del ADN obtenido después de la amplificación por un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o utilizando un estuche según la reivindicación 11.

ES 2 267 717 T3

13. Procedimiento de detección de varios organismos diferentes en una muestra, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas realizadas en unos pequeños volúmenes comprendidos entre 5 y 50 μl :

- a. se realiza una amplificación opcional y la fijación de los ácidos nucleicos diana de dichos organismos diferentes por adsorción específica sobre el electrodo serigrafiado con una tinta a base de carbono,
- b. se realiza una hibridación con unos ácidos nucleicos complementarios a las dianas, estando unido cada uno de ellos a un agente de reconocimiento diferente,
- c. se añaden los agentes complementarios a los agentes de reconocimiento acoplados a unos marcadores enzimáticos diferentes,
- d. se añaden los diferentes sustratos de las enzimas con la finalidad de generar los diferentes compuestos electroactivos,
- e. se mide la corriente farádica correspondiente a los diferentes compuestos electroactivos, en la superficie del electrodo, aplicando el potencial específico de cada compuesto.

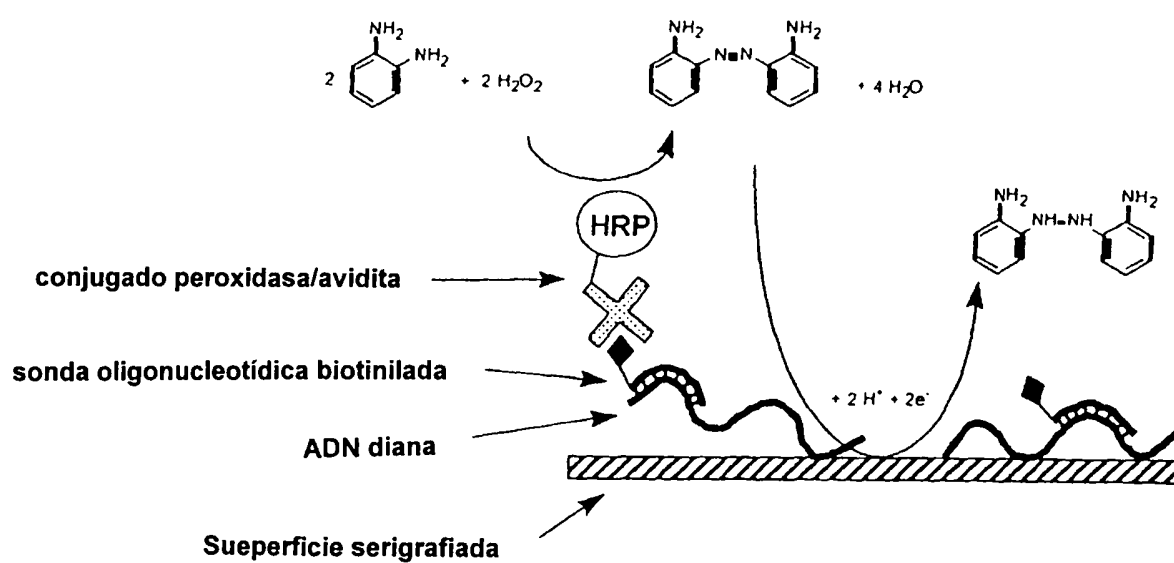
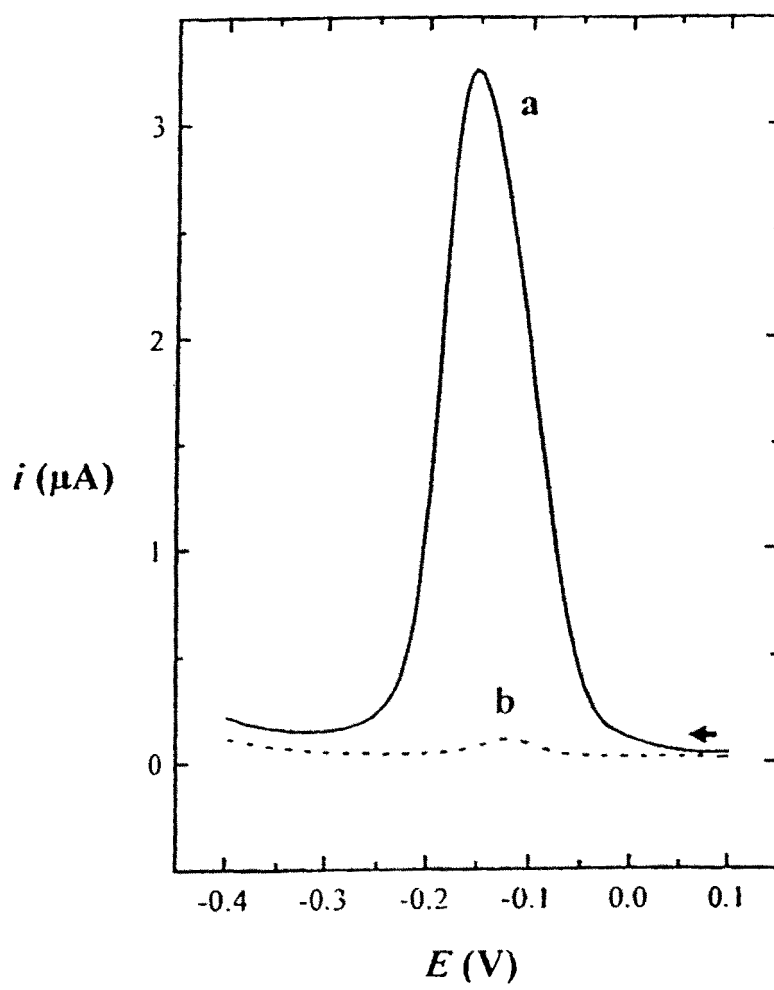


FIG.1

FIG.2

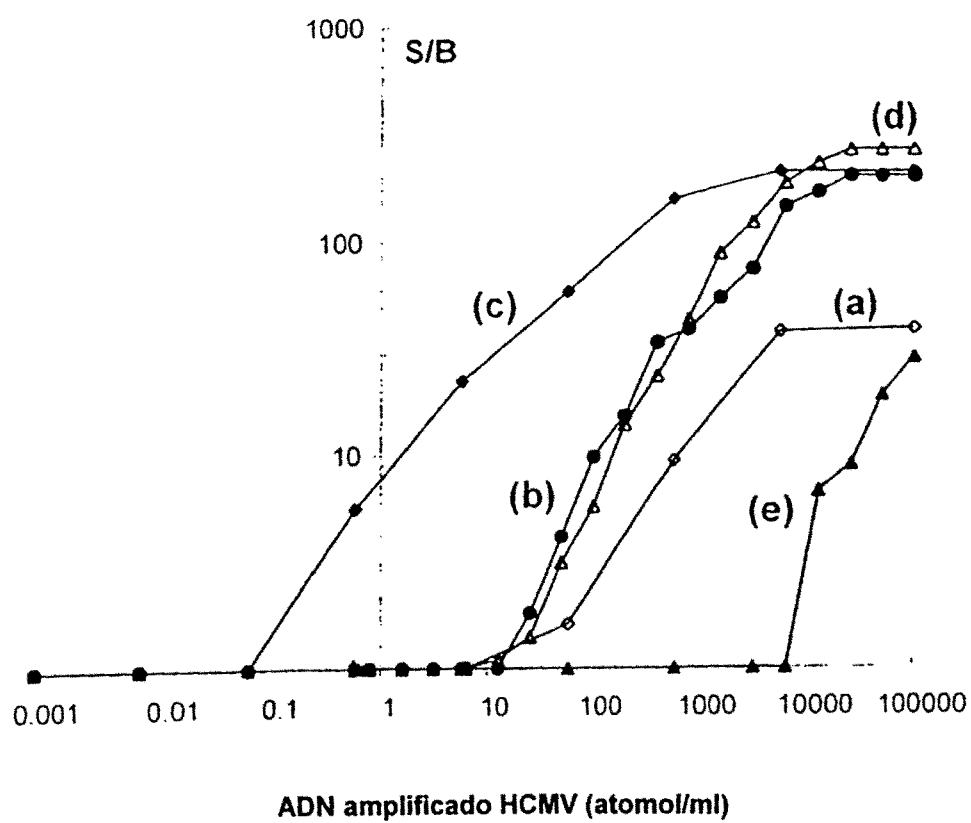


FIG.3

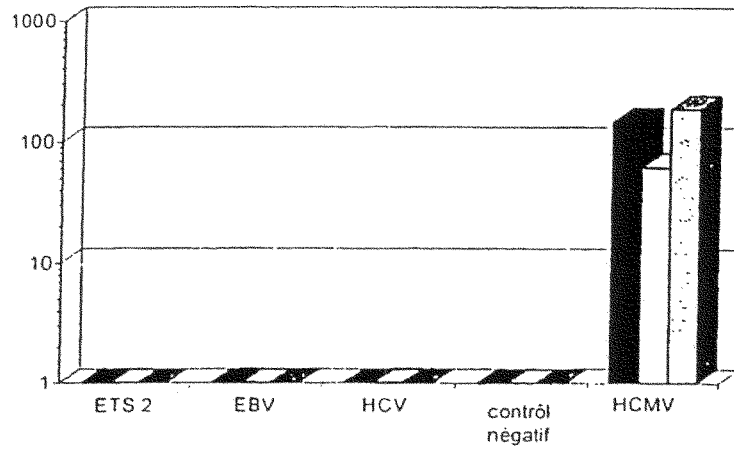


FIG.4

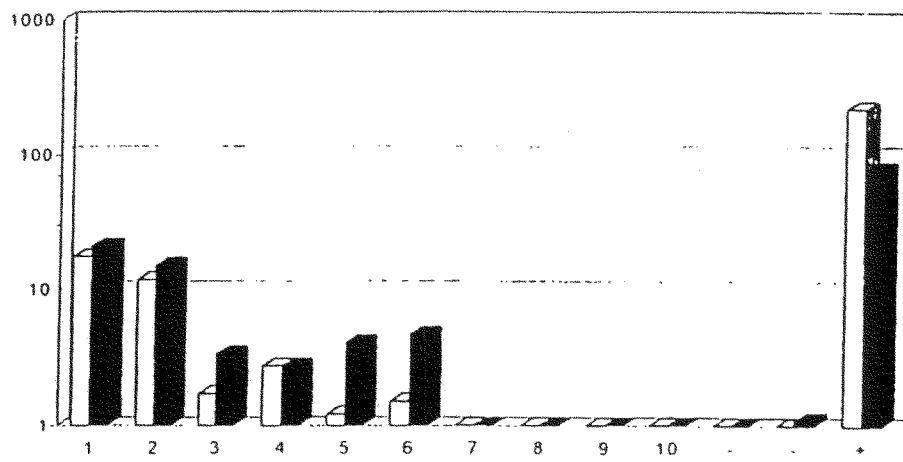


FIG.5

ES 2 267 717 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> ARGENE SA	
5	<120> KIT ELECTROQUÍMICO DE DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS	
	<130> D18496	
	<140> FR 00 02323	
	<141> 2000-02-04	
10	<160> 3	
	<170> PatentIn Ver. 2.2	
15	<210> 1	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> HCMV AD169	
20	<400> 1	
	ggatccgcat ggcattcacg tatgt	25
25	<210> 2	
	<211> 25	
	<212> ADN	
30	<213> HCMV AD169	
	<400> 2	
35	gaattcagtg gataacctgc ggcga	25
	<210> 3	
	<211> 21	
40	<212> ADN	
	<213> HCMV AD169	
45	<400> 3	
	gccaccgcag atagtaagcg c	25
50		
55		
60		
65		