



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 291 475**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

C12N 9/54 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02738990 .7**

86 Fecha de presentación : **14.05.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1404862**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2004**

54 Título: **Proteinasas termoestables de bacterias termofílicas.**

30 Prioridad: **14.05.2001 NZ 511680**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

73 Titular/es: **ZyGEM Corporation Limited
Level One, Core Facilities Building
Waikato Innovation Park, Ruakura Road
Hamilton, NZ**

72 Inventor/es: **Daniel, Roy, McIver y
Saul, David, J.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Proteinasas termoestables de bacterias termofílicas.

5 **Campo técnico**

Esta invención se relaciona con procedimientos mejorados para técnicas de biología molecular. En particular, se prevé el procedimiento que facilitará técnicas de diagnóstico de biología molecular mejorada al suministrar medios para remover la contaminación extraña, así como también simplificar los procedimientos totales.

10 Preferiblemente la contaminación que se remueve como consecuencia de la presente invención incluye proteínas y nucleasas.

Técnica anterior

15 La reacción de cadena de polimerasa (PCR) se ha vuelto rápidamente una de las técnicas más ampliamente utilizadas en biología molecular. Éste es un medio rápido, poco costoso y simple de producir números relativamente grandes de copias de moléculas de ADN (por vía de amplificación enzimática de una secuencia de ácido nucleico de interés específica) desde cantidades diminutas de material fuente, aún cuando la fuente de ácido nucleico sea de 20 calidad relativamente pobre.

Un PCR estándar involucra la preparación de una muestra, la mezcla maestra de reactivos y los cebadores de oligonucleótido, seguidos por la detección y análisis de los productos de reacción.

25 Aunque cualquier protocolo de preparación de ácido nucleico molde es aceptable para los propósitos del PCR, es a menudo mejor utilizar tan pocas etapas como sea posible en la preparación del ácido nucleico con el fin de evitar la reducción del rendimiento y/o la contaminación accidental con ácido nucleico no deseado.

30 Los procedimientos de diagnóstico basados en ácido nucleico en laboratorios comerciales y académicos a menudo requieren extracciones de ácido nucleico provenientes de sustancias naturales. Las aplicaciones varían desde huellas digitales de ADN forense a monitoreo médico, agrícola y ambiental. Es importante que cualquier extracción de ácido nucleico esté libre de contaminación particularmente cuando la concentración del ácido nucleico en la muestra inicial es muy baja y/o cuando la contaminación pueda conducir a resultados incorrectos.

35 Esto es particularmente en el caso de análisis forenses y de evidencia donde las cantidades de material de partida se pueden medir en picogramos o menos. La contaminación de la muestra puede ocurrir simplemente como resultado del tubo de muestra que es abierto a la atmósfera o que es tocado por un técnico.

40 En razón a la facilidad con la cual la muestra se puede contaminar, es un requisito que las técnicas de extracción de ácido nucleico reproducibles estén libres de contaminación y requieran protocolos dirigidos a minimizar tal contaminación.

45 Las técnicas de extracción de ácido nucleico estándar son problemáticas en la medida en que el tubo de muestra pueda requerir abrir y taponamientos en etapas a lo largo del procedimiento de extracción. Sería por lo tanto ventajoso desarrollar un protocolo que posibilite reacciones simples, en tubo cerrado minimizando la probabilidad de contaminación.

50 La tecnología PCR a menudo necesita procedimientos de purificación largos. Estos procedimientos involucran incubaciones largas con proteinasas, fenol y extracciones de cloroformo, y finalmente una precipitación de sal etanólica.

Numerosos métodos se han descrito para la preparación de ácido nucleico proveniente de tejido animal para amplificación por PCR. Un ejemplo típico se describe por Hunt, Parks y Lumley (1997) Food Chemistry Vol 60: 437-442.

55 Típicamente los métodos para extracción de ADN provenientes de una muestra de tejido animal (tal como carne o hueso) contiene las siguientes etapas:

- 1) Resuspensión de la muestra de tejido en un amortiguador que contiene dodecilsulfato de sodio (SDS).
- 60 2) Homogenización.
- 3) Incubación con la enzima proteinasa K durante 1-2 horas.
- 4) Extracción de disolvente de la muestra con fenol.
- 65 5) Extracción de disolvente con una mezcla de fenol/cloroformo/isoamilalcohol.

- 6) Extracción de disolvente con cloroformo.
- 7) Precipitación durante un mínimo de 1 hora en una solución 3M de acetato de sodio y 3 volúmenes de etanol.
- 8) Centrifugación de ADN.
- 9) Lavado del pelmazo 2 veces en etanol.
- 10) Secado al aire y resuspensión del pelmazo en amortiguador.

Los métodos más simples están disponibles para la liberación de ADN proveniente de la sangre. Más comúnmente, se utiliza el producto comercial QuelexTM. Estos métodos suministran rendimientos moderados de ADN al simplemente hervir la muestra en la presencia de este agente.

Sin embargo, para remover la inhibición del PCR, los científicos forenses prelavan rutinariamente y centrifugan las células de sangre para lisar las células rojas y remover el pigmento que contiene hierro. Esto necesita una etapa adicional y una fuente de contaminación al procedimiento y da como resultado la pérdida de rendimiento con muestras de sangre degradada o ambientalmente comprometidas (típicamente muestras de escenas de crimen).

El solicitante ha conducido experimentos que muestran la extracción de ácido nucleico que utilizando nuevas proteinasas remueven esta inhibición, eliminado así la necesidad de esta etapa y dando como resultado un potencial reducido de contaminación de muestras y un rendimiento mejorado.

Otras técnicas estándar utilizadas en biología molecular también pueden beneficiarse de reacciones de tubo simple, cerradas, por ejemplo la remoción de enzimas de restricción y fosfatasas que no son lábiles al calor y requieren extracciones de fenol/cloroformo que consumen tiempo, precipitaciones de sal etanólica, y etapas de lavado para purificar la muestra. No se hace admisión de que cualquier referencia constituya técnica anterior. La discusión de las referencias establece que sus autores aseveran, y los solicitantes se reservan el derecho a controvertir la precisión y pertinencia de los citados documentos. Se entenderá claramente que, aunque un número de publicaciones de la técnica anterior se relacionan aquí, esta referencia no constituye una admisión de que cualquiera de estos documentos forma parte del conocimiento general común en la técnica, en Nueva Zelanda o en cualquier otro país.

Se reconoce que el término "comprende" puede, bajo varias jurisdicciones, serle atribuido un significado exclusivo o inclusivo. Para el propósito de esta especificación, y a menos que se note otra cosa, el término "comprende" debe tener un significado inclusivo - es decir, que se tomará para significar una inclusión de no solamente los componentes listados que éste directamente referencia, sino también otros componentes o elementos no especificados. Este raciocinio también será utilizado con el término "comprendidos" o "que comprende" que se utiliza en relación con una o más etapas en un método o proceso.

Es un objeto de la presente invención manejar los problemas anteriores o por lo menos proveer al público con una elección útil.

Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes de la descripción que sigue la cual es dada solamente por vía de ejemplo.

Descripción de la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención se suministra un método para la preparación de muestras de ácido nucleico en un sistema cerrado, que incluye las etapas de:

- i) agregar proteinasa termofílica de *Bacillus* EA1 a una muestra que contiene ácido nucleico, en donde la proteinasa digiere la proteína en la muestra y es capaz de auto-catalizarse en o por encima de 90°C;
- ii) cerrar el sistema;
- iii) incubar dicha muestra durante un período a 65-80°C como se requiera para efectuar una o más de las lisis de las células, la digestión de proteínas, y la digestión de enzimas de pared celular, por vía de actividad de dicha proteinasa termofílica; y
- iv) incubar la muestra en o por encima de 90°C para efectuar la auto-catálisis de la proteinasa termofílica;

en donde la proteína y la proteinasa son desnaturalizadas en un sistema cerrado sin la adición de agentes desnaturizantes adicionales,

Para facilidad de referencia a lo largo de la especificación, el término "ácido nucleico" se referirá aquí a un ADN. Sin embargo, esto no debe ser visto como una limitación para el método que también podría ser Utilizado para la preparación de muestras de ARN.

ES 2 291 475 T3

Para el caso de referencia a lo largo de la especificación, la enzima de proteinasa termofílica de EA1 se denominará aquí como una proteinasa.

5 La temperatura de incubación preferida requerida para efectuar una o más de las lisis de las células, digestión de proteínas, digestión de enzimas de pared celular, por vía de actividad de proteinasa es 75°C.

La temperatura de incubación preferida requerida para efectuar la autólisis y/o la desnaturalización de la proteinasa es 94°C.

10 Sin embargo, se debe apreciar que estas temperaturas se dan solo por vía de ejemplo y no significan ser de ninguna manera limitantes.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se suministra un método para la preparación de muestras de ácido nucleico sustancialmente como se describieron anteriormente, dicho método incluye las etapas iniciales de:

15 Agregar por lo menos una enzima mesofílica con la proteinasa termofílica *Bacillus* EA1 a la muestra, y en donde antes de la incubación a 65-80°C la muestra se incuba durante un período por debajo de 40°C según se requiera para efectuar la remoción de cualquiera de las paredes celulares por vía de actividad de dicha por lo menos una enzima mesofílica.

20 En modalidades preferidas la enzima mesofílica es una celulasa u otra enzima degradante de la pared celular.

La temperatura de incubación inicial preferida requerida para efectuar la remoción de cualquiera de las paredes celulares por vía de la actividad de dicha enzima mesofílica es 37°C. Una vez de nuevo, esto no se debe ver como una limitación de ninguna manera.

30 Las enzimas proteolíticas derivadas tanto de los organismos mesofílicos como moderadamente termofílicos son consideradas de gran importancia económica, con las proteinasas microbianas tomando un gran mercado compartido de enzimas comerciales. La estabilidad térmica de las enzimas derivadas de organismos termofílicos asegura que tales enzimas tengan un número de aplicaciones potenciales. Un número de micro-organismos termofílicos que producen proteinasas extracelulares que tienen aplicaciones comerciales, en razón de su alta estabilidad intrínseca a ambientes extremos, han sido el foco de esta invención.

35 La proteinasa EA1 es un miembro del grupo 5 16S rARN de *Bacillus* (que incluye *B. stearothermophilus*), aislado del Monte Erebus, Antártica. La termoestabilidad de la proteinasa del EA1 se presta a sí mismo para utilizarse en el presente procedimiento.

La purificación, caracterización y secuencias genéticas del EA1 se ha publicado previamente y el lector se le sugiere la siguiente referencia:

40 Saul DJ *et al.* Sequence of the gene encoding a highly thermostable neutral proteinase from *Bacillus*. sp. strain EA1: expression in *Escherichia coli* and characterisation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1996. 1308 (J):74-80.

Los requisitos para una proteinasa en esta invención son que:

- 45
- 1) sea sustancialmente activa árida estable en el rango de 65-80°C.
 - 2) sea capaz de autolisarse fácilmente y/o desnaturalizarse en o por encima de 90°C, y opcionalmente
 - 50 3) tenga un perfil de actividad de temperatura tal que ésta tenga una actividad baja por debajo de 40°C (acompañando así las enzimas mesofílicas, por ejemplo celulasa, que no se degraden).

55 La proteinasa Rt41A es una alcalina proteinasa termoestable que es conocida comercialmente como PreTaq™, que es utilizada para la preparación de ADN y mRNA antes de la amplificación por PCR. El PreTaq™ - *Thermus* sp. str. Sepa Rt41A es una proteinasa de serina dependiente de Ca²⁺. El Rt41A es una especie de los grupos de la familia de las especies *Thermus* hasta ahora encontrada en Nueva Zelanda.

60 Los protocolos de extracción de ADN estándar involucran muestras de incubación con Proteinasa K, originando la lisis de células a temperaturas donde las enzimas deletéreas que se liberan de las células son activas de tal forma que pueden degradar una muestra de ADN.

El uso de proteinasas termofílicas permiten que la extracción de ADN y la lisis celular sea llevada a cabo a temperaturas donde estas enzimas deletéreas están inactivas, preservando así el ADN.

65 El PreTaq™ está comercialmente disponible como una alternativa termoestable a la Proteinasa K para limpiar el ADN sin degradación.

Sin embargo, el perfil de temperatura-actividad del PreTaq™ no es ideal en razón a que éste permanece activo y no es removido fácilmente a altas temperaturas, y volviéndose así en si mismo un contaminante. La proteinasa EA1 se ha identificado por los solicitantes como proteinasas dependientes de Ca^{2+} termoestables alternativas que son más fáciles de remover a temperaturas altas.

En la proteinasa termoestable de la modalidad preferida, se agrega al tubo de muestra. El tubo de muestra es luego incubado y sometido a un cambio de temperatura. Luego del cambio de temperatura, ocurre la degradación de la proteína.

El procedimiento opera a 65-80°C en la medida en que estas enzimas son altamente activas entre estas temperaturas. A esta temperatura, las células son lisadas y las proteinasas degradan cualquier proteína contaminante. En particular, ellas remueven rápidamente las nucleasas que degradan el ADN a temperaturas donde estas nucleasas están inactivas, minimizando de esta manera la degradación de ADN de la muestra.

La presente invención se ha dirigido al desarrollo de un protocolo mejorado utilizando una proteinasa termofílica para extraer el ADN proveniente de un rango de sustancias en una reacción de tubo cerrada simple.

El desarrollo de un sistema de tubo cerrado, simple tiene muchas ventajas sobre la técnica anterior. Los procedimientos de extracción de ADN habituales son largos, requieren el uso de un número de químicos tóxicos tales como fenol; y numerosas etapas que requieren la abertura y cierre de tubos que permiten que ocurra la contaminación fácilmente.

El sistema de tubo cerrado de la presente invención permite la extracción de ADN sustancialmente libre de contaminación y con un alto rendimiento, que se puede utilizar sin las etapas de purificación largas en un amplio rango de técnicas de diagnóstico.

El procedimiento de la presente invención confía en que la proteinasa y/o la proteinaza/pared celular degraden el cocktail de enzimas que tienen diferentes actividades a diferentes temperaturas. Al ciclarse a través de temperaturas variables, las actividades de diferentes enzimas se pueden poner en juego sin necesidad de abrir tunos y agregar nuevos reactivos.

Los nuevos procedimientos se dirigen a purificar el ácido nucleico al requerir que el tubo solo sea abierto para agregar la muestra inicialmente y luego posteriormente abrirla para la prueba. De acuerdo con esto, el procedimiento es más rápido y no es propenso a la introducción de contaminantes tal como los protocolos previamente utilizados.

El presente método está dirigido así a mejorar las técnicas de diagnóstico estándares de biología molecular, tal como el PCR, y minimizar la contaminación de las muestras como resultado de abrir y taponar los tubos de muestra.

Para las aplicaciones basadas en PCR, las proteinasas se pueden remover posteriormente al calentar las muestras a 90°C o por encima, lo que da como resultado una auto-catálisis rápida (auto-digestión o desnaturalización). Los amortiguadores de reacción también son similares a aquellos más comúnmente utilizados en la reacción de cadena de polimerasa (PCR). Estos dos factores remueven la necesidad de la extracción de fenol/cloroformo y las etapas de precipitación de sal etanólica de los protocolos habituales, resultando de esta manera en mejoras significativas en el rendimiento del ADN y en un riesgo más reducido de contaminación o exposición a químicos tóxicos.

Para las aplicaciones que requieran digestión de ADN a temperatura baja (por ejemplo, digestión de enzima de restricción de ADN), las proteinasas no necesitan ser removidas en la medida en que ellas tengan una actividad muy baja a 37°C. De acuerdo con esto, las hacen ideales para otras técnicas de diagnóstico tal como la preparación de tarugos para electroforesis de gel de campo de pulso, donde de otra manera se requiere el lavado extensivo para remover la Proteinasa K.

Las proteinasas también permiten que ADN digerido de restricción sea utilizado para el ligamento de ADN sin protocolos de purificación largos para remover las enzimas de restricción. Después de la incubación a 37°C, los tubos de muestra se pueden calentar a 65-80°C para permitir a las proteinasas remover las enzimas de restricción. Estas temperaturas no desnaturalizan el ADN. Luego de esta incubación las muestras se enfrían para las reacciones de ligación de baja temperatura, las cuales se llevan a cabo a temperatura ambiente o por debajo.

En la medida en que las proteinasas termofílicas tengan muy baja actividad a bajas temperaturas, ellas no necesitan ser removidas.

Donde las reacciones multi-etapa o multi-enzima se requieran, las proteinasas se pueden utilizar en una mezcla de enzima. En la medida en que hay tan baja actividad por debajo de 40°C, otras reacciones de enzima son posibles de ocurrir en la presencia de las proteinasas. Las mezclas de las enzimas mesofílicas activas a temperaturas más bajas y una de las proteinasas anteriormente mencionadas se puede utilizar para debilitar y/o remover las paredes celulares de las plantas y tejido fungoso y bacteriano, esporas y biopelículas antes de continuar con el procedimiento de extracción de ADN de tubo cerrado de la presente invención.

Esta invención también se presta en si misma al desarrollo de un conjunto de protocolos y formulaciones de kit para que la extracción de ADN solucione los problemas experimentados con las estrategias de extracción de ADN habitualmente empleadas, las cuales son consumidoras de tiempo, ineficientes y propensas a contaminación.

Un ejemplo de esto es el rango de los productos Whatman FTA®. Estos productos son herramientas relativamente nuevas en los análisis de ADN forenses, que contienen desnaturalizantes de proteína, agentes quelantes y una trampa de radical libre diseñada para proteger y atrapar el ácido nucleico. En aplicaciones forenses, las tarjetas FTA® son las más comúnmente utilizadas para la recolección de muestras de referencia tales como sangre. El ADN en la muestra se une al sustrato de FTA® aunque otros materiales en la muestra (inhibidores tales como pigmentos que contienen hierro) se remueven mediante una serie de etapas de lavado.

Una ventaja principal de las tarjetas FTA® es su adecuabilidad a la automatización, en razón a que todas las etapas en el proceso se pueden llevar a cabo en un tubo simple utilizando robots. Sin embargo, aunque las tarjetas son efectivas para su uso pretendido, las etapas de lavado recomendadas son consumidoras de tiempo e involucran aberturas múltiples de tubo, incrementando el riesgo de contaminación.

Al utilizar la proteasa EA1, los protocolos anteriormente mencionados no requieren etapas de lavado y así las enzimas son probadas por eficacia con extracción de ADN proveniente de las muestras de la tarjeta FTA®.

La extracción utilizando la proteasa EA1 se encontró que es efectiva y más simple que los procedimientos recomendados. Además, parece normalizarse la cantidad de ADN unido a la tarjeta y de esta manera suministra una fuente más controlada de molde a la posterior amplificación de PCR.

Como resultado de esta normalización, la variación entre los perfiles se reduce significativamente cuando se comparan los perfiles utilizando los procedimientos del fabricante. Las etapas de calentamiento en el proceso de extracción EA1 parecen remover el ADN de exceso no adherido a la tarjeta, dejando solamente moléculas estrechamente unidas.

Esta conclusión es soportada por las mediciones del rendimiento del ADN producido por el sistema EA1. La extracción EA1 da un rendimiento promedio inferior que aquel obtenido utilizando el método del fabricante, pero más significativamente, produce rendimientos con una variación reducida. Como resultado de este efecto, se obtienen unos perfiles STR más consistentes y se rechazan más pocos perfiles debido a la altura de pico inconsistente.

Aunque la presente invención está dirigida al uso de enzimas mesofílicas y termofílicas preferidas para uso en técnicas PCR mejoradas en particular, se debe apreciar que la presente invención puede tener aplicaciones para un rango de técnicas de diagnóstico de ADN donde la limpieza del ADN para remover los contaminantes es particularmente benéfica, o para técnicas de diagnóstico donde la presente invención se pueda adaptar para lograr un resultado benéfico similar.

De acuerdo con esto, esta invención está dirigida al desarrollo de proteinasas mejoradas y en la investigación para el uso de tales enzimas en técnicas de diagnóstico de biología molecular.

Breve descripción de los dibujos

Aspectos adicionales de la presente invención serán evidentes de la siguiente descripción, dada por vía de ejemplo solamente y con referencia a los dibujos que la acompañan en los cuales:

La Figura 1 es una comparación de las etapas involucradas en la extracción de ADN que utiliza un protocolo estándar y el nuevo protocolo que utiliza proteinasas de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención;

La Figura 2 es una representación diagramática de las actividades que ocurren a diferentes temperaturas que utilizan un nuevo protocolo de extracción de ADN de acuerdo con una modalidad preferida de la presente invención.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Con referencia a las figuras por vía solamente de ejemplo, se suministra un método para la preparación de muestras de ADN para reacción de cadena de polimerasa que remueve las proteínas y los inhibidores contaminantes de las muestras, y suministra una alternativa a los procedimientos existentes.

La figura 1 ilustra la diferencia en el número de etapas, tiempo tomado y probabilidad de introducción de contaminantes entre los protocolos estándar y el protocolo mejorado de la presente invención.

El método de la presente invención también incluye preferiblemente la adición de por lo menos una enzima mesofílica y por lo menos una enzima termofílica no específica a una muestra que contiene ADN para ensayo y amplificación por vía de PCR.

La muestra es luego incubada durante un período preferido a 37°C para efectuar la remoción de cualquiera de las paredes celulares por vía de actividad de las enzimas mesofílicas.

ES 2 291 475 T3

La temperatura se incrementa entonces a 75°C según se requiera para efectuar una o más de lisis de las células, digestión de proteínas, digestión de las enzimas de la pared celular, por vía de actividad de las enzimas termofílicas, en donde dichas enzimas son proteinasas.

Un incremento adicional en la temperatura a 94°C efectúa la auto-digestión y/o desnaturalización de las proteinasas termofílicas.

Ciclar los tubos sellados desde 37-75-94°C se degradará primero cualquiera de las paredes celulares o las capas protectoras, luego degradará las enzimas mesofílicas y finalmente degradará o desnaturalizará las proteinasas termofílicas.

El procedimiento confía en las proteinasas o el cóctel de enzimas que degradan la proteína/pared celular que tienen actividades diferenciales a temperaturas diferentes. Al ciclarse a través de temperaturas variables, diferentes actividades de enzima se pueden poner en juego sin la necesidad de abrir los tubos y agregar nuevos reactivos.

De acuerdo con esto, el procedimiento es rápido y no es propenso a la introducción de contaminantes como son los protocolos previamente utilizados.

El método preferido se caracteriza por el uso de proteinasas termofílicas las cuales son sustancialmente estables y activas a 75°C pero que son fácilmente autolisadas y/o desnaturalizadas cuando dicha muestra se incuba a 94°C.

Las proteinasas termofílicas seleccionadas para uso con la presente invención incluyen una proteinasa derivada de *Bacillus sp.* que incluye *Bacillus sp.* str. EA1, que es una proteinasa neutra.

En un procedimiento estándar para uso con tejido animal, los reactivos serían primero agregados sobre hielo para asegurar la degradación mínima del ADN. Los tubos de muestra serían entonces cambiados a 75°C donde las células se lisan y las proteínas se desnaturalizan y son digeridas por proteinasas termofílicas. Existe una degradación de ADN mínima que ocurra en esta etapa por las nucleasas endógenas. Los tubos son cambiados a 94°C donde la proteinasa termofílica se auto-digiere y/o desnaturaliza.

Un procedimiento modificado de acuerdo con una modalidad de la presente invención se presenta en la Figura 2 donde las enzimas alternativas se requieren para degradar las paredes celulares (particularmente útiles para plantación y extracciones de hongos), como sigue:

a) Los tubos se cambian a 37°C y las paredes celulares se remueven con enzimas mesofílicas. Las proteinasas termofílicas están inactivas a esta temperatura y por lo tanto no degradan las enzimas de la pared celular.

b) Los tubos de muestra son entonces transferidos a 75°C donde las células se lisan y las proteínas y las enzimas de las paredes celulares se digieren por las proteinasas termofílicas.

c) Los tubos son entonces transferidos a 94°C donde las proteinasas se auto digieren.

De acuerdo con esto, el presente método está dirigido a mejorar las técnicas de diagnóstico de biología molecular estándar, tal como el PCR, y minimizar la contaminación de las muestras como resultado de la apertura y taponado de los tubos de muestra.

Los nuevos procedimientos están dirigidos a purificar el ácido nucleico al requerir que el tubo solamente se abra para agregar la muestra inicialmente y luego posteriormente se abra para PCR.

La proteinasa descrita (EA1) es desestabilizada por los quelantes y es intrínsecamente menos estable y por lo tanto más fácil de remover al extremo del tratamiento comparado con las enzimas termofílicas previamente utilizadas.

La presente invención también evita la degradación no deseada de la muestra de ácido nucleico por medio de las enzimas celulares luego de la lisis celular, como la etapa de lisis se puede llevar a cabo a 75°C donde estas enzimas están inactivas. Esta es una mejora significativa sobre los métodos habituales que utilizan Proteinasa k a temperaturas inferiores, donde la degradación del ácido nucleico no se puede evitar.

La enzima es cuidadosamente seleccionada para ser activa a temperatura alta pero puede ser aún muerta en el extremo del procedimiento con la actividad de enzima estando detenida con mayor seguridad. Es esencial para inactivar esta enzima o que ésta pueda potencialmente atacar la enzima que lleva a cabo la reacción PCR. La proteinasa preferida se deriva de *Bacillus* como se mencionó previamente siendo EA1.

Esta invención demuestra la posibilidad para uso de un rango de proteinasas termofílicas, en aplicaciones basadas en ácido nucleico, particularmente para métodos más rápidos y simplificados para la preparación de muestras de ADN.

Los aspectos de la presente invención se han descrito por vía de ejemplo solamente y se debe apreciar que las modificaciones y las adiciones se pueden hacer a ésta sin apartarse del alcance de ésta como se define en las reivindicaciones finales.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de muestras de ácido nucleico en un sistema cerrado, que incluye las etapas de:

- i. Agregar proteinasa termofílica de *Bacillus* EA1 a una muestra que contiene ácido nucleico, en donde la proteinasa digiere la proteína en la muestra y es capaz de auto-catálisis en o por encima de 90°C;
- ii. Cerrar el sistema:
- iii. Incubar dicha muestra durante un período a 65-80°C según se requiera para efectuar una o más de las lisis de las células, la digestión de proteínas, y la digestión de las enzimas de pared celular, por vía de la actividad de dicha proteinasa termofílica; y
- iv. Incubar la muestra en o por encima de 90°C para efectuar la auto-catálisis de la proteinasa termofílica.

En donde la proteína y la proteinasa son desnaturalizadas en un sistema cerrado sin la adición de agentes desnaturizantes adicionales.

2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1 en donde la muestra se incuba durante un total de 45 minutos o menos.

3. Un método como se reivindica en la reivindicación 1 o 2 en donde la temperatura de incubación requerida para efectuar una o más de las lisis de células, digestión de proteínas, y digestión de enzimas de pared celular es 75°C.

4. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la muestra se incuba a 94°C para efectuar la auto-catálisis de la proteinasa termofílica.

5. Un método como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que incluye una etapa inicial de agregar por lo menos una enzima mesofílica con la proteinasa termofílica del *Bacillus* EA1 a la muestra, y en donde antes de la incubación a 65-80°C la muestra se incuba durante un período por debajo de 40°C según se requiera para efectuar la remoción de cualquiera de las paredes celulares por vía de actividad de dicha por lo menos una enzima mesofílica.

6. Un método como se reivindica en la reivindicación 5 en donde dicha por lo menos una enzima mesofílica es una celulasa.

7. Un método como se reivindica en la reivindicación 5 o reivindicación 6 en donde la temperatura de incubación inicial requerida para efectuar la remoción de cualquiera de las paredes celulares es 37°C.

8. Un método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende además desarrollar una reacción de cadena de polimerasa (PCR).

9. Una mezcla multi-enzima que incluye por lo menos proteinasa termofílica de *Bacillus* EA1 y por lo menos una enzima mesofílica, en donde por lo menos la enzima mesofílica es activa a temperaturas por debajo de 40°C según se requiera para debilitar y/o remover las paredes celulares de una planta y tejido fungoso y bacteriano, esporas, y biopelículas antes de la extracción de ácido nucleico.

10. Una mezcla multi-enzima como se reivindica en la reivindicación 9 en donde dicha por lo menos una enzima mesofílica es una celulasa.

11. Un kit que incluye un volumen unitario de proteinasa termofílica de *Bacillus* EA1, e instrucciones y significados para la preparación de las muestras de ácido nucleico en un sistema cerrado, y un volumen unitario de por lo menos una enzima mesofílica.

12. Un kit como se reivindica en la reivindicación 11 en el cual dicha por lo menos una enzima mesofílica y dicha proteinasa termofílica están presentes en una mezcla multi-enzima.

Figura 1

Es una comparación de las etapas involucradas con la extracción de ADN utilizando un protocolo estándar y las nuevas proteinasas

PROTOCOLO ACTUAL	PROTOCOLO NUEVO
➔ Adición de Detergente + Proteinasa k Incubación ➔ Extracción de Fenol ➔ Extracción de Cloroformo ➔ Precipitación de Alcohol ➔ Lavadas de Alcohol ➔ Secado al Aire ➔ Resuspensión en Amortiguador Tiempo aproximado = 3-4 horas	➔ Adición de Proteinasa termoestable Incubación Cambio de temperatura Tiempo aproximado = 45 min máximo ➔ Dilución
➔ ■ El tubo se abre en este punto proporcionando así una fuente de contaminación	

Figura 2

