

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 441**

51 Int. Cl.:

B01D 15/08 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2013 PCT/US2013/042671**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13177525**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2013 E 13794485 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2854981**

54 Título: **Procedimientos de fraccionamiento y detección de ácido nucleico**

30 Prioridad:

24.05.2012 US 201261651426 P

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

14.11.2018

73 Titular/es:

**MERIDIAN BIOSCIENCE, INC. (100.0%)
3471 River Hills Drive
Cincinnati, OH 45244, US**

72 Inventor/es:

**SLEPNEV, VLADIMIR, I.;
KODVAWALA, AHMER;
LOEFFLER, BRIAN;
HINDUPUR, ANAND;
PONAKA, REDDY y
ELAGIN, VECHESLAV, A.**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 689 441 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

Procedimientos de fraccionamiento y detección de ácido nucleico.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos de aislamiento y purificación de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica o matriz. Más particularmente, la presente invención se refiere al aislamiento y a la purificación de ácidos nucleicos utilizando cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel.

10

Antecedentes de la invención

El aislamiento y la identificación de ácidos nucleicos son etapas importantes en muchas pruebas de diagnóstico clínico y detección bioquímica. La separación de ácidos nucleicos a partir de las complejas composiciones celulares en las que se encuentran es con frecuencia una etapa inicial necesaria antes de poder emprender la detección o amplificación. La presencia de grandes cantidades de residuos celulares, tales como proteínas e hidratos de carbono, en las composiciones con frecuencia dificulta las reacciones y técnicas utilizadas en biología molecular. La presencia de agentes exógenos frecuentemente utilizados para el aislamiento de ácido nucleico también puede inhibir la amplificación de ácido nucleico. Por tanto, de manera indeseable los procedimientos de aislamiento y amplificación actuales requieren mucho tiempo, son complicados e ineficaces. Por tanto, son deseables procedimientos mejorados para el aislamiento y la detección de ácidos nucleicos, para una amplia variedad de aplicaciones en el diagnóstico médico para infecciones microbianas, detección de variaciones genéticas, ciencia forense, tipado de tejido y sangre, detección de patógenos medioambientales e investigación básica, por nombrar algunos.

15

20

25

Se conocen una variedad de procedimientos para el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos, pero generalmente se basan en una serie compleja de etapas de extracción y lavado y requieren mucho tiempo y son laboriosos de realizar. Los procedimientos clásicos para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de materiales de partida complejos, tales como sangre, hemoderivados, tejidos u otros materiales biológicos, implican lisis del material biológico, seguido por estrategias de aislamiento tales como extracción en fase sólida o extracción con fenol seguido por precipitación con etanol.

30

También se ha utilizado la tecnología de perlas paramagnéticas para el aislamiento de ácido nucleico. La mayoría de los procedimientos basados en perlas magnéticas se basan en someter a lisis la muestra, seguido por la unión de ácidos nucleicos con perlas magnéticas y lavado. Los ácidos nucleicos aislados obtenidos a partir de estos procedimientos con frecuencia contienen agentes, tales como etanol, que inhiben la amplificación y detección adicionales.

35

La cromatografía de exclusión molecular (SEC), también denominada cromatografía de filtración en gel o permeación en gel (GPC), utiliza partículas porosas apiladas dentro de una columna para separar moléculas de diferentes tamaños. Generalmente se utiliza para separar moléculas biológicas y determinar pesos moleculares y distribuciones de peso molecular de polímeros. Las moléculas que son más pequeñas que el tamaño de poro pueden entrar en las partículas y por tanto presentan una trayectoria más larga y un tiempo de tránsito más prolongado que las moléculas más grandes que no pueden entrar en las partículas. Las moléculas más grandes que el tamaño de poro no pueden entrar fácilmente en los poros, y eluyen juntas de manera más temprana en el cromatograma. Las moléculas que pueden entrar en los poros presentan un tiempo de residencia promedio en las partículas que depende del tamaño molecular y la forma. Por tanto, diferentes moléculas presentan diferentes tiempos de tránsito totales a través de la columna.

40

45

Todavía existe la necesidad de procedimientos mejorados de purificación y detección de ácido nucleico, que sean rápidos, económicos y sencillos de realizar, que permitan obtener rendimientos detectables con pérdidas mínimas, mediante lo cual los ácidos nucleicos obtenidos estén listos para su amplificación y análisis posteriores.

50

Sumario de la invención

En determinadas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento de detección de un ácido nucleico presente en una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes: a) combinar la muestra biológica con un tampón de lisis para formar una mezcla de lisis que comprende el ácido nucleico liberado de células en dicha muestra biológica; b) someter un volumen de la mezcla de lisis a una cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un volumen de medio de exclusión molecular, en el que dicho volumen de mezcla de lisis está comprendido entre 0,01 y 0,6 del volumen del medio de exclusión molecular, y que presenta un caudal de separación de menos de 10 minutos para producir una disolución eluida que comprende ácido nucleico aislado; c) combinar la disolución eluida con reactivos de amplificación de ácido nucleico que comprenden ADN polimerasa, oligonucleótidos y nucleósidos trifosfato para la amplificación de ácido nucleico; d) amplificar el ácido nucleico en la disolución eluida; y e) detectar productos de amplificación de ácido nucleico.

55

60

65

La presente invención también proporciona un procedimiento de purificación de un ácido nucleico a partir de una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes: a) combinar la muestra biológica con un tampón de lisis para formar una mezcla de lisis que comprende el ácido nucleico liberado de células en dicha muestra biológica; y b) someter un volumen de la mezcla de lisis a una cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un volumen de medio de exclusión molecular, en el que dicho volumen de mezcla de lisis está comprendido entre 0,01 y 0,6 del volumen del medio de exclusión molecular, y que presenta un caudal de separación de menos de 10 minutos para producir una disolución eluida que comprende ácido nucleico aislado. En determinadas formas de realización, la invención proporciona la etapa posterior de analizar dicho ácido nucleico aislado utilizando una reacción catalizada por enzimas.

La presente invención proporciona además un procedimiento de purificación de un ácido nucleico a partir de una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes: a) combinar la muestra biológica con una disolución de desnaturalización que separa cadenas de ADN bicatenario; b) someter un volumen de la mezcla de muestra biológica a una cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un volumen de medio de exclusión molecular, en el que dicho volumen de mezcla de lisis está comprendido entre 0,01 y 0,6 del volumen del medio de exclusión molecular, y que presenta un caudal de separación basado en la gravedad de menos de 10 minutos para producir una disolución eluida que comprende ácido nucleico aislado; y c) recoger la disolución eluida para su análisis adicional.

En una forma de realización alternativa, la presente invención proporciona un procedimiento de purificación de un ácido nucleico a partir de una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes: a) combinar la muestra biológica con un tampón de lisis para formar una mezcla de lisis que comprende el ácido nucleico liberado de células en dicha muestra biológica; b) aplicar un volumen de la mezcla de lisis a un medio de cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un extremo de carga, un extremo de elución y un volumen de medio de exclusión molecular, opcionalmente en el que dicho volumen de mezcla de lisis está comprendido entre 0,35 y 0,8 del volumen del medio de exclusión molecular, y permitir que la mezcla de lisis entre en el medio de cromatografía de exclusión molecular; y c) proporcionar un diferencial de presión positivo a la columna para producir una disolución eluida que contiene ácido nucleico para su posterior amplificación o análisis. En determinadas formas de realización, el diferencial de presión se crea aplicando una presión positiva al lado de carga de la columna. En otra forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento de purificación de ácidos nucleicos, que comprende las etapas siguientes: a) aplicar un volumen de una muestra que contiene ácidos nucleicos a un medio de cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un extremo de carga, un extremo de elución y un volumen de medio de exclusión molecular, y permitir que la muestra entre en el medio de cromatografía de exclusión molecular; y b) proporcionar un diferencial de presión negativo o vacío al extremo de elución de la columna y recoger el fluido drenado que contiene ácido nucleico para su amplificación o análisis adicionales.

La presente invención proporciona además un procedimiento de purificación de un ácido nucleico a partir de una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes: a) someter un volumen de una mezcla de muestra biológica que contiene ácido nucleico y un agente de lisis a cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un volumen de medio de exclusión molecular, en el que dicho volumen de la mezcla está comprendido entre 0,01 y 0,6 del volumen del medio de exclusión molecular, y que presenta un caudal de separación basado en la gravedad de menos de 10 minutos para producir una disolución eluida que comprende ácido nucleico aislado; y c) recoger la disolución eluida para su análisis adicional.

En determinadas formas de realización, la invención proporciona equilibrar adicionalmente dicha columna de cromatografía con un tampón de equilibrado que comprende Mg^{2+} 1-10 mM o un detergente no iónico, o una combinación, antes de la etapa de sometimiento que se utilizará esencialmente para llevar a cabo la etapa de amplificación de ácido nucleico. En determinadas formas de realización, la invención proporciona que el tampón de lisis comprende un hidróxido alcalino a un pH > 11. En determinadas formas de realización, la invención proporciona que el tampón de lisis comprende urea o sales caotrópicas. En determinadas formas de realización, la invención proporciona que el tampón de lisis separa ácido nucleico bicatenario en ácido nucleico monocatenario e inhibe interacciones de ácido nucleico con proteína.

En determinadas formas de realización, la invención proporciona que el medio de exclusión molecular comprende un polímero tal como poliacrilamida, polibisacrilamida o polimetacrilamida. En determinadas formas de realización, la invención proporciona que el medio de exclusión molecular presenta un límite de exclusión de tamaño molecular de aproximadamente 10 kDa o más. En determinadas formas de realización, el caudal de separación se basa en la gravedad.

La invención proporciona que el ácido nucleico es ADN, ARN o una mezcla de los mismos. La invención proporciona además que la etapa de amplificación puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en RT-PCR, qPCR, PCR digital, LAMP, secuenciación y una reacción catalizada por enzimas actualmente conocida o desarrollada posteriormente. En determinadas formas de realización, la invención proporciona que la muestra biológica puede seleccionarse de entre cualquier fuente, incluyendo sangre, saliva, heces, orina, muestra respiratoria o caldo de cultivo enriquecido.

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

5

La figura 1 ilustra un esquema de flujo de trabajo de preparación de muestra universal (USP).

La figura 2 ilustra un esquema de flujo de trabajo de preparación de muestra universal (USP) utilizando presión positiva.

10

La figura 3 ilustra un esquema de flujo de trabajo de preparación de muestra universal (USP) utilizando presión negativa.

Descripción detallada de la invención

15

La presente invención proporciona un procedimiento y sistema de purificación, detección y amplificación de ácido nucleico universalmente aplicable utilizando cromatografía de exclusión molecular para la separación de ácidos nucleicos de otros componentes celulares. El procedimiento y sistema proporciona ácidos nucleicos aislados en menos tiempo que las técnicas convencionales en una forma que está sustancialmente libre de otros inhibidores de amplificación, detección y/o análisis de ácido nucleico. El ácido nucleico aislado también puede prepararse desnaturalizado a partir de una forma bicatenaria para dar una monocatenaria durante el procedimiento de purificación, eliminando por tanto una etapa de desnaturalización térmica en el procedimiento de amplificación y detección de ácido nucleico posterior. Estas y otras ventajas y características de la invención resultarán evidentes para un experto en la materia.

20

En determinadas formas de realización, la invención proporciona un procedimiento de detección de un ácido nucleico presente en una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes: a) combinar la muestra biológica con un tampón de lisis para formar una mezcla de lisis que comprende el ácido nucleico liberado de células en dicha muestra biológica; b) someter un volumen de la mezcla de lisis a una cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un volumen de medio de exclusión molecular, en el que dicho volumen de mezcla de lisis está comprendido entre 0,01 y 0,6 del volumen del medio de exclusión molecular, y que presenta un caudal de separación de menos de aproximadamente 10 minutos para producir una disolución eluida que comprende ácido nucleico aislado; c) combinar la disolución eluida con reactivos de amplificación de ácido nucleico que comprenden ADN polimerasa, oligonucleótidos y nucleósidos trifosfato para la amplificación de ácido nucleico; d) amplificar el ácido nucleico en la disolución eluida; y e) detectar productos de amplificación de ácido nucleico.

25

La presente invención también proporciona un procedimiento de purificación de un ácido nucleico a partir de una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes: a) combinar la muestra biológica con un tampón de lisis para formar una mezcla de lisis que comprende el ácido nucleico liberado de células en dicha muestra biológica; y b) someter un volumen de la mezcla de lisis a una cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un volumen de medio de exclusión molecular, en el que dicho volumen de mezcla de lisis está comprendido entre 0,01 y 0,6 del volumen del medio de exclusión molecular, y que presenta un caudal de separación de menos de aproximadamente 10 minutos para producir una disolución eluida que comprende ácido nucleico aislado. En determinadas formas de realización, la invención proporciona la etapa posterior de opcionalmente amplificar y detectar o analizar dicho ácido nucleico aislado utilizando una reacción catalizada por enzimas.

30

35

La presente invención proporciona además un procedimiento de purificación de un ácido nucleico a partir de una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes: a) combinar la muestra biológica con una disolución de desnaturalización que separa cadenas de ADN bicatenario; b) someter un volumen de la mezcla de muestra biológica a una cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un volumen de medio de exclusión molecular, en el que opcionalmente dicho volumen de mezcla de lisis está comprendido entre 0,01 y 0,6 del volumen del medio de exclusión molecular, y que presenta un caudal de separación basado en la gravedad de menos de aproximadamente 10 minutos para producir una disolución eluida que comprende ácido nucleico aislado; y c) recoger la disolución eluida para su amplificación o análisis adicionales.

40

45

La presente invención proporciona además un procedimiento de purificación de un ácido nucleico a partir de una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes: a) someter un volumen de una mezcla de muestra biológica que contiene ácido nucleico y un agente de lisis a cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un volumen de medio de exclusión molecular, en el que dicho volumen de la mezcla está comprendido entre 0,01 y 0,6 del volumen del medio de exclusión molecular, y que presenta un caudal de separación basado en la gravedad de menos de aproximadamente 10 minutos para producir una disolución eluida que comprende ácido nucleico aislado; y b) recoger la disolución eluida para su amplificación o análisis adicionales.

50

55

60

65

En la práctica, el procedimiento puede modificarse adicionalmente mediante la utilización de presión positiva o negativa en la columna. Puede aplicarse presión positiva al extremo de carga (parte superior) de la columna o puede aplicarse presión negativa al extremo de elución (parte inferior) de la columna. Cuando se emplea un gradiente de presión, opcionalmente el volumen de mezcla de lisis puede ser de 0,35 a 0,8 del volumen del medio de exclusión molecular.

En determinadas formas de realización, el volumen de la mezcla de lisis puede variar en cierta medida desde entre 0,01 y 0,6 del volumen del medio de exclusión molecular, hasta entre 0,02 y 0,5 del volumen del medio de exclusión molecular, hasta entre 0,1 y 0,4 del volumen del medio de exclusión molecular. En determinadas formas de realización, el volumen de la mezcla de lisis es de 200-400 μl de muestra por 800-1200 μl de medio de filtración.

En determinadas formas de realización, la invención proporciona un caudal de separación basado en la gravedad de menos de 10 minutos para producir una disolución eluida que comprende ácido nucleico aislado, sin embargo, la velocidad puede ser de menos de 20 minutos, menos de 15 minutos o menos de 12,5 minutos, y alternativamente puede incluso ser de menos de 10 minutos a menos de 9, 8, 7, 6 o 5 minutos.

En determinadas formas de realización, la invención proporciona equilibrar adicionalmente dicha columna de cromatografía con un tampón de equilibrado que comprende Mg^{2+} 1-10 mM o un detergente no iónico, o una combinación, antes de la etapa de sometimiento que se utilizará esencialmente para llevar a cabo la etapa de amplificación de ácido nucleico.

En determinadas formas de realización, la invención proporciona que el medio de exclusión molecular comprende un polímero tal como poliacrilamida, polibisacrilamida o polimetacrilamida. En determinadas formas de realización, la invención proporciona que el medio de exclusión molecular presenta un límite de exclusión de tamaño molecular de aproximadamente 10 kDa o más. En determinadas formas de realización, el caudal de separación se basa en la gravedad.

La invención proporciona que el ácido nucleico es ADN, ARN o una mezcla de los mismos. La invención proporciona además que la etapa de amplificación puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en RT-PCR, qPCR, PCR digital, LAMP, secuenciación y una reacción catalizada por enzimas actualmente conocida o desarrollada posteriormente. En determinadas formas de realización, la invención proporciona que la muestra biológica puede seleccionarse de entre cualquier fuente, incluyendo sangre, saliva, heces, orina, muestra respiratoria o caldo de cultivo enriquecido.

En determinadas formas de realización, la muestra biológica se mezcla con un tampón de lisis, lo que provoca la rotura de células o virus y libera los ácidos nucleicos. El tampón de lisis utilizado en el procedimiento de la invención comprende un hidróxido alcalino, tal como NaOH u otros álcalis, con un pH de más de 11, en combinación con un detergente, tal como dodecilsulfato de sodio (SDS). Alternativamente, el tampón de lisis también puede comprender urea (por ejemplo 8 M) o una sal caotrópica, tal como sal de guanidinio 6 M. En determinadas formas de realización, la invención proporciona que el tampón de lisis separa ácido nucleico bicatenario en ácido nucleico monocatenario e inhibe interacciones de ácido nucleico con proteína.

La presente invención proporciona además que la muestra biológica sometida a lisis con el tampón de lisis se aplica en la parte superior de la columna de medio de filtración en gel de SEC y se permite que entre en el gel de separación de SEC mediante flujo por gravedad. Después de entrar completamente la disolución de muestra en el medio de gel, puede aplicarse un volumen adicional de un tampón de elución en la parte superior del medio de filtración en gel de SEC y se recoge la disolución eluida en el último flujo a través. En determinadas formas de realización, el tampón de elución es agua de calidad molecular. En determinadas situaciones, resulta ventajoso utilizar agua para mover ácidos nucleicos a través del medio de filtración en gel de SEC con un caudal superior.

El tampón de equilibrado y de elución es un tampón de reacción que se utiliza para una reacción y/o aplicación posterior subsiguiente, incluyendo, pero sin limitarse a, detección y cuantificación de ADN/ARN mediante diversos procedimientos de amplificación y detección, tales como RT-PCR, qPCR, PCR digital, LAMP, secuenciación y cualquier otra reacción catalizada por enzimas. En otras formas de realización determinadas, el tampón de elución puede ser el mismo que el tampón de equilibrado, el tampón de separación y/o el tampón de reacción. En otras formas de realización determinadas, el tampón de elución es diferente del tampón de equilibrado, el tampón de separación y/o el tampón de reacción.

La presente invención proporciona que, dado que en determinadas formas de realización el tampón de equilibrado utilizado en el procedimiento de la invención está sustancialmente libre de un inhibidor de la amplificación de ácido nucleico (tal como proteína endógena o etanol exógeno, o sales tales como cloruro de guanidina) que interferiría con la amplificación de ácido nucleico y/u otras aplicaciones posteriores, los ácidos nucleicos purificados obtenidos a partir del procedimiento de la invención pueden utilizarse para diversas aplicaciones posteriores comentadas anteriormente. En determinadas formas de realización, la presente

invención proporciona que el tampón de elución esta sustancialmente libre de un inhibidor de la amplificación de ácido nucleico.

5 Una ventaja particular del procedimiento de la invención es la capacidad para obtener rápidamente volúmenes superiores del ácido nucleico purificado en la reacción de amplificación, aumentando por tanto la sensibilidad de detección, lo cual es importante para aplicaciones de diagnóstico. El volumen de material de ácido nucleico eluido puede utilizarse en combinación con un aglomerado liofilizado que contiene ADN polimerasa, dNTP y otros componentes requeridos para la reacción de amplificación.

10 La presente invención proporciona además que en determinadas formas de realización el tampón de lisis combinado con la muestra biológica puede contener un agente desnaturizante para provocar la separación de ADN bicatenario, dando como resultado ADN monocatenario durante el procedimiento de purificación. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, tampón alcalino a un pH superior a 11 (NaOH 0,01 M), sales de guanidinio (por ejemplo cloruro de guanidinio 6 M), urea (por ejemplo urea 8 M) y disoluciones acuosas de disolventes orgánicos (tales como formamida, dimetilformamida o dimetilsulfóxido).

15 Por tanto, el procedimiento de la invención proporciona ácidos nucleicos purificados que pueden utilizarse directamente en los procedimientos de amplificación de ácido nucleico posteriores sin implicar una etapa de desnaturización térmica del ADN y equipos adicionales relacionados con la misma (tales como un bloque térmico o un instrumento requerido para alcanzar la temperatura de desnaturización del ADN (habitualmente 20 80-98°C)), proporcionando una ventaja que es particularmente importante para cualquier tecnología de amplificación isotérmica, incluyendo, pero sin limitarse a, amplificación mediada por bucle (LAMP), amplificación dependiente de helicasa (HAD), amplificación por recombinasa (RPA). Además, la separación de las cadenas de ADN puede dar como resultado un cambio de la forma molecular de moléculas de ácido nucleico aumentando el tamaño hidrodinámico aparente. Este efecto puede limitar adicionalmente la posibilidad de entrada de ADN en los poros de partículas de separación y aumentar la movilidad del ADN en la cromatografía de exclusión molecular.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, "ácidos nucleicos" se refieren a ADN, ARN o cualquier modificación sintética o que se produce de manera natural de los mismos, y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, los ácidos nucleicos son ADN, que puede ser de mono, bi o tricatenario o de cualquier otra forma, lineal o circular. Los ácidos nucleicos que pueden purificarse mediante el procedimiento de la presente invención son polímeros con una longitud mínima de 10 bases y ningún límite con respecto a la longitud máxima. Para el aislamiento y la detección en la presente invención se prefiere particularmente ADN genómico.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, "aislado" significa que un compuesto, tal como un ácido nucleico, está separado de al menos algunos de los constituyentes con los que está asociado en la naturaleza. "Aislado" y "purificado" pueden utilizarse de manera intercambiable en la presente memoria.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, pueden obtenerse "muestras biológicas" a partir de materiales de muestras clínicas para diagnóstico, alimentos y productos asociados, y muestras medioambientales. En determinadas formas de realización, tales muestras biológicas pueden comprender todos los tipos de células animales de mamífero y no de mamífero, células vegetales y bacterias. Las muestras representativas incluyen sangre completa y hemoderivados, tales como plasma o capa leucocítica, saliva, semen, homogeneizados tisulares, orina, heces (deposiciones), líquido cefalorraquídeo o cualquier otro líquido corporal, tejidos, cultivos celulares, suspensiones celulares, etc. El material biológico también incluye muestras medioambientales tales como tierra, agua o muestras de alimentos. La muestra también puede incluir materiales de partida relativamente puros o parcialmente purificados, tales como preparaciones semipuras obtenidas mediante otros procedimientos de separación celular.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, "tampón de lisis" se refiere a una disolución acuosa tamponada, que rompe una pared celular o cápside viral, desnaturiza proteínas celulares o virales y libera ácidos nucleicos en dicha disolución. En determinadas formas de realización, el tampón de lisis incluye hidróxido de sodio (NaOH) y dodecilsulfato de sodio (SDS). En determinadas formas de realización, el tampón de lisis comprende NaOH de 45 0,01 a 2 M y SDS a del 0,1 al 3%. Alternativamente, el tampón de lisis puede contener sales caotrópicas (por ejemplo, cloruro de guanidina), agentes desnaturizantes de proteínas (por ejemplo urea), tampones con pH extremo (más de 11) y detergentes. En determinadas formas de realización, el tampón de lisis puede contener un tensoactivo no iónico. La presente invención contempla o combinación cualquier tensoactivo adecuado que se determina mediante selección y evaluación empíricas, que puede someter a lisis la membrana celular. En la técnica se conocen bien procedimientos de lisis celular utilizando una disolución de lisis y se describen ampliamente en la bibliografía. Tal como se mencionó anteriormente, algunas formas de realización del tampón de lisis pueden provocar simultáneamente la lisis de las células o alteración de la cápside viral y provocar la desnaturización de ácidos nucleicos y separación de cadenas de ADN. El tampón de lisis puede proporcionarse como una única disolución o como disoluciones independientes (por ejemplo de álcali y detergente) que en 60 combinación producen una condición de lisis.

65

5 Convenientemente, puede lograrse la lisis celular utilizando un tampón de lisis que comprende caotropsos y/o detergentes. Por ejemplo, se encuentra que la combinación de un caotropo con un detergente es particularmente eficaz. Una disolución de lisis adecuada a modo de ejemplo incluye un caotropo, tal como GTC o GHCl, y un detergente, tal como SDS o sarcosilo. Los agentes de lisis se suministran en una disolución acuosa simple, o se incluyen en una disolución tampón, para formar un denominado “tampón de lisis”. Puede utilizarse cualquier tampón adecuado, incluyendo, por ejemplo, tampones TRIS, BICINA, TRICINA y fosfato. Alternativamente, los agentes de lisis se añaden por separado. Las concentraciones y cantidades adecuadas de agentes de lisis varían según el sistema preciso y pueden determinarse de manera apropiada.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, un “tampón de elución” se refiere a una disolución que facilita el flujo a través de una columna de medios de exclusión molecular, y puede incluir la misma composición que el tampón de equilibrado. En el contexto de la cromatografía de exclusión molecular, se entiende que el propósito principal del tampón de elución es facilitar el flujo a través de la columna, y el tampón de elución, si es diferente del tampón de equilibrado, sólo alcanzará la salida de la columna después de los ácidos nucleicos de la muestra biológica. En algunas formas de realización, el tampón de elución es una disolución de baja viscosidad a un pH que no provocará la descomposición química del medio de SEC. En algunas formas de realización, el tampón de elución es agua. La composición de la disolución tampón de elución puede incluir un colorante (por ejemplo colorante rojo de fenol) para una identificación visual fácil del tampón de elución.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, un “tampón de reacción” se refiere a una disolución tamponada que facilita la amplificación y detección posteriores, y puede incluir sales que proporcionan capacidad tamponante en el intervalo de pH óptimo para realizar la amplificación posterior (los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, TRIS, BICINA, TRICINA), sales que facilitan, o son esenciales para, la reacción de amplificación posterior (tales como iones Mg^{2+}), sales que crean una fuerza iónica óptima para realizar la amplificación posterior (incluyendo, pero sin limitarse a, NaCl, KCl), detergentes (tales como TWEEN 20, TRITON X-100, etc.) y posiblemente otros compuestos que pueden aumentar el rendimiento de la reacción de amplificación de ácido nucleico posterior. Algunas formas de realización de la composición de tampón de reacción se representan en la sección de ejemplos.

30 Tal como se utiliza con respecto al procedimiento de la invención, un “tampón de equilibrado” se refiere a una disolución tamponada para empaquetar medio de SEC en una columna de separación de la presente invención. La composición del “tampón de equilibrado” es la misma composición que la del tampón de reacción. En otras formas de realización dadas a conocer en la presente memoria, la composición de tampón de equilibrado es una disolución tamponada que proporciona un almacenamiento estable del ácido nucleico purificado. La composición del tampón de equilibrado en tales formas de realización comprende compuestos tamponantes (los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, TRIS, BICINA, TRICINA) a un pH dentro del intervalo de pH 6-10. La composición del tampón de equilibrado en dicha forma de realización también puede incluir un compuesto quelante de metales (por ejemplo, EDTA) que protege los ácidos nucleicos frente a la hidrólisis o descomposición mediada por metales. La composición del tampón de equilibrado en tales formas de realización también puede incluir un detergente (tal como TWEEN 20, TRITON X-100, etc.) para prevenir la interacción no específica del ácido nucleico con la matriz de SEC. La composición del tampón de equilibrado también puede incluir un ácido nucleico portador (tal como ARNt de levadura a de 0,1 a 10 $\mu\text{g/ml}$, polímeros de poliA-poliT, etc.) para prevenir la interacción no específica del ácido nucleico con la matriz de SEC. La composición del tampón de equilibrado también puede incluir inhibidores del crecimiento bacteriano o desinfectantes (por ejemplo, azida de sodio) para permitir el almacenamiento ambiental de columnas empaquetadas.

50 La presente invención proporciona además que la muestra biológica sometida a lisis con el tampón de lisis se aplica en la parte superior de la columna de medio de filtración en gel de SEC y se permite que entre en el gel de separación de SEC mediante flujo por gravedad. El esquema preferido del procedimiento de esta forma de realización se presenta en la figura 1. La columna de medio de filtración en gel de SEC se equilibra en tampón de equilibrado. La columna de medio de filtración en gel de SEC se equilibra en un tampón de reacción para su análisis posterior (por ejemplo amplificación). En otras formas de realización determinadas, la muestra biológica sometida a lisis con el tampón de lisis se aplica directamente a la columna sin retirar ninguno de los componentes en una etapa intermedia entre la lisis y la aplicación en columna.

55 La cromatografía de exclusión molecular o de filtración en gel es un procedimiento en el que se separan moléculas en disolución por su tamaño. Las moléculas pequeñas que pueden penetrar en poros de la fase estacionaria pueden entrar en todo el volumen de poros y el volumen entre partículas, y eluirán tarde. Una molécula muy grande (tal como un ácido nucleico) que no puede penetrar en los poros se mueve en el volumen entre partículas (~30-35% del volumen de columna) y eluirá más temprano cuando este volumen de fase móvil ha pasado a través de la columna. El principio subyacente de SEC es que partículas de tamaños diferentes eluirán (se filtrarán) a través de una fase estacionaria a velocidades diferentes. Un modo preferido de cromatografía de filtración en gel de la presente invención es utilizar flujo por gravedad, sin embargo, pueden realizarse determinadas modificaciones de vacío o presión para modificar el caudal tal como se describe a continuación.

El medio de filtración en gel es una fase estacionaria para cromatografía de filtración en gel. Para la puesta en práctica de la presente invención se utilizan particularmente medios de filtración en gel, que presentan poros lo suficientemente pequeños como para impedir que ácidos nucleicos entren en los poros, pero lo suficientemente grandes como para permitir la entrada en los poros de moléculas de proteína u otros compuestos orgánicos (tales como hidratos de carbono, lípidos, etc.) e inorgánicos y presentan interacción mínima con la superficie de las fases estacionarias. En determinadas formas de realización, la columna de cromatografía de filtración en gel de SEC presenta un límite de exclusión de tamaño molecular de aproximadamente 10 kDa o más. Más preferentemente, los medios de filtración en gel de SEC de la presente invención incluyen fases estacionarias que excluyen moléculas con un peso molecular de más de 5×10^6 Da, al tiempo que proporcionan la separación de moléculas con un peso molecular en el intervalo de 50.000 a 500.000 Da. Los ejemplos de medio de filtración en gel útiles para la presente invención incluyen, pero no se limitan a: productos de Sephacryl (S100, S200, S300, S400, S500, S1000), productos de Sepharose (2B, 4B y 6), productos de Toyopearl (HW-50, HW-55, HW-65, HW-75). En otras formas de realización determinadas, el medio de filtración en gel Sephacryl presenta un tamaño de partícula de aproximadamente 50 micrómetros.

En determinadas formas de realización, el medio de filtración en gel de SEC se empaqueta en una columna de plástico desechable que contiene un filtro poroso en la parte inferior. El medio de filtración en gel de SEC se cubre por otro filtro poroso y la columna puede taparse en la parte superior para impedir la evaporación para un almacenamiento a largo plazo. En determinadas formas de realización, el diseño del dispositivo que utiliza el procedimiento de la invención puede incluir un lecho adsorbente extraíble, que puede retener el líquido se sale de la columna de gel de SEC durante la aplicación de muestra. En otras formas de realización determinadas, el medio de filtración en gel de SEC está encerrado entre discos de filtro poroso inferior y superior que presentan una porosidad de aproximadamente 40-100 micrómetros.

Después de que la disolución de muestra entre completamente en el medio de gel, se aplica un volumen de un tampón de elución en la parte superior del medio de filtración en gel de SEC para facilitar el flujo a través de la columna. Opcionalmente, se aplica un volumen adicional del tampón de elución para proporcionar más flujo a través de la columna. Los volúmenes de la columna, la muestra y el tampón de elución pueden seleccionarse para proporcionar la mejor separación con una dilución mínima de los ácidos nucleicos aplicados. En los ejemplos se presentan varios ejemplos de tales razones. El volumen desplazado por el último volumen del tampón de elución se recoge. Dado que el tampón aplicado a la columna de SEC tras la muestra siempre saldrá de la columna después de los ácidos nucleicos de la muestra, su composición está determinada principalmente por factores de conveniencia. En determinadas formas de realización, el tampón de elución es agua de calidad molecular. Resulta ventajoso utilizar agua para mover ácidos nucleicos a través de un medio de filtración en gel de SEC con un caudal superior. En otras formas de realización determinadas, el tampón de elución puede ser el mismo que el tampón de equilibrado, el tampón de separación y/o el tampón de reacción. En otras formas de realización determinadas, el tampón de elución es diferente del tampón de equilibrado, el tampón de separación y/o el tampón de reacción.

En una forma de realización alternativa de la invención, se aplica una mezcla de lisis sobre la columna y se permite que entre en el medio de separación. Se aplica un diferencial de presión positivo a la columna para producir una disolución eluida que contiene ácido nucleico. La disolución eluida que contiene ácido nucleico se recoge para su posterior amplificación o análisis. En determinadas formas de realización, la presión positiva fuerza fluido intersticial a partir de la columna de SEC, destruyendo de ese modo la columna de SEC. En determinadas formas de realización, tal como se representa en la figura 2, el diferencial de presión se crea aplicando una presión positiva al lado de carga de la columna. La razón óptima del volumen de mezcla de lisis con respecto al volumen de la columna está definida por dos factores principales: en primer lugar, el volumen de la mezcla de lisis debe ser mayor que un volumen vacío de la columna, y en segundo lugar, el volumen de la mezcla de lisis debe ser menor que el volumen al que los componentes del tampón de lisis eluirían de la columna en condiciones de flujo constante (sin aplicar presión adicional). En una forma de realización, el volumen de la mezcla de lisis está en el intervalo de más de 0,35 volúmenes de la columna de SEC y menos de 0,8 volúmenes de la columna de SEC (el volumen de volumen de SEC se define como el volumen de medio de SEC empaquetado en una columna). En otra forma de realización preferida, el volumen de la mezcla de lisis está en el intervalo de más de 0,4 volúmenes de la columna de SEC y menos de 0,6 volúmenes de la columna de SEC. En algunas formas de realización de esta invención, la mezcla de lisis entra en la columna con flujo por gravedad. En condiciones de flujo por gravedad, el flujo se detiene de manera espontánea cuando la mezcla de lisis entra en la columna impidiendo que se drene la columna.

El diferencial de presión positivo puede proporcionarse por diferentes medios, incluyendo, pero sin limitarse a, por medio de insertar un émbolo o un tapón de presurización en un cilindro de la columna de SEC. El volumen de la disolución eluida de la columna es normalmente menor que el volumen vacío esperado de la columna de SEC. En la forma de realización preferida, este volumen está en el intervalo de 0,15-0,3 volúmenes de la columna de SEC, y más preferentemente en el intervalo de 0,175-0,25 volúmenes de la columna de SEC.

De manera notable, el volumen de líquido recogido que contiene ácidos nucleicos es menor que el volumen de la mezcla de lisis aplicada. Optimizando las razones de volumen de columna de SEC, volumen de mezcla de lisis y

volumen de líquido drenado, es concebible lograr condiciones en las que los ácidos nucleicos no se diluyen durante dicha purificación mediante SEC.

5 Además, si el frente de ataque de la banda de ácido nucleico que migra a través de la columna se ralentiza durante la migración debido a la interacción con medio de SEC (por ejemplo, interacción de naturaleza electrostática), puede ser posible obtener una concentración eficaz de ácido nucleico en la fracción recogida.

10 En otra forma de realización alternativa de la invención (representada en la figura 3), se aplica una muestra que contiene ácidos nucleicos sobre la columna y se permite que entre en el medio de separación. Se aplica una presión negativa o vacío al lado de elución o salida de la columna forzando que el fluido intersticial que contiene ácido nucleico salga de la columna. El fluido eluido que contiene ácido nucleico se recoge para su amplificación o análisis adicionales.

15 En determinadas formas de realización, la razón del volumen de la muestra con respecto al volumen de medio de SEC debe ser de menos de 1,0, y puede estar en un intervalo comprendido entre 0,01 y 0,9. Opcionalmente, puede aplicarse un volumen adicional de tampón a la columna para mover ácidos nucleicos hacia el lado de salida de la columna. El volumen del tampón adicional es normalmente menor que el volumen del medio de SEC en la columna.

20 En algunas formas de realización de esta invención, la muestra de ácido nucleico entra en la columna con flujo por gravedad. En condiciones de flujo por gravedad, el flujo se detendrá de manera espontánea cuando la muestra haya entrado en el medio de SEC impidiendo que se drene la columna.

25 El diferencial de presión negativo o vacío puede proporcionarse por diferentes medios, incluyendo, pero sin limitarse a, por medio de conexión de un tubo (por ejemplo, un tubo Vacutainer) a una baja presión al lado de salida de la columna de SEC. El volumen del líquido intersticial drenado de la columna es normalmente menor que el volumen vacío esperado de la columna de SEC. En la forma de realización preferida, este volumen está en el intervalo de 0,1-0,4 volúmenes de la columna de SEC, y en algunas formas de realización en el intervalo de 0,175-0,25 volúmenes de la columna de SEC.

30 El diferencial de presión negativo es la diferencia en la presión entre la presión a la que se exponen el medio de SEC y el extremo de elución de la columna. Por ejemplo, si el medio de SEC está en condiciones de presión atmosférica, la presión aplicada al extremo de elución de la columna es menor que la presión atmosférica.

35 De manera notable, el volumen de líquido recogido que contiene ácidos nucleicos puede ser menor que el volumen de la muestra aplicada que contiene ácidos nucleicos. Optimizando las razones de volumen de columna de SEC, el volumen de mezcla de lisis y el volumen de líquido drenado, es posible lograr condiciones en las que los ácidos nucleicos no se diluyen durante dicha purificación mediante SEC.

40 Además, si el frente de ataque de la banda de ácido nucleico que migra a través de la columna se ralentiza durante la migración debido a la interacción con medio de SEC (por ejemplo, interacción electrostática), es posible obtener una concentración eficaz de ácido nucleico en la fracción recogida.

45 Los procedimientos alternativos proporcionan una separación incluso más rápida, estando limitados únicamente por el tiempo requerido para que la mezcla de lisis entre en el lecho de columna formado por el medio de SEC.

50 El tampón de equilibrado, en el que se eluyen ácidos nucleicos, es un tampón de reacción que se utiliza para una reacción y/o aplicación posterior subsiguiente, incluyendo, pero sin limitarse a, detección y cuantificación de ADN/ARN mediante diversos procedimientos de amplificación y detección, tales como RT-PCR, qPCR, PCR digital, LAMP, secuenciación, y cualquier otra reacción catalizada por enzimas. El tampón de equilibrado utilizado en el presente procedimiento de la invención puede estar sustancialmente libre de un inhibidor que interferiría con la amplificación de ácido nucleico y/u otras aplicaciones posteriores.

55 Una ventaja particular del procedimiento de la invención es la capacidad para obtener un volumen más grande del ácido nucleico purificado para su utilización en la reacción de amplificación, aumentando por tanto la sensibilidad de detección, lo cual es particularmente importante para aplicaciones de diagnóstico. El volumen más grande de material eluido puede utilizarse en combinación con un aglomerado liofilizado que contiene ADN polimerasa, dNTP y otro componente requerido para la reacción de amplificación. Tal como se utiliza en la presente memoria, la "ADN polimerasa" es cualquier enzima que cataliza o ayuda a catalizar la polimerización de desoxirribonucleótidos para dar una cadena de ADN utilizando un molde de ácido nucleico (ADN o ARN). La ADN polimerasa de la presente invención puede representarse por una mezcla de enzimas con una actividad ADN polimerasa.

65 Por tanto, el presente procedimiento de la invención proporciona ácidos nucleicos purificados que van a utilizarse directamente en los procedimientos de amplificación de ácido nucleico posteriores sin implicar una etapa de desnaturalización térmica del ADN y equipos adicionales relacionados con la misma, tales como un instrumento

de bloque térmico requerido para alcanzar la temperatura de desnaturalización del ADN (habitualmente 80-98°C), proporcionando una ventaja que es particularmente importante para tecnologías de amplificación isotérmica, incluyendo, pero sin limitarse a, amplificación mediada por bucle (LAMP), amplificación dependiente de helicasa (HAD), amplificación por recombinasa (RPA). Tal como se utiliza en la presente memoria, la "amplificación de ácido nucleico" es el procedimiento de aumentar el número de copias de la secuencia de ácido nucleico original (ADN o ARN) utilizando una enzima o enzimas que catalizan la síntesis de polinucleótidos. Los ejemplos de amplificaciones de ácido nucleico de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación mediada por bucle (LAMP), amplificación mediada por molde (TMA).

La presente divulgación proporciona además un kit para purificar ácido nucleico a partir de una muestra biológica. En otras formas de realización, se proporciona un kit para detectar un ácido nucleico presente en una muestra biológica. En determinadas formas de realización, los kits de purificación y detección pueden incluir uno o más de los siguientes tal como se describe en la presente memoria: un tampón de lisis; una columna de cromatografía de exclusión molecular; los componentes para construir una columna de cromatografía de exclusión molecular; tubos para recogida de especímenes, residuos y/o muestras; tampón de equilibrado. Preferentemente, se proporcionan con los mismos instrucciones de utilización de los kits para purificación y/o detección de ácido nucleico según los procedimientos de la presente invención.

A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones.

Debe entenderse que lo anterior se refiere a formas de realización preferidas de la presente invención y que pueden realizarse numerosos cambios en las mismas sin apartarse del alcance de la invención. La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no debe interpretarse que imponen en modo alguno limitaciones sobre el alcance de la misma. Por el contrario, debe entenderse claramente que puede recurrirse a otras diversas formas de realización, modificaciones y equivalentes de las mismas que, tras la lectura de la descripción en la presente memoria, se les pueden ocurrir a los expertos en la materia sin apartarse de la presente invención que está determinada por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de las formas de realización preferidas de la misma y a partir de las reivindicaciones. Estas y muchas otras variaciones y formas de realización de la invención resultarán evidentes para un experto en la materia tras una revisión de la descripción y ejemplos adjuntos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de columnas de separación y dispositivo de USP

El dispositivo de USP del presente ejemplo contiene una columna de plástico que contiene medio de filtración en gel Sephacryl encerrado entre discos de filtro poroso inferior y superior. Se evaluaron volúmenes de gel en un intervalo de 0,83-1,32 ml. Se preparó un gran número de columnas con un volumen de medio de SEC de 0,89 ml y 1,14 ml. Tolerancia objetivo para el volumen de gel de +/-3%. El dispositivo de USP se cerró de manera permanente en la parte inferior antes de la utilización. El usuario abrió la trayectoria de fluido para iniciar la operación (rompiendo o cortando la punta inferior de la columna).

Procedimiento de llenado: Se introdujo un disco inferior en el dispositivo de preparación de muestra universal (USP) de la presente invención, y después se dispuso y/o empaquetó la suspensión del medio de filtración en gel Sephacryl (tamaño de partícula de 50 µm) en tampón de reacción Illumigene en el dispositivo. La concentración de la suspensión era del 40-60%, utilizándose lo más frecuentemente el 55%. También se introdujo un disco superior en el dispositivo (la porosidad de 40-100 µm del disco de filtro permite que el tampón pase a través del filtro, al tiempo que se bloquean las partículas de gel entre los dos filtros) para cubrir el medio de filtración en gel Sephacryl. Se tapó el dispositivo USP en la parte superior para evitar la evaporación. El dispositivo de USP con la columna de medio de filtración en gel Sephacryl puede almacenarse a 2-27°C durante periodos de tiempo prolongados (por ejemplo, hasta un año). El dispositivo de USP puede incluir un lecho adsorbente extraíble, que puede retener el líquido que sale de la columna durante la aplicación de muestra.

Ejemplo 2

ARN viral y detección de virus

El propósito de este experimento era demostrar la capacidad del flujo de trabajo de preparación de muestra universal (USP) para purificar ARN viral y la capacidad del flujo de trabajo de preparación de muestra universal (USP) para detectar ácido nucleico viral. Este experimento se realizó con la reacción de RT y amplificación en una etapa. Se recogieron los especímenes clínicos nasofaríngeos y nasales en medio de transporte. Se congeló

5 el medio a -80°C, hasta su utilización. Se transportaron 200 µl de espécimen clínico a un tubo Eppendorf limpio. Se añadieron 50 µl de tampón de lisis [NaOH 0,2 N y SDS al 1%) y 50 µl de tampón de PBS complementado con azida (PBSA) al mismo tubo. Se volteó el tubo 3 veces para mezclar. Se cargaron 200 µl de la mezcla de espécimen en columnas de USP (equilibradas en tampón de reacción de LAMP {base Trizma 4,8456 g/l, KCl 1,4912 g/l, sulfato de magnesio, 2,5 M (anhidro) 6,4 ml/l, sulfato de amonio 2,6426 g/l, Tween-20 2,0 ml/l, azida de sodio 0,94 g/l}).

10 Una vez que el espécimen entró en el gel, se cargaron 200 µl de agua de calidad molecular en la parte superior de la columna. Se colocó un tubo de elución limpio para la etapa final. Se añadieron 200 µl de tampón de reacción a la columna y se recogió el material eluido. Se utilizaron 5 µl de elución para realizar RT-LAMP en una etapa a 55°C. Se leyó la reacción en tiempo real en un termociclador de PCR en tiempo real Rotorgene Q.

Composición de reacción de LAMP fluorescente

15 Composición de reacción de LAMP fluorescente Flu A

	- dNTP	1,4 mM
	- BSA al 10%	0,6%
20	- Cebador FluA1 F3	0,2 µM
	- Cebador FluA1 B3	0,2 µM
25	- Cebador Flu AMFIP	1,6 µM
	- Cebador FluA1 BIP	1,6 µM
	- Cebador FluA1 LF	0,8 µM
30	- Cebador FAM FluA1 LB	0,5 µM
	- Polimerasa BST	0,9 µl
35	- Transcriptasa inversa	1 U
	- Inhibidor de ARNasa (40 U/µl)	10 U

40 Composición de reacción de LAMP fluorescente Flu B

	- dNTP	1,4 mM
	- BSA al 10%	0,6%
45	- Cebador FluB1 F3	0,2 µM
	- Cebador FluB1 B3	0,2 µM
	- Cebador FluB1 FIP	1,6 µM
50	- Cebador FluB1 BIP	1,6 µM
	- Cebador FluB1 LF	0,8 µM
55	- FB LBQ	0,04 µM
	- Polimerasa BST	0,9 µl
	- Transcriptasa inversa	1 U
60	- Inhibidor de ARNasa (40 U/µl)	10 U

Especimen de Flu A

ID de espécimen	valor de ct	Detección
PSH 1964	18,01	Positiva
PSH 0337	34,33	Positiva
PSH 1965	17,45	Positiva
PSH 1927	18,77	Positiva
PSH 1979	18,42	Positiva

5

Especimen de Flu B

ID de espécimen	valor de ct	Detección
PCMC 9410	20,76	Positiva
PCMC 4483	17,63	Positiva
PCMC 11207	14,38	Positiva
PCMC 10457	15,32	Positiva
PCMC 11383	29,9	Positiva

Especimen negativo para influenza

ID de espécimen	valor de ct	Detección
7678	0	Negativa
7679	0	Negativa
7711	0	Negativa
7756	0	Negativa
7757	0	Negativa

10 **Ejemplo 3**

ADN bacteriano y detección en espécimen de heces

15 Este experimento se realizó para demostrar la capacidad del flujo de trabajo de preparación de muestra universal para someter a lisis células bacterianas y obtener ADN purificado. Este experimento también demuestra que el flujo de trabajo de USP purifica ADN a partir de un espécimen de heces clínico que es sólido, semisólido y acuoso. El ADN purificado está listo para aplicaciones moleculares posteriores.

20 Se obtuvieron especímenes de heces positivos para *C. diff* mediante Illumigene a partir de centros clínicos. Se mantuvieron los especímenes congelados a -80°C, hasta su utilización. Se observó que la consistencia de especímenes de heces era sólida, semisólida y acuosa.

25 Se trató una carga de hisopo completa de espécimen con 1480 µl de tampón de lisis {NaOH 0,1 N y SDS al 0,54%}. 50 µl de control de ensayo, que contenía *E. coli* transformada con un plásmido que codificaba para el gen Spa de *Staphylococcus aureus*. Se suspendieron células *E. coli* fijadas en formaldehído en Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM a una absorbancia a 600 nm de 0,700 - 0,800. Se diluyó la suspensión celular 1:10.000 en PBSA con ARNt de levadura 400 ng/ml y se añadió a la muestra. Se agitó con vórtex la muestra sometida a lisis para mezclar durante 10 segundos y se filtró a través de un filtro de 7 µm.

30 Se cargaron 200 µl de la mezcla de lisis sobre columnas de USP compuestas por SEPHACRYLA S-300 y se equilibraron en tampón de reacción de LAMP (composición descrita anteriormente). Una vez que el espécimen entró en el gel, se cargaron 200 µl de agua de calidad molecular en la parte superior de la columna. Una vez que el agua de calidad molecular entró completamente en el gel, se retiró el tubo de residuo de debajo de la columna. Se colocó un tubo de elución limpio para la etapa final. Se añadieron 200 µl de agua de calidad molecular a la columna y se recogió el último flujo a través en un tubo de elución limpio. Se utilizaron 50 µl de elución para amplificar el gen de toxina A de *C. diff* en reacción de LAMP a 63°C utilizando un dispositivo de prueba de *C. difficile* de Meridian (n.º de catálogo 280050). Se utilizaron 50 µl de elución para amplificar el gen spa de *S. aureus* en reacción de LAMP a 63°C.

40 En una tabla a continuación se presentan los resultados de la prueba de amplificación:

Consistencia de espécimen	ID de espécimen	Prueba (min)	Control (min)
Sólida	N.º 17	24	24
Sólida	N.º 14	27	24
Sólida	N.º 36	28	28
Semisólida	N.º 48	26	23
Semisólida	N.º 42	22	25
Acuosa	N.º 19	23	27
Sólida	N.º 17	24	24

Ejemplo 4

5 Espécimen de orina

Se empaquetaron columnas con 1,14 ml de medio de SEC Sephacryl S300 equilibrado en tampón de reacción de LAMP complementado con ARNt de levadura como portador. Se procesaron muestras de orina clínicas sobrantes, previamente sometidas a prueba para detectar *Chlamydia* y *Gonorrhea* utilizando una prueba de amplificación de ácido nucleico (ProbeTec (Beckton Dickinson), mediante separación de USP).

a) Preparación de espécimen de orina

Se transfirieron 1,5 ml de orina a un tubo de microcentrifugadora de 2,0 ml limpio y se complementaron con una gota de control de ensayo (suspensión diluida de células *E. coli*, que albergaban un plásmido que comprende la secuencia del gen Spa de *Staphylococcus aureus*, dispensada desde un frasco cuentagotas. Se centrifugaron los tubos a 6000 rpm durante 3 min. Se descartaron los sobrenadantes volteando los tubos. Se resuspendieron los aglomerados que contenían células en 250 µl de tampón de lisis (NaOH 0,2 N y SDS al 1%).

20 b) PROCESAMIENTO DE ADN

Se aplicaron 250 µl de mezcla de lisis a la columna de USP y se permitió que el líquido entrara en el medio de columna mediante flujo por gravedad. Se aplicaron 250 µl de tampón (que contenía colorante rojo para potenciar el seguimiento visual de flujo de líquido a través del filtro de columna superior) a la columna y se permitió que el líquido entrara en el medio de columna mediante flujo por gravedad. Se aplicaron 250 µl de tampón de elución a la columna y se recogió el tampón desplazado eluido de la columna en un tubo de microcentrifugadora de 2,0 ml limpio.

30 c) Amplificación LAMP:

Se añadieron 50 µl de muestra de ADN procesado a las cámaras de prueba y de control de dispositivos Illumigene (Meridian Bioscience, Cincinnati, OH) que contenían perlas liofilizadas que comprendían reactivos de amplificación LAMP secados. Se añadió una gota de aceite mineral a cada cámara para recubrir la mezcla de reacción. Se cerraron los dispositivos Illumigene y se colocaron en un lector illumipro para una incubación de 40 minutos a 63°C. Se midió la señal óptica mediante el lector al comienzo, durante y al final de la incubación. 55 de las 55 muestras de orina clínicas positivas para *Chlamydia trachomatis* mediante BD ProbeTec fueron positivas mediante amplificación LAMP tras el procesamiento mediante USP. 13 de las 14 muestras de orina clínicas positivas para *Neisseria gonorrhoea* mediante BD ProbeTec fueron positivas mediante amplificación LAMP tras el procesamiento mediante USP. El tiempo promedio para obtener un resultado positivo en reacciones de LAMP de prueba fue de 20 minutos.

Ejemplo 5

45 Medios de transporte

El propósito de este experimento era demostrar la viabilidad de la utilización del flujo de trabajo de preparación de muestra universal para someter a lisis células y purificar ADN a partir de especímenes que se recogen en medio de transporte.

50 Con este fin, se realizaron adiciones conocidas de cultivo madre de *Mycoplasma* purificado en medio de transporte M4 a 100 UFC/ml y 50 UFC/ml.

55 Se transfirieron 300 µl de muestra de *Mycoplasma* a un tubo limpio. Se añadieron 50 µl de control de ensayo y 50 µl de tampón de lisis. Se volteó la mezcla tres veces para mezclar. Se cargaron 350 µl de mezcla de muestra sobre columnas de USP. Se recogió el flujo a través en un tubo de residuo. Una vez que la muestra entró completamente en la columna, se retiró el tubo de residuo. Se coloca un tubo limpio debajo de la columna. Se

añadieron 350 µl de tampón de reacción sobre la columna. El flujo a través con ADN purificado se recoge en el tubo limpio.

5 Se cargan 50 µl de eluyente en el lado de prueba de dispositivos de prueba de *Mycoplasma* para amplificar una secuencia específica de *Mycoplasma*. Se cargan 50 µl de eluyente en el lado de control del dispositivo de prueba de *Mycoplasma* para amplificar una secuencia específica de spa.

<i>Mycoplasma</i> UFC/ml	Tiempo para la amplificación		
	Promedio de prueba	Desv. est.	Detección
100	20,6	1,26	Positiva
50	20	0	Positiva

10 **Ejemplo 6**

Lavado broncoalveolar

Este ejemplo presenta evidencias de que el lavado broncoalveolar es un espécimen clínico adecuado para la purificación y amplificación de ADN de *Mycoplasma* con el flujo de trabajo de preparación de muestra universal.

15 Con este fin, se preparó una dilución apropiada de cultivo madre de *Mycoplasma* en matriz clínica. Las diluciones fueron de 150 UFC/ml y 75 UFC/ml.

20 Se mezclaron 200 µl de las diluciones anteriores con 50 µl de tampón de lisis y 50 µl de control de ensayo. Se volteó el tubo tres veces para mezclar. Se cargaron 200 µl de lisado sobre la columna de USP. Una vez que toda la muestra entró en la columna, se cargaron 200 µl de agua de calidad molecular sobre la columna. Tras recoger la última gota de flujo a través, se descartó el tubo de residuo. Se colocó un tubo de elución limpio debajo de la columna de USP. Se añadieron 200 µl de tampón de reacción de LAMP a la columna. Se recogió el flujo a través. Se añadieron 50 µl de elución al dispositivo de prueba de *Mycoplasma* para someter a prueba la presencia de ADN de *Mycoplasma*. Se añadieron 50 µl de elución al lado de control del dispositivo de prueba para someter a prueba la presencia de ADN de control.

Muestras	Prueba	Control
5 ufc/prueba de cepa FH de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1 a 23 min, 7 a 25 min, 1 a 30 min, 1 a 37 min,	7 a 27 min, 3 a 30 min
2,5 ufc/prueba de cepa FH de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2 a 23 min, 5 a 25 min, 3 a 27 min	3 a 27 min, 7 a 30 min

30 **Ejemplo 7**

Cultivo de sangre

Este experimento se realizó para demostrar la viabilidad de la amplificación de ADN a partir de sangre y productos relacionados con la sangre con flujo de trabajo de USP.

35 Se sometió a prueba un cultivo de sangre, que se había mostrado que era positivo para *Staphylococcus aureus*, utilizando un procedimiento de USP. Se mezclaron 400 µl de cultivo de sangre positivo con 100 µl de tampón de lisis. Se volteó el tubo tres veces para mezclar. Se cargaron 200 µl de lisado sobre la columna de USP. Se añadieron 200 µl de 1X tampón de reacción a la columna seguido por 200 µl de agua de calidad molecular para elución.

N.º	Especimen	Tiempo para amplificación de Spa (min)	Detección
1	Cultivo de sangre	23	Positiva
2	Cultivo de sangre	20	Positiva

45 **Ejemplo 8**

Utilización de Sephacryl S-1000

El propósito de este experimento era demostrar la viabilidad de la utilización de flujo de trabajo de preparación de muestra universal para someter a lisis células y purificar ADN a partir de especímenes que se recogen en medio de transporte.

50 Para este fin, se realizaron adiciones conocidas de cultivo madre de *Mycoplasma* purificado en medio de transporte M4 a 20 UFC/ml.

Se transfirieron 300 µl de muestra de *Mycoplasma* a un tubo limpio. Se añadieron 50 ul de control de ensayo y 50 µl de tampón de lisis. Se volteó la mezcla tres veces para mezclar. Se cargaron 350 ul de mezcla de muestra sobre columnas de USP. Se recoge el flujo a través en un tubo de residuo. Una vez que la muestra entró completamente en la columna, se retiró el tubo de residuo. Se coloca un tubo limpio debajo de la columna. Se añadieron 350 µl de tampón de reacción sobre la columna. Se recoge el flujo a través con ADN purificado en el tubo limpio.

Se cargaron 50 µl de eluyente en el lado de prueba de dispositivos de prueba de *Mycoplasma* para amplificar una secuencia específica de *Mycoplasma*. Se cargaron 50 ul de eluyente en el lado de control del dispositivo de prueba de *Mycoplasma* para amplificar una secuencia específica de spa.

Myco, UFC/ml	Prueba (min)	Control (min)
20	27	30
20	25	30
20	27	30
20	ND	27
20	30	30
20	30	30
20	ND	30
20	ND	30
20	27	30
20	ND	30

Ejemplo 9

Intervalos de volumen

Este estudio se realizó para demostrar la versatilidad y flexibilidad en cuanto a volúmenes de muestra, tampón de lavado y tampón de elución en el flujo de trabajo de USP. En este estudio se utilizaron tres volúmenes diferentes de cada uno de muestra, lavado y tampón de elución. Se utilizaron heces con adiciones conocidas de *C. diff* como introducción de muestra y se utilizó una prueba de *C. diff* mediante Illumigene para detectar ADN. Se diluyeron heces con adiciones conocidas de *C. diff* en heces negativas combinadas hasta un final de 256 UFC/prueba.

Se mezcló una carga de hisopo completa de espécimen con 1480 µl de tampón de lisis. Se añadieron dos gotas de control de ensayo de *Mycoplasma*, que contenía *E. coli* transformada con gen Spa de *Staphylococcus aureus*, a la muestra. Se agitó la muestra con vórtex para mezclar durante 10 segundos. Se filtraron 10 gotas a través de un filtro de 7 µm.

Se cargaron 160 µl, 200 µl y 240 µl de muestra sobre columnas de USP (compuestas por SEPHACRYL S-300 y equilibradas en tampón de reacción de LAMP). Una vez que el espécimen entró en el gel, se añadieron 160 µl, 200 µl y 240 µl de agua de calidad molecular. Una vez que el agua de calidad molecular entró completamente en el gel, se retiró el tubo de residuo de debajo de la columna. Se colocó un tubo de elución limpio para la etapa final. Se añadieron 160 µl, 200 µl y 240 µl de agua de calidad molecular a la columna y se recogió el último flujo a través en un tubo de elución limpio. Se utilizaron 50 µl de elución para amplificar el gen de toxina A de *C. diff* en reacción de LAMP a 63°C. Se utilizaron 50 ul de elución para amplificar el gen Spa de *S. aureus* en reacción de LAMP a 63°C.

Volumen de muestras	Prueba	Control
160 ul de muestra sobre USP (-20%)	7 a 27 min, 3 a 30 min	10 a 23 min,
200 ul de muestra sobre USP	5 a 27 min, 5 a 30 min	9 a 23 min, 1 a 25 min
240 ul de muestra sobre USP (+20%)	3 a 25 min, 3 a 27 min, 3 a 30 min, 1 a 33 min	10 a 23 min

Volumen de lavado	Prueba	Control
160 ul de tampón de lavado (-20%)	8 a 30 min, 1 a 40 min, 1 ND	4 a 23 min, 4 a 25 min, 2 a 27 min
Flujo de trabajo convencional	5 a 27 min, 5 a 30 min	9 a 23 min, 1 a 25 min
240 ul de tampón de lavado (+20%)	1 a 25 min, 6 a 27 min, 1 a 30 min, 2 ND	9 a 23 min, 1 a 30 min,

Volumen de elución	Prueba	Control
160 ul de elución (-20%)	1 a 25 min, 6 a 27 min, 2 a 30 min, 1 a 40 min,	8 a 23 min, 2 a 25 min
Flujo de trabajo convencional	5 a 27 min, 5 a 30 min	9 a 23 min, 1 a 25 min
240 ul de elución (+20%)	1 a 25 min, 5 a 27 min, 2 a 30 min, 1 a 33 min, 1 a 35 min,	10 a 23 min

Ejemplo 10

Pruebas de tolerancias de volumen para USP

5

La determinación de la tolerancia de volumen de entrada y salida del procedimiento de extracción es una etapa importante en la evaluación de la eficacia del procedimiento. El siguiente experimento se realizó para someter a prueba las tolerancias de volumen para USP. En primer lugar, se empaquetaron columnas con 1,78 ml (suspensión al 50% de Sephacryl S 300 hr realizada en 1X tampón de reacción). Se diluyó disolución madre bacteriana de *Mycoplasma pneumoniae* hasta una concentración de 50 ufc/ml en medio M4 y se diluyó el control interno, que contenía células *E. coli* que albergaban plásmido que contenía el gen Spa de *Staphylococcus aureus*, hasta 10.000 veces en tampón de PBSA con 400 ng/ml de ARNt de levadura. Se prepararon muestras con cantidades variables de control interno, *Mycoplasma* y tampón de lisis tal como se muestra en la tabla para lograr las entradas de 250, 300 y 400 ul. Se mezclaron suavemente las muestras 6 veces con una pipeta automática de 200 ul. Antes de la carga de muestra a las columnas, se eliminó mediante drenaje el exceso de tampón. Se permitió que las muestras aplicadas se absorbieran en el material de gel durante un minuto y se descartó el flujo a través. Tras este procedimiento, se eluyó ácido nucleico utilizando diversas cantidades (200, 250, 300 y 400 ul) de 1X tampón de reacción. Se recogieron los eluatos en tubos de 1,5 ml limpios durante aproximadamente un minuto. Se aplicaron cincuenta microlitros de eluatos a dispositivos de *Mycoplasma* Illumigene que contenían perlas de prueba y de control. Se incubaron adicionalmente estos dispositivos a 63°C durante 40 min en un lector ILLUMIPRO-10. La tabla muestra que para un intervalo de volúmenes de entrada y de elución, se detectaron los ADN de prueba y de control.

10

15

20

Volumen de muestra (µl)	Volumen de control (µl)	Volumen de disolución de lisis (µl)	Volumen de entrada total (µl)	Volumen de salida (µl) (elución)	Prueba (min)	Control (min)
100	50	100	250	300	33	37
200	50	100	400	300	30	33
150	50	100	300	250	30	33
100	100	100	300	400	30	33
100	50	150	300	200	33	33
200	50	150	400	200	30	33

Ejemplo 11

Elución de muestra con un émbolo de jeringa en lugar de gravedad

Muestras: Medio Amies líquido con adiciones conocidas de células de *Chlamydia* (CT) y *Gonorrhea* (NG) tal como se muestra en la tabla 1 a continuación. Se mezcló un ml del medio con adiciones conocidas de *Chlamydia* y *Gonorrhea* con aproximadamente 40 µl de control de ensayo y 250 µl de tampón de lisis y se mezcló el contenido mediante volteos simples.

Columnas M-Prep: Se empaquetaron las columnas M-prep con 1,14 ml de suspensión de Sephacryl S300 hr que estaba saturada con tampón de reacción Illumigene. Se cargaron quinientos microlitros del lisado a la columna y se descartó el flujo a través eluido. Se recogió de las columnas la muestra de ácido nucleico en un tubo de 1,5 ml con la ayuda de un émbolo de jeringa simplemente empujando el émbolo al interior de la columna. El volumen de ácido nucleico eluido obtenido oscila entre aproximadamente 200 y 450 µl.

Amplificación mediante Illumigene: Se añadieron cincuenta microlitros de cada eluato a la prueba de *Chlamydia* mediante Illumigene y reacciones de control y se añadieron otros 50 µl de cada eluato a la prueba de *Gonorrhea* mediante Illumigene y reacciones de control. Se incubaron los dispositivos de reacción cargados a 63°C durante 40 minutos en lectores ILLUMIPRO-10 y se recopilaron los tiempos de amplificación tal como se muestra en la tabla 1.

45

Tabla 1: Diez repeticiones de muestras sometidas a prueba a cada concentración, los tiempos de detección de la amplificación mediante Illumigene se muestran en minutos. ND indica que no hay ninguna detección.

Amies Líquido con adiciones conocidas de células CT y NG por ml	Volumen de muestra (µl)	Control de ensayo (µl)	Volumen de tampón de lisis (µl)	Volumen de entrada de columna (µl)	Volumen de salida de columna (µl)	Elución con émbolo			
						CT		NG	
						Prueba (tiempo en minutos)	Control (tiempo en minutos)	Prueba (tiempo en minutos)	Control (tiempo en minutos)
100 ufc/10 ufi (n=10)	1000	40	250	500	200-450	9 a 20, 23	6 a 23, 2 a 25, 27, 30	7 a 20, 3 a 23	23, 6 a 25, 2 a 27, 33
30 ufc/3 ufi (n=10)	1000	40	250	500	200-450	7 a 20, 3 a 23	4 a 23, 5 a 25, 35	20, 4 a 23, 4 a 25, 30	2 a 23, 7 a 25, 33
10 ufc/1 ufi (n=10)	1000	40	250	500	200-450	2 a 20, 5 a 23, 25, 35, ND	8 a 23, 2 a 25	20, 6 a 23, 25, 2 a ND	5 a 23, 5 a 25

5 **Ejemplo 12**

Elución de muestra con el tapón de dispositivo de preparación de muestra en lugar de gravedad en combinación con detección mediante LAMP y PCR

10 Muestras: Para el estudio se seleccionaron muestras de orina congeladas anteriormente sometidas a prueba y positivas para *Neisseria gonorrhoea*. Se mezcló un ml de la muestra de orina con aproximadamente 40 µl de control de ensayo y 80 µl de NaOH 1 M seguido por 250 µl de tampón de lisis y se mezcló el contenido mediante volteeos simples.

15 Columnas M-Prep: Se empaquetaron las columnas M-prep con 1,14 ml de suspensión de Sephacryl S300 hr que estaba saturada con tampón de reacción Illumigene. Se cargaron quinientos o 700 microlitros del lisado a la columna y se descartó el flujo a través eluido. Se recogió de las columnas la muestra de ácido nucleico en un tubo de 1,5 ml con la ayuda del tapón de columna M-prep empujándolo simplemente al interior de la columna. El volumen de ácido nucleico eluido obtenido era de aproximadamente 200 - 250 µl.

20 Amplificaciones mediante Illumigene: Se añadieron cincuenta microlitros de cada eluato a la prueba de *Gonorrhoea* mediante Illumigene y reacciones de control. Se incubaron los dispositivos de reacción cargados a 63°C durante 40 minutos en lectores illumiPro-10 y se recopilaron los tiempos de amplificación tal como se muestra en la tabla 2.

25 Amplificaciones por PCR en tiempo real: En las reacciones de PCR se utilizaron cinco microlitros del ADN eluido a partir de cada procedimiento de preparación de muestra mencionado anteriormente. Se configuraron las reacciones utilizando mezcla maestra Quantifast (Qiagen) y se realizaron las amplificaciones utilizando un ciclador térmico Rotor-Gene Q (Qiagen). En la tabla 3 se muestran los valores de Ct. ND indica que no se observó ninguna amplificación para esas muestras particulares.

30 Tabla 2: Los tiempos de detección de la amplificación mediante Illumigene se muestran en minutos. ND indica que no hay ninguna detección. Múltiples puntos de tiempo para una prueba dada muestran los resultados de pruebas repetidas.

Muestra de orina	Muestra (µl)	Control de ensayo (µl)	Tampón de lisis (µl)	NaOH 1 M (µl)	Entrada de columna (µl)	Salida de columna (µl)	Carga de lisado de 500 µl en la columna		Carga de lisado de 700 µl en la columna	
							Prueba, tiempo en minutos	Control, tiempo en minutos	Prueba, tiempo en minutos	Control, tiempo en minutos
1	1000	40	250	80	500	250	23	33	23	23
2	1000	40	250	80	500	250	20	37	20	33
3	1000	40	250	80	500	250	ND, 60	25, 25	ND, ND	25, 30
4	1000	40	250	80	500	250	20	27	20	25
5	1000	40	250	80	500	250	20	23	20	25
6	1000	40	250	80	500	250	27, 35	45, 37	ND, 37	ND, 33

ES 2 689 441 T3

7	1000	40	250	80	500	250	20	23	20	25
8	1000	40	250	80	500	250	25	25	20	25
9	1000	40	250	80	500	250	20	27	20	27
10	1000	40	250	80	500	250	23	33	20	23
11	1000	40	250	80	500	250	20	25	20	23
12	1000	40	250	80	500	250	ND, 20	ND, 30	20	23
13	1000	40	250	80	500	250	23	30	23	27
14	1000	40	250	80	500	250	20	27	20	33
15	1000	40	250	80	500	250	20	25	20	30
16	1000	40	250	80	500	250	20	27	20	25
17	1000	40	250	80	500	250	20	25	20	25
18	1000	40	250	80	500	250	20, 20	50, 35	20	33
19	1000	40	250	80	500	250	20	30	25, ND, 20	60, ND, 33
20	1000	40	250	80	500	250	20	25	20	25
21	1000	40	250	80	500	250	20	25	20	33
22	1000	40	250	80	500	250	20	25	20	25
23	1000	40	250	80	500	250	20	27	20	30
24	1000	40	250	80	500	250	20	23	20	23

ND: Sin detección

5 Tabla 3: Se muestran los valores de Ct de la amplificación por PCR en tiempo real para entradas de lisado tanto de 500 µl como de 700 µl. En la reacción de PCR se utilizan cinco µl del ADN eluido. ND indica que no se obtuvo ningún valor de Ct.

N.º de muestra de orina	Muestra (µl)	Control de ensayo (µl)	Tampón de lisis (µl)	NaOH 1 M (µl)	Entrada de columna (µl)	Salida de columna (µl)	Carga de lisado de 500 µl en la columna	Carga de lisado de 700 µl de en la columna
							Valor de Ct	Valor de Ct
1	1000	40	250	80	500	250	44	39
2	1000	40	250	80	500	250	35	32
3	1000	40	250	80	500	250	ND	ND
4	1000	40	250	80	500	250	39	36
5	1000	40	250	80	500	250	41	37
6	1000	40	250	80	500	250	47	ND
7	1000	40	250	80	500	250	50	39
8	1000	40	250	80	500	250	40	41
9	1000	40	250	80	500	250	34	31
10	1000	40	250	80	500	250	48	38
11	1000	40	250	80	500	250	38	33
12	1000	40	250	80	500	250	ND	41
13	1000	40	250	80	500	250	43	42
14	1000	40	250	80	500	250	42	34
15	1000	40	250	80	500	250	43	35
16	1000	40	250	80	500	250	44	36
17	1000	40	250	80	500	250	40	34
18	1000	40	250	80	500	250	35	33
19	1000	40	250	80	500	250	40	36
20	1000	40	250	80	500	250	39	32
21	1000	40	250	80	500	250	44	29
22	1000	40	250	80	500	250	34	37
23	1000	40	250	80	500	250	34	30
24	1000	40	250	80	500	250	43	35

ND: Ningún valor de Ct obtenido

Ejemplo 13

Elución de muestra utilizando recipiente sometido a vacío en lugar de gravedad en combinación con detección mediante LAMP

5

La utilización de vacío puede lograrse utilizando un recipiente previamente empaquetado con un cierre que mantiene un vacío. Se utilizó un dispositivo BD Vacutainer para demostrar la aplicación. Los medios de SEC utilizados fueron Sephacryl S-300 en 1X RB. El recipiente utilizado fue una jeringa de 10 ml con un ajuste de bloqueo de tipo Luer y una aguja de calibre 26 y filtros para mantener los medios en el recipiente. Se llenó el

10

El experimento de aplicación se realizó utilizando especímenes clínicos preparados a bajas concentraciones. La matriz clínica era orina y el objetivo eran células de *Chlamydia*. Se añadió control de ensayo a los especímenes, seguido por el tampón de lisis. Una vez mezclados, se añadieron 500 ul del espécimen sometido a lisis a los medios y se drenaron por gravedad. Una vez que el flujo de muestra se había detenido, se recogió el ácido nucleico objetivo perforando un dispositivo Vacutainer. El dispositivo Vacutainer extrajo el fluido intersticial del exterior de los medios y dejó el fluido interno en la perla de Sephacryl. Después se sometió a prueba este material utilizando dispositivos Illumigene CT demostrando una amplificación satisfactoria. Véanse los resultados en la tabla 1.

15

20

Tabla 1: Resultados del experimento de aplicación

Especimen preparado	Resultado de prueba mediante Illumigene (n=5)	Resultado de control mediante Illumigene (n=5)
CT (3 UFI)	5 positivos (3 a 22, 2 a 24)	5 positivos (4 a 22, 1 a 24)
CT (1 UFI)	5 positivos (4 a 20, 1 a 24)	5 positivos (2 a 22, 3 a 24)

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de un ácido nucleico presente en una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes:

5

a) combinar la muestra biológica con un tampón de lisis para formar una mezcla de lisis que comprende el ácido nucleico liberado de células en dicha muestra biológica, en el que dicho tampón de lisis comprende un hidróxido alcalino a un pH > 11 en combinación con un detergente;

10

b) someter un volumen de la mezcla de lisis a una cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un volumen de medio de exclusión molecular, en el que dicho volumen de mezcla de lisis está comprendido entre 0,01 y 0,6 del volumen del medio de exclusión molecular, y que presenta un caudal de separación de menos de 10 minutos para producir una disolución eluida que comprende ácido nucleico aislado, en el que la muestra biológica sometida a lisis con el tampón de lisis se aplica directamente a la columna sin una etapa de tratamiento intermedia entre la lisis y la aplicación en columna;

15

c) combinar la disolución eluida con reactivos de amplificación de ácido nucleico que comprenden ADN polimerasa, oligonucleótidos y nucleósidos trifosfato para la amplificación de ácido nucleico;

20

d) amplificar el ácido nucleico en la disolución eluida; y

e) detectar productos de amplificación de ácido nucleico,

25

que además comprende equilibrar dicha columna de cromatografía con un tampón de reacción que se utiliza para la posterior amplificación de ácido nucleico antes del sometimiento de la etapa b).

2. Procedimiento de purificación de un ácido nucleico a partir de una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes:

30

a) combinar la muestra biológica con una disolución de desnaturalización que separa cadenas de ADN bicatenario;

35

b) someter un volumen de la mezcla de muestra biológica a una cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un volumen de medio de exclusión molecular, en el que dicho volumen de mezcla de lisis está comprendido entre 0,01 y 0,6 del volumen del medio de exclusión molecular, y que presenta un caudal de separación basado en la gravedad de menos de 10 minutos para producir una disolución eluida que comprende el ácido nucleico aislado; y

40

c) recoger la disolución eluida para su amplificación o análisis adicionales, que además comprende equilibrar dicha columna de cromatografía con un tampón de reacción que se utiliza para un procedimiento de amplificación posterior o cualquier otra reacción catalizada por enzimas antes del sometimiento de la etapa b).

45

3. Procedimiento de purificación de un ácido nucleico a partir de una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes:

50

a) combinar la muestra biológica con un tampón de lisis para formar una mezcla de lisis que comprende el ácido nucleico liberado de células en dicha muestra biológica, en el que dicho tampón de lisis comprende un hidróxido alcalino a un pH > 11 en combinación con un detergente; y

55

b) someter un volumen de la mezcla de lisis a una cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un volumen de medio de exclusión molecular, en el que dicho volumen de mezcla de lisis está comprendido entre 0,01 y 0,6 del volumen del medio de exclusión molecular, y que presenta un caudal de separación de menos de 10 minutos para producir una disolución eluida que comprende el ácido nucleico aislado, en el que la muestra biológica sometida a lisis con el tampón de lisis se aplica directamente a la columna sin una etapa de tratamiento intermedia entre la lisis y la aplicación en columna;

60

que además comprende equilibrar dicha columna de cromatografía con un tampón de reacción que se utiliza para un procedimiento de amplificación posterior o cualquier otra reacción catalizada por enzimas antes del sometimiento de la etapa b).

4. Procedimiento de purificación de un ácido nucleico a partir de una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes:

65

a) combinar la muestra biológica con un tampón de lisis para formar una mezcla de lisis que comprende el ácido nucleico liberado de células en dicha muestra biológica, en el que dicho tampón de lisis comprende un hidróxido alcalino a un pH > 11 en combinación con un detergente;

5 b) aplicar un volumen de la mezcla de lisis a un medio de cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un extremo de carga, un extremo de elución y un volumen de medio de exclusión molecular, en el que dicho volumen de mezcla de lisis está comprendido entre 0,35 y 0,8 del volumen del medio de exclusión molecular, y permitir que la mezcla de lisis entre completamente en el medio de cromatografía de exclusión molecular, en el que la muestra biológica sometida a lisis con el
10 tampón de lisis se aplica directamente a la columna sin una etapa de tratamiento intermedia entre la lisis y la aplicación en columna; y

15 c) proporcionar un diferencial de presión positivo al lado de carga de la columna forzando que el fluido intersticial que contiene ácido nucleico se drene del medio de SEC, y recoger el fluido drenado que contiene ácido nucleico para su amplificación o análisis adicionales,

20 que además comprende equilibrar dicha columna de cromatografía con un tampón de reacción que se utiliza para un procedimiento de amplificación posterior o cualquier otra reacción catalizada por enzimas antes del sometimiento de la etapa b).

5. Procedimiento de purificación de un ácido nucleico a partir de una muestra biológica, que comprende las etapas siguientes:

25 a) combinar la muestra biológica con un tampón de lisis para formar una mezcla de lisis que comprende el ácido nucleico liberado de células en dicha muestra biológica, en el que dicho tampón de lisis comprende un hidróxido alcalino a un pH > 11 en combinación con un detergente;

30 b) aplicar un volumen de la muestra que contiene ácidos nucleicos a un medio de cromatografía de exclusión molecular en una columna que comprende un extremo de carga, un extremo de elución y un volumen de medio de exclusión molecular, y permitir que la muestra entre en el medio de cromatografía de exclusión molecular, en el que la muestra biológica sometida a lisis con el tampón de lisis se aplica directamente a la columna sin una etapa de tratamiento intermedia entre la lisis y la aplicación en columna; y

35 c) proporcionar un diferencial de presión negativo o vacío al extremo de elución de la columna y recoger el fluido drenado que contiene ácido nucleico para su amplificación o análisis adicionales

40 que además comprende equilibrar dicha columna de cromatografía con un tampón de reacción que se utiliza para un procedimiento de amplificación posterior o cualquier otra reacción catalizada por enzimas antes del sometimiento de la etapa b).

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tampón de reacción utilizado para equilibrar dicha columna de cromatografía comprende Mg^{2+} 1-10 mM o un detergente no iónico, o una combinación.

45 7. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la amplificación es isotérmica.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 5, en el que dicho tampón de lisis comprende urea o sal caotrópica.

50 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 5, en el que dicho tampón de lisis separa un ácido nucleico bicatenario en ácido nucleico monocatenario e inhibe interacciones de ácido nucleico con proteína.

55 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho medio de exclusión molecular comprende poli(acrilamida), polibis(acrilamida) o polimet(acrilamida).

60 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho ácido nucleico es ADN, ARN o una mezcla de los mismos.

12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de amplificación se selecciona de entre el grupo que consiste en RT-PCR, qPCR, PCR digital, LAMP, secuenciación y una reacción catalizada por enzimas.

65 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha muestra biológica es sangre, saliva, heces, orina, muestra respiratoria o caldo de cultivo enriquecido.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho medio de exclusión molecular presenta un límite de exclusión de tamaño molecular de aproximadamente 10 kDa o más.
- 5 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en el que el caudal de separación se basa en la gravedad.
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que además comprende la etapa posterior de analizar dicho ácido nucleico aislado utilizando una reacción catalizada por enzimas.
- 10 17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, en el que la mezcla de lisis entra en el medio de cromatografía de exclusión molecular (SEC) mediante flujo por gravedad.

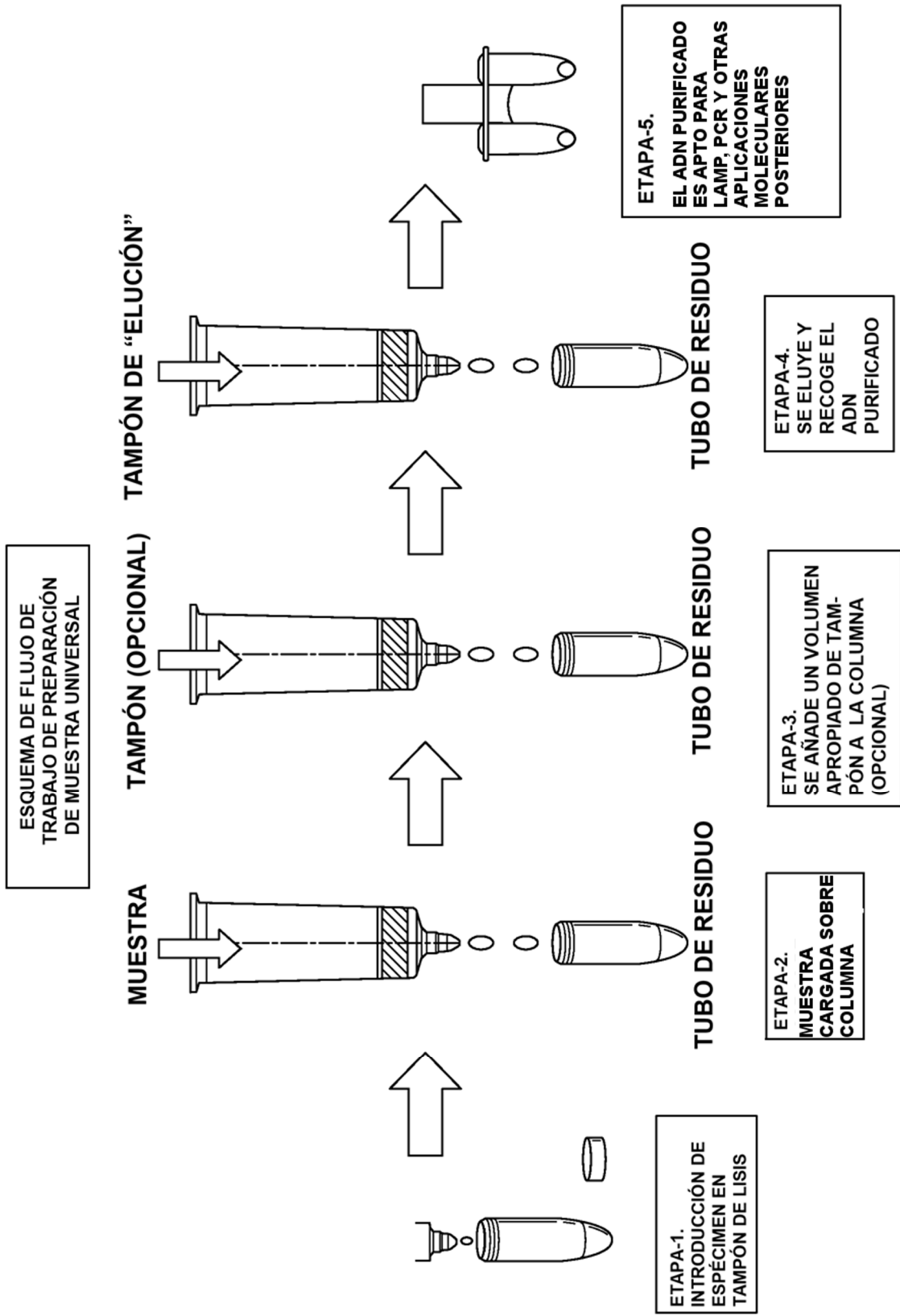


FIG. 1

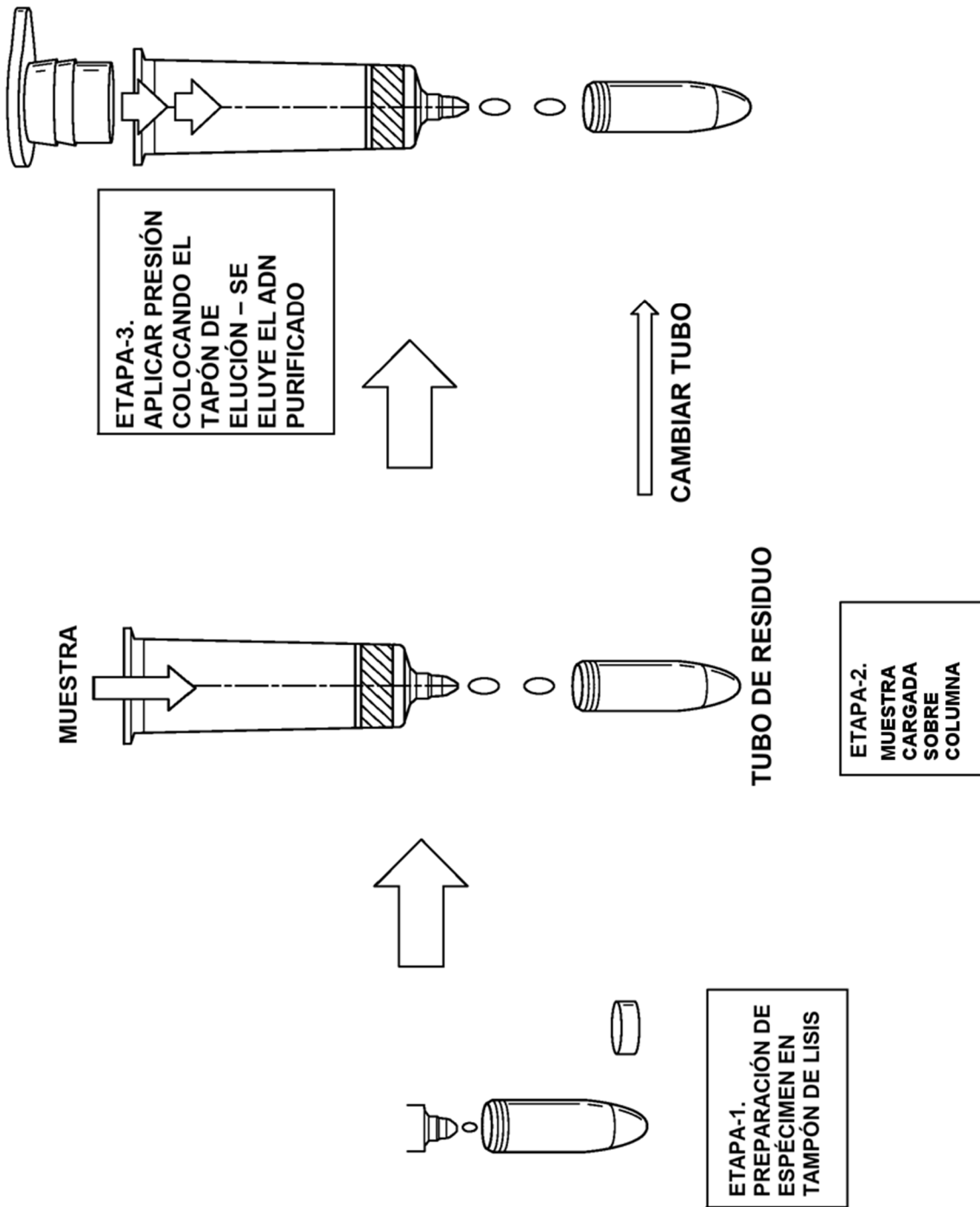


FIG. 2

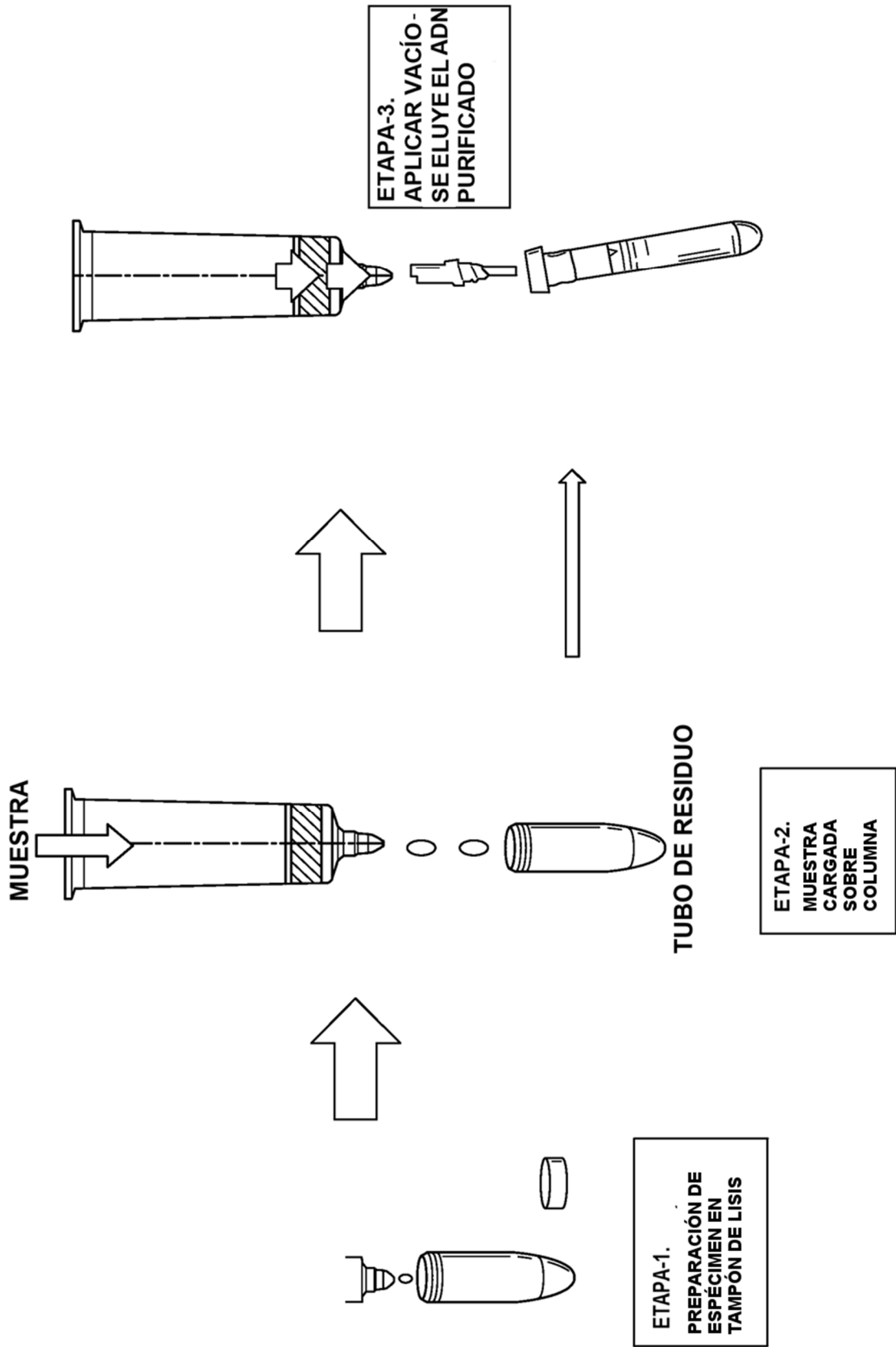


FIG. 3