



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 321 627**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05026593 .3**

(96) Fecha de presentación : **06.12.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1669449**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2006**

(54) Título: **Kit-reactivo para preparar una disolución muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico y método de detección de ácido nucleico usando la disolución de tratamiento.**

(30) Prioridad: **07.12.2004 JP 2004-353849**

(73) Titular/es: **SYSMEX CORPORATION**
5-1 Wakinohama-Kaigandori 1-chome
Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 651-0073, JP

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.06.2009

(72) Inventor/es: **Otomo, Yasuhiro;**
Takeda, Kazuhiko;
Abe, Shigeki y
Nakabayashi, Kazuki

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.06.2009

(74) Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 321 627 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

Kit-reactivo para preparar una disolución muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico y método de detección de ácido nucleico usando la disolución de tratamiento.

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana, que comprende usar la disolución de tratamiento. Además, la presente invención se refiere a un kit para amplificar un ácido nucleico diana, que comprende la disolución de tratamiento.

Antecedentes

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método de amplificación de un ácido nucleico en el que puede amplificarse exponencialmente un fragmento de ADN diana llevando a cabo repetidamente la disociación de una cadena de ADN para dar una cadena sencilla, posteriormente la unión, a la cadena de ADN, de un cebador correspondiente a una región específica en la cadena, y reacción de síntesis de ADN con una ADN polimerasa. Además del método de PCR, hay métodos de amplificación de ácido nucleico tales como RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa), NASBA (amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico), LAMP (amplificación de ADN isotérmica mediada por bucle), TMA (método de amplificación mediada por transcripción) y 3SR (replicación de secuencias autosostenida).

La reacción de amplificación de un ácido nucleico en los métodos de amplificación de ácido nucleico mencionados anteriormente es sensible a la influencia de una sustancia que inhibe la reacción de amplificación de ácido nucleico, tal como una proteína (denominado a continuación en el presente documento, inhibidor) contenida en una muestra biológica, y la reacción de amplificación de ácido nucleico se inhibe por el inhibidor. En consecuencia, es necesaria la operación de extracción o purificación de un componente de ácido nucleico tal como ADN o ARN a partir de una muestra biológica antes de la detección de un ácido nucleico mediante el método de amplificación de ácido nucleico. Sin embargo, la operación de extracción o purificación de un componente de ácido nucleico es problemática y requiere mucho tiempo. Como métodos que pueden amplificar un ácido nucleico diana sin realizar la operación de extracción o purificación de un componente de ácido nucleico, se conocen métodos descritos en la solicitud de patente estadounidense abierta a consulta al público número 2005/0089857 (WO0070073) o el documento internacional abierto a consulta por el público número 00/08136 (WO0008136).

La solicitud de patente estadounidense abierta a consulta al público número 2005/0089857 citada anteriormente describe un método de amplificación de un ácido nucleico diana, que comprende tratar una muestra biológica con una disolución que contiene una sal que interacciona con un inhibidor con el fin de reducir la influencia del inhibidor.

El documento internacional abierto a consulta por el público número 00/08136 citado anteriormente describe un método de amplificación de un ácido nucleico a partir de un microorganismo presente en una muestra tal como heces, que comprende lavar la muestra con un disolvente orgánico para eliminar un inhibidor. Específicamente, cuando la muestra es heces, se suspenden las heces en una disolución tampón adecuada, y se centrifuga la suspensión resultante para eliminar sólidos grandes, y se recoge su sobrenadante. Se centrifuga el sobrenadante obtenido, y se descarta el sobrenadante resultante, y se lavan los precipitados residuales añadiendo un disolvente orgánico y centrifugando los precipitados, y se recuperan microorganismos como precipitados y se usan como una muestra para amplificación de ácido nucleico. El documento internacional abierto a consulta por el público número 00/08136 citado anteriormente describe que pueden usarse como disolvente orgánico disolventes orgánicos hidrófilos tales como etanol, metanol, 2-propanol, propanona (acetona), etanonitrilo (acetonitrilo) y dimetilsulfóxido (DMSO) o disolventes orgánicos anfipáticos tales como butanol, 2-butanol y acetato de etilo. El documento internacional abierto a consulta al público número 00/08136 también describe que la muestra puede ser tejidos recogidos quirúrgicamente del organismo vivo, una muestra sólida tal como un tejido se homogeneiza de manera deseable para facilitar el lavado, y un ácido nucleico como objeto de amplificación no se limita particularmente a un gen de un microorganismo patógeno o un gen derivado del organismo vivo.

Sin embargo, en el método en el documento internacional abierto a consulta al público número 00/08136, se usa como muestra un tejido derivado de un organismo vivo, y cuando ha de amplificarse un ácido nucleico derivado del tejido pero no un ácido nucleico en un microorganismo presente en el tejido, surge ahí un problema que cuando el tejido homogeneizado se lava con el disolvente orgánico mencionado anteriormente, se elimina el ácido nucleico objetivo junto con un inhibidor, reduciendo así la cantidad de ácido nucleico que puede recuperarse.

El documento WO2004072270 da a conocer un método para detectar ácido nucleico usando una disolución de enjuague, que contiene un disolvente miscible en agua y DMSO, y una disolución de homogeneización, que contiene un tensioactivo. En este documento, las muestras de ARN se aíslan de los tejidos tras los tratamientos mediante la disolución de enjuague y mediante la disolución de homogeneización sin emplear una amplificación directa ni una etapa de detección.

Sumario

El alcance de la presente invención se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas, y no se ve afectada en grado alguno por las declaraciones dentro de este sumario.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana, que comprende las etapas de: preparar una disolución de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico tratando una muestra biológica con una disolución de tratamiento que contiene dimetilsulfóxido, conteniendo la disolución de muestra ácido nucleico que se transfiere desde la muestra biológica; amplificar el ácido nucleico diana contenido en la disolución de muestra; y detectar el ácido nucleico diana amplificado.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un kit de reactivos para amplificar un ácido nucleico diana, que comprende: un primer reactivo para tratar una muestra biológica, que comprende una disolución de tratamiento que contiene dimetilsulfóxido; y un segundo reactivo para la reacción de amplificación de ácido nucleico, que comprende desoxirribonucleótidos trifosfato, una ADN polimerasa y un cebador que es complementario al ácido nucleico diana.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra los resultados en el ejemplo 1.

La figura 2 es una gráfica que muestra los resultados en el ejemplo 2, en el que se usó el ganglio linfático como muestra biológica.

La figura 3 es una gráfica que muestra los resultados en el ejemplo 2, en el que se usó el ovario como muestra biológica.

La figura 4 es una gráfica que muestra los resultados en el ejemplo 2, en el que se usó el riñón como muestra biológica.

La figura 5 es una gráfica que muestra los resultados en el ejemplo 2, en el que se usó el pulmón como muestra biológica.

La figura 6 es una gráfica que muestra los resultados en el ejemplo 2, en el que se usó el hígado como muestra biológica.

La figura 7 es una gráfica que muestra los resultados en el ejemplo 2, en el que se usó el corazón como muestra biológica.

La figura 8 es una gráfica que muestra los resultados en el ejemplo 2, en el que se usó el bazo como muestra biológica.

La figura 9 es una gráfica que muestra los resultados en el ejemplo 2, en el que se usó el estómago como muestra biológica.

La figura 10 es una gráfica que muestra los resultados en el ejemplo 2, en el que se usó el colon como muestra biológica.

Descripción de las realizaciones preferidas

La disolución de tratamiento para preparar una disolución de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico contiene dimetilsulfóxido (DMSO) con el fin de reducir la influencia de un inhibidor. Una disolución de muestra preparada tratando una muestra biológica con la disolución de tratamiento para transferir un ácido nucleico contenido en la muestra biológica a la disolución de tratamiento se usa en la reacción de amplificación de un ácido nucleico, mediante la cual puede recuperarse eficazmente el ácido nucleico incluso si se deriva de un tejido, y puede reducirse eficazmente la influencia de un inhibidor durante la amplificación de ácido nucleico.

La disolución de tratamiento es una disolución obtenida disolviendo dimetilsulfóxido (DMSO) en disolvente acuoso. La concentración de DMSO en la disolución de tratamiento es preferiblemente del 1 al 50% (v/v), más preferiblemente del 5 al 30% (v/v), todavía más preferiblemente del 10 al 25% (v/v). La disolución de tratamiento que contiene DMSO a la concentración se usa para tratar una muestra biológica preparando así una disolución de muestra para la amplificación de ácido nucleico, y la disolución de muestra se usa en la reacción de amplificación de un ácido nucleico, mediante la cual puede reducirse una posible disminución de la actividad enzimática en la reacción de amplificación de ácido nucleico, y puede reducirse eficazmente la influencia de un inhibidor durante la amplificación de ácido nucleico.

Para evitar la degradación de un ácido nucleico contenido en la disolución de muestra, se usa de manera deseada una disolución de tratamiento ácida que es inferior a pH 7,0. El pH de la disolución de tratamiento es preferiblemente de 2,5 a 5,0, más preferiblemente de 3,0 a 4,0.

ES 2 321 627 T3

El disolvente acuoso incluye agua y una disolución tampón. Por ejemplo, la disolución tampón que permite que el pH de la disolución se mantenga ácido puede usarse como disolvente acuoso para preparar la disolución de tratamiento ácida.

La disolución de tratamiento contiene además un tensioactivo con el fin de aumentar la cantidad de un ácido nucleico contenido en la disolución de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico. El tensioactivo contenido en la disolución de tratamiento es preferiblemente un tensioactivo no iónico. Entre diversos tensioactivos no iónicos se prefiere un tensioactivo no iónico a base de polioxietileno. El tensioactivo no iónico a base de polioxietileno es de manera particularmente preferible un tensioactivo representado por la siguiente fórmula general:



en la que R1 representa un grupo alquililo, un grupo alquenilo, un grupo alquilo C10 a C22 o un grupo isoocitilo; R2 representa -O- ó -(C₆H₄)-O-; y n es un número entero de 8 a 120.

Ejemplos preferidos del tensioactivo no iónico a base de polioxietileno incluyen éter laurílico de polioxietileno, éter cetílico de polioxietileno, éter oleílico de polioxietileno, éter miristílico de polioxietileno, éter estearílico de polioxietileno, éter nonilfenílico de polioxietileno y éter isoocitilfenílico de polioxietileno. La concentración del tensioactivo en la disolución de tratamiento se selecciona de modo que se sea una concentración preferible dependiendo del tipo del tensioactivo usado. Por ejemplo, la concentración del tensioactivo no iónico, en la disolución de tratamiento es preferiblemente del 0,1 al 6% (v/v), más preferiblemente del 1 al 5% (v/v). La disolución de tratamiento puede contener también una agente desespumante junto con el tensioactivo.

La muestra biológica no está particularmente limitada. Por ejemplo, la muestra biológica incluye tejidos tales como ganglios linfáticos o sangre completa, plasma, suero, orina, saliva, secreciones y fluido corporales recogidos de organismos vivos tales como seres humanos o animales. La muestra biológica también incluye tejidos cultivados y células cultivadas obtenidas mediante el cultivo de tejidos o células recogidos de seres humanos o animales. Además, la muestra biológica incluye muestras derivadas de no animales tales como plantas y microorganismos.

La disolución de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico es una disolución obtenida mezclando una muestra biológica con la disolución de tratamiento, y contiene un ácido nucleico que sirve como molde en la reacción de amplificación de ácido nucleico. Para su uso en la reacción de amplificación del ácido nucleico, la disolución de muestra se mezcla con reactivos para la reacción de amplificación de ácido nucleico. Los reactivos para la reacción de amplificación de ácido nucleico incluyen desoxirribonucleótidos trifosfato, enzimas tales como una ADN polimerasa y ARN transcriptasa inversa, al menos una clase de cebador que es complementario al ácido nucleico diana, y una disolución tampón dando condiciones preferibles a la reacción enzimática. Además, los reactivos para la reacción de amplificación de ácido nucleico pueden combinarse con la disolución de tratamiento para constituir un kit de reactivos para amplificar un ácido nucleico diana. Por ejemplo, cuando el kit de reactivos comprende un primer reactivo para tratar una muestra biológica y un segundo reactivo para la reacción de amplificación de ácido nucleico, el primer reactivo comprende una disolución de tratamiento que contiene dimetilsulfóxido y el segundo reactivo comprende desoxirribonucleótidos trifosfato, enzimas tales como una ADN polimerasa y ARN transcriptasa inversa y un cebador que es complementario al ácido nucleico diana. Para constituir el segundo reactivo, puede combinarse un reactivo de un primer grupo que contiene desoxirribonucleótidos trifosfato y enzimas tales como una ADN polimerasa y ARN transcriptasa inversa con un reactivo de un segundo grupo que contiene un cebador que es complementario al ácido nucleico diana. Además, puede combinarse un reactivo de un primer grupo que contiene desoxirribonucleótidos trifosfato y enzimas tales como una ADN polimerasa y ARN transcriptasa inversa con un reactivo de un segundo grupo que contiene un cebador que es complementario al ácido nucleico diana con un reactivo de un segundo grupo que contiene enzimas tales como una ADN polimerasa y ARN transcriptasa inversa. Además, puede combinarse un reactivo de un primer grupo que contiene desoxirribonucleótidos trifosfato con un reactivo de un segundo grupo que contiene enzimas tales como una ADN polimerasa, y ARN transcriptasa inversa y un reactivo de un tercer grupo que contiene un cebador que es complementario al ácido nucleico diana.

Cuando la disolución de muestra se prepara mezclando una muestra biológica con la disolución de tratamiento, las células que contienen un ácido nucleico diana se rompen o se lisan para transferir el ácido nucleico en las células a la disolución de tratamiento. Particularmente, cuando se usa una muestra sólida tal como un tejido como muestra biológica, la disolución de muestra se hace homogénea de manera deseable con un homogeneizador, una mezcladora o similar para preparar la disolución de muestra mezclando la muestra biológica con la disolución de tratamiento. Para eliminar los materiales sólidos relativamente grandes tales como residuos celulares, la disolución de muestra que se hace homogénea puede someterse si es necesario a tratamiento tal como filtración y centrifugación para preparar la disolución de muestra.

El ácido nucleico diana incluye, pero no se limita a, ADN y ARN derivado del organismo vivo, ADN y ARN microbiano, y ADN y ARN derivado de plantas.

El inhibidor se refiere a una sustancia que inhibe la reacción de amplificación de un ácido nucleico, y ejemplos del inhibidor incluyen proteínas, lípidos y azúcares contenidos en la muestra biológica. Cuando el inhibidor está contenido en la disolución de muestra preparada a partir de la muestra biológica, la reacción de amplificación de un ácido nucleico se inhibe debido a la influencia del inhibidor.

La influencia del inhibidor puede reducirse disminuyendo la concentración del inhibidor en la disolución de muestra. El método de disminución de la concentración del inhibidor incluye la dilución de la disolución de muestra. Sin embargo, la concentración del ácido nucleico diana en la disolución de muestra también disminuye mediante la dilución de la disolución de muestra. Particularmente, cuando la cantidad de un ácido nucleico diana en la muestra biológica es baja, la concentración del ácido nucleico diana en la disolución de muestra se hace muy baja tras la dilución a alto grado, dando como resultado problemas tales como la necesidad de un largo tiempo en la amplificación de ácido nucleico, un nivel inferior del ácido nucleico amplificado que limite de detección, y no lograr amplificar el ácido nucleico. Por consiguiente, la disolución de tratamiento que contiene DMSO puede usarse para reducir la influencia de un inhibidor contenido en la disolución de muestra, sin diluir la disolución de muestra a alto grado. El grado de dilución óptimo para amplificar un ácido nucleico reduciendo eficazmente la influencia de un inhibidor varía dependiendo de la cantidad y el tipo de la muestra biológica usada. Por consiguiente, cuando la disolución de muestra se prepara a partir de una muestra biológica usando la disolución de tratamiento, se selecciona un grado de dilución adecuado de manera deseable dependiendo de la cantidad y el tipo de la muestra biológica usada. Para la dilución puede usarse la disolución de tratamiento.

La disolución de muestra preparada a partir de una muestra biológica usando la disolución de tratamiento puede usarse en métodos conocidos para amplificar ácidos nucleicos. Pueden mencionarse métodos para amplificar ácidos nucleicos, tales como PCR (reacción en cadena de la polimerasa), RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa), LAMP (amplificación de ADN isotérmica mediada por bucle), RT-LAMP (amplificación de ADN isotérmica mediada por bucle con transcriptasa inversa), TMA (método de amplificación mediado por transcripción), NASBA (amplificación basada en secuencias de ácido nucleico), 3SR (replicación de secuencia autosostenida), SDA (amplificación por desplazamiento de cadena) e ICAN (amplificación de ácidos nucleicos iniciada por cebadores química e isotérmica). Como una clase de métodos de amplificación de ácido nucleico, pueden mencionarse también métodos de amplificación de señal tales como RCA (amplificación por círculo rodante), INVADER, CPT (tecnología de la sonda cíclica) y PALSAR (reacción de autoensamblaje de ligador con alternancia de sonda). En el método de amplificación de señal, no se amplifica el ácido nucleico diana por sí mismo sino una secuencia de nucleótidos específica complementaria al ácido nucleico diana. El método de amplificación de ácido nucleico es preferiblemente PCR, RT-PCR, LAMP o RT-LAMP, de manera particularmente preferible LAMP o RT-LAMP desde el punto de vista de la amplificación rápida del ácido nucleico.

El método de detección del ácido nucleico diana amplificado no está particularmente limitado, y el ácido nucleico diana puede detectarse mediante métodos conocidos en la técnica. Es posible emplear, por ejemplo, electroforesis sobre gel de agarosa, un método de detección de detección en tiempo de real con sondas usando un marcador fluorescente, y un método de detección mediante la turbidez de un subproducto generado tras la síntesis de ADN. Si es necesario también puede usarse un método de detección de un ácido nucleico diana confirmando un patrón de escisión de ácido nucleico obtenido mediante tratamiento enzimático, un método de detección de un ácido nucleico determinando su secuencia de nucleótidos mediante análisis de secuencia y otros muchos métodos. Cuando una banda del ácido nucleico diana casi no puede distinguirse debido a muchas bandas no específicas, la banda del ácido nucleico diana puede confirmarse mediante transferencia de tipo Southern con sondas para el ácido nucleico específico. Desde el punto de vista de la detección rápida del ácido nucleico diana, el método de detección del ácido nucleico diana particularmente preferible es el método de detección en tiempo de real con una sonda usando un marcador fluorescente y el método de detección mediante la turbidez de un subproducto generado tras la síntesis de ADN.

La disolución de tratamiento puede usarse ampliamente en examen clínico para la valoración de la presencia o ausencia de enfermedades mediante el método de amplificación de ácido nucleico. Tales enfermedades incluyen, por ejemplo, infecciones, enfermedades relacionadas con genes y cánceres.

Las células cancerosas salen de un foco primario y se propagan por medio de la circulación sanguínea o del sistema linfático hacia todo el organismo. En la operación del cáncer, el foco debe eliminarse de la manera más precisa posible de modo que se requiere que su metástasis se detecte de manera precisa, y se realiza un tratamiento adecuado dependiendo de la metástasis. Por consiguiente el diagnóstico de la metástasis de cáncer en el ganglio linfático durante la operación tiene un significado muy importante. En el cáncer de mama, por ejemplo, la zona del ganglio linfático que ha de escindirse en la operación es de manera más deseable lo más pequeña posible para mejorar la CDV (calidad de vida). En el cáncer de esófago debe seleccionarse operación abdominal, apertura del pecho o incisión cervical dependiendo del sitio de propagación del cáncer en el ganglio linfático. En el cáncer de próstata, debe determinarse si la operación ha de continuarse o suspenderse, si la escisión ha de continuarse y si ha de llevarse a cabo tratamiento hormonal cuando existe metástasis en ganglio linfático. En el cáncer de estómago, la zona del ganglio linfático que va a extirparse y el tipo de operación se cambian dependiendo de la presencia o ausencia de la metástasis del cáncer en el ganglio linfático. En el cáncer de estómago, la presencia o ausencia de la metástasis del cáncer en el ganglio linfático se convierte en una pauta para el plan de tratamiento tras la operación, por ejemplo una pauta para seleccionar si por ejemplo ha de administrarse un fármaco anticancerígeno y si ha de realizarse radioterapia. En este caso, si puede diagnosticarse rápidamente la metástasis del cáncer usando una muestra biológica recogida durante la operación, la zona del ganglio linfático que va a extirparse, el tipo de operación que va a realizarse y el tratamiento complementario que va a realizarse pueden determinarse en la operación incluso durante un corto tiempo, permitiendo así al paciente recibir el mejor tratamiento. Además, puede reducirse la carga sobre el paciente durante la operación.

Cuando se usa la disolución de tratamiento descrita anteriormente, puede prepararse rápidamente una disolución de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico a partir de una muestra biológica sin extraer o purificar

ES 2 321 627 T3

un ácido nucleico. Por consiguiente, la disolución de tratamiento puede usarse de manera eficaz particularmente en el diagnóstico de metástasis del cáncer que debería completarse rápidamente usando el método de amplificación de ácido nucleico durante la operación.

El ácido nucleico que sirve como indicador del cáncer incluye ácidos nucleicos de citoqueratinas tales como citoqueratina 18, citoqueratina 19 y citoqueratina 20 y marcadores tumorales tales como CEA (antígeno carcinoembrionario), PSA (antígeno específico de la próstata) y CA-15-3 (antígeno de hidratos de carbono 15-3).

Ejemplo 1

En este ejemplo se examinó el efecto de DMSO contenido en la disolución de tratamiento para preparar la disolución de muestra. En este ejemplo, se usó la disolución de tratamiento que contenía DMSO para preparar una disolución de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico a partir de una muestra biológica, y se usaron la disolución de muestra preparada y un reactivo para la reacción de amplificación de ácido nucleico para llevar a cabo RT-LAMP.

Como muestra biológica, se usaron células Molt-4 cultivadas comerciales. Las células Molt-4 son células tumorales subcultivadas derivadas de ser humano de leucemia linfocítica aguda.

Como disolución de tratamiento, se usaron 4 disoluciones de tratamiento que tenían diferentes concentraciones de DMSO del 0% (v/v), 5% (v/v), 10% (v/v) y el 20% (v/v), respectivamente. La composición de las disoluciones de tratamiento se muestra a continuación. La disolución de tratamiento contiene un tensioactivo Brij35 (fabricado por Sigma Aldrich Japón) que es lauril éter de polioxietileno (23). Como agente de deformación está contenido KS-538 fabricado por Shin-Etsu Chemical Co., Ltd en la disolución de tratamiento.

Composición de reactivos (disolución de tratamiento para preparar la disolución de muestra)

Tampón de glicina (pH 3,0)	200 mM
DMSO	0 - 20% (v/v)
Brij35	5% (v/v)
KS-538	0,05% (v/v)

Se llevó a cabo la amplificación de ácido nucleico mediante RT-LAMP en la que se usó ARN de β -actina como ácido nucleico diana. La β -actina se expresa a un nivel definido en cada célula.

Como reactivo para la reacción de amplificación de ácido nucleico, se usaron una disolución de reacción, una disolución enzimática y un reactivo de cebador que contenía seis cebadores expuestos en las SEQ ID NOS: 1 a 6. La composición de cada reactivo se muestra a continuación.

Composición de reactivos (disolución de reacción)

Disolución tampón Tris 750 mM (pH 8,0)	1,00 μ l
10x disolución tampón Thermopol (fabricada por New England Bio Lab)	2,50 μ l
dNTP 10 mM	2,00 μ l
MgSO ₄ 100 mM	0,75 μ l
Ditiotreitol 100 mM	1,25 μ l
Tergitol al 2% (fabricado por Sigma Aldrich Japón)	2,50 μ l
H ₂ O	3,97 μ l
Cantidad total	13,97 μ l

ES 2 321 627 T3

Composición de reactivos (reactivo enzimático)

5	Transcriptasa inversa del VMA 10 U/ μ l	0,14 μ l
	(fabricada por Promega)	
10	Bst ADN polimerasa 8 U/ μ l (fabricada por New England Bio Lab)	2,27 μ l
	Inhibidor de ARNasa (fabricado por Promega)	0,63 μ l
15	Cantidad total	3,04 μ l

Composición de reactivos (reactivo de cebador)

20	Cebador interno directo 80 pmol/ μ l (SEQ ID NO: 1)	1,00 μ l
	Cebador interno inverso 80 pmol/ μ l (SEQ ID NO: 2)	1,00 μ l
25	Cebador externo directo 5 pmol/ μ l (SEQ ID NO: 3)	1,00 μ l
	Cebador externo inverso 5 pmol/ μ l (SEQ ID NO: 4)	1,00 μ l
30	Cebador en bucle directo 60 pmol/ μ l (SEQ ID NO: 5)	1,00 μ l
	Cebador en bucle inverso 60 pmol/ μ l (SEQ ID NO: 6)	1,00 μ l
35	Cantidad total	6,00 μ l

(1) Preparación de una disolución de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico

Se añadieron 4 ml de la disolución de tratamiento a 300 mg de células Molt-4, y se rompieron las células y se homogeneizaron a 25.000 rpm durante 90 segundos con un homogeneizador fabricado por Microtec Nition. Entonces, se centrifugó la disolución homogeneizada (10.000 xg, 1 minuto) dando un sobrenadante. Se usó el sobrenadante resultante como una disolución de muestra de dilución de una vez. Adicionalmente, se diluyó la disolución de muestra de dilución de una vez 2, 4, 8, 10 y 16 veces con la disolución de tratamiento, para preparar disoluciones de muestra diferentes en el grado de dilución.

(2) Amplificación de ácido nucleico mediante RT-LAMP

Se realizó la amplificación de ácido nucleico mediante RT-LAMP en la que el ácido nucleico diana era ARN de β -actina. En primer lugar, se mezclaron entre sí 13,97 μ l de la disolución de reacción, 3,04 μ l del reactivo enzimático y 6,00 μ l del reactivo de cebador para preparar una mezcla de reactivos. Se mezclaron 23 μ l de la mezcla de reactivos con 2 μ l de cada disolución de muestra preparada en (1), y entonces se hicieron reaccionar a 65°C durante 30 minutos. En la detección del ácido nucleico amplificado se usó un instrumento de medición de la turbidez en tiempo real Loopamp (LA-200) fabricado por Teramecs. La reacción de amplificación de ácido nucleico puede monitorizarse en tiempo real con este instrumento realizando una reacción de amplificación de ácido nucleico a una temperatura predeterminada y detectando simultáneamente la turbidez del pirofosfato de magnesio formado como subproducto de la amplificación. En este ejemplo, se midió la absorbancia a una temperatura fijada a 65°C durante 30 minutos tras haberse mezclado la disolución de muestra con el reactivo para la reacción de amplificación de ácido nucleico.

En la figura 1 se muestra en una gráfica de barras el tiempo que había transcurrido hasta que la absorbancia de cada disolución de muestra alcanzó 0,1. El tiempo (min.) que había transcurrido hasta que la absorbancia (Abs a 650 nm) alcanzó 0,1 se muestra en la ordenada. El triángulo en blanco sobre la gráfica de barras indica que la absorbancia no alcanzó 0,1 dentro del tiempo de reacción (30 minutos). El grado de dilución se muestra en la abscisa. En la gráfica de barras se usan las siguientes disoluciones de tratamiento de izquierda a derecha: la disolución de tratamiento a una concentración de DMSO del 0%, la disolución de tratamiento a una concentración de DMSO del 5%, la disolución de tratamiento a una concentración del DMSO de 10% y la disolución de tratamiento a una concentración de DMSO del 20%.

ES 2 321 627 T3

En las muestras diluidas a grados relativamente bajos de dilución (diluidas 1, 2 y 4 veces respectivamente) en la figura 1, las muestras usando la disolución de tratamiento que no contenía DMSO (es decir, a la concentración de DMSO del 0%) mostraron que había transcurrido más tiempo hasta que la absorbancia alcanzó 0,1 que las muestras usando las disoluciones de tratamiento que contenían DMSO (es decir, a las concentraciones de DMSO del 5%, 10% y el 20%, respectivamente). En este caso, el contenido de un inhibidor en la disolución de muestra es mayor a medida que el grado de dilución es menor. A partir de lo anterior, se encontró que la influencia de un inhibidor contenido en la disolución de muestra se reduce añadiendo DMSO a la disolución de tratamiento.

Cuando se comparan los tiempos que habían transcurrido hasta que la absorbancia alcanzaba 0,1 en las muestras que contenían DMSO a las concentraciones del 5%, 10% y el 20% respectivamente, las muestras que contenían DMSO a la concentración del 20% y diluidas a un grado de dilución menor muestran la disminución más significativa en el tiempo. Incluso en la muestra diluida una vez, el tiempo que ha transcurrido hasta que la absorbancia alcanza 0,1 es tan corto como de aproximadamente 22 minutos. A partir de este resultado, se encontró que cuando la concentración de DMSO es del 20%, puede reducirse más eficazmente la influencia de un inhibidor en la disolución de muestra.

Entre las disoluciones de muestra diluidas a grados de dilución relativamente altos (diluidas 8, 10 y 16 veces respectivamente) en la figura 1, las disoluciones de muestra incluso usando la disolución de tratamiento que no contiene DMSO permiten reducir el tiempo que había transcurrido hasta que la absorbancia alcanzó 0,1 hasta el mismo grado que se había conseguido mediante las disoluciones de muestra que contenían DMSO. Esto es, presumiblemente, debido a que mediante la dilución de la disolución de muestra a un alto grado de dilución, la concentración de un inhibidor contenido en la disolución de muestra se reduce también, reduciendo así la influencia del inhibidor.

Ejemplo 2

Se llevó a cabo RT-LAMP en este ejemplo en el que se usaron varias clases de tejidos como muestra biológica, y se usó la disolución de tratamiento que contenía DMSO para preparar la disolución de muestra.

Se usaron nueve clases de tejidos (ganglio linfático, ovario, riñón, pulmón, hígado, corazón, bazo, estómago y colon) extirpados de un ratón como muestra biológica.

Como disolución de tratamiento, se usó una disolución tampón que tenía la siguiente composición que contenía el 20% (v/v) de DMSO.

Composición de reactivos (disolución de tratamiento para preparar una disolución de muestra)

Disolución tampón de glicina (pH	200 mM
3,0)	
DMSO	20% (v/v)
Brij35	5% (v/v)
KS-538	0,05% (v/v)

Se llevó a cabo la amplificación de ácido nucleico mediante RT-LAMP en la que el ácido nucleico diana era ARN de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La GAPDH es expresa a una cantidad definida en cada célula.

Como reactivo para la reacción de amplificación de ácido nucleico, se usaron la disolución de reacción usada en el ejemplo 1, la disolución enzimática usada en el ejemplo 1 y un reactivo de cebador que contenía seis cebadores expuestos en las SEQ ID NOS: 7 a 12.

ES 2 321 627 T3

Composición de reactivos (disolución de cebador)

5	Cebador interno directo 80 pmol/ μ l (SEQ ID NO: 7)	1,00 μ l
10	Cebador interno inverso 80 pmol/ μ l (SEQ ID NO: 8)	1,00 μ l
15	Cebador externo directo 5 pmol/ μ l (SEQ ID NO: 9)	1,00 μ l
	Cebador externo inverso 5 pmol/ μ l (SEQ ID NO: 10)	1,00 μ l
20	Cebador en bucle directo 60 pmol/ μ l (SEQ ID NO: 11)	1,00 μ l
25	Cebador en bucle inverso 60 pmol/ μ l (SEQ ID NO: 12)	1,00 μ l
30	Cantidad total	6,00 μ l

(1) Preparación de una disolución de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico

35 Se añadieron 4 ml de la disolución de tratamiento a 300 mg de cada clase de tejido, y se rompieron las células y se homogeneizaron a 25.000 rpm durante 90 segundos con un homogeneizador fabricado por Microtec Niton. Entonces, se centrifugó la disolución homogeneizada (10.000xg, 1 minuto), y se diluyeron los sobrenadantes resultantes respectivamente 10 veces con la disolución de tratamiento, y se usaron éstos como disoluciones de muestra.

(2) Amplificación de ácido nucleico mediante RT-LAMP

45 Se realizó la amplificación de ácido nucleico mediante RT-LAMP en la que el ácido nucleico diana era ARN de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). En primer lugar, se mezclaron entre sí 13,97 μ l de la disolución de reacción, 3,04 μ l del reactivo enzimático y 6,00 μ l del reactivo de cebador para preparar una mezcla de reactivos. Se mezclaron 23 μ l de la mezcla de reactivos con 2 μ l de cada disolución de muestra preparada en (1), y entonces se hicieron reaccionar a 65°C durante 30 minutos. En la detección del ácido nucleico amplificado, se usó un instrumento de medición de la turbidez en tiempo real Loopamp (LA-200) fabricado por Teramecs. En este ejemplo, se midió la absorbancia a una temperatura fijada a 65°C durante 30 minutos tras mezclarse la disolución de muestra con el reactivo para la reacción de amplificación de ácido nucleico. Se usó una muestra usando ARN total de roedor (fabricado por Applied Biosystems) en lugar de la disolución de muestra como control positivo, y se usó una muestra usando la disolución de tratamiento en lugar de la disolución de muestra como control negativo.

55 Cada una de las figuras 2 a 10 es una gráfica que muestra la amplificación del ADNc de GAPDH en cada clase de tejido. En cualquier gráfica, se muestra la absorbancia (Abs a 650 nm) en la ordenada y el tiempo (min.) en la abscisa. Los resultados se muestran en las gráficas en las que se usaron los siguientes tejidos como muestra biológica: el ganglio linfático en la figura 2, el ovario en la figura 3, el riñón en la figura 4, el pulmón en la figura 5, el hígado en la figura 6, el corazón en la figura 7, el bazo en la figura 8, el estómago en la figura 9 y el colon en la figura 10. En cada gráfica, el símbolo de círculos negros es un símbolo de cada clase de tejido, el símbolo de círculos blancos es un símbolo del control positivo y el símbolo de triángulos negros es un símbolo del control negativo.

60 En las figuras 2 a 10, el tiempo de arranque de la amplificación del ADNc y la cantidad del ADNc amplificado cuando se habían usado los tejidos como muestra biológica eran similares a los del control positivo. El control positivo no contiene ningún inhibidor. A partir de este resultado, se encontró que puede usarse la disolución de tratamiento para cualquier tejido para reducir la influencia de un inhibidor y amplificar el ácido nucleico diana.

65

Ejemplo 3

En este ejemplo, se preparó una disolución de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico a partir de una muestra biológica usando la disolución de tratamiento (que contenía DMSO al 20% (v/v)) para preparar una disolución de muestra, y se usaron la disolución de muestra preparada y un reactivo comercial para llevar a cabo la RT-PCR.

Como muestra biológica, se usaron ganglios linfáticos humanos (A), (B), (C), (D) y (E) en los que se reconoció clínicamente la metástasis del cáncer como muestra biológica. Como control negativo, se usaron ganglios linfáticos humanos normales (F), (G) y (H).

Como disolución de tratamiento, se usó la misma disolución de tratamiento que en el ejemplo 2.

Se realizó la amplificación de ácido nucleico mediante RT-PCR en la que el ácido nucleico diana era ARN de citoqueratina 19 (CK19). Se sabe que CK19 se expresa en células epiteliales y también se expresa en tejidos tales como el ganglio linfático en el que se reconoce la metástasis del cáncer, y también existe una diferencia en el nivel de expresión de la misma entre tejidos normales y tejidos cancerosos. En este ejemplo, se usaron 3 cebadores expuestos en las SEQ ID NOS: 13 a 15.

Se llevó a cabo la RT-PCR usando reactivos de mezcla madre para RT-PCR en una sola etapa de TaqMan fabricados por Applied Biosystems y unidad de PCR de cuantificación en tiempo real (ABI PRISM 7700) fabricada por Applied Biosystems. Los reactivos de mezcla madre para RT-PCR en una sola etapa de TaqMan son un kit de reactivos para RT-PCR, que consistía en 2 x mezcla madre y 40 x mezcla de inhibidor de ARNasa. El ácido nucleico amplificado puede cuantificarse con ABI PRISM 7700 realizando la reacción de amplificación de ácido nucleico a una temperatura predeterminada durante un tiempo predeterminado y entonces detectando la densidad de fluorescencia aumentada dependiendo de la amplificación del ácido nucleico.

(1) Preparación de disoluciones de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico

Se añadieron 4 ml de la disolución de tratamiento a 300 mg de cada una de las muestras biológicas (A) a (H), y se rompieron las células y se homogeneizaron a 25.000 rpm durante 90 segundos con un homogeneizador fabricado por Microtec Niton. Entonces, se centrifugaron las disoluciones homogeneizadas (10.000 xg, 1 minuto), y se diluyeron los sobrenadantes resultantes 10 veces con la disolución de tratamiento y se usaron como disoluciones de muestra de ARNm bruto (A) a (H), respectivamente. Usando el kit RNeasy Mini fabricado por QIAGEN, se purificaron ARNm a partir de los sobrenadantes anteriores y se usaron como purificados dando disoluciones de muestra de ARNm (A) a (H), respectivamente. El tiempo necesario desde la purificación del ARNm del sobrenadante hasta la preparación de la disolución de muestra de ARNm purificado es aproximadamente de 60 minutos.

(2) Amplificación de ácido nucleico mediante RT-PCR

En este ejemplo, se realizó la RT-PCR en la que se usaron las disoluciones de muestra de ARNm bruto (A) a (H) y las disoluciones de muestra de ARNm purificado (A) a (H) preparadas en (1) respectivamente como disolución de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico. En primer lugar, se preparó una disolución de reacción que contenía la mezcla madre, mezcla de inhibidor de ARNasa y los 3 cebadores, y se mezcló la disolución de reacción así preparada con la disolución de muestra con el fin de llevar a cabo la RT-PCR. La RT-PCR consistió en 40 ciclos que implicaban cada uno una reacción de transcripción inversa 48°C durante 30 minutos y mantener la mezcla a 95°C durante 10 minutos, entonces a 95°C durante 15 segundos y a 60°C durante 1 minuto. Se mezcló la disolución de reacción que contenía la mezcla madre, mezcla de inhibidor de ARNasa y los 3 cebadores con la disolución de muestra y se reguló de modo que la composición final se convirtió en 1 x mezcla madre, 1 x mezcla de inhibidor de ARNasa, cebador directo 300 nM (SEQ ID NO: 13), cebador inverso 300 nM (SEQ ID NO: 14) y sonda de TaqMan 200 nM (SEQ ID NO: 15).

TABLA 1

		Cantidad de ADNc (copia / reacción)
5 10 15 20	Disoluciones de muestra de ARNm bruto	(A) 0,50 x 10 ⁵
		(B) 1,20 10 ⁶
		(C) 0,14 10 ⁵
		(D) 0,14 10 ⁶
		(E) 0,83 10 ⁴
		(F) ND
		(G) ND
		(H) ND
25 30 35	Disoluciones de muestra de ARNm purificado	(A) 0,83 10 ⁵
		(B) 0,46 10 ⁶
		(C) 0,11 10 ⁵
		(D) 0,16 10 ⁶
		(E) 0,11 10 ⁴
		(F) ND
		(G) ND
		(H) ND

La tabla 1 muestra la cantidad de ADNc (copias/reacción) de CK19 amplificado mediante la reacción de amplificación en cada muestra. La cantidad de ADNc (copias/reacción) en la tabla indica el número de copias de ADNc de CK19 contenidas en la muestra tras finalizar la reacción de amplificación. En la tabla, ND se refiere a una muestra en la que la cantidad de ADNc es inferior a 10² (copias/reacción), y cuando la cantidad de ADNc está en este intervalo, no se considera que se haya amplificado el ácido nucleico diana.

Cuando se comparaba la cantidad de ADNc de CK19 amplificado mediante RT-PCR usando la disolución de muestra de ARNm bruto (A) con aquella usando la disolución de muestra de ARNm purificado (A), las dos son muy similares entre sí. Esto se aplica también a los casos de (B) a (E), de manera similar al caso de (A), en los que cuando se compara la cantidad de ADNc de CK19 amplificado usando la disolución de muestra de ARNm bruto con aquella usando la disolución de muestra de ARNm purificada, las dos son muy similares entre sí. A partir de estos resultados, se encontró que incluso si se usa la disolución de muestra de ARNm bruto como disolución de muestra, el producto de amplificación puede obtenerse en una cantidad similar a aquella usando la disolución de muestra de ARNm purificado. En cualquier disolución de muestra (F) a (H) usada como control negativo, no se confirmó amplificación de ADNc de CK19.

Ejemplo 4

Usando una disolución de tratamiento que contiene tensioactivo, se preparó una disolución de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico en este ejemplo a partir de una muestra biológica, y se midió la cantidad de ARN contenido en la disolución de muestra preparada.

Se usaron ganglios linfáticos recogidos de 4 ratones (ratones MRL) de la misma raza respectivamente como muestra biológica. Como disolución de tratamiento, se usaron disoluciones de tratamiento (I) a (IV) que contenían DMSO y un tensioactivo. La composición para las disoluciones de tratamiento se muestra a continuación. Las disoluciones de tratamiento respectivas son diferentes en el tipo o la concentración del tensioactivo contenido: es decir, la disolución de tratamiento (I) contiene el 1% (v/v) de Nonidet P-40 que es isooctil fenil éter de polioxietileno (9); la disolución de tratamiento (II) contiene el 1,5% (v/v) de Brij35 que es lauril éter de polioxietileno (23); la disolución de tratamiento (III) contiene el 3% (v/v) de Brij35; la disolución de tratamiento (IV) contiene el 5% (v/v) de Brij35.

ES 2 321 627 T3

Composición de reactivos (disolución de tratamiento para preparar una disolución de muestra)

Disolución tampón de glicina (pH 3,0)	200 mM
DMSO	20% (v/v)
Tensioactivo	1 - 5% (v/v)
KS-538	0,05% (v/v)

(1) Preparación de disoluciones de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico

Se añadió la disolución de tratamiento (I), (II), (III) o (IV) a cada ganglio linfático de ratón, y se rompieron las células y se homogeneizaron a 25.000 rpm durante 90 segundos con un homogeneizador fabricado por Microtec Nition. Entonces, se centrifugó cada una de las disoluciones homogeneizadas (10.000 xg, 1 minuto), y se usó el sobrenadante resultante como disolución de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico. En este ejemplo, se preparó cada disolución de muestra de manera que contuviese aproximadamente 1 µl de la disolución de tratamiento por 0,075 mg de la muestra biológica.

(2) Extracción de ARN

Se extrajo el ARN contenido en la disolución de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico obtenida en (1) usando el kit RNeasy Mini fabricado por QIAGEN.

(3) Cuantificación del ARN

Se diluyó el extracto de ARN obtenido en el método descrito anteriormente 10 veces con la disolución de tratamiento, y se cuantificó el ARN midiendo la absorbancia (Abs 280 nm) de la muestra diluida. Los resultados se muestran en la tabla 2.

TABLA 2

	Ganglios linfáticos (mg) / disolución de tratamiento (µl)	Cantidad de ARN (µg/ml)
(I)	61 mg / 813 µl	71 µg/ml
(II)	59 mg / 787 µl	122 µg/ml
(III)	75 mg / 1000 µl	97 µg/ml
(IV)	67 mg / 893 µl	115 µg/ml

La tabla 2 muestra la cantidad de ARN (µg/ml) en cada una de las disoluciones de muestra obtenidas finalmente en las que cada ganglio linfático (mg) se mezcló con cada disolución de tratamiento (µl). (I), (II), (III) y (IV) en la tabla se refieren a los casos en los que se usaron las disoluciones de tratamiento (I), (II), (III) y (IV) como disolución de tratamiento, respectivamente.

La tabla 1 reveló que cuando se usaron las disoluciones de tratamiento (I), (II), (III) y (IV), estaban contenidos 71 (µg/ml), 122 (µg/ml), 97 (µg/ml) y 115 (µg/ml) de ARN respectivamente, lo que indica que estaba contenida una cantidad suficiente de ARN para la reacción de amplificación de ácido nucleico.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar un ácido nucleico diana, que comprende las etapas de:

homogeneizar un tejido derivado de un organismo vivo en una disolución de tratamiento que comprende dime-
tilsulfóxido, disolvente acuoso y un tensioactivo, de manera que se transfiere un ácido nucleico del tejido a la
disolución de tratamiento;

mezclar el homogeneizado obtenido y un reactivo para la reacción de amplificación de ácido nucleico, sin
extraer ni purificar un ácido nucleico en el homogeneizado;

amplificar el ácido nucleico diana contenido en la mezcla; y

detectar el ácido nucleico diana amplificado.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la concentración de dimetilsulfóxido es del 1 al 50% (v/v).

3. Método según la reivindicación 1, en el que el tensioactivo es un tensioactivo no iónico a base de polioxietileno.

4. Método según la reivindicación 1, en el que el disolvente acuoso es una disolución tampón.

5. Método según la reivindicación 1, en el que el pH de la disolución de tratamiento es de 2,5 a 5,0.

6. Método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de eliminar materiales sólidos del homoge-
neizado.

7. Método según la reivindicación 6, en el que los materiales sólidos se eliminan mediante filtración o centrifuga-
ción.

8. Método según la reivindicación 1, en el que el reactivo para la reacción de amplificación de ácido nucleico
comprende desoxirribonucleótidos trifosfato, una ADN polimerasa y un cebador que es complementario al ácido
nucleico diana.

9. Método según la reivindicación 1, en el que el reactivo para la reacción de amplificación de ácido nucleico
comprende desoxirribonucleótidos trifosfato, una ARN transcriptasa inversa, una ADN polimerasa y un cebador que
es complementario al ácido nucleico diana.

10. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de amplificación se lleva a cabo mediante PCR (reacción
en cadena de la polimerasa), RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa), LAMP (ampli-
ficación de ADN isotérmica mediada por bucle) o RT-LAMP (amplificación de ADN isotérmica mediada por bucle
con transcriptasa inversa).

11. Kit reactivo para amplificar un ácido nucleico diana, contenido en una muestra preparada sin extraer ni purificar
un ácido nucleico,

que comprende:

un primer reactivo, que comprende una disolución de tratamiento para transferir ácido nucleico desde un tejido
derivado de un organismo vivo a la disolución de tratamiento, en el que la disolución de tratamiento comprende
dimetilsulfóxido, disolvente acuoso y un tensioactivo; y

un segundo reactivo para la reacción de amplificación de ácido nucleico, que comprende desoxirribonucleótidos
trifosfato, una ADN polimerasa y un cebador que es complementario al ácido nucleico diana.

12. Kit reactivo según la reivindicación 11, en el que el segundo reactivo comprende además una ARN transcriptasa
inversa.

13. Kit reactivo según la reivindicación 11, en el que la concentración de dimetilsulfóxido es 1 a 50% (v/v).

14. Kit reactivo según la reivindicación 11, en el que el tensioactivo es un tensioactivo no iónico basado en polio-
xietileno.

15. Kit reactivo según la reivindicación 11, en el que el disolvente acuoso es una disolución tampón.

16. Kit reactivo según la reivindicación 11, en el que el pH de la disolución de tratamiento es 2,5 a 5,0.

Fig. 1

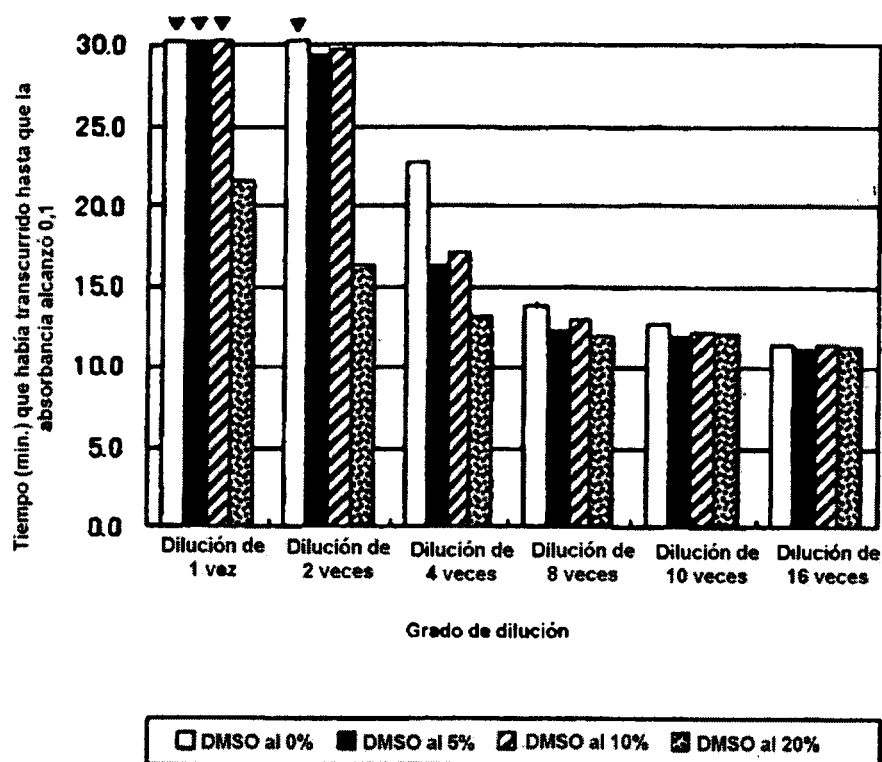


Fig. 2

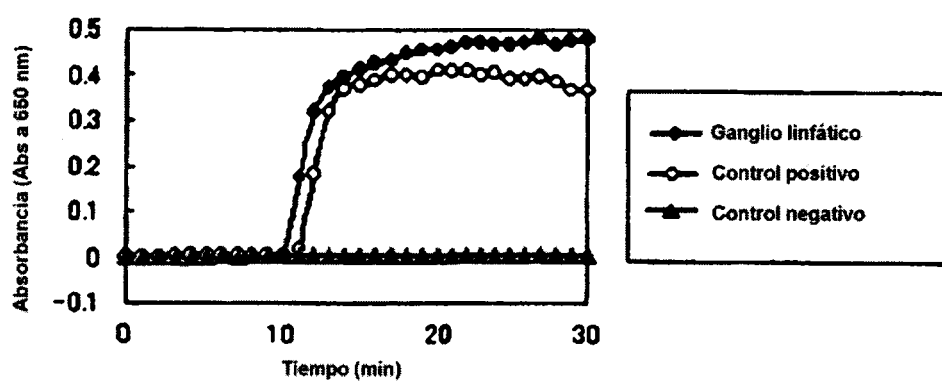


Fig. 3

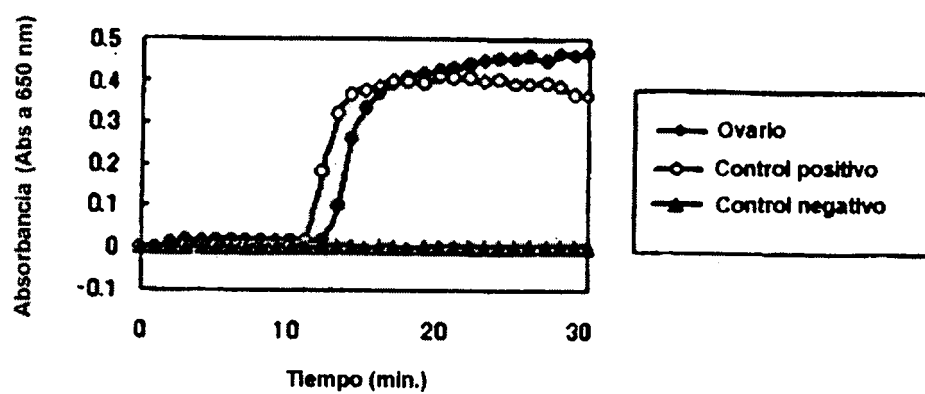


Fig. 4

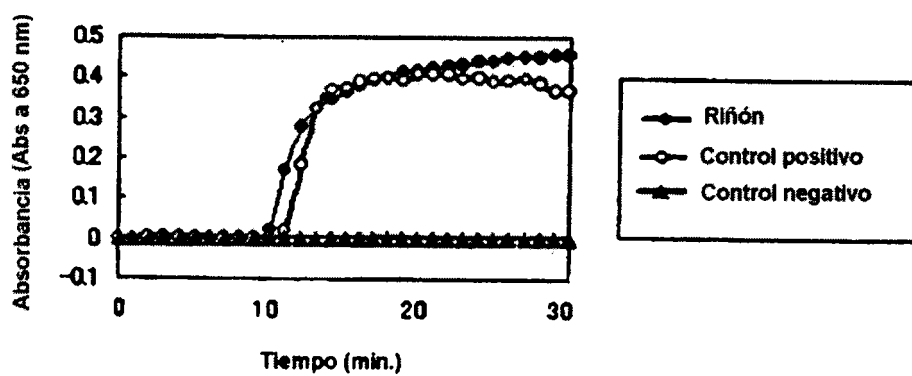


Fig. 5

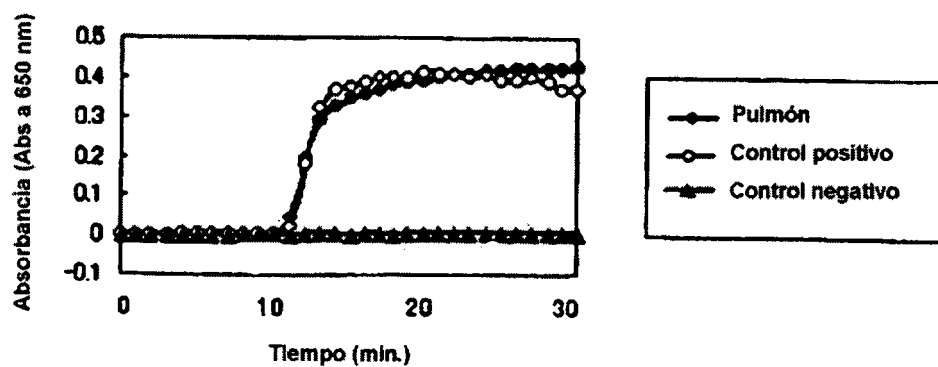


Fig. 6

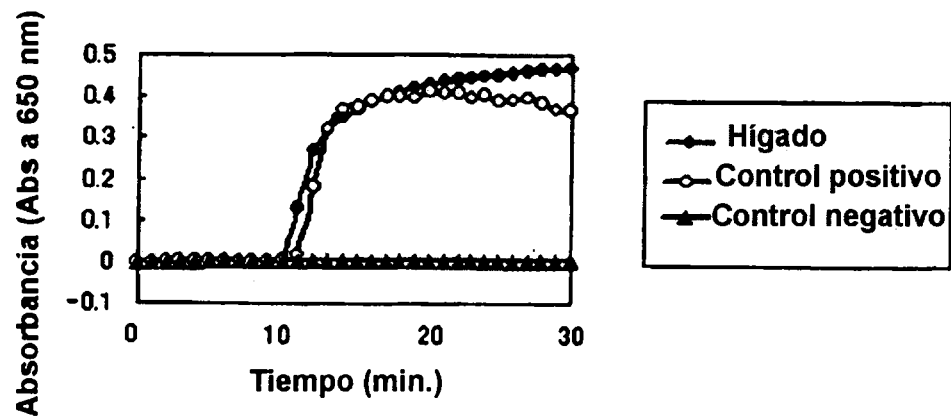


Fig. 7

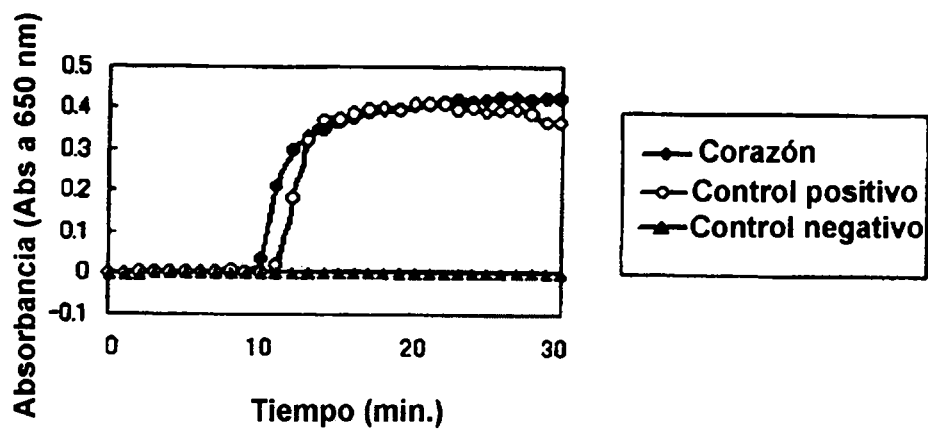


Fig. 8

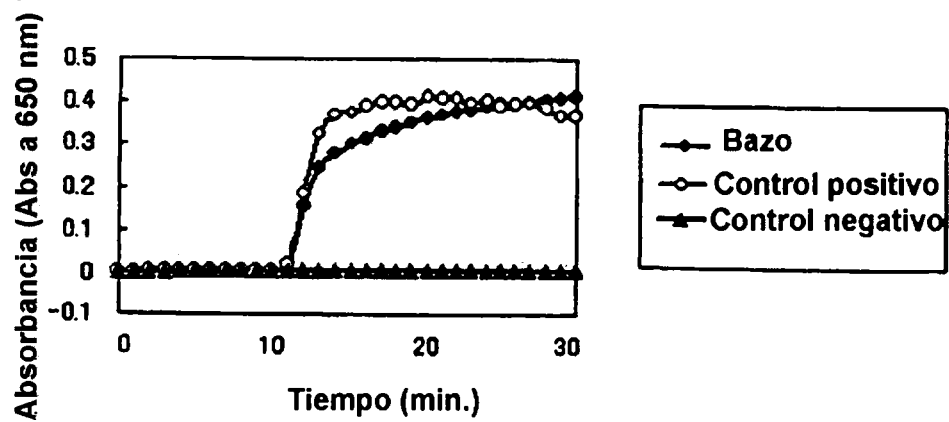


Fig. 9

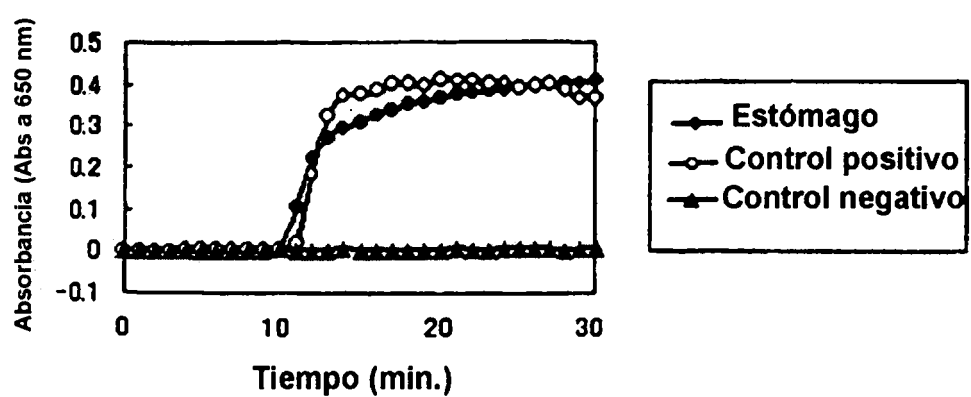
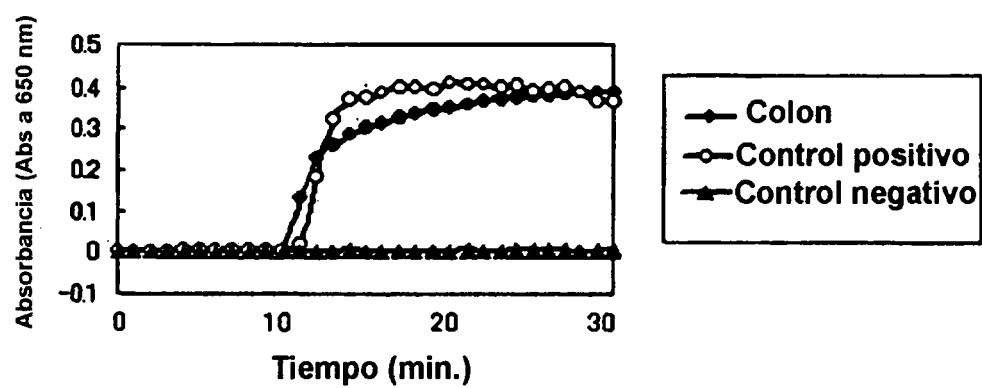


Fig. 10



ES 2 321 627 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Sysmex Corporation	
5	<120> Disolución de tratamiento para preparar disolución de muestra para la reacción de amplificación de ácido nucleico y método para detectar ácido nucleico usando la disolución de tratamiento	
	<130> 2004-075JP	
10	<150> JP 2004-353849	
	<151> 7-12-2004	
15	<160> 15	
	<170> PatentIn versión 3.1	
	<210> 1	
20	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> ADN diseñado basándose en el gen de la beta-actina	
	<400> 1	
30	tgaaggtagt ttcgtggatg cctgaggcac tcttccagc	39
	<210> 2	
35	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> ADN diseñado basándose en el gen de la beta-actina	
	<400> 2	
45	tgaagtgtga cgtggacatc cagggtacat ggtggtgc	38
	<210> 3	
50	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> ADN diseñado basándose en el gen de la beta-actina	
	<400> 3	
60	tggcaatgag cggttcc	17
	<210> 4	
65	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 321 627 T3

<220>
 <223> ADN diseñado basándose en el gen de la beta-actina

5 <400> 4
 tccttctgca tcctgtcg 18
 <210> 5
 10 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> ADN diseñado basándose en el gen de la beta-actina

20 <400> 5
 acaggactcc atgccc 16
 <210> 6
 25 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> ADN diseñado basándose en el gen de la beta-actina

35 <400> 6
 tgtacgccaa cacagtgc 18
 <210> 7
 40 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> ADN diseñado basándose en el gen de GAPDH

50 <400> 7
 cagaaggggc ggagatgatg caccaccatg gagaaggc 38
 <210> 8
 <211> 38
 55 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> ADN diseñado basándose en el gen de GAPDH

65 <400> 8
 tgatgggtgt gaaccacgag gcaggatgca ttgctgac 38
 <210> 9

ES 2 321 627 T3

	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> ADN diseñado basándose en el gen de GAPDH	
10	<400> 9	
	tgtcgtggag tctactgg	18
15	<210> 10	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> ADN diseñado basándose en el gen de GAPDH	
25	<400> 10	
	gggggctaag cagttgg	17
	<210> 11	
30	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> ADN diseñado basándose en el gen de GAPDH	
	<400> 11	
40	tggctccacc cttcaagtg	19
	<210> 12	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> ADN diseñado basándose en el gen de GAPDH	
	<400> 12	
55	aatatgacaa ctcactcaag a	21
	<210> 13	
	<211> 20	
60	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
65	<223> ADN diseñado basándose en el gen de CK19	

ES 2 321 627 T3

	<400> 13		
	cagatcgaag gcctgaagga		20
5	<210> 14		
	<211> 19		
	<212> ADN		
10	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> ADN diseñado basándose en el gen de CK19		
15	<400> 14		
	cttggcccct cagcgtact		19
20	<210> 15		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> ADN diseñado basándose en el gen de CK19		
30	<400> 15		
	gcctacctga agaagaacca tgaggaggaa		30
35			
40			
45			
50			
55			
60			
65			