



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 291 199**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/10** (2006.01)  
**C12N 1/06** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00922263 .9**  
86 Fecha de presentación : **14.04.2000**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1177420**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.02.2002**

54 Título: **Medio cubierto por FTA para uso como herramienta de diagnóstico molecular.**

30 Prioridad: **14.04.1999 US 129191 P**  
**04.02.2000 US 180353 P**  
**31.03.2000 US 193556 P**

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: **Whatman, Inc.**  
**200 Park Avenue, Suite 210**  
**Florham Park, New Jersey, US**

72 Inventor/es: **Fomovskaia, Galina;**  
**Smith, Martin, Alexander;**  
**Davis, James, Critser y**  
**Jones, Kevin**

74 Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 291 199 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

Medio cubierto por FTA para uso como herramienta de diagnóstico molecular.

5 **Contexto de la invención****Campo técnico**

La presente invención hace referencia a un aparato, medio, y método para evaluación de ADN.

10

**Técnica de contexto**

El genotipo es la disciplina basada en la identificación de un genoma de un individuo en relación con alelos y/o mutaciones específicas de enfermedades que se dan como un efecto de vínculo de los padres. La rápida purificación del ADN genómico es una parte esencial del proceso de genotipo; el ADN genómico de un individuo estando expresada la unidad para toda la secuencia de ADN de cada alelo.

15

El ADN genómico humano no puede secuenciarse directamente. Con el fin de llevar a cabo el análisis secuencial en regiones de los cromosomas que pueden contener porciones de mutaciones o secuencias específicas de enfermedades, las porciones seleccionadas se amplían por medio de PCR y de este modo los productos ampliados se secuencian. Las porciones seleccionadas de los cromosomas que se han ampliado se dictan por la secuencia específica de los cebos usados en la ampliación PCR. Los grupos de cebos que se emplean en los estudios de genotipo están disponibles en el mercado y son representantes del cromosoma que se encuentra sometido a examen. Si los estudios de vínculos identifican que una enfermedad que está soportando secuencia se encuentra en un cromosoma particular, entonces se emplearán muchos grupos de cebos a lo largo de ese cromosoma para obtener el material genético a secuenciar. Los productos PCR resultantes pueden representar de manera correcta el cromosoma completo sometido a examen. Debido a la gran longitud de cromosomas, muchas reacciones de PCR se llevan a cabo sobre la plantilla del ADN genómico de un solo paciente.

20

25

El ADN genómico humano se purifica mediante una gran variedad de métodos (Molecular Cloning, Sambrook *et al.* (1989)). Como consecuencia, muchos fabricantes de kits o equipos comerciales proporcionan productos para tales técnicas, como por ejemplo: AmpReady™ (Promega, Madison, Wisconsin), DNeasy™ (Qiagen, Valencia, California), y Split Record™ (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Indiana). Estos productos se basan en el uso de matrices especializadas o sistemas búfer para el rápido aislamiento de la molécula ADN genómico.

30

Más recientemente, han aparecido técnicas basadas en el filtro microporoso como herramientas para la purificación de ADN genómico así como una gran multitud de ácidos nucleicos. La ventaja de matrices basadas en filtros es que pueden crearse en varios formatos que incluyen tubos, tubos de giro, láminas y placas con microporos. Las membranas de filtro microporoso como matrices de soporte de purificación tienen ventajas añadidas en la técnica. Proporcionan un sistema compacto y sencillo de manipular que permite la captura de la molécula deseada y la retirada de los componentes no deseados en una fase de fluido con un elevado rendimiento y tiempos de proceso más rápidos que los posibles con la cromatografía de columna. Esto se debe a las rápidas tasas de difusión sobre las membranas con filtro.

35

Los ácidos nucleicos transferidos a las membranas mediante transferencia Southern y después calentados en las mismas pueden detectarse empleando polietileneimina conjugada con enzima que actúa como una sonda etiquetada (Matsuhisa A *et al.* (1994) J. Biochem; 116(3):478-81.

40

Las moléculas de ácido nucleico se han capturado en las membranas con filtro, generalmente bien mediante simple adsorción o mediante una reacción química entre grupos reactivos complementarios presentes en la membrana con filtro o en un ligando enlazado al filtro que resulta de la formación de un enlace covalente entre el ligando y el ácido nucleico deseado.

45

Los materiales de la membrana con filtro poroso usados para inmovilización de ácido nucleico no covalente han incluido materiales tales como nylon, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno hidrofóbico (PVDF), y microfibra de cristal. También se han desarrollado un número de métodos y reagentes que también permiten el enlace directo de ácidos nucleicos en soportes sólidos, como oligonucleótidos y cebos (por ejemplo, J. M. Coull *et al.*, Tetrahedron Lett. Vol. 27, page 3991; B. A. Conolly, Nucleic Acids Res., vol. 15, page 3131, 1987; B. A. Conolly y P. Rider, Nucleic Acids Res., vol. 12, page 4485, 1985; Yang *et al.* P.N.A.S. Vol. 95: 5462-5467). UV cross-linking of DNA (Church *et al.*, PNAS, vol. 81, page 1991, 1984). También se ha escrito sobre el Kit de Columna para la Captura de Generación (Gentra Systems, Minneapolis, MN) y de ARN (Khandjian, *et al.*, Anal. Biochem, Vol. 159, pages 227, 1986) a las membranas de nylon.

50

55

Se han utilizado muchos métodos químicos para la inmovilización de moléculas como ácidos nucleicos en membranas con filtro. Por ejemplo, papel activado (TransBind. TM, Schleicher & Schuell Ltd. Keene, N.H), membrana PVDF cubierta por hidrogel y activada por carbodimidazola (Immobilin-IAV.TM, Millipore Corp. Bedford, Mass.), papel MAP (Amersham, Littlechalfon Bucks, Wisconsin), nylon activado (BioDyne.TM, Pall Corp., (Glen Cove, N.Y), DVS- y nitrocelulosa activada con bromuro y cianogen. Las membranas unidas a ligandos específicos son también conocidos como la Membrana de Captura Biotina SAM2TM (Promega) que se enlaza con moléculas biotinilizadas

60

## ES 2 291 199 T3

en base a su afinidad con estreptavidina o sistema de membrana de afinidad MAC (proteína A/G) (Amico, Bedford, Massachussets). Algunas de las desventajas de unión covalentes de biomoléculas en membranas activadas son:

- 5 a) La inmovilización de molécula a menudo es lenta y requiere 20-180 minutos para la finalización de la reacción.
- b) Se necesita una concentración elevada de ligando y biomolécula para una inmovilización rápida.
- 10 c) Se necesita una agitación constante durante el proceso de inmovilización que pueden dar como resultado la desnaturalización y desactivación molecular.
- d) Una vez que el proceso de inmovilización se ha completado, a menudo se requiere un paso de bloqueo (tapón) para retirar la capacidad de enlace covalente residual.
- 15 e) Las moléculas enlazadas covalentemente no se pueden recuperar de la membrana con filtro.

Existe una necesidad en varias áreas específicas, tales como la medicina forense, de un medio y proceso de inmovilización de ácido nucleico que muestre la elevada especificidad de inmovilización covalente en la membrana con filtro sin el uso de reacciones químicas severas y largos tiempos de incubación, que también pueda emplearse en escenas del crimen, con archivos de muestras de sangre y otros usos relacionados. En particular, existe una necesidad por la captura y separación de ácidos nucleicos de una mezcla en una fase fluida en una matriz de membrana con filtro en medicina forense. De especial interés resulta la habilidad para almacenar y archivar los ácidos nucleicos enlazados sobre la matriz de membrana con filtro para tales usos.

25 Más recientemente, la microfibras de cristal ha demostrado que puede enlazarse específicamente con ácidos nucleico de una variedad de ácidos nucleicos que contienen fuentes de manera muy efectiva (por ejemplo ver: Itoh *et al* (1997) Preparación simple y rápida de preparación de plantillas de plásmida mediante método de filtración usando placas de filtro microtítulo. NAR, vol. 25, No. 6: 1315-1316; Anderson, B. *et al* (1996) Método para preparaciones de plantilla ADN en M13 96-pozos para secuencias a gran escala. Bio Techniques vol. 20: 1022-1027). Bajo condiciones correctas de sal y búfer, los ácidos nucleicos se enlazaron con cristal o sílice con elevada especificidad.

En base a las Patentes de Estados Unidos 5,496,562, 5,756,156 y 5,807,527, se ha demostrado que los ácidos nucleicos o el material genético puede inmovilizarse con un soporte o filtro deseco de base celulósica (filtro FTA). El soporte sólido descrito se acondiciona con una composición química que es capaz de llevar a cabo varias funciones: 35 (i) lisar material celular intacto tras el contacto, liberando material genético; (ii) permitir las condiciones para facilitar la inmovilización del material genético con el soporte sólido (probablemente por una combinación de condiciones mecánicas y caotrópicas), (iii) mantener el material genético inmovilizado en un estado estable sin dañar debido a la degradación, la actividad de la endonucleasa, la interferencia UV, y el ataque microbiano, y (iv) mantener el material genético como una molécula enlazada a un soporte que se retira de su soporte sólido durante cualquier proceso de flujo 40 o corriente inferior (como se demostró por Del Rio *et al.* (1995) BioTechniques, Vol. 20: 970-974).

La utilidad del llamado material de filtro celulósico FTA descrito en las patentes de Estados Unidos 5,496,562, 5,756,156 y 5,807,527 ha sido demostrada para varias técnicas de ácido nucleico como ribotipos bacterianos (Rogers, C & Burgoyne, L (1997) Anal. Biochem. Vol. 247: 223-227), detección de diferencias de base sencilla en ADN viral 45 y humano (Ibrahim *et al* (1998) Anal. Chem. Vol. 70: 2013-2017), bases de datos de ADN (Ledray *et al* (1997) J. Emergency Nursin. Vol. 23, No. 2: 156-158), proceso automatizado para electroforesis STR (Belgrader, B & Marino, M (1996) L.R.A., vol. 9: 3-7, Belgrader *et al* (1995) BioTechniques. Vol. 19, No. 3: 427-432), y ensayo de ligadura de oligonucleosidos para diagnósticos (Baron *et al* (1996) Nature Biotech. Vol. 14: 1279-1282).

50 Se ha demostrado que el ácido nucleico o el material genético aplicado y inmovilizado, los filtros FTA no pueden retirarse simplemente, o eluirse del soporte sólido una vez se han enlazado (Del Rio *et al.* (1995) BioTechniques, Vol. 20: 970-974). Esto supone una principal ventaja para aplicaciones donde se precisan varios procesos con dirección descendente a partir de la misma muestra, como un perfilamiento STR o un genotipo.

55 En la actualidad, el material celular se aplica un medio de filtro FTA, y generalmente el material celular, una vez aplicado forma una mancha o punto sobre el filtro FTA. A partir de esta mancha o punto, se pueden tomar pequeños punzones; cada pequeño punzón tendrá que inmovilizarse con el suficiente ácido nucleico o material genético como para facilitar un único proceso descendente como una reacción PCR. Como los dos cebos administrados a una reacción PCR se presentan en solución, no es consecuencia que la plantilla de ácido nucleico celular se inmovilice con el filtro. 60 Se formará una pieza de ADN que ha sido sintetizada usando técnicas de amplificación en solución. Dichas piezas pueden retirarse a continuación fácilmente de la reacción aspirando la fase líquida del punzón del filtro sólido FTA. Por lo tanto, para procesos múltiples a partir de una sola muestra, deben tomarse muchos punzones. La toma de múltiples punzones consume mucho tiempo e incluso no ha llevado a una automatización más simplificada.

65 Resulta mucho más deseable proporcionar ácido nucleico como una fracción soluble a partir de la cual las alícuotas pueden fácilmente administrarse o repartirse a tantas reacciones como sea preciso. La manipulación de líquido automatizado de este tipo es una técnica fundamental dentro de la industria farmacológica y otras industrias (por ejemplo, ver: Armstrong *et al.* (1998) J. Biomolecular Screening. Vol. 3, No. 4 271-275).

Resulta deseable adaptar la presente tecnología y modificarla para uso específico en el campo de medicina forense. Además, resultaría ventajoso ser capaz de cualificar y cuantificar rápidamente ácido nucleico en el medio, bien en correlación con tales usos, o independientemente de ellos.

## 5 Resumen de la invención

De acuerdo con la presente invención se proporciona un kit para proporcionar ácido nucleico que comprende: (i) un sustrato para lisar células y purificar ácido nucleico que consta de una matriz sólida formada por nitrocelulosa, estando la matriz sólida cubierta por una capa química que está formada por una base débil, un agente quelante, y un surfactante aniónico o detergente que facilita la lisis celular; y (ii) medios de indicador para indicar la presencia de ácido nucleico, donde el indicador es un conjugado de polietileneimina o un ensayo inmunosorbente asociado con enzimas (ELISA) usando anticuerpos con ADN humano.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para purificar ácido nucleico que comprende los siguientes pasos: (i) aplicar a una muestra que comprende ácido nucleico o un sustrato que consta de una matriz sólida formada por nitrocelulosa, estando la matriz sólida cubierta por una capa química que está formada por una base débil, un agente quelante, y un surfactante aniónico o detergente que facilita la lisis celular; y (ii) capturar el ácido nucleico en el interior del sustrato; (iii) opcionalmente, fijar el ácido nucleico al sustrato; (iv) aplicar un medio indicador para indicar la presencia de ácido nucleico; (v) generar una señal para indicar la presencia de ácido nucleico, donde el indicador es un conjugado de polietileneimina o un ensayo inmunosorbente asociado con enzimas (ELISA) usando anticuerpos con ADN humano.

En un aspecto adicional, se proporciona una tarjeta sanguínea para etiquetar bolsas de transfusión de sangre que comprenden el kit descrito anteriormente y medios de mantenimiento de integridad.

## Breve descripción de los dibujos

Otras ventajas de la presente invención se apreciarán fácilmente ya que se vuelven muchos más comprensibles por referencia a la siguiente descripción detallada cuando se considera en conexión con los dibujos acompañantes donde:

La Figura 1 es una vista transversal de una membrana de filtro hecha de acuerdo con la presente invención; y

La Figura 2 es una vista transversal de un dispositivo hecho de acuerdo con la presente invención.

La Figura 3 es una fotografía que muestra la intensidad de color del producto soluble desarrollado en las muestras de ADN cargadas sobre la membrana FTA por ensayo de conjugado polietileneimida-peroxidasa; y

La Figura 4 es una fotografía que muestra la intensidad de color del producto insoluble desarrollado en las muestras de ADN cargadas sobre la membrana FTA por ensayo de conjugado polietileneimida-peroxidasa.

## Descripción de la invención

La matriz puede usarse para inmovilizar un material genético en la misma y permitir elución posterior del material genético de la misma. Una capa como la definida anteriormente se asocia funcionalmente con la matriz para permitir lisis celular y liberar el material genético de las células lisadas mientras se estabiliza el material genético liberado inmovilizado. La presente invención es adecuada para varios usos nuevos de la tecnología. Más específicamente, la presente invención proporciona un producto capaz de (1) identificar la presencia de ácido nucleico en un sustrato y hacerlo rápidamente; (2) mantener la integridad del sustrato; y (3) emplearse en realizaciones nuevas que se benefician de las ventajas de estas mejoras.

La composición química del sustrato facilita la lisis de células completas y la posterior captura de los ácidos nucleicos liberados. La composición química además ayuda en su almacenamiento a largo plazo. La composición del sustrato es tal que se puede llevar a cabo la rápida purificación del ácido nucleico capturado. Es decir, el propio sustrato permite la liberación de ácido nucleico mediante el paso de elución y proporciona de este modo una fracción soluble de ácido nucleico. Como se explica con más detalle a continuación y se ejemplifica en los siguientes ejemplos, la presente invención es más eficiente con relación a la elución de ADN total a partir de la muestra. Sin embargo, el ácido nucleico y las poblaciones de ácido nucleico puede eluirse específicamente.

El sustrato, cuando se procesa de acuerdo con la invención para proporcionar un ácido nucleico que eluye material de filtro proporciona un número de ventajas y aplicaciones. Por lo tanto, el uso del sustrato de la presente invención proporciona ventajas de identificación y cuantificación de ácido nucleico que contiene fluidos biológicos así como múltiples procesos de fluidos.

La presente invención, generalmente mostrada en 10 en la Figura 1, incluye los siguientes componentes:

(i) una matriz adecuada, preferentemente una membrana con filtro 12;

(ii) una capa química 14; y

## ES 2 291 199 T3

(iii) un proporcionador de mantenimiento para integridad.

La reacción de la membrana con filtro con la solución con la capa química produce la membrana con filtro de la invención. Si la membrana es fibrosa, esta cubierta o capa es una capa de las fibras del filtro, no de la superficie del filtro. De manera alternativa, la cubierta o capa puede impregnar las fibras.

Preferentemente, la matriz de la presente invención es una membrana de nitrocelulosa o de filtro de nylon. La matriz comprende nitrocelulosa.

El medio empleado para la membrana con filtro de la invención no inhibe la porción de la solución con capa química y que no inhibe el almacenamiento, elución y posterior análisis de ácido nucleico que contiene material añadido al mismo. Esto incluye matrices secas planas o una matriz combinada con un ligante. Es preferible que la membrana con filtro de la invención sea de naturaleza porosa para facilitar la inmovilización del ácido nucleico. A diferencia de lo que la técnica anterior sostiene, la presente invención permite la elución del material genético de la misma en un estado que permite el posterior análisis. De manera inesperada, tal elución es un paso eficiente en el tiempo proporcionando por lo tanto un análisis inmediato.

El término “solución con capa química” como aquí se emplea significa una composición química que es capaz de sorber la membrana con filtro anteriormente mencionada. La composición de la solución con capa química es tal y como se describe y se relaciona con lo esbozado en las patentes de Estados Unidos 5,496,562, 5,756,156 y 5,807,527. La adsorción de la solución con capa química con la membrana con filtro seleccionada da como resultado la formación de la membrana con filtro de la invención.

La solución química incluye una base débil, un agente quelante, y un surfactante o detergente aniónico, y opcionalmente ácido úrico y sales de urato tal y como se ha descrito con detalle en las Patentes de Estados Unidos anteriormente citada 5,807,527. Más preferentemente, la base débil puede ser un Tris, trishidroximetil metano, bien como una base libre o como el carbonato, y el agente quelante puede ser EDTA, y el detergente aniónico puede ser dodecil sulfato de sodio. Otras capas que tienen una función similar también pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención.

El detergente aniónico puede seleccionarse del grupo que incluye dodecil sulfato sódico (SDS). El SDS puede obtenerse de varias formas, como la forma C12 y el lauril sulfato. Otros detergentes aniónicos pueden usarse, tales como alquil aril sulfonatos, tetradecilsulfato sódico, sulfatos de alcohol de cadena larga (grasos), sodio 2-etilhexilsulfato olefina sulfatos, sulfosuccinatos o ésteres de fosfato. El detergente aniónico, como el SDS, puede aplicarse a la matriz con filtro en varias concentraciones.

Generalmente, el 5%-10% SDS puede emplearse de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, las concentraciones aumentadas de SDS, hasta el 10%, que no pueden estar contenidas en el interior del cocktail FDA, como se ha establecido en las patentes de la técnica anterior descritas previamente, proporcionaban concentraciones de micelas más grandes que generan una mayor capacidad para lisar y por lo tanto una mayor producción de ácido nucleico, como se demuestra en la sección de ejemplos establecida a continuación. Una concentración óptima definida de SDS se logra en la tasa de concentración 5-7.5% para cubrir una microfibrilla particular de cristal con el fin de enriquecer y purificar diferentes poblaciones de plásmidos directamente a partir de cultivos líquidos en un formato multipozo, siendo tales formatos bien conocidos en la técnica.

El término “funcionalmente asociado con” significa que la capa se dispone, sobre, o sino se asocia con el soporte y apoyo de la presente invención de tal modo que las funciones de soporte y cubrimiento juntas inmovilicen el ácido nucleico por medio de una acción de lisis celular de células presentadas para el soporte. Es decir, la cubierta puede adsorberse, absorberse, cubrirse, o sino disponerse en relación funcional con el medio. Por ejemplo, el soporte, en la forma de un filtro con membrana, puede disponerse en una solución que contiene la solución química. Como se ha establecido anteriormente, el soporte de la presente invención es preferentemente un medio con filtro poroso y puede tener la forma de un medio plano y seco. El medio puede combinarse con un ligante, y ejemplos de ligantes bien conocidos en la técnica son por ejemplo, polivinilacrilamida, polivinilacrilato, polivinilalcohol, gelatina.

La matriz de la presente invención puede ser capaz de liberar el material genético inmovilizado en la misma mediante una elución de calor. Preferentemente, tal elución de calor se lleva a cabo mediante la exposición del soporte que tiene material genético almacenado en el mismo con agua calentada, estando el agua libre de nucleasa. Esta capacidad para permitir la elución caracteriza varios materiales de soporte de la presente invención.

La membrana con filtro de la invención es tal que en cualquier momento durante un régimen de almacenamiento, permite la rápida purificación del ácido nucleico inmovilizado. La invención es tal que el ácido nucleico inmovilizado se recoge en la forma de una fracción soluble seguida de un proceso simplificado de elución, durante el cual el ácido nucleico inmovilizado se libera de la membrana con filtro de la invención. La membrana con filtro de la invención produce ácido nucleico en cantidad suficiente como para no dañar los análisis en dirección descendentes tales como reacción de cadena de polimerasa (PCR), reacción de cadena ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), transcriptasa inversa iniciada PCR, ADN o técnicas de hibridación ARN, secuencias y similares.

## ES 2 291 199 T3

La inmovilización del ácido nucleico en un soporte sólido, a pesar de ser una muestra adecuada para reacciones singulares PCR, no puede medirse o detectarse mediante técnicas tradicionales como densidad óptica o fluorescencia. El ácido nucleico debe estar en solución para estas técnicas. Otras técnicas post-purificación donde se desea que el ácido nucleico esté en forma soluble incluyen clonación, ensayo de protección por hibridización, transformación bacteriana, transfección mamífera, amplificación mediada por transcripción, y otros métodos similares. La presente invención proporciona ácido nucleico en forma soluble. Además, la señal generada por el indicador de la presente invención proporciona una identificación positiva de la presencia de ácido nucleico en el sustrato.

La fuente de ácido nucleico puede ser una muestra biológica que contenga células completas. La célula completa puede estar, aunque no se restringe a, en sangre, cultivo bacteriano, colonias bacterianas, saliva, orina, agua potable, plasma, muestras de deposición, y esputo. Las muestras pueden recogerse mediante varios métodos conocidos en la técnica, transportados al sustrato, y posteriormente aplicarse al mismo. De manera alternativa, el sustrato puede tener la forma de un dispositivo de muestreo, como un hisopo, material en lámina, bola, o similar y se puede obtener una muestra directamente de la fuente. En otras palabras, el sustrato puede tener la forma de un dispositivo que puede pasar o deslizar o sino obtener la muestra celular a partir de una fuente. La fuente puede un tubo de muestra que contenga un líquido de muestra, un órgano, como una boca, oreja, u otra parte de un humano o animal, un fondo para muestra, como una muestra sanguínea en una escena del crimen o similar, u otras fuentes diferentes de células conocidas en el campo científico, en la medicina forense, y en otros campos técnicos.

Además, la matriz con filtro fibroso de la presente invención puede fabricarse o hacerse de varias formas. Por ejemplo, la matriz con filtro fibroso puede fabricarse en forma de una lámina, lo que la permite tener varios formatos como placas multi-pozo, tubos de giro, portaobjetos, cartuchos, hisopos, y plataformas.

El término “mantenedor de integridad” o “medios de mantenimiento de integridad” como aquí se emplea, se refiere a un miembro sellable que evita la degradación y/o pérdida de la matriz. Preferentemente, el mantenedor de integridad de la presente invención crea un sello hermético de aire previniendo de este modo que el aire, las bacterias y otros elementos contaminadores entren en contacto con la matriz y el ácido nucleico purificado. El mantenedor de integridad puede tener la forma de una bolsa de plástico, con o sin un sello, celulosa, un envase sellable, parafilm o similares.

El mantenedor de integridad puede abrirse para permitir la aplicación de una muestra en la matriz. A continuación se cierra y sella conteniendo de este modo los sustratos. Por consiguiente, si el sustrato madura y se hace frágil o quebradizo, queda contenido y no se pierde. De manera alternativa, el mantenedor de integridad puede aplicarse sobre el sustrato después de que se haya aplicado la muestra.

La presente invención proporcionar un método para aislar y archivar ácido nucleico mediante los pasos generales de aplicar una muestra de ácido nucleico a un sustrato consistente en una cubierta o capa fijada a la matriz, el sustrato capturando físicamente al ácido nucleico, y a continuación enlazando el ácido nucleico con el sustrato. Después, se genera una señal cuando el ácido nucleico se enlaza con el sustrato. El paso de enlace se consigue calentando el sustrato que tiene el ácido nucleico aplicado al mismo, mediante el método descrito anteriormente.

El paso de aplicación puede realizarse aplicando células completas al sustrato. El propio sustrato produce la lisis celular liberando de este modo el ácido nucleico hacia el sustrato. Siendo un sustrato poroso, el sustrato presente una vasta área de superficie sobre la cual el ácido nucleico está enlazado.

Un paso de lavado, como con los diferentes búferes establecidos en la sección de ejemplos, pero no limitados a ellos, puede realizarse después de la lisis celular. A continuación, el sustrato físicamente captura el ácido nucleico en el interior del mismo.

El ácido nucleico enlazado puede liberarse del sustrato para posterior procesos y análisis. La liberación se consigue mediante los pasos de lavado a elevada temperatura, como se demuestra en los ejemplos a continuación. De manera sorprendente, el enriquecimiento de diferentes poblaciones de ácido nucleico procedentes de la misma fuente célula puede conseguirse usando regímenes de temperatura gradual. Por ejemplo, el plasma ADN puede aislarse y enriquecerse a partir de colonias bacterianas usando el sustrato de la presente invención. Las poblaciones, como poblaciones más grandes de plásmido superenrollado, seguido por plásmido rasgado y finalmente plásmido lineal que migra desde la parte superior del gel aislante pueden conseguirse utilizando aumentos graduales en temperatura de incubación.

Es sabido que el cocktail de cubierta o capa FTA de la técnica anterior contiene 2% de SDS. Es poco probable que este porcentaje aumente debido a los puntos de saturación cuando se encuentra junto con otros componentes del cocktail. Esto limita la capacidad de lisar de los filtros de cubierta FTA de la técnica anterior cuando una concentración crítica de micelos de SDS puede alcanzarse fácilmente cuando se presenta con grandes cantidades de células, como con una colonia bacteriana. Por lo tanto, los sustratos que contienen una concentración mayor de agente lítico, el detergente aniónico, permiten una mayor capacidad de lisis y a su vez, mayores recuperaciones de ácido nucleico. Esto se demuestra en los ejemplos que siguen a continuación.

La membrana con filtro de la invención puede tener los mismos componentes químicos que FTA que permite la acción de lisis celular y liberación de ácido nucleico tras la misma aplicación. El componente químico asegura la estabilidad del ácido nucleico por medio de desnaturalizantes de proteína, un control radical libre, e inhibidores virales/microbiales. La diferencia entre los soportes sólidos FTA de la técnica anterior y la membrana con filtro de la

invención es que el soporte con base sólida, o filtro, se ha cambiado en comparación con el descrito para productos FTA. Este cambio en material de soporte sólido, o filtro, ha permitido, tras un paso de elución por calor simplificado, que el ácido nucleico enlazado se retire de la membrana con filtro de la invención mientras que no se puede retirar de soportes sólidos FTA (ver Del Rio *et al* (1995) *BioTechniques*. Vol. 20: 970-974). El ácido nucleico liberado de la membrana con filtro de la invención se presenta por lo tanto como una fracción soluble que puede alicuotarse fácilmente para múltiples procesos que se realizan en dirección descendente como amplificación PCR. El ácido nucleico soluble eluido también puede entrar en técnicas donde el ácido nucleico es una necesidad como el análisis de densidad óptica, detección de fluorescencia, la clonación, transformación y similares. Esta técnica añadida de elución permite una elevada producción de múltiples regímenes de procesos, como el genotipo.

La presente invención puede encontrar utilidad en muchas áreas de genómica. Por ejemplo, la presente invención proporciona la capacidad para eluir material genético enlazado para la rápida purificación del material genético que se utilizará en diferentes aplicaciones dentro de la medicina forense, como identificación, identificación de paternidad y maternidad, y en la escena de un crimen.

Se pide a prisioneros de muchos países que proporcionen una muestra genética (muestra de sangre o bucal) para fines de identificación de ADN. El uso de la presente invención facilitar un medio para el almacenamiento a largo plazo de material genético del prisionero. Si es necesario, el material genético puede comprobarse tan pronto como se toma o muchos años después de su almacenamiento. El material genético puede obtenerse bien como una fracción soluble o sólida una vez se aísla en el medio con filtro de la presente invención.

La presente invención puede utilizarse para identificaciones de maternidad/paternidad teniendo un uso particular para una madre o una madre o un hospital donde se ha perdido o cambiado de lugar a un recién nacido. La rápida habilidad de la presente invención proporciona aún mayor utilidad en casos en los que una rápida identificación de un niño cambiado podría ser más propicia.

La presente invención supone una contribución significativa a la metodología actual para la preparación de material genético soluble que sino supone una gran inversión de tiempo y que a menudo da como resultado una plantilla inadecuada que está dañada o contaminada. La presente invención proporciona una elevada producción de material genético purificado de calidad superior en menos de veinte minutos de tiempo en el laboratorio. El material genético rápidamente purificado puede emplearse para cualquier tipo de aplicación con alimentos/agricultura como trazado, cría, identificación y clonación.

La eficiencia con la que los fabricantes de alimentos detectan el brote patogénico tanto en el ganado como en el producto finalizado es la medida de una compañía o empresa con éxito. El uso de la presente invención como un hisopo que puede simplemente presionarse contra alimentos o el uso de una tarjeta en la cual puede reconocerse la sangre de una res muerta permite usos de la presente invención para aislar rápidamente y detectar la presencia de material genético patogénico. Las técnicas de ensayos de técnica anterior que consumían tanto tiempo e implicaban preparaciones de ácido nucleico no necesitan llevarse a cabo si se emplea la presente invención. El ácido nucleico patogénico recogido puede usarse como una fracción soluble o fracción de fase sólida con la elección de un paso de elución.

El material para trazar las reses muertas, bien para temas legales o de salud, permite a los fabricantes mantener el control de sus productos. En el momento de matar en un matadero, una tarjeta que utiliza la presente invención puede unirse a la res muerta donde se ha reconocido su sangre. Al mismo tiempo, puede reconocerse una segunda tarjeta con la misma sangre y guardarse en un archivo en el matadero. Si surge un tema de identificación para una cierta res muerta, los archivos genéticos tanto en la res como en el matadero puede utilizarse. Si la tarjeta de la res muerta se retira de manera inadvertida, la identificación aún puede llevarse a cabo simplemente presionando carne de res muerta sobre una tarjeta.

Reconocer los genes y características deseadas que son necesarias para una generación posterior de una planta o animal requiere la generación fiable y efectiva en tiempo de ácido nucleico a partir de padres potenciales. La presente invención puede usarse para aislar material genético tanto soluble como en fase sólida para proporcionar resultados efectivos y fiables. Igualmente, la presente invención, en la forma de microplacas, un tubo o un chip, puede usarse para la generación y detección de material genético. La presente invención proporciona una metodología para archivo eficaz en costos y en tiempo de preparación superior de plantillas (bien solubles o sólidas).

Presionando un medio, en la forma de un hisopo u otra forma, permite al usuario recoger microbios contaminados en productos alimenticios de cualquier tipo. El material genético aislado del medio puede emplearse a continuación para cualquier tipo de procedimiento de diagnóstico dependiendo de la necesidad de material genético en fase soluble o sólida. Este análisis puede realizarse de manera efectiva casi inmediatamente, a diferencia de técnicas anteriores.

Mediante el uso de técnicas de manipulación genética, los alimentos se han producido con mayor tamaño, sabor, más maduros y con mayor contenido de azúcar. Muchos países prohíben la venta de productos alimenticios genéticamente modificados y por lo tanto requieren que se lleven a cabo exámenes. Debido a que se están buscando genes específicos que generen estas características, se precisa material genético. La presente invención puede usarse para proporcionar una rápida purificación de material genético tanto soluble como en fase sólida.

## ES 2 291 199 T3

En vista de lo mencionado, la presente invención encuentra utilidad en varias áreas de genómica.

Se llevaron a cabo experimentos iniciales para demostrar la posibilidad de utilizar materiales cubiertos con FTA como membranas para cuantificación y detección de ADN. Los primeros experimentos mostraron que las células enteras pueden depositarse en la membrana cubierta con FTA como nitrato de celulosa, con lisis celular y enlace de ácido nucleico fácilmente llevado a cabo en contacto. El ADN inmovilizado puede detectarse (y cuantificarse) mediante el uso de una sonda de ADN específica y no específica u otros generadores de señal y una de las versiones de los inmunoensayos.

En el uso de sustrato cubierto con FTA en el cual se reconoce la sangre leucoreducida, el componente de ácido nucleico de la muestra se fija al sustrato y de este modo queda disponible para medida directa con una sonda como PEI. Si la detección está por debajo del límite inferior, entonces la muestra es considerada leucoreducida. Tal sistema ofrece un gran ahorro de tiempo para bancos de sangre que actualmente usan microscopios para caracterizar eficiencias en depleción. Con una pauta más hacia la leucodepleción de sangre en la fuente más que en el lateral, una simple metodología de detección resulta muy útil.

Existen muchos líquidos en varias industrias que no deberían presentar ninguna biocontaminación en el punto de venta. También los líquidos son controlados para aumentar en biocontaminación durante un tiempo. Los líquidos también pueden incluir plantillas biológicas donde la presencia de microbios puede mostrar enfermedad o infección. Una muestra de un líquido se añadiría a un sustrato cubierto con FTA, y células en el interior de la muestra, incluyendo carga biológica no deseada, pasarán en contacto con la fijación de ácido nucleico inmediatamente. Puede emplearse la detección directa con una sonda general de ADN para mostrar la presencia de contaminaciones celulares o una sonda específica de especies también puede emplearse, y mediante hibridización, identificará la presencia de células no deseadas a partir de una muestra multicelular. Este tipo de sistema puede utilizarse en la industria alimenticia, con líquidos tales como la leche, vino, cerveza, y zumos. En medicina, la orina, sangre y extractos de deposiciones pueden aplicarse al sistema con detección directa del ácido nucleico inmovilizado llevada a cabo con sondas específicas de especies. En la industria medioambiental, el agua potable, el agua del mar, y el agua del río pueden encontrar utilidad en el sistema propuesto.

Una enfermedad tal como el lupus se caracteriza por la presencia de ADN de doble trenzado en el flujo sanguíneo. Por lo tanto, un paciente de lupus tendrá en su sistema anticuerpos que ascenderán a la presencia del antígeno dsADN. El dsADN humano salpicado y fijado en membrana cubierta con FTA puede por lo tanto utilizarse como una plataforma para llevar a cabo ELISA directamente si la muestra aplicada contiene los anticuerpos del lupus. Los pasos de inmovilización prolongada con el fin de llevar a cabo ELISA "tradicional" no se aceptan con un enfoque FTA.

En los ejemplos a continuación se presenta una descripción así como en las figuras acompañantes incluidas.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

Células de sangre de humano blanco y ADN purificado se emplearon como muestras para cargar en piezas de membrana tratada con FTA para un ensayo ELISA basado en la interacción iónica entre conjugado polietileneimina-peroxidasa (PEI-PO) y ADN.

El objetivo del experimento fue confirmar que el ADN podía unirse a la membrana FTA para posterior detección y para confirmar que el ADN podía liberarse de la célula y unirse a una membrana de manera suficientemente firme para la siguiente detección.

#### *Materiales y protocolo*

Se utilizaron cuatro membranas. Las membranas son las siguientes:

1. Membrana de nitrocelulosa, tamaño del poro 0.2  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schull; 2. Membrana de Nylon, tamaño del poro 0.2  $\mu\text{m}$ , Osmonics; 3. Membrana de Nylon, tamaño del poro 1.2  $\mu\text{m}$ , Osmonics; y 4. cristal-FTA, grado F572-08, Whatman (usado para comparación).

Las membranas se empaparon con la solución FTA durante dos horas a temperatura ambiente con una suave agitación, se secaron completamente a temperatura ambiente, y se calentaron a 80°C durante una hora.

Se emplearon muestras de ADN de WBC en 5-10<sup>3</sup> célula/ $\mu\text{l}$ , WBC, 5 células/ $\mu\text{l}$ , y ADN, 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

#### *Protocolo*

Todos los pasos del ensayo se llevaron a cabo en una placa con 96 pozos. Los círculos de cada membrana, 0.5 mm en diámetro, se pusieron en el fondo de los pozos. Las muestras de ADN de 3  $\mu\text{l}$  por pozo se descargaron en duplicado. A continuación, la placa se bloqueó con una solución Tween-20 PBS/BSA, incubada con un conjugado

## ES 2 291 199 T3

polietileneimina-peroxidasa, se lavó con una solución Tween-20 PBS/BSA, y finalmente se incubó con diferentes sustratos de Peroxidasa para desarrollar productos de colores solubles o insolubles.

### Resultados

5 Las muestras positivas y negativas de ADN desarrollaron diferentes intensidades de color en las membranas de nylon FTA, y en la de nitrocelulosa FTA, ambas teniendo un tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ , cuando el resultado de la reacción de enzima fue un producto soluble (tabla 1, foto 1).

10 Las muestras positivas y negativas de ADN sólo desarrollaron diferentes intensidades de color en las membranas de nitrocelulosa FTA, con un tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ , cuando el resultado de la reacción de enzima fue un productos insoluble (tabla 2, foto 2).

### Ventajas o Características Inesperadas

15 El ADN puede cargarse en membranas tratadas con FTA o SDS para uso posterior en una determinación de ELISA. Además, ADN puede liberarse de membranas tratadas con WBA o FTA (con un tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ ) para posteriores determinaciones analíticas.

20 Las propiedades físicas y químicas de la membrana tratada con FTA (como tamaño de poro o composición de membrana) son críticas para su aplicación a evaluaciones de ADN. Por ejemplo, la membrana con nylon FTA, con un tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ , mostró los mejores resultados para medir una cantidad diferente de ADN y discriminando las muestra positivas de ADN y negativas de ADN.

25 *Intensidad de Color Desarrollada en Muestras Cargadas en Materiales FTA por Ensayo PEI-PO con el Producto Soluble de PO, Lectura a 490 nm, 13 de Enero, 2000 test*

		A 5X10 <sup>3</sup> WBC/ $\mu\text{L}$	B 5X10WBC/ $\mu\text{l}$	C 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ADN	D 0-control
30	I	1.131	0.58	sobre lectura	0.511
35	II	2.279	1.445	1.92	2.408
40	II	sobre lectura	sobre lectura	sobre lectura	sobre lectura
45	IV	1.034	0.506	2.208	0.327

50 La sobrelectura se da cuando una densidad óptica de la muestra es superior a 3.000. Se cargó una muestra de 3  $\mu\text{l}$  en cada pozo.

*Estimación Visual del Desarrollo en el Color en las Muestras Cargadas en Materiales-FTA por Ensayo PEI-PO con el Producto Soluble de PO, Lectura a 490 nm, 13 de Enero, 2000 test*

55 *0.2  $\mu\text{m}$  Nylon (Comparativo)*

60 Se desarrolló un aro marrón oscuro en la mitad de la membrana cuando se trató con 5X10<sup>3</sup>WBC/ $\mu\text{l}$ . Se desarrolló un fondo marrón claro con ningún aro o anillo cuando se añadió 5X10WBC/ $\mu\text{l}$ . Cuando se añadió 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ADN el Nylon 0.2  $\mu\text{m}$  desarrolló un fondo marrón oscuro. Finalmente, se desarrolló un fondo marrón claro en la situación de control.

*1.2  $\mu\text{m}$  Nylon (Comparativo)*

65 Para todas las concentraciones anteriormente mencionadas, el fondo de todas las piezas es el mismo marrón oscuro. No existe diferencia de color de las membranas positivas de ADN y la de control.

## ES 2 291 199 T3

### *Cristal-FTA (Comparativo)*

Como con el material 1.2  $\mu\text{m}$  de nylon, el fondo de todas las piezas es el mismo marrón oscuro. No existe diferencia de color de las membranas positivas de ADN y la de control.

#### *0.2 $\mu\text{m}$ nitrocelulosa*

Con la adición de  $5 \times 10^3 \text{WBC}/\mu\text{l}$  se desarrolló un aro marrón oscuro en la mitad de la membrana con un fondo muy claro. Se desarrolló un aro marrón muy claro de la membrana cuando se añadió  $5 \times 10^3 \text{WBC}/\mu\text{l}$ . Se desarrolló un fondo marrón oscuro cuando se añadió  $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  ADN. Un fondo marrón muy claro se desarrolló en la situación de control.

### Ejemplo 2

#### *Membrana de nitrato celulosa FTA aplicación para determinación de ADN*

##### *Membranas*

Se emplearon membranas de Nitrato de Celulosa Whatman con tamaños de poro de 0.1, 0.2, 0.45 y 0.8  $\mu\text{m}$  para los siguientes experimentos. Las membranas se empaparon con la solución FTA durante dos horas a temperatura ambiente con una suave agitación, se secaron completamente a temperatura ambiente, y se calentaron a  $80^\circ\text{C}$  durante una hora.

##### *Muestras ADN*

Se emplearon tres muestras de ADN para los siguientes ejemplos. Estas muestras incluyen las siguientes: 1. ADN de trenzado sencillo,  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 2. ADN de trenzado sencillo,  $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; muestra negativa de ADN - PBS con 3% solución BSA.

##### *Protocolo*

Se fijaron 2  $\mu\text{l}$  de soluciones de ADN de trenzado sencillo con una concentración de  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  y  $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; en las piezas de la membrana en una placa con 96 pozos. La placa se bloqueó con solución búfer PBS-BSA-Tween-20, se incubó con un conjugado polietileneimina-peroxidasa (PEI-PO) y se lavó tres veces antes de la incubación con soluciones de sustrato.

El ADN unido a la membrana FTA, en un conjunto de pozos, se visualizó directamente sobre la membrana cuando el producto insoluble de PO se desarrolló tras la incubación con 3-3'-dianisidina. Se incubó un conjunto duplicado de pozos con 1,2-ortofenilenediamina dihidrocloruro (OPD) y se estimó el desarrollo de color en sobrenadante a 490 nm.

##### *Resultados*

La intensidad de color que se desarrolló en la membrana FTA directamente se relaciona con la cantidad de ADN cargada por pozo. La mejor resolución entre muestras de ADN positivo con diferente concentración de ADN y muestras de ADN negativo se consiguió en la membrana con un tamaño de poro de 0.8  $\mu\text{m}$ , la lectura en 490 nm fue: pozos de ADN negativo, 0.204;  $0.2 \mu\text{g}$  ADN/pozo, 1.070;  $1 \mu\text{g}$  ADN/pozo, 1.776.

Cuando el producto insoluble PO indicó la cantidad de ADN, las diferencias más distintas entre muestras de ADN positivo con diferente concentración de ADN y muestras de ADN negativo se consiguió en la membrana con un tamaño de poro de 0.1  $\mu\text{m}$ .

### Ejemplo 3

#### *Membrana de nylon FTA y nitrocelulosa aplicación para determinación WBA*

##### *Membranas*

Se utilizaron cuatro membranas para el siguiente experimento. Estas membranas son las siguientes: Membrana de nitrocelulosa, tamaño del poro 0.2  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schull; Membrana de Nylon, tamaño del poro 0.2  $\mu\text{m}$ , Osmonics; Membrana de Nylon, tamaño del poro 1.2  $\mu\text{m}$ , Osmonics; y cristal-FTA, grado F572-08, Whatman (usado para comparación).

Las membranas se empaparon con la solución FTA durante dos horas a temperatura ambiente con una suave agitación, se secaron completamente a temperatura ambiente, y se calentaron a  $80^\circ\text{C}$  durante una hora.

## ES 2 291 199 T3

### Muestras WBC

Las muestras de varias concentraciones se emplearon en el experimento. Estas concentraciones incluyeron: WBC,  $5 \times 10^3$  célula/ $\mu\text{l}$ ; WBC, 5 célula/ $\mu\text{l}$ ; control positivo ADN,  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ADN de trenzado sencillo en agua; y control negativo WBC, 3% BSA en PBS.

### Protocolo

Todos los pasos del ensayo se llevaron a cabo en una placa con 96 pozos. Los círculos de cada membrana, 0.5 mm en diámetro, se pusieron en el fondo de los pozos. Las muestras de WBC de  $3 \mu\text{l}$  se cargaron en cada pozo, por duplicado. A continuación, la placa se bloqueó con una solución Tween-20 PBS/BSA, incubada con un conjugado polietileneimina-peroxidasa, se lavó con una solución Tween-20 PBS/BSA, y finalmente se incubó con diferentes sustratos de Peroxidasa para desarrollar productos de colores solubles o insolubles.

### Resultados

Las muestras positivas y negativas de WBC desarrollaron diferentes intensidades de color en las membranas de nylon FTA, y en la de nitrocelulosa FTA, ambas teniendo un tamaño de poro de  $0.2 \mu\text{m}$ . La intensidad de color se desarrolló cuando el resultado de la reacción de enzima fue un producto soluble.

Las muestras positivas y negativas de ADN desarrollaron diferentes intensidades de color en las membranas de nitrocelulosa FTA, con un tamaño de poro de  $0.2 \mu\text{m}$ . De nuevo, la intensidad de color se desarrolló cuando el resultado de la reacción de enzima fue un producto insoluble.

### Conclusiones

La intensidad de color se desarrolló en la membrana FTA en una placa con 96 pozos como resultado del ensayo PEI-PO. Esto directamente se correlaciona con la cantidad de WBC. El ADN puede liberarse de WBC en una membrana tratada con FTA para posterior determinación analítica.

Las propiedades físicas y químicas de la membrana tratada con FTA, como tamaño de poro, son importantes para la evaluación de ADN. Con la base de dos experimentos se ha demostrado que la membrana con un tamaño de poro de  $0.8 \mu\text{m}$  es la mejor para la determinación de ADN, mientras que la membrana con un tamaño de poro de  $0.1 \mu\text{m}$  es la más prometedora para la evaluación de WBC.

Resultados presentados en las 2 Tablas y los 2 Dibujos, marcados de la siguiente manera

#### Filas:

- I 0.2  $\mu\text{m}$  Nylon (Comparativo)
- II 1.2  $\mu\text{m}$  Nylon (Comparativo)
- III Cristal-FTA (Comparativo)
- IV 0.2  $\mu\text{m}$  nitrocelulosa

Columnas:	A	B	C	D
Concentración	$5 \times 10^3$ WBC/ $\mu\text{l}$	5 WBC/ $\mu\text{l}$	$2 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ ADN	0-control

Observar que  $3 \mu\text{l}$  de la muestra se cargaron en el pozo.

Las ventajas incluyen aliviar el cuello de la botella de preparación de ácido nucleico. Así mismo, los adaptadores de GC en los cebos específicos de gen permiten la inmovilización de la fase sólida (Ver Yang *et al.* (1998) PNAS. Vol. 95, pp. 5462-5467). Además, el ADN puede cargarse en la membrana tratada con FTA para posterior determinación por ELISA y el ADN puede liberarse de WBC sobre membrana tratada con FTA ( $0.2 \mu\text{m}$  de tamaño de poro) para posterior determinación analítica.

#### Ejemplo 4

Se analizó el límite de detección del ensayo PEI-PO sobre membrana de nitrato celulosa FTA para ADN de trenzado sencillo y doble.

## ES 2 291 199 T3

### Objetivos

Membrana de Nitrato Celulosa Whatman, con un tamaño de poro de 0.8  $\mu\text{m}$  se trató con una solución FTA. Se estudiaron siete variables diferentes para descubrir los puntos sensibles de cada paso del ensayo PEI-PO para determinación de ADN en una placa con 96 pozos y se usó para determinar el límite de detección del método para ADN purificado. Las muestras de ADN como soluciones de ADN de trenzado sencillo y doble se fijaron sobre las membranas tratadas con FTA en una placa de 96 pozos, 40 pg - 400 ng ADN/pozo. Todos los pasos e ingredientes del ensayo, el pretratamiento de placas, el paso de calentamiento tras la carga de ADN, el búfer de bloqueo, pueden contribuir a la sensibilidad del ensayo. Los resultados preliminares sugirieron que el límite de detección de este método sobre membrana de nitrato celulosa con tamaño de poro 0.8 es 40 pg/pozo para ADN de trenzado sencillo y 400 pg para ADN de doble trenzado.

### Materiales

#### 15 Membranas

Las Membranas de Nitrato Celulosa se obtuvieron de la biblioteca de muestras de Tecnologías Arbor. Se emplearon las membranas con un tamaño de poro de 0.8  $\mu\text{m}$  para los siguientes experimentos. Las membranas se empaparon con FTA durante una hora a 80°C, se secaron por completo a temperatura ambiente y se calentaron a 80°C durante una hora.

#### Muestras de ADN

Se empleó ADN genómico humano de cadena sencilla que tenía las siguientes concentraciones: 20 ng/ $\mu\text{l}$ , 2 ng/ $\mu\text{l}$ , 200 pg/ $\mu\text{pl}$ , 20 pg/ $\mu\text{pl}$ . Se usó agua DEPC como control de ADN negativo. 2  $\mu\text{l}$  de cada muestra de concentración de ADN se cargó en las piezas de membrana de nitrato celulosa FTA. Los especímenes se cargaron en duplicado y en triplicado.

Para llevar a cabo el experimento, se utilizaron las soluciones de bloqueo de PBS, 3% BSA, 0.1% Tween-20 (solución de bloqueo #1), PBS, 3% BSA (solución de bloqueo #2), y 10 x solución de Denhardt (1% Ficoll 400, 1% polivinilpirolidona, 1% BSA), 4 x SET (NaCl, EDTA, Tris-HCl, pH 8.0), 0.1% SDS (solución de bloqueo #3).

Se eligieron todas estas variables para descubrir los puntos sensibles de cada paso del ensayo PEI-PO para determinación de ADN en la placa con 96 pozos.

Se realizaron dos experimentos con membrana de nitrato celulosa FTA para determinación de ADN. El objetivo del primer experimento fue encontrar el límite de detección del método para ADN de trenzado sencillo y doble usando el siguiente protocolo. En primer lugar, se fijaron 2  $\mu\text{l}$  de diferentes soluciones de ADN en las piezas de la membrana en una placa de 96 pozos por duplicado. La placa se calentó durante una hora a 80°C. A continuación, la placa se bloqueó con solución de bloqueo 1 durante una hora a 37°C. La placa se incubó con conjugado PEI-PO durante una hora a 37°C y después se lavó tres veces con PBS, 0.1% Tween, durante diez minutos a 37°C. El ADN en un conjunto de los pozos se visualizó directamente en la membrana cuando el producto soluble de Po se desarrolló tras la incubación con 3,3'-dianisidina. Un conjunto duplicado de los pozos se incubó con 1,2-ortofenilenediamina dihidrocloruro (OPD) y el desarrollo de color en el sobrenadante se estimó en 490 nm.

El objetivo del segundo experimento fue repetir la determinación del límite de detección y comparar los resultados tras incubar con diferentes soluciones de bloqueo. En este experimento, se usaron las placas no tratadas y las placas tratadas con 0.1% Tween-20. La membrana en cada tipo de placa, tras la carga de ADN, fue bien calentada o no calentada.

### 50 Resultados

La combinación de lavado de la placa con Tween-20 y empleo de solución de bloqueo #1 dio el mejor resultado con un fondo no específico bajo. La medida del fondo a 490 nm fue tan baja como 0.200 en membranas con ADN negativo. Las soluciones de bloqueo #2 y #3 aumentaron la sorción de PEI-PO. La medida del fondo a 490 nm fue 0.6-0.8. El límite de detección del método se encontró en 40 pg/pozo para ADN de trenzado sencillo y 400 pg/pozo para ADN de doble trenzado. El paso de calentamiento resultó necesario para la determinación pura de ADN mediante el ensayo PEI-PO sobre la membrana de nitrato celulosa.

### 60 Conclusiones

La placa debería pretratarse con 0.1% solución Tween-20 antes de la determinación de ADN sobre la membrana de FTA para crear bajo fondo no específico. Entre los tres búferes sólo funciona la solución de bloqueo #1 (PBS, 3% BSA, 0.1% Tween-20) como solución de bloqueo para sorción no específica PEI-PO en la membrana de FTA.

Los resultados sugirieron que el límite de detección de este método en membrana de nitrato celulosa con un tamaño de poro de 0.8 es 40 pg/pozo para ADN de trenzado sencillo y de 400 pg para ADN de doble trenzado.

## ES 2 291 199 T3

### Ejemplo 5

Se emplearon dos modificaciones ELISA para confirmar que se puede liberar ADN de células blancas de sangre (WBC) en una membrana de nitrato celulosa tratada con FTA para posterior determinación cuantitativa.

5 Membranas Whatman nitrato celulosa y de nylon, con un tamaño de poro de  $0.2 \mu\text{m}$ , se trataron con una solución FTA. Se emplearon las dos versiones de tratamiento FTA. En primer lugar, las membranas se trataron con FTA en una placa con 96 pozos, y se usó para la determinación de ADN en la misma placa. En segundo lugar, las membranas se trataron con solución FTA, se secaron, cortaron en piezas en la placa y a continuación se emplearon para la  
10 determinación de ADN.

Las dos modificaciones ELISA se emplearon para confirmar que el ADN puede liberarse de células blancas de sangre (WBC) en membrana de nitrato celulosa tratada con FTA para posterior determinación analítica.

### 15 *Materiales*

#### *Membranas*

Se utilizaron membranas de nitrato celulosa Whatman, de tamaño de poro  $0.2$ ,  $0.8 \mu\text{m}$  y membranas de nylon  
20 Whatman, estándar y SP, ambas con un tamaño de poro de  $0.2 \mu\text{m}$ .

#### *Tratamiento FTA*

Se aplicaron dos tratamientos: Primero - las piezas de la membrana,  $5 \times 10 \text{ cm}$ , se empaparon con una solución FTA  
25 (sin ácido úrico) durante 15 minutos, se calentaron a  $80^\circ\text{C}$  durante una hora. Segundo - las membranas se almacenaron entre papel puro en bolsas de plástico. Las membranas se cortaron en círculos de  $0.5 \text{ mm}$  de diámetro, y se cargaron en las placas con 96 pozos. Se aplicaron  $10 \mu\text{l}$  de la solución FTA a cada pozo sobre la parte superior de la membrana. La placa se secó por completo a  $80^\circ\text{C}$ .

### 30 *Muestras de ADN*

Se empleó ADN genómico humano de cadena sencilla que tenía las siguientes concentraciones:  $2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ,  $200 \text{ pg}/\mu\text{l}$ ,  
20  $20 \text{ pg}/\mu\text{l}$ ; así mismo se empleó agua DEPC control de ADN negativo.

### 35 *Muestras WBC*

Se aislaron WBC de sangre fresca humana tras la lisis de células rojas con búfer de cloruro de amonio y tres pasos  
40 de lavado con PBS, 1.5% BSA. La suspensión de WBC se diluyó para concentraciones celulares de  $8 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^2$  y 2 células por  $\mu\text{l}$ .  $2 \mu\text{l}$  de cada muestra de concentración WBC se cargó en las piezas de membranas FTA por duplicado y triplicado.

#### *Diseño y método de estudio*

El objetivo de los experimentos era descubrir el tratamiento óptimo de FTA de las membranas para determinación  
45 de ADN en una placa con 96 pozos. El objetivo del segundo experimento era comparar los dos ensayos diferentes ELISA para determinación de WBC den la membranas de nitrato celulosa y nylon.

ELISA se llevó a cabo tomando como base los anticuerpos para ADN humano y se diseñó tras la optimización  
50 de los siguientes pasos: El experimento comenzó con la carga de muestras WBC y ADN en las piezas de membranas FTA en una placa con 96 pozos, A continuación, la placa se calentó durante una hora a  $80^\circ\text{C}$ . La incubación se dio después con la solución de bloqueo, PBS, 3% BSA, 0.1% Tween-20. Después, hubo una incubación con anticuerpos monoclonales humanos (Abs) específicos del ADN humano, incluyendo  $1 \mu\text{g}$  de Abs/ml durante una hora a  $37^\circ\text{C}$  o durante toda la noche en un frigorífico. A continuación, se lavó tres veces durante cinco minutos a temperatura ambiente. La incubación con anticuerpos de ratón específicos de IgG humano conjugado con bitoína, en una dilución  
55 de 1:15.000 se dio durante una hora a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se lavó tres veces durante cinco minutos a temperatura ambiente. Después, tuvo lugar la incubación con avidin-poli-HRP, en una dilución 1:5.000 durante 45 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se lavó tres veces durante cinco minutos a temperatura ambiente. El sustrato OPD se incubó durante 20 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . La incubación se paró con 3M de ácido sulfúrico. El sobrenadante se transfirió de los pozos a las placas réplica. A continuación, la placa de lectura se analizó a  $490 \text{ nm}$ .

### 60 *Resultados*

Se desarrolló un elevado fondo positivo en todas las membranas tratadas con FTA en la placa. No se observaron  
65 diferencias en lo relativo a estadísticas entre los pozos de ADN positivo y ADN negativo con las membranas que se trataron con FTA en la placa. Cuando las membranas se trataron con FTA antes de la carga en la placa, se formaron aros brillantes marrones oscuros en las membranas de nitrato celulosa cargadas con WBC,  $8 \times 10^3$  células por  $\mu\text{l}$  durante el ensayo PEI-PO. Los mismos aros brillantes para esta concentración WBC, así como para la concentración de  $40 \times 10^2$ , se observaron sobre la membrana de nitrato celulosa con un ensayo basado en los anticuerpos con ADN humano. No

## ES 2 291 199 T3

se vieron aros en las membranas cargadas con ADN puro, o 20 WBC para muestras  $\mu\text{l}$ . La intensidad de color medida en las placas después de PEI-PO y anticuerpos a ensayos de ADN humano a 490 nm se presentó en la siguiente tabla.

5 *Intensidad de Color Desarrollada en las Muestras WBC Cargadas en la Membrana de Nitrato Celulosa - FTA, Ensayos ELISA, Lectura a 490 nm, Marzo 10-14 Tests*

	Ensayo PEI-PO		Abs para ADN humano	
	Medio	SDS	Medio	SDS
10 $8 \times 10^3$ cél/ $\mu\text{l}$	1.491	0.152	2.013	0.771
15 $4 \times 10^2$ cél/ $\mu\text{l}$	1.255	0.214	0.645	0.104
20 20 cél/ $\mu\text{l}$	1.079	0.204	0.303	0.041
Control ADN-positivo	1.120	0.290	0.405	0.026
25 Control ADN-negativo	0.830	0.117	0.324	0.042

35 La intensidad de color desarrollada en membranas positivas WBC depende directamente de la concentración WBC. El fondo no específico fue inferior tras el ensayo basado en anticuerpos con ADN humano. Ambos ensayos dieron intensidad similar entre muestras de ADN positivo y ADN negativo, 0.74 para ensayo PEI-PO y 0.8 para anticuerpos con ensayo de ADN humano. Pero en el caso de usar anticuerpos específicos, se observó una diferencia más pronunciada entre muestras con diferente concentración de WBC.

### 40 *Conclusiones*

El ADN puede liberarse de WBC sobre membranas de nitrato celulosa tratadas con FTA para posterior determinación. La intensidad de color desarrollado en las membranas positivas WBC depende de la concentración celular.

45 Los inmunoensayos basados en la interacción entre ADN y polietileneimina (no específico) o ADN y anticuerpos monoclonales con ADN (específico) pueden aplicarse a la determinación de ADN en membranas de nitrato celulosa FTA en una placa con 96 pozos. El tratamiento de la membrana con FTA directamente en los pozos da como resultado una elevada sorción no específica de PEI para las membranas.

50 Las membranas de nylon, tanto la estándar como ST, con un tamaño de poro de 0.2, tienen un muy elevado fondo no específico tras la incubación con PEI-PO y anticuerpos con ensayos de ADN humano. En el presente caso, estas membranas no podrían recomendarse para determinación de ADN con ensayos ELISA.

### 55 Ejemplo 6

*Aplicación de membrana de nitrato celulosa FTA para medida del nivel de anticuerpos para ADN humano. Diagnóstico de Lupus*

#### 60 *Diseño de Estudio*

65 ADN genómico humano de doble trenzado o suspensión de WBC como fuentes de ADN humano se cargaron en la piezas de membrana de nitrato celulosa FTA en una placa con 96 pozos. La placa se incubó con anticuerpos (Abs) específicos del ADN humano, que se obtuvieron del paciente con la enfermedad de Lupus. La concentración de Abs fue 1  $\mu\text{g}$  de Abs/ml. En ensayo ELISA con la base de Abs anti-humanos de ratón conjugados con biotina y poli-avidin-HRP se llevó a cabo en la placa. La intensidad de color se desarrolló en los Abs para los pozos de ADN positivo humano y los pozos de control medidos a 490 nm.



## ES 2 291 199 T3

### 6. Prueba de Patógeno Múltiple

5 La sangre de donante administrada a un dispositivo FTA puede testarse para muchos patógenos a la vez mediante técnicas PCR. Una gota de sangre de 50  $\mu\text{g}$  produce una gran superficie sobre un filtro desde el cual se pueden tomar muchas otras punzadas de un milímetro. Así mismo, la provisión existe para llevar a cabo diferentes y específicas reacciones PCR en la misma punzada.

### 7. Transporte de muestra de sangre

10 Las donaciones realizadas en las instituciones no llevan a cabo necesariamente NAT. Se toman caras medidas para sacar sangre en tubos y transportarlos a centros de pruebas de NAT. Un dispositivo FAT con una gota de sangre de donante puede enviarse mediante servicio postal de Estados Unidos a temperatura ambiente sin ningún gasto adicional.

### 8. Tarjetas FTA para Ambulancias

15 Las víctimas de accidentes, etc, pueden testarse rápidamente con NAT si la sangre de la víctima se archiva en una tarjeta FTA que es transportada por el personal que viaja en la ambulancia.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un equipo para purificar ácido nucleico que comprende:

5 (i) un sustrato para lisar células y purificar ácido nucleico que está formado por una matriz sólida consistente en nitrocelulosa, estando la matriz sólida cubierta por una capa química que comprende una base débil, un agente quelante, y un surfactante o detergente aniónico que facilita la lisis celular; y

10 (ii) medios indicadores para indicar la presencia de ácido nucleico, donde el medio indicador es un conjugado de polietileneimina o un ensayo inmunosorbente unido a una enzima (ELISA) que usa anticuerpos a ADN humano.

2. El equipo de la reivindicación 1, donde dicha matriz cubierta tiene la forma seleccionada del grupo consistente esencialmente en un hisopo, una lámina, una tarjeta, y una bola.

15 3. El equipo de acuerdo con la reivindicación 1, donde la matriz sólida es una membrana de nitrocelulosa.

4. El equipo de acuerdo con la reivindicación 1, donde el equipo además consta de medios de mantenimiento de integridad para preservar la matriz y purificar el ácido nucleico.

20 5. El equipo de acuerdo con la reivindicación 4, donde dichos medios de mantenimiento de integridad se seleccionan del grupo consistente esencialmente en una bolsa de plástico, celofán, un envase sellable, cartucho y parafilm.

25 6. El equipo de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicho sustrato es una lámina, y dicho medio de mantenimiento de integridad es una bolsa de plástico.

7. Un método de purificación de ácido nucleico consistente en los pasos de:

30 (i) aplicar una muestra consistente en ácido nucleico a un sustrato formado por una matriz sólida consistente en nitrocelulosa, estando la matriz sólida cubierta por una capa química que comprende una base débil, un agente quelante, y un surfactante o detergente aniónico que facilita la lisis celular;

(ii) capturar el ácido nucleico en el interior del sustrato;

35 (iii) opcionalmente, fijar el ácido nucleico al sustrato;

(iv) aplicar un medio indicador para indicar la presencia de ácido nucleico;

40 (v) generar una señal para indicar la presencia del ácido nucleico, donde la señal se genera mediante un conjugado de polietileneimina o un ensayo inmunosorbente unido a una enzima (ELISA) que usa anticuerpos a ADN humano.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho paso de generación se define además como una generación de señal fluorescente, un indicador de color o indicador fotométrico.

45 9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde la matriz sólida es una membrana de nitrocelulosa.

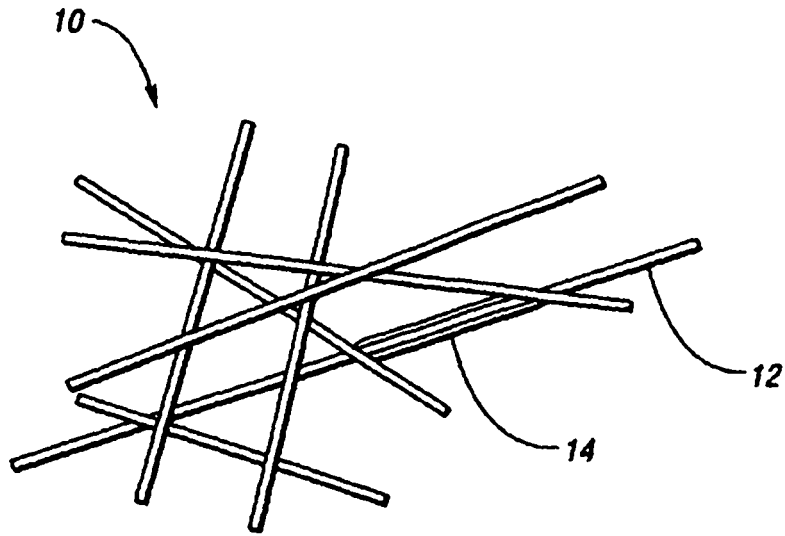
10. Un método de acuerdo con las reivindicaciones anteriores 7 a 9, que además incluye el paso de analizar la cantidad de ácido nucleico capturado cuantificando la señal generada.

50 11. Una tarjeta sanguínea para etiquetar las bolsas de transfusión de sangre comprendiendo el equipo de las reivindicaciones 1 a 3 y los medios de mantenimiento de integridad.

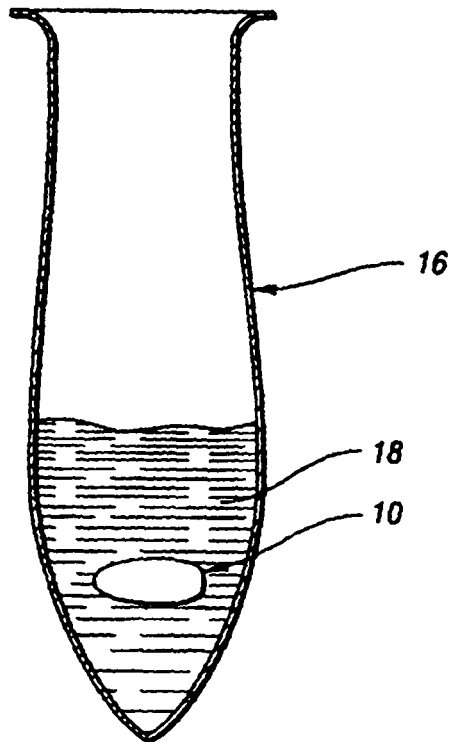
55

60

65



*Fig. 1*



*Fig. 2*

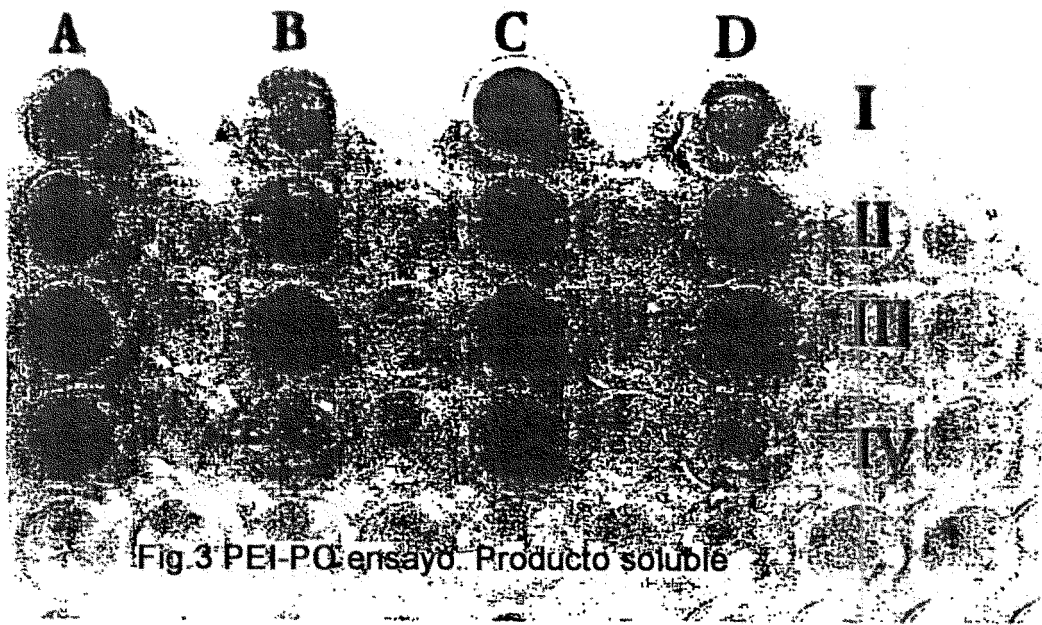
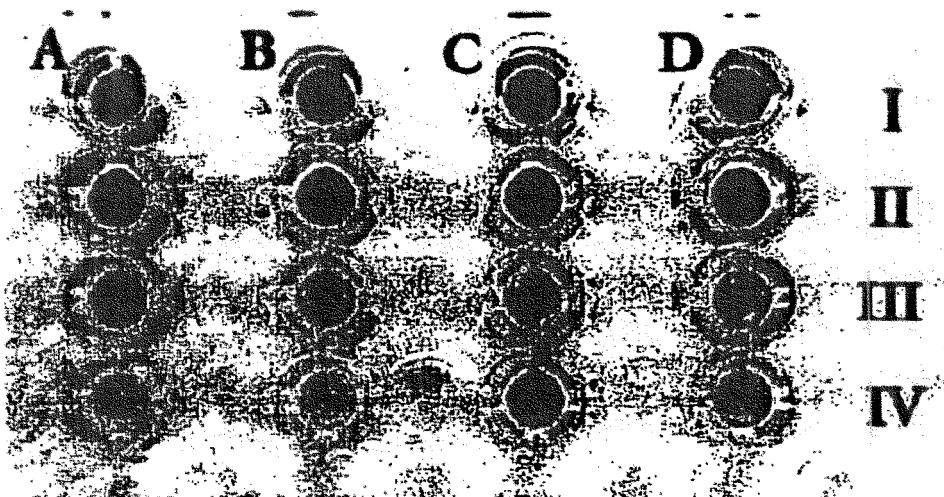


Fig. 3 PEI-PO ensayo. Producto soluble

*Fig. 3* PEI-PO ensayo. Producto soluble



*Fig. 4* PEI-PO ensayo. Producto soluble