



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 333 532**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05103113 .6**
96 Fecha de presentación : **19.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1589105**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

54 Título: **Extracción de ácidos nucleicos usando partículas de diámetro pequeño magnéticamente respondedoras.**

30 Prioridad: **23.04.2004 US 564587**
08.07.2004 US 885949

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.02.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.02.2010

73 Titular/es: **Becton Dickinson and Company**
1 Becton Drive
Franklin Lakes, New Jersey 07417, US

72 Inventor/es: **Fort, Thomas L. y**
Collis, Matthew P.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Extracción de ácidos nucleicos usando partículas de diámetro pequeño magnéticamente respondedoras.

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad bajo 35 U.S.C. § 119 frente a la solicitud provisional de patente de EE.UU. N° 60/564.587 presentada el 23 de abril de 2004.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a tecnología de comunicación de pluralidad está dirigida a composiciones y procedimientos para extraer sustancias de una muestra. Más particularmente, la presente invención está dirigida a composiciones y procedimientos para extraer ácidos nucleicos de muestras mediante unión reversible con partículas de diámetro pequeño respondedoras magnéticamente.

15 Antecedentes de la invención

En la discusión siguiente se describirán ciertos artículos y procedimientos para fines básicos e introductorios. Nada de lo contenido en la presente memoria descriptiva debe interpretarse como una “admisión” de la técnica anterior. El solicitante se reserva expresamente el derecho de demostrar, cuando sea adecuado, que los artículos y procedimientos a los que se hace referencia en la presente memoria descriptiva no constituyen técnica anterior bajo las condiciones reglamentarias aplicables.

20 El aislamiento y/o separación de ácidos nucleicos es un trabajo necesario en muchos procedimientos diagnósticos y bioquímicos. Entre las técnicas conocidas para conseguir este objetivo se incluyen la lisis de materiales biológicos para liberar los ácidos nucleicos contenidos en los mismos, seguido por la eliminación o separación de al menos una porción del ácido nucleico.

30 El ácido nucleico se puede separar y/o eliminar mediante una serie de diferentes técnicas. Una de estas técnicas implica la unión reversible del ácido nucleico a partículas magnéticas. Las patentes de EE.UU. N° 5.973.138 y 6.433.160, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria descriptiva por referencia en su totalidad, también son ilustrativos de las técnicas de separación que utilizan partículas respondedoras magnéticamente.

35 Aunque dichas técnicas generalmente son eficaces, todavía queda mucho por mejorar. Por ejemplo, la aplicación de un campo magnético a las partículas magnéticas descritas en lo que antecede puede hacer que las partículas se “agrupen” juntos. Se cree que este agrupamiento se debe a la atracción magnética residual retenida por las partículas después de eliminar el campo magnético. Este fenómeno requiere la aplicación de un procedimiento de “desmagnetización” para eliminar el agrupamiento de las partículas.

Resumen de la invención

40 La presente invención proporciona composiciones y técnicas que son eficaces en prevenir el agrupamiento o agregación de partículas respondedoras magnéticamente, de modo que se evita la necesidad de un procedimiento de desmagnetización.

45 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para unir de forma reversible al menos una molécula de ácido nucleico, que comprende: crear una mezcla en un contenedor, en la que la mezcla comprende la muestra, al menos una partícula respondedora magnéticamente, y un resto; y proporcionar la mezcla con un pH inferior a aproximadamente 7,0, de modo que se alteran las propiedades de carga superficial de al menos una partícula magnéticamente respondedora. La alteración en las propiedades de carga superficial de al menos una partícula respondedora magnéticamente hace que al menos una molécula de ácido nucleico se una de forma inespecífica a al menos una partícula respondedora magnéticamente para formar un complejo. Preferentemente, la al menos una partícula respondedora magnéticamente está sin recubrir, sin tratar, carece de modificación en la superficie y tiene un diámetro de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 0,3 μm .

55 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la unión reversible de al menos una molécula de ácido nucleico, que comprende: (i) crear una mezcla en un contenedor, en la que la mezcla comprende una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, al menos una partícula respondedora magnéticamente que tiene un diámetro de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 0,3 μm , y un resto; (ii) proporcionar la mezcla con un pH ácido, de modo que se alteran las propiedades de carga superficial de al menos una partícula magnéticamente respondedora, en la que la alteración en las propiedades de carga superficial de al menos una partícula respondedora magnéticamente hace que la al menos una molécula de ácido nucleico se una de forma inespecífica a la al menos una partícula respondedora magnéticamente para formar un complejo; (iii) aplicar un campo magnético al complejo; (iv) eliminar el resto de la mezcla del contenedor mientras se aplica el campo magnético al complejo; (v) eluir la al menos una molécula de ácido nucleico de la al menos una partícula respondedora magnéticamente; y (vi) reaplicar el campo magnético a la al menos una partícula respondedora magnéticamente eluida, de modo que se separa la al menos una partícula respondedora magnéticamente de la al menos una molécula de ácido nucleico.

Breve descripción de la figura

Las características anteriores y de otro tipo, aspectos y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción, las reivindicaciones adjuntas y las formas de realización ejemplo que se muestran en las figuras, que se describen brevemente a continuación. Debe observarse que, a menos que se especifique lo contrario, elementos similares tienen los mismos números de referencia.

La Fig. 1 es una ilustración esquemática de una forma de realización de un procedimiento realizado de acuerdo con los principios de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Los principios de la presente invención se describirán con más detalle mediante la siguiente discusión de ciertas formas de realización ilustrativas y por referencia a la figura anterior.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “ácido nucleico” significa ácido desoxirribonucleico (ADN), ribonucleico (ARN) o cualquier modificación natural o sintética de los mismos, así como combinaciones de los anteriores.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “muestra” significa cualquier sustancia que contiene ácido nucleico, incluidas, entre otras, sangre, plasma, suero, orina, aspirados de médula ósea, líquido cefalorraquídeo, tejido, células, heces, saliva, secreciones orales, secreciones nasales, lavado bronquial, pelo, fluidos cervicales, fluidos vaginales, semen, esputo y fluidos linfáticos.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “partícula magnéticamente respondedora” significa una partícula a la que se puede impartir un momento magnético o, de otro modo, que se puede mover bajo la acción de un campo magnético. Entre dichas partículas se incluyen hidróxido férrico, óxido ferrosférrico, sulfuro de hierro y cloruro de hierro.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “unido de forma inespecífica” significa que el mecanismo de unión no se produce a través de un receptor, agente de captura, o similares, que se acoplaría de forma selectiva únicamente con un agente específico.

Las partículas magnéticamente respondedoras de la presente invención pueden estar sin recubrir, sin tratar y/o carecer de cualquier tipo de modificación en la superficie. Las partículas magnéticamente respondedoras de la presente invención se unen de forma inespecífica al ácido nucleico, es decir se unen al mismo de forma inespecífica en ciertas condiciones.

El solicitante ha descubierto que cuando están en un entorno ácido, las partículas magnéticamente respondedoras se unirán de forma reversible a los ácidos nucleicos. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, el solicitante cree que un entorno ácido aumenta la naturaleza electropositiva de las partículas, de modo que se incrementa la unión de las partículas a los ácidos nucleicos electronegativos.

Como se ha indicado anteriormente, de acuerdo con otra forma de realización, preferentemente las partículas magnéticamente respondedoras de la presente invención están sin recubrir, sin tratar y/o carecen de modificación en la superficie. Por tanto, las partículas se unen de modo inespecífico a los ácidos nucleicos. Por tanto, las partículas son útiles en la presente invención y el hierro puede ser un óxido de hierro de formas tales como hidróxido férrico y óxido ferrosférrico, que tienen baja solubilidad en un entorno acuoso. Otras partículas de hierro, tales como sulfuro de hierro y cloruro de hierro, pueden también ser adecuadas para unirse y extraer ácidos nucleicos usando las condiciones descritas en la presente memoria descriptiva.

La forma de las partículas magnéticamente respondedoras no es crítica para la presente invención. Las partículas magnéticamente respondedoras pueden tener varias formas, incluidas, por ejemplo, esferas, cubos, óvalos, forma de cápsula, forma de comprimido, formas aleatorias sin descripción, etc., y pueden tener una forma uniforme o una forma no uniforme. Cualquiera que sea la forma de la partícula, su diámetro medio en su punto más ancho es, generalmente, de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 0,3 μm . De acuerdo con una forma de realización, las partículas magnéticamente respondedoras tienen un diámetro de aproximadamente 0,3 μm .

El entorno ácido en el que las partículas magnéticamente respondedoras se unen de forma efectiva y reversible al ácido nucleico se puede proporcionar mediante diversos medios. Por ejemplo, las partículas magnéticamente respondedoras se pueden añadir a una solución ácida o una solución ácida puede añadirse a las partículas. Como alternativa, una solución o entorno en el que se encuentren las partículas magnéticamente respondedoras se puede acidificar mediante la adición de un agente acidificante, tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido acético o ácido cítrico. Siempre que el entorno en el que se encuentren las partículas magnéticamente respondedoras tenga un pH inferior a aproximadamente 7,0, las partículas se unirán de forma reversible a los ácidos nucleicos, así como a partículas u organismos enteros intactos.

El complejo unido de ácido nucleico/partícula se puede eluir en un tampón adecuado para su posterior manipulación. Calentar el entorno de las partículas con el ácido nucleico unido y/o elevar el pH de tal entorno puede conseguir dicha elución. Entre los agentes que se pueden usar para ayudar a la elución del ácido nucleico a partir de las partículas magnéticamente respondedoras se incluyen soluciones básicas o tampones, tales como hidróxido potásico, hidróxido sódico o cualquier compuesto que aumente el pH del entorno en una medida suficiente de modo que el ácido nucleico electronegativo se desplaza de las partículas magnéticamente respondedoras.

El ácido nucleico se puede extraer después, concentrar y/o aislar. Posteriormente, el ácido nucleico se puede someter a otros procedimientos, tales como uno o más de: cultivo, amplificación en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, amplificación por desplazamiento de cadena, amplificación por desplazamiento de cadena con transcriptasa inversa, clonación, secuenciación, amplificación mediada por transcripción y amplificación de cadena con ligasa.

A continuación se describirá un procedimiento de ejemplo realizado de acuerdo con los principios de la presente invención por referencia a la Fig. 1. En la etapa A, una muestra 10 se localiza en un contenedor 15. La muestra 10 contiene ácido nucleico 20.

Después, en la etapa B se forma una mezcla 25 que incluye la mezcla 10, el ácido nucleico 20 y las partículas magnéticamente respondedoras 30. Como se ha indicado en lo que antecede, las partículas magnéticamente respondedoras 30 pueden tener un diámetro de aproximadamente $0,1\ \mu\text{m}$ a aproximadamente $0,3\ \mu\text{m}$, y puede ser de aproximadamente $0,3\ \mu\text{m}$. Las partículas 30 pueden estar sin recubrir, sin tratar y carecer de modificación de superficie. El pH de esta mezcla se lleva a un nivel adecuado, preferentemente a menos de aproximadamente 7,0, o inferior. La mezcla se puede formar por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, las partículas magnéticamente respondedoras 30 pueden añadirse a una solución ácida, o una solución ácida puede añadirse a las partículas 30. Como alternativa, una solución o entorno en el que las partículas magnéticamente respondedoras 30 se encuentren se puede acidificar mediante la adición de un agente acidificante tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido acético o ácido cítrico.

Opcionalmente, a la mezcla descrita en lo que antecede se puede añadir una solución control de extracción. La solución control de extracción contiene un agente que se puede detectar u observar, cuya presencia es indicativa de un procedimiento de extracción con éxito o sin éxito. La solución control de extracción puede tener cualquier composición adecuada y contener cualquier agente adecuado. A modo de ejemplo, la solución control de extracción puede contener un agente en forma de un oligonucleótido con un fluoróforo unido al mismo. El agente también se une a las partículas magnéticamente respondedoras. La presencia del agente se puede detectar después en un posterior ensayo de amplificación, de modo que indica si una extracción deseada ha tenido éxito.

Como se ha descrito anteriormente, el cambio en el pH produce una modificación de las características de la carga superficial de al menos las partículas magnéticamente respondedoras 30, lo que hace que el ácido nucleico 20 se una a las partículas magnéticamente respondedoras 30, de modo que se forma un complejo. Después se aplica un campo magnético. Como se ilustra en la etapa C, esto se puede conseguir acercando los imanes permanentes opuestos 40, o electroimanes -no mostrados) a la parte exterior del contenedor 15. Bajo la influencia del campo magnético, el complejo ácido nucleico unido 20/partícula magnéticamente respondedora 30 es desplazado hacia los imanes 40. El sobrenadante, o resto, de la mezcla 25 puede retirarse después del contenedor 15 (etapa D).

En esta etapa pueden realizarse opcionalmente una o más etapas de lavado (no mostradas) para eliminar adicionalmente sustancias indeseables. Se puede utilizar cualquier lavado adecuado. Por ejemplo, se puede utilizar agua, un detergente no iónico o un detergente no iónico/solución ácida de baja concentración.

La etapa E es ilustrativa de la elución del complejo para liberar el ácido nucleico 20 de las partículas magnéticas. Esta elución se puede conseguir a través de cualquier medio adecuado, tal como con un agente químico, energía química, o una combinación de ambos. Por ejemplo, se puede añadir un agente tampón 45 para incrementar el pH hasta un nivel adecuado. De acuerdo con la forma de realización, el pH se eleva a aproximadamente 8,3-8,4. El tampón puede comprender KOH.

A continuación, los imanes se acercan al contenedor 15 en la etapa F, que ahora desplaza sólo las partículas magnéticamente respondedoras 30 a las paredes laterales del contenedor 15. Después, el ácido nucleico 20 puede retirarse del contenedor 15 (etapa G).

Una ventaja del uso de las partículas respondedoras magnéticamente descritas en lo que antecede de la presente invención es que el procedimiento de separación/extracción descrito en lo que antecede se puede realizar sin una etapa de “desmagnetización”, que a menudo se requiere en las técnicas convencionales para eliminar la atracción magnética residual entre partículas y que puede producir “agrupamiento”.

Tras la etapa G, el ácido nucleico 20 puede someterse a otros procesos, tales como uno o más de los siguientes: cultivo, amplificación de la cadena con la polimerasa, amplificación de la cadena con polimerasa y transcripción inversa, amplificación por desplazamiento de cadena, amplificación por desplazamiento de cadena y transcriptasa inversa y amplificación de la cadena con ligasa.

Las etapas del procedimiento de ejemplo descritas en lo que antecede se pueden llevar a cabo manualmente, de forma automática o mediante una combinación de etapas manuales y automáticas. Las etapas automáticas pueden realizarse con un dispositivo robótico automático, que opcionalmente incluye pipeteo automático, mezclado y funcionalidad de posicionamiento del imán. El dispositivo robótico automático puede controlarse con un ordenador. Uno de estos dispositivos está disponible comercialmente en Becton, Dickinson and company, como BD Viper™.

La presente invención se puede usar en una serie de diferentes contextos. Por ejemplo, la presente invención puede utilizarse junto con sistemas y procedimientos del tipo descrito en la patente de EE.UU. Nº 6.672.458, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria descriptiva por referencia en su totalidad. Generalmente, estos tipos de sistemas y procedimientos implican la extracción, amplificación y detección de especies diana presentes en una muestra biológica. Dicho procedimiento puede implicar cualquier combinación adecuada de las etapas siguientes.

Un contenedor en forma de un tubo de extracción está provisto de partículas magnéticamente respondedoras. Un agente de lisis se dispensa en el tubo de extracción que contiene las partículas magnéticamente respondedoras mediante un dispositivo robótico automático.

Después, una muestra se dispensa en el tubo de extracción, también mediante el dispositivo robótico automático, y después se mezcla para lisar el (los) organismo(s) de interés contenidos en la muestra a un pH alto, de modo que se libera el ácido nucleico. Se puede añadir una solución ácida al tubo de extracción. La solución ácida actúa para normalizar diferentes tipos de muestras, de modo que se estimula un pH consistente.

Se puede añadir una solución control de extracción a los tubos de extracción mediante el dispositivo robótico automático, y mezclarse. La solución control de extracción contiene un oligonucleótido y fluoróforo unido al mismo que, junto con el ácido nucleico, se une a las partículas magnéticamente respondedoras para formar un complejo. El fluoróforo unido al oligonucleótido se desplaza a través de la extracción y la cantidad de fluoróforo se lee en un posterior ensayo de amplificación e indica una extracción con éxito o sin éxito. Un campo magnético se aplica a los contenidos del tubo de extracción acercando un par de imanes opuestos a la parte exterior del tubo, de modo que desplaza el complejo a la periferia interna del tubo. Después, el dispositivo robótico automático aspira los contenidos del tubo y deja el complejo en su interior.

A continuación, el complejo se lava con una solución de, por ejemplo, detergente no iónico. Un detergente no iónico adecuado está comercialmente disponible como "Tween® 20". El ácido residual contenido en los espacios intersticiales entre las partículas magnéticamente respondedoras mantiene un pH ácido. Como alternativa, se puede añadir al detergente no iónico una solución ácida suave. Tras el lavado, el campo magnético se reaplica para desplazar el complejo a la periferia interna del tubo y se aspira el lavado del tubo.

Después, al tubo de extracción se añade un tampón de elución y se mezcla, para eluir el ácido nucleico del complejo. El tampón de elución se añade y mezcla con el dispositivo robótico automático. A continuación, el ácido nucleico se puede separar de las partículas magnéticamente respondedoras mediante manipulación de los imanes del modo descrito en lo que antecede.

Después de la extracción descrita en lo que antecede, el ácido nucleico se puede someter a procedimientos adicionales, tales como técnicas para detectar y/o cuantificar analitos diana. Por ejemplo, se puede usar cualquier procedimiento adecuado para amplificación en los procedimientos de la invención. Dichos procedimientos incluyen, entre otros, reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"), amplificación por desplazamiento de cadena ("SDA"), amplificación por desplazamiento termófilo de cadena ("toda"), replicación de secuencia autosostenida ("3SR"), amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico ("NASBA"), sistema de replicasa Q β ; reacción en cadena de la ligasa ("LCR") y amplificación mediada por transcripción ("TMA"). La detección puede realizarse mediante cualquier mecanismo adecuado. Por ejemplo, el incremento de la fluorescencia de una sonda indicadora.

Ejemplos no limitantes específicos comprendidos por los principios de la presente invención se describirán a continuación para ilustrar adicionalmente los conceptos de la presente invención.

Ejemplo 1

Se realizó un experimento para comparar el funcionamiento de varias cantidades de partículas magnéticas de diámetro pequeño (0,3 μm) con una cantidad estándar de partículas de diámetro mayor (1,0 μm) dentro del contexto de un ensayo para *Chlamydia trachomatis* (CT).

Se proporcionan contenedores en forma de tubos de extracción con partículas magnéticamente respondedoras. Las partículas magnéticas de diámetro pequeño se identifican como óxido ferrosférico TB 5600, comercialmente disponible en Elementis. Estas partículas tienen un diámetro medio de aproximadamente 0,3 μm . Las partículas magnéticas de diámetro mayor se identifican como óxido ferrosférico M-25 RPS, comercialmente disponible en PEA Ridge. Estas partículas tienen un diámetro medio de aproximadamente 1,0 μm . Las partículas se añadieron a los tubos de acuerdo con el programa siguiente.

TABLA I

Nº de tubo	Tamaño medio de partícula	Cantidad
1	0,3 μm	2,5 mg
2	0,3 μm	5,0 mg
3	0,3 μm	10,0 mg
4	0,3 μm	20,0 mg
5	0,3 μm	40,0 mg
6	1,0 μm	40,0 mg

Las partículas se midieron gravimétricamente y se dispensaron a mano en los tubos de extracción.

En cada tubo de extracción que contiene las partículas magnéticamente respondedoras se dispensa una solución de ácido fosfórico (H_3PO_4) de una concentración 5M mediante el dispositivo BD ViperTM.

Las muestras de orina se adultera a 100 partículas/ml. Un dispositivo robótico automático dispensó 950 μl de las muestras de orina adulterada en los tubos de extracción. El dispositivo robótico dispensó 50 μl de H_3PO_4 5M en los tubos de extracción. Las muestras de orina se mezclan con la solución de ácido fosfórico para lisar el (los) organismo (s) de interés contenidos en la muestra, de modo que se libera el ácido nucleico. El ácido nucleico electronegativo liberado de una célula se asocia con las partículas electropositivas.

Se aplica un campo magnético a los contenidos del tubo de extracción. Después, el dispositivo robótico automático aspira los contenidos del tubo, dejando el complejo en el interior y se retira el campo magnético del contenedor. El dispositivo robótico automático realiza una doble extracción repitiendo las etapas descritas en lo que antecede, comenzando con la introducción de orina adulterada en el tubo de extracción.

Después, el complejo se lava con una solución 1 mM de lavado con glicina-HCl. Tras lavar, el campo magnético se vuelve a aplicar para desplazar el complejo hacia la periferia interna del tubo y el lavado se aspira del tubo.

Después se añade al tubo de extracción una solución tampón de elución y se mezcla, para eluir el ácido nucleico de las partículas presentes en el complejo. A cada tubo se añadieron aproximadamente 370 μl del tampón de elución. La solución tampón de elución comprende una solución basada en una mezcla de KOH y bicina. El tampón de elución se añade y mezcla mediante el dispositivo robótico automático.

La muestra eluida que contiene ácido nucleico se transfiere a pozos de cebado Chlamydia BDProbeTecTM comercialmente disponibles a 150 μl por pocillo. Los pozos de cebado se mantienen a temperatura ambiente durante 20 minutos. Los pozos de cebado se transfieren a una placa caliente a 72°C. Los pozos de amplificación Chlamydia ProbeTec se transfieren a una placa caliente a 54°C al mismo tiempo que los pozos de cebado se transfieren a la placa caliente a 72°C. Las placas se incuban a temperatura durante 10 minutos. Después del periodo de incubación de 10 minutos, 100 μl de solución se transfieren desde los pozos de cebado a los pozos de amplificación. La solución se mezcla tres veces. Encima de los pozos se aplica una cubierta adhesiva para prevenir la pérdida por evaporación de la muestra durante la amplificación. Las placas que contienen los pozos de amplificación se colocan en un lector BDProbeTecTM.

El procedimiento de amplificación se monitorizó con un lector BDProbeTecTM, que detectó el incremento fluorescente asociado con la conversión de la sonda indicadora. El lector produce valores "MOTA" (medida distinta a la aceleración) basados en la detección de la conversión de la sonda indicadora durante el procedimiento de amplificación. Los valores MOTA medios generados durante el periodo de monitorización para cada una de las muestras descritas en lo que antecede se indican más adelante en la Tabla II.

ES 2 333 532 T3

TABLA II

Nº de tubo	Valor MOTA medio
1	24.160
2	68.410
3	42.789
4	38.816
5	28.053
6	45.358

A partir de los valores MOTA indicados en la Tabla II es evidente que la extracción y amplificación del analito CT diana usando 5,0 mg de partículas magnéticamente respondedoras de 0,3 μm (tubo nº 2) tuvo más éxito que la extracción y amplificación usando 40,0 mg de partículas magnéticas de 1,0 μm (tubo nº 6), como se pone de manifiesto mediante el valor MOTA medio más alto asociado con el tubo nº 2. En el caso del ciclo usando sólo 2,5 mg de las partículas de 0,3 μm (tubo nº 1), se cree que el valor MOTA medio menor es atribuible a una deficiencia en el área de unión de las partículas y/o un elevado porcentaje de las partículas de 0,3 μm que se pegan a la punta de la pipeta durante la dispensación. En el caso de los ciclos que utilizan más de 5,0 mg de las partículas de 0,3 μm (tubos nº 3, 4, 5), los valores MOTA medios menores se pueden atribuir a un incremento de la inhibición en el procedimiento de amplificación debido a la mayor masa del hierro y al mayor espacio intersticial entre partículas, que tiende a aumentar la cantidad de potenciales inhibidores de la amplificación y otros componentes cargados negativamente específicos de la orina presentes durante la amplificación.

Ejemplo 2

Se realizó un experimento para determinar las cantidades óptimas de partículas magnéticas y de agente de lisis ácido fosfórico para usar en la extracción de un analito diana.

Se proporcionan contenedores en forma de tubos de extracción con partículas magnéticamente respondedoras. Las partículas magnéticamente respondedoras son las partículas de óxido ferrosférico de Elementis TB5600 mencionadas en el ejemplo 1.

A cada tubo de extracción que contiene las partículas magnéticamente respondedoras se dispensa una solución de ácido fosfórico (H_3PO_4) de concentración 5M. El ácido fosfórico se dispensó mediante un dispositivo robótico automático, a saber el dispositivo extractor automático BD VIPER™.

Los tubos de extracción se cargaron con partículas magnéticas y ácido fosfórico siguiendo el siguiente programa expuesto en la Tabla III.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 333 532 T3

TABLA III

Tubo nº 1	Masa de las partículas de hierro	Volumen de ácido fosfórico
1	5 mg	50 ml
2	5 mg	80 ml
3	5 mg	110 ml
4	5 mg	140 ml
5	10 mg	50 ml
6	10 mg	80 ml
7	10 mg	110 ml
8	10 mg	140 ml
9	20 mg	50 ml
10	20 mg	80 ml
11	20 mg	110 ml
12	20 mg	140 ml

Las muestras de orina que tiene un volumen de 1,0 ml se dispensaron después en los tubos de extracción, también mediante el dispositivo robótico automático. Las muestras de orina se adultera hasta un nivel de 100 partículas/ml y se mezclaron con la solución de ácido fosfórico para lisar el (los) organismos de interés contenidos en la muestra, de modo que se libera ácido nucleico.

Se aplica un campo magnético a los contenidos del tubo de extracción. El dispositivo robótico automático acerca un par de imanes opuestos al exterior del tubo, de modo que se desplaza el complejo a la periferia interna del tubo. El dispositivo robótico automático después aspira los contenidos del tubo, dejando el complejo en su interior, y el campo magnético se retira del contenedor.

Después el complejo se lava con una solución 1mM de glicina-HCl de lavado con el dispositivo robótico automático. Después del lavado, el campo magnético se vuelve a aplicar para desplazar el complejo a la periferia interna del tubo y el lavado se aspira del tubo.

Después, al tubo de extracción se añadió una solución tampón de elución mediante el BD Viper™ y se mezcla, para eluir el ácido nucleico del complejo. A cada tubo se añadió una cantidad de 370 µl de tampón. La solución tampón de elución comprende una solución basado en una mezcla de KOH y bicina. La muestra de ácido nucleico eluida se añade después a los pozos de cebador sometidos al mismo procedimiento de amplificación por desplazamiento de cadena descrito en el Ejemplo 1. El analito diana fue CT.

Para el ensayo descrito en lo que antecede se recogieron los siguientes datos contenidos en la Tabla IV.

ES 2 333 532 T3

TABLA IV

Nº de tubo	Valor MOTA medio
1	77.391
2	82.371
3	60.109
4	53.540
5	84.785
6	76.455
7	72.180
8	77.665
9	42.113
10	50.654
11	52.405
12	48.319

A partir de los datos anteriores es evidente que los tubos de extracción que contienen 5 mg y 10 mg de las partículas exhibían mejor funcionamiento. Los tubos nº 2, 5 y 8 (5 mg/80 ml, 10 mg/50 ml y 10 mg/140 ml, respectivamente, exhibieron el mejor funcionamiento, como queda mostrado por los valores MOTA medios más elevados.

Aunque esta invención se satisface mediante formas de realización en muchas formas diferentes, como se describe con detalle en relación con las formas de realización preferidas de la invención, se entiende que la presente divulgación debe considerarse como ejemplo de los principios de la invención y no pretende limitar la invención a las formas de realización específicas ilustradas y descritas en la presente memoria descriptiva. Expertos en la técnica pueden realizar numerosas variaciones si desviarse del espíritu de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para unir de forma reversible al menos una molécula de ácido nucleico, que comprende:

- (i) crear una mezcla en un contenedor, en el que la mezcla comprende una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, al menos una partícula magnéticamente respondedora que tiene un diámetro de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 0,3 μm , y un resto; y
- (ii) proporcionar la mezcla con un pH ácido, de modo que se alteran las propiedades de carga superficial de la al menos una partícula respondedora magnéticamente;

en el que la alteración en las propiedades de carga superficial de la al menos una partícula respondedora magnéticamente es tal que la al menos una molécula de ácido nucleico pasa a unirse de forma inespecífica a la al menos una partícula magnéticamente respondedora para formar un complejo.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la al menos una partícula magnéticamente respondedora está sin recubrir, sin tratar y carece de modificación de superficie.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (i) comprende añadir la al menos una partícula magnéticamente respondedora al contenedor, añadiendo un agente de lisis al contenedor, añadiendo la muestra al contenedor, y mezclando.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la al menos una partícula magnéticamente respondedora comprende una partícula de óxido de hierro.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la al menos una partícula magnéticamente respondedora tiene un diámetro de aproximadamente 0,3 μm .

6. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende la etapa de aplicar un campo magnético al complejo.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, que además comprende la etapa adicional de eluir la al menos una molécula de ácido nucleico de la al menos una partícula magnéticamente respondedora.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la etapa de eluir comprende añadir una solución tampón al contenedor.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, que además comprende la etapa de volver a aplicar un campo magnético a la al menos una partícula magnéticamente respondedora eluida, de modo que se separa la al menos una partícula magnéticamente respondedora de la al menos una molécula de ácido nucleico.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, que además comprende al menos uno de PCR, SDA, tSDA, 3SR, NASBA, Q β , LCR y TMA.

FIG. 1

