

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 903**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2016** **PCT/GB2016/050738**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016** **WO16147004**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2016** **E 16719888 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020** **EP 3277809**

54 Título: **Aislamiento de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

17.03.2015 GB 201504459

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

19.04.2021

73 Titular/es:

REVOLUGEN LIMITED (100.0%)
Unit 4, Rossington Place, Graphite Way, Hadfield
Derbyshire SK13 1QG, GB

72 Inventor/es:

MINTER, STEPHEN JOHN y
PATSOS, GEORGIOS

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 819 903 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

Aislamiento de ácidos nucleicos

5 La presente invención se refiere al aislamiento de ácidos nucleicos que comprenden ADN de material biológico (p. ej., células) mediante el uso de un procedimiento de lisis y un procesamiento del lisado para aislar los ácidos nucleicos que comprenden ADN. Más particularmente, la invención implica la inmovilización de los ácidos nucleicos que comprenden ADN del material biológico lisado en un soporte sólido y la purificación de los ácidos nucleicos que comprenden ADN en el soporte antes de la elución de los ácidos nucleicos que comprenden ADN del soporte para su recogida. Un objetivo particular de la presente invención consiste en proporcionar un proceso que es relativamente rápido y sencillo de llevar a la práctica y que produce ácidos nucleicos que comprenden ADN de alta pureza con un buen rendimiento. La invención también se refiere a composiciones para su uso en el procedimiento de lisis.

15 El aislamiento de ácidos nucleicos intactos y puros que comprenden ADN de material biológico (p. ej., células) tiene importancia en diversos campos, p. ej., investigación y diagnóstico clínico. Por tanto, meramente a modo de ejemplo, las muestras clínicas que contienen células de un paciente pueden ser sometidas a un procedimiento (incluyendo la etapa de lisis celular) para aislar ácidos nucleicos que comprenden ADN, que luego se analizan mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Dicho análisis puede tener por objeto la identificación del ADN a partir de una bacteria particular (para determinar si el paciente ha sido infectado o no por esa bacteria) o dicho análisis puede tener por objeto si el ADN del paciente tiene o no una o más mutaciones puntuales responsables de una afección médica.

20 El documento US-A-8 598 338 desvela composiciones y un método para utilizar un soporte sólido con el fin de aislar ADN del material biológico (p. ej., células). El método incluye al menos las siguientes etapas:

25 (a) lisar el material biológico con una composición de lisis tamponada que contiene (i) una sal de litio, p. ej., cloruro de litio, en una concentración de al menos 1 M pero con preferencia por concentraciones mucho más altas (hasta 10 M), (ii) un agente activo de superficie que puede ser SDS a una concentración de 0,05 a 0,2 % pero que es preferentemente un agente activo de superficie no iónico presente en concentraciones mucho más altas (p. ej., al menos 5 %), y (iii) un agente quelante opcional;

30 (b) mezclar la composición de (a) con una "solución de adición de ADN" que puede ser o bien (i) un alcohol sin diluir (p. ej., metanol, etanol o lo más preferentemente iso-propanol), o bien (ii) una solución de una sal de litio a una concentración de 10-15 M;

35 (c) poner en contacto la mezcla resultante con un soporte sólido para inmovilizar el ADN del material lisado;

(d) lavar el soporte con un líquido de lavado que contiene un alcohol, y

40 (e) eluir el ADN.

Aunque no se excluye de la divulgación general del documento US-A-8 598 338, es muy preferible que el procedimiento del mismo se efectúe sin el uso de agentes caotrópicos (p. ej., sales de guanidinio). Los procedimientos descritos en los Ejemplos 4 y 5 siguen la enseñanza descrita anteriormente y usan la solución de lisis con LiCl 6 M y las "soluciones de adición de ADN" con LiCl 10 M.

50 El procedimiento del documento US-A-8 598 338 tiene la desventaja de que las altas concentraciones de sal de litio usadas en las composiciones de lisis y en las "soluciones de adición de ADN" corren el riesgo de contaminar el ADN aislado con sal de litio. En este sentido, se sabe que LiCl a 30 Mm inhibe la reacción de PCR, véase el artículo titulado "Inhibition of Polymerase Chain Reaction by Lithium Chloride", escrito por Ganaie *et al.*, (International Journal of Life Science & Pharma Research, Vol. 2/edición 4, octubre-diciembre de 2012, páginas L1 a L5). Por lo tanto, la contaminación por LiCl puede afectar a las aplicaciones corriente abajo.

55 Es por tanto un objetivo de la presente invención obviar o mitigar la desventaja mencionada anteriormente.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de aislamiento de ácidos nucleicos que comprenden ADN del material biológico, comprendiendo el método las etapas que consisten en:

60 (i) efectuar un lisado del material biológico con una solución acuosa que comprende un litio a una concentración de 0,05 a menos de 1 M, un agente quelante, y un tensioactivo para producir una composición acuosa lisada,

(ii) tratar la composición lisada con un soporte sólido en presencia de un agente caotrópico disuelto a una concentración de 0,05 a 2 M y de 25 % a 60 % en volumen en el líquido de un alcohol C₁₋₃ disuelto, siendo dicho soporte sólido capaz de inmovilizar el ADN,

65 (iii) separar el soporte sólido del líquido,

(iv) tratar el soporte sólido con una primera solución de lavado que contiene una sal de litio a una concentración de 0,05 a 1 M, conteniendo dicha primera solución de lavado de 20 % a 90 % en volumen de un alcohol C₁₋₃ disuelto,

(v) separar el soporte sólido del primer líquido de lavado,

(vi) tratar el soporte sólido con un segundo líquido de lavado que comprende al menos 80 % en volumen de un alcohol C₁₋₃, siendo el resto, si lo hubiera, agua,

(vii) separar el soporte sólido de la segunda solución de lavado, y

(viii) eluir los ácidos nucleicos que comprenden ADN del soporte sólido.

Las características preferidas de la presente divulgación, que pueden usarse en cualquier combinación, se desvelan en el Apéndice 1 de la presente memoria descriptiva.

El ácido nucleico que comprende ADN aislado por el método de la invención puede incorporar ARN y puede ser ácido nucleico total.

La invención proporciona excelentes resultados en el aislamiento de ácidos nucleicos que comprenden ADN. Contrariamente a las enseñanzas del documento US-A-8 598 338, los procedimientos de lisis usan concentraciones relativamente bajas de sal de litio y también emplean un agente caotrópico (preferentemente una sal de guanidinio). Los ácidos nucleicos aislados que comprenden ADN son de gran pureza, habiendo poco riesgo de contaminación por sales de litio en vista de las cantidades relativamente bajas de las mismas empleadas en el proceso de la invención. El método de la invención da como resultado el aislamiento de ácidos nucleicos sustancialmente puros y sustancialmente intactos que comprenden ADN.

El método del segundo aspecto de la invención puede usarse para aislar ácidos nucleicos que comprenden ADN (en particular ADN genómico) de un amplio intervalo de muestras de origen biológico que contienen ADN. La muestra de la que se va a aislar el ADN puede ser, o puede comprender, células, por ejemplo, células animales (incluyendo mamíferos), células vegetales, células bacterianas, o levadura u otras células fúngicas. Alternativamente, la muestra de la que se va a aislar el ADN puede ser, o puede comprender, uno o más virus.

Las células, virus u otra muestra que contiene ADN de la que se vayan a aislar los ácidos nucleicos que comprenden ADN puede proceder o haber estado presente en una muestra de tejido o en fluidos corporales tales como sangre, esputo, orina o LCR.

En ciertas realizaciones (p. ej., para la lisis de las bacterias gramnegativas), el método de la invención puede efectuarse sin tratamiento de las células sin una enzima de proteasa (p. ej., proteinasa K) y sin necesidad de una etapa de calentamiento. En otras realizaciones (p. ej., para el tratamiento de tejido (tal como sangre con el objeto de lisar células de sangre entera) y para la lisis de bacterias grampositivas), la muestra puede ser tratada adicionalmente con una proteasa (p. ej., proteinasa K). En las últimas realizaciones, el tratamiento con la enzima proteasa (proteinasa K) puede ser eficaz de manera simultánea con el tratamiento con la solución de lisis que comprende litio.

Los ácidos nucleicos que comprenden ADN obtenido por el método de la invención son suficientemente puros para ser usados con el objeto de un análisis posterior mediante técnicas bien conocidas en la técnica. El ADN puede ser usado, por ejemplo, con fines de investigación o para el diagnóstico de una afección médica, según sea necesario.

El método de la invención puede efectuarse convenientemente en un sedimento del material biológico (p. ej., células) a lisar. El sedimento puede producirse mediante centrifugación de una muestra líquida que contiene el material biológico, usando técnicas muy conocidas en la técnica.

En la etapa (i) del método de la invención para aislar ácidos nucleicos que comprenden ADN de la muestra de material biológico (p. ej., células), el material se lisa con una composición acuosa que comprende litio (proporcionado por una sal de litio) en una concentración de 0,05 a menos de 1,0 moles por litro, un agente quelante y un tensioactivo. La composición puede comprender los componentes expuestos, puede consistir esencialmente en los componentes expuestos, o consistir en estos componentes.

La sal de litio es preferentemente un haluro de litio, lo más preferentemente cloruro de litio y está preferentemente presente en la composición en una concentración de 0,05 a menos de 1 moles por litro, preferentemente 0,1 a 0,9 moles por litro, más preferentemente 0,6 a 0,9 moles por litro, incluso más preferentemente de 0,75 a 0,85 moles por litro, y lo más preferentemente aproximadamente 0,8 moles por litro.

El agente quelante, que es lo más preferentemente EDTA o una sal del mismo tal como una sal de metal alcalino (p. ej., sodio), está preferentemente presente en la composición en una concentración de 1 a 20 mM por litro, más

preferentemente de 8 a 15 milimoles por litro, más preferentemente de 9 a 11 milimoles por litro y lo más preferentemente aproximadamente 10 milimoles por litro.

5 El agente activo de superficie puede ser un tensioactivo no iónico pero es más preferentemente un tensioactivo aniónico, lo más preferentemente SDS.

La solución de lisis puede tener un pH de 7 a 8, pero no necesariamente se tampona a un pH en este intervalo. Por tanto, la solución de lisis puede ser una composición no tamponada.

10 En una primera realización que lleva a cabo el método de la invención, el material a lisar (p. ej., en forma de sedimento) puede tratarse con la solución de lisis que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en los componentes definidos en la etapa (i) del método de la invención. El material (p. ej., células) se mezcla a fondo con la composición (p. ej., mediante pipeteo) y la lisis se efectúa a temperatura ambiente durante un período de tiempo adecuado. Un período de tiempo de 15 a 25 minutos, p. ej., de aproximadamente 20 minutos es generalmente
15 adecuado.

De acuerdo con esta primera realización, el lisado puede entonces ser mezclado con una solución de un agente caotrópico, preferentemente proporcionado por una sal de guanidinio (p. ej., cloruro de guanidinio, también conocido como clorhidrato de guanidinio o clorhidrato de guanidina), teniendo la solución de la sal de guanidinio una
20 concentración en el intervalo de 0,05 a 1 M, preferentemente de 0,1 a 1 M, más preferentemente de 0,5 a 0,9 M, y lo más preferentemente de 0,6 a 0,7 M. Acto seguido, la composición resultante se mezcla de nuevo a fondo. El etanol (u otro alcohólico C₁₋₃, p. ej., iso-propanol) puede entonces añadirse con la mezcla y en una cantidad tal que la solución se vuelve clara. Generalmente, la cantidad de etanol (u otro alcohólico) será de 35 % a 45 % en volumen, lo más preferentemente de 35 % a 40 % en volumen. Una vez más se efectúa una mezcla a fondo. La mezcla resultante se
25 pone entonces en contacto con el soporte sólido, de acuerdo con los procedimientos descritos más detalladamente en la descripción posterior de la presente memoria descriptiva.

En una segunda realización alternativa del método de la invención, la solución acuosa de lisis puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en agua y los otros componentes definidos para las etapas (i) y (ii) del método.
30 En esta realización, la solución acuosa de lisis puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en agua, cloruro de litio a una concentración de 0,2 a 0,3 M, EDTA o una sal de sodio del mismo a una concentración de 1 a 5 mM, cloruro de guanidinio a una concentración de 0,6 a 0,7 M, SDS en una cantidad de 0,2 a 0,4 % en peso y 35-40 % en volumen de etanol o de otro alcohólico C₁₋₃ (p. ej., iso-propanol).

35 Para realizaciones adicionales del método del segundo aspecto de la invención, la etapa de lisis puede ser efectuada en presencia del soporte sólido. Por tanto, por ejemplo, cualquiera de las soluciones de lisis definidas anteriormente puede ponerse en contacto con el soporte sólido y el material biológico que se añade acto seguido.

El soporte sólido, como se usa para el método de la invención, puede ser un material de sílice o a base de sílice. El
40 material de sílice o a base de sílice puede ser un vidrio, preferentemente un vidrio de borosilicato. El soporte puede comprender un material fibroso, y preferentemente comprende fibras de un material de sílice o a base de sílice. El filtro comprende preferentemente fibras de vidrio de borosilicato. Por preferencia, el soporte tiene la forma de una lámina o membrana fibrosa en la que las fibras son de un vidrio de borosilicato. Los filtros del tipo disponible bajo la designación POREX F son adecuados para su uso en la invención. Convenientemente, el soporte sólido se
45 proporciona como un filtro (en forma de una lámina o membrana) en un tubo de centrifugación del tipo bien conocido en la técnica. Tal como se indica, el filtro en el tubo de centrifugación es preferentemente una lámina o membrana que contiene fibras de borosilicato. Preferentemente más de un filtro o lámina de este tipo se proporciona en el tubo de centrifugación. Lo más preferentemente, existen cuatro de estos filtros de membrana o lámina (en relación cara a cara) en el tubo de centrifugación. Se obtienen resultados particularmente buenos cuando los filtros de lámina o membrana
50 comprenden el material disponible como POREX F.

La composición que resulta de la etapa (ii) del método (que puede haberse efectuado simultáneamente con la etapa (i)) puede introducirse en el tubo de centrifugación que se centrifuga acto seguido. Durante la centrifugación, los ácidos nucleicos que comprenden ADN (que, en última instancia, debe ser aislado) se unen al soporte sólido y la mayoría de
55 las impurezas (proteínas, etc.) pasan a través del soporte sólido (filtro) y se recogen en el sobrenadante, que, después, puede descartarse.

En la siguiente etapa del método, el soporte sólido se lava para eliminar cualquier impureza restante y dejar los ácidos nucleicos sustancialmente puros que comprenden el ADN inmovilizado en el soporte. El lavado se efectúa en dos
60 fases. En la primera fase de lavado, el soporte sólido se trata con un primer líquido de lavado que contiene una sal de litio (preferentemente un haluro de litio, lo más preferentemente cloruro de litio) en una concentración de 0,05 a 1 M (preferentemente de 0,3 a 1 M, p. ej., de 0,3 a 0,6 M, o de 0,6 a 1 M) y etanol (u otro alcohólico C₁₋₃, p. ej., iso-propanol) en una cantidad de 45-55 % en volumen. El primer líquido de lavado puede, por ejemplo, prepararse disolviendo la cantidad apropiada de sal de litio, es decir, 50 % de etanol acuoso (u otro alcohólico C₁₋₃, p. ej., iso-propanol). El primer
65 líquido de lavado preferentemente consiste esencialmente en, y más preferentemente en sal de litio, etanol (u otro alcohólico C₁₋₃, p. ej., iso-propanol) y agua. Se descubrió la combinación de la sal de litio (preferentemente cloruro de

litio) y etanol (u otro alcohól C₁₋₃, p. ej., iso-propanol) para que sea particularmente eficaz como primer líquido de lavado. Resulta lo más preferente que el primer líquido de lavado contenga cloruro de litio en una concentración de aproximadamente 400 mM a 800 mM (p. ej., aproximadamente 400 mM o aproximadamente 800 mM) en un 50 % de etanol acuoso (u otro alcohól C₁₋₃), p. ej., iso-propanol).

Si el procedimiento de aislamiento se lleva a cabo en un tubo de centrifugación, entonces el primer líquido de lavado se añade al tubo de centrifugación que luego se centrifuga para hacer que el primer líquido de lavado pase a través del filtro y elimine al menos algunas de las impurezas restantes para su recogida en el sobrenadante, que, después, se descarta.

Una segunda etapa de lavado, y habitualmente definitiva se efectúa entonces con un segundo líquido de lavado que comprende al menos 80 % en volumen de etanol u otro alcohól C₁₋₃ (p. ej., iso-propanol), siendo el resto, si lo hubiera, agua. Este segundo líquido de lavado comprende preferentemente (o consiste esencialmente en o consiste) aproximadamente en 90 % en volumen de etanol u otro alcohól C₁₋₃ (p. ej., iso-propanol).

En el caso de que el método se efectúe usando un tubo de centrifugación, el segundo líquido de lavado se añade al tubo de centrifugación que luego se centrifuga para forzar al segundo líquido de lavado a que pase a través del filtro y elimine al menos las impurezas restantes para su recogida en el sobrenadante, que, después, se descarta.

En esta fase, los ácidos nucleicos aislados que componen el ADN están inmovilizados, en una forma sustancialmente pura, en el soporte sólido y pueden eluirse con una solución de elución. La solución de elución puede comprender (consiste esencialmente en o consiste en) una solución tamponada de EDTA o una sal del mismo. Una solución de elución particular adecuada comprende Tris-HCl en una concentración de aproximadamente 10 mM, y sal disódica de EDTA dihidratada a una concentración de aproximadamente 0,5 mM, teniendo la composición un pH de 9.

En el caso de que el método de la invención se ponga en práctica con una columna de centrifugación que contiene un filtro en el que se inmovilizan los ácidos nucleicos que comprenden ADN, la solución de elución puede ser añadida a la columna de centrifugación que luego se centrifuga para hacer que la solución de elución eluda los ácidos nucleicos que comprenden ADN del soporte sólido para su recogida.

Los ácidos nucleicos recogidos que comprenden ADN pueden entonces ser analizados más a fondo según sea necesario.

Como se ha indicado anteriormente, el método de la invención se efectúa preferentemente usando un tubo de centrifugación. A continuación se expone un protocolo típico para llevar a cabo el método de la invención:

Sedimentar células por centrifugación y descartar el sobrenadante
Añadir 300 µl de solución acuosa de lisis (excluyendo la sal de guanidinio y el etanol), preferentemente que comprende LiCl 800 mM, sal disódica de EDTA dihidratada 10 mM, 1 % de SDS) y mezclar bien por pipeteo
Incubar durante 20 min a TA
Añadir 350 µl de solución de sal de guanidinio (preferentemente una concentración madre de clorhidrato de guanidinio 2 M) y mezclar por inversión del tubo o pipeteo
Añadir 400 µl de EtOH y mezclar por inversión del tubo o pipeteo
Colocar 600 µl en una columna de centrifugación y centrifugar a 8000 rpm durante 1 min
Colocar el lisado restante en una columna de centrifugación y centrifugar a 8000 rpm durante 1 min
Lavar 1x a 8000 rpm durante 1 min con 500 µl del primer líquido de lavado (preferentemente LiCl 400 mM, 50 % de EtOH)
Lavar 1x a 14.000rpm durante 3 min con 500 µl del segundo líquido de lavado (preferentemente 90 % de EtOH)
Centrifugar 1x a 14.000 rpm durante 1 min
Añadir 200 µl de tampón de elución (preferentemente Tris-HCl 10 mM, sal disódica de EDTA dihidratada 0,5 mM, pH 9,0) y eluir a 8000 rpm durante 1 min.

La invención ha sido hasta ahora descrita particularmente con respecto al método de aislamiento de ácidos nucleicos que comprenden ADN y las composiciones de las soluciones según se usan en este método. La invención proporciona además kits que pueden ser usados para poner en práctica el método con el fin de obtener ácidos nucleicos que comprenden ADN.

De acuerdo con un (tercer) aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit para extraer ADN genómico de células, comprendiendo el kit en combinación:

- (i) una solución acuosa que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en agua, cloruro de litio a una concentración de 0,7 a 0,9 moles por litro, EDTA o una sal de sodio del mismo a una concentración de 5 a 15

mM, y de 0,9 a 1,1 % en peso de SDS,

(ii) una solución acuosa de una sal de guanidinio, (preferentemente aproximadamente 2 M de concentración madre, de la cual pueden usarse 350 µl en un volumen final de 1050 µl),

(iii) etanol,

5 (iv) un primer líquido de lavado que contiene cloruro de litio en una concentración de 0,3 a 0,6 M, conteniendo dicho primer líquido etanol en una cantidad de 45 % a 55 % en volumen,

(v) un segundo líquido de lavado que comprende al menos 80 % en peso de etanol, siendo el resto, si lo hubiera, agua,

(vi) un tampón de elución, y

10 (vii) una columna de centrifugación que tiene un filtro para inmovilizar el ADN.

Los reactivos y componentes del kit pueden ser como se ha descrito con más detalle anteriormente.

15 En una modificación del kit del tercer aspecto de la invención, el kit modificado puede incluir una solución acuosa etanólica (u otra alcanólica C₁₋₃) de la sal de guanidinio (es decir, la combinación de (ii) y (iii) anteriores).

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para extraer de las células ácidos nucleicos genómicos que comprenden ADN, comprendiendo el kit en combinación:

20 (i) una solución acuosa que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en cloruro de litio en una concentración de 0,2 a 0,3 moles por litro, EDTA o una sal de sodio del mismo en una concentración de 1 a 5 milimoles por litro, SDS en una cantidad de 0,2-0,4 % en peso, una sal de guanidinio que tiene una concentración de 0,6 a 0,7 M y etanol en una cantidad de 35-45 % en volumen,

25 (ii) un primer líquido de lavado que contiene cloruro de litio en una concentración de 0,3 a 0,6 M, conteniendo dicho primer líquido etanol en una cantidad de 45 % a 55 % en volumen,

(iii) un segundo líquido de lavado que comprende al menos 80 % en peso de etanol, siendo el resto, si lo hubiera, agua,

(iv) un tampón de elución, y

30 (v) una columna de centrifugación que tiene un filtro para inmovilizar los ácidos nucleicos que comprenden ADN.

Los reactivos y componentes del kit pueden ser como se ha descrito con más detalle anteriormente.

35 También se desvela una composición acuosa de lisis, que comprende, que consiste en, o que consiste esencialmente en una solución acuosa que contiene una sal de litio a una concentración de 0,5 a 1,0 M, un agente quelante, y un tensioactivo.

La invención se ilustrará ahora con referencia a los siguientes Ejemplos 1-5 no limitantes y las Figs. 1-5 de los dibujos anexos.

40 En los Ejemplos 1-4, se hace referencia al "Método_A". Se trata de un procedimiento de acuerdo con la invención y se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo.

(a) Sedimentar células por centrifugación y descartar el sobrenadante

45 (b) Añadir 300 µl de solución de lisis (LiCl 800 mM, sal disódica de EDTA dihidratada 10 mM, 1 % de SDS) y mezclar bien por pipeteo

(c) Incubar durante 20 min a temperatura ambiente

(d) Añadir 350 µl de clorhidrato de guanidina 2 M y mezclar por inversión del tubo o pipeteo

(e) Añadir 400 µl de EtOH y mezclar por inversión del tubo o pipeteo

50 (f) Colocar 600 µl en una columna de centrifugación (con 4 filtros de POREX F) y centrifugar a 8000 rpm durante 1 min

(g) Colocar el lisado restante en una columna de centrifugación y centrifugar a 8000 rpm durante 1 min

(h) Añadir 500 µl del primer líquido de lavado (LiCl 400 mM, 50 % de EtOH) y centrifugar a 8000 rpm durante 1min

55 (i) Añadir 500 µl del segundo líquido de lavado (LiCl 400 mM, 90 % de EtOH) y centrifugar a 14.000 rpm durante 3 min

(j) Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 min

(k) Añadir 200 µl de tampón de elución (Tris-HCl 10 mM, sal disódica de EDTA dihidratada 0,5 mM, pH 9,0) y eluir a 8000 rpm durante 1 min.

60 **Ejemplo 1**

Uso de DIV

65 El Método_A fue desarrollado para su uso en el diagnóstico *in vitro* (DIV), que se dirige principalmente a las ITS como la *Neisseria gonorrhoea* (NG) o la *Chlamydia trachomatis* (CT), pero no se limita a las ITS o solo a la NG y a la CT.

Las muestras clínicas usadas para verificar el potencial de DIV del Método_A ya habían sido diagnosticadas como

positivas para NG, positivas para CT o negativas (NEG) tanto para NG como CT por el uso del sistema BD Viper que prueba la presencia de tanto NG como CT (los números representan la identificación del paciente). Se centrifugaron aproximadamente 10 ml de muestras clínicas de orina en cubetas de centrifugación selladas a 5000 x g durante 30 min y los sedimentos se procesaron usando el Método_A. Los extractos de ADN se usaron como plantillas en experimentos de PCR cuantitativa (q) y digital en gota (dd). En ambos experimentos el diagnóstico derivado del uso del Método_A coincidió con el del sistema BD Viper (Tabla 1).

Tabla 1. Los extractos de ADN del Método_A derivados de muestras clínicas de orina confirmaron el diagnóstico inicial mediante el uso de qPCR y ddPCR. El valor Ct representa el valor de qPCR del umbral de ciclo.

Muestras positivas para NG				
ID de la muestra	Resultado de CT		Resultado de NG	
	qPCR (valor CT)	ddPCR (copias/μl)	qPCR (valor CT)	ddPCR (copias/μl)
NG_1	-	0	26,2	815
NG_2	-	0,18	25,63	1192
NG_3	-	0	33,87	5,75
NG_4	-	0	32,55	20,1
NG_5	-	0	25,48	2460
Muestra positiva para CT				
CT_01	31,02	12,39	-	0
Muestra negativa para NG y CT				
NEG_1	-	0	-	0,28

Ejemplo 2

Porcentaje de recuperación del ADN extraído

Aproximadamente 10^8 células de cultivo de laboratorio de *Neisseria gonorrhoea* (NG) fueron tratadas de acuerdo con el Método_A para extraer ácidos nucleicos que comprenden ADN por triplicado en dos experimentos independientes. La concentración y la pureza de cada uno de los replicados se evaluaron mediante la cuantificación de Nanodrop. A continuación, se usaron los valores de concentración promedio y de la relación A260/A280 de cada experimento para calcular el promedio y la desviación típica de ambos experimentos. Se determinó que la pureza del ADN que se usaría como entrada para evaluar el potencial de recuperación del ADN del Método_A se encontraba dentro de los límites de las normas aceptadas (Tabla 2).

Tabla 2. Rendimiento y pureza de la concentración de las muestras usadas para la evaluación del porcentaje de recuperación del ADN.

Método_A Rendimiento y pureza de concentración			
Concentración (ng/μl)		A260/A280	
Promedio	Desviación típica	Promedio	Desviación típica
77,73333333	0,23570226	2,096666667	0,00942809

Los triplicados se agruparon para cada uno de los dos experimentos. Cada agrupación se usó para alicuotar 2, 4 y 6 μg de ADN para el porcentaje de los experimentos de recuperación de ADN. Con más detalle, Cada agrupación se usó para producir dos conjuntos de triplicados que se usarán posteriormente en dos experimentos por agrupación. En resumen, las muestras de ADN purificadas se pasaron por el protocolo de extracción del Método_A y se usaron los valores previos y posteriores a la extracción de Nanodrop para calcular el porcentaje de recuperación de ADN del sistema del Método_A. El porcentaje de valores promedio de recuperación de cada uno de los cuatro experimentos individuales se usó para calcular el promedio y la desviación típica de todos los experimentos. En conclusión, la recuperación del ADN del Método_A es alta (80 a 90 %) dependiendo de la concentración total del ADN de entrada. Aunque el porcentaje de recuperación del ADN se reduce a medida que aumenta la cantidad de ADN, el intervalo de concentración usado en estos experimentos (2 a 6 μg) está muy por encima de las concentraciones de ADN previstas que se derivan de las muestras clínicas (cientos de nanogramos; datos no mostrados) (Tabla 3 y Figura 1).

Tabla 3. Porcentaje de recuperación del ADN del Método_A.

Entrada de ADN	Porcentaje de recuperación	
	Promedio	Desviación típica
2 μg	90,59022	7,4396196
4 μg	84,20733	4,5165637
6 μg	80,84856	4,5078996

Ejemplo 3**Fenotipo de ADN extraído, comparación de rendimiento y pureza con DNeasy**

- 5 Aproximadamente $0,5 \times 10^8$ células de cultivo de laboratorio de NG fueron tratadas de acuerdo con el Método_A para extraer ácidos nucleicos que comprenden ADN por cuadruplicado, comparando el Método_A (20 min de lisis) con DNeasy (1 h de lisis) usando la parte de extracción de gram negativa del protocolo. DNeasy fue elegido como patrón de comparación puesto que es considerado como uno de los kits de extracción de ADN de mejor rendimiento en el mercado. El ADN extraído usando ambos métodos produjo un fenotipo muy similar, juzgado por electroforesis en gel de agarosa (Figura 2). Además, el Método_A produjo especies de ADN con menor peso molecular de mayor rendimiento que DNeasy. La pureza (A260/A280) y el rendimiento se evaluaron mediante la cuantificación de Nanodrop (Tabla 4). Las mayores lecturas del Método_A podrían explicarse principalmente por la diferencia de cantidad para las bandas de menor peso molecular. Las dos bandas inferiores del gel son, de acuerdo con el proveedor de la cepa: NCTC (Public Health England), el plásmido críptico de NG y su derivado superenrollado. Por lo tanto, el sistema del Método_A es particularmente eficiente en el aislamiento de plásmidos bacterianos. Los plásmidos bacterianos son dianas de diagnóstico muy importantes, es decir, la resistencia a los antibióticos por parte de NG, y el plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* (CT) conservado entre los serovares. Asimismo, la resistencia a los antimicrobianos codificados en plásmidos es un fenómeno muy extendido en muchas especies de bacterias; véase, por ejemplo, el artículo escrito de P.M. Bennett titulado "Plasmid Encoding Antibiotic Resistance: and Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Bacteria (British Journal of Pharmacology (2008) 153, S347-S357).

Tabla 4. Comparación del rendimiento y la pureza del ADN entre el Método_A y DNeasy comercial.

Comparación del rendimiento y pureza del Método_A vs DNeasy				
	Concentración (ng/μl)		A260/A280	
	Promedio	Desviación típica	Promedio	Desviación típica
Método_A	32,4	0,25819889	2,095	0,031091264
DNeasy	17,7	0,244948974	2,2575	0,073654599

Ejemplo 4**Sensibilidad**

- Para analizar la sensibilidad de NG del Método_A, se tituló un cultivo de células de laboratorio en un antecedente de 300.000 células epiteliales HeLa, que es un número muy grande de células nucleadas para muestras de orina reales (se esperan ~7000 células nucleadas humanas por ml de orina). Las titulaciones se realizaron desechando las células de NG de una placa de agar chocolate (cultivo de NG O/N) y luego suspendiendo las bacterias en 1x PBS. 1/100, 1/1000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000 de titulaciones de la solución madre bacteriana se prepararon por cuadruplicado y se centrifugaron junto con las células HeLa, por lo tanto, se adicionan 300.000 células HeLa con diferentes números de células de NG. Se usaron dos replicados para extraer ADN y otros dos cultivados O/N en placas de agar chocolate para el recuento viable total (RVT). 5 μl de cada extracto (extracto total de 200 μl de eluato) se usó como plantilla en una reacción por PCR (cebadores específicos de NG). 3 μl de amplicones se analizaron en un gel de agarosa al 2 % (Figura 3). La electroforesis en gel de agarosa no puede usarse para la cuantificación fiable del resultado de la amplificación de la PCR, por lo tanto, se usó una combinación de valores de RVT y un ensayo de λ-exonucleasa (como se desvela en la solicitud de patente PCT n.º PCT/GB2015/052561) para calcular el número de células de NG viables que se lisaron para cada dilución y asociarlo a un resultado cuantificable del ensayo. Dado que las placas de agar chocolate estaban cubiertas con una capa de células de NG para la mayoría de las diluciones, solo se contaron las placas de 1/1.000.000 y 1/100.000 de dilución y el número de células para el resto de las diluciones se extrapolaron en función de estos recuentos. La dilución 1/1.000.000 y 1/100.000 dio un promedio de ~30 y 300 células de NG respectivamente, por lo tanto, estos valores se usaron para extrapolar el número de células para el resto de las diluciones.

- Asimismo, el ensayo de λ-exonucleasa es un ensayo enzimático de amplificación isotérmica altamente específico que puede aceptar amplicones de PCR como analitos. El resultado de este ensayo es directamente proporcional a la cantidad inicial de analito según se controla mediante lecturas en tiempo real en un lector de placas de fluorescencia. Debido a su alta especificidad, la cuantificación solo es relevante para la secuencia diana y no para las secuencias amplificadas no específicas, cebadores-dímeros etc. En este ensayo en particular se interrogó a una región conservada por NG que estaría presente en el amplicón (Figura 4). Después de 30 minutos de incubación a 37 °C, se leyeron los valores de UFR en un antecedente de placa lectora y se restó la fluorescencia (muestra de PCR en blanco) de todas las muestras. En conclusión, el sistema del Método_A puede usarse para extraer ADN PCRable de unas pocas decenas a cientos (menor sensibilidad a aproximadamente ~30 a 300) de células bacterianas contra un alto antecedente de células nucleadas humanas.

Ejemplo 5

Este ejemplo usa el siguiente procedimiento ("Método_B") para extraer ácido nucleico que comprende ADN de las células sedimentadas.

1. Añadir 300 µl de solución de lisis (LiCl 0,8 M, EDTA 10 mM, 1 % de SDS) al sedimento y pipetear a fondo.
2. Añadir 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml de solución madre) y agitar con formación de vórtice durante 5 s.
3. Incubar a 56 °C durante 20 minutos.
4. Añadir 350 µl de (clorhidrato de guanidina 2 M) y agitar con formación de vórtice durante 5 s.
5. Añadir 400 µl de etanol y agitar con formación de vórtice durante 5 s.
6. Añadir 600 µl de la solución resultante a la columna de centrifugación.
7. Centrifugar de 8000 a 11.000 rpm durante 1 minuto.
8. Descartar el flujo.
9. Añadir el resto de la muestra a la columna de centrifugación.
10. Centrifugar de 8000 a 11.000 rpm durante 1 minuto.
11. Descartar el flujo.
12. Añadir 500 µl del primer líquido de lavado (LiCl 0,8 M en 50 % de etanol) a la columna de centrifugación.
13. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.
14. Descartar el flujo.
15. Añadir 500 µl del segundo líquido de lavado (90 % de etanol) a la columna de centrifugación.
16. Centrifugar a 14.000 rpm durante 3 minutos.
17. Descartar el flujo.
18. Centrifugar la columna de centrifugación a 14.000 rpm durante 1 minuto.
19. Descartar el flujo.
20. Añadir de 100 a 200 µl de tampón de elución (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,5 mM, pH 9,0) a la columna de centrifugación.
21. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
22. Eluir a 8000 rpm durante 1 minuto en tubos Eppendorf de 1,5 ml.

Las velocidades de carga pueden variar (de 8000 a 11.000 rpm) dependiendo de la densidad de la muestra.

Los volúmenes de elución de TE pueden variar (de 100 a 200 µl) dependiendo de la concentración del extracto que se necesite.

El Método_B se usó para extraer ácido nucleico que comprende ADN de 10^9 células de Escherichia coli y se cargaron 5 µl de extractos en un gel de agarosa con bromuro de etidio al 1 % junto con una escalera de Hind III. Los resultados se muestran en la Fig. 5. Todos los replicados exhibieron una banda de ADN genómico de alto peso molecular junto con el fenotipo típico de ARN.

También se cuantificaron 2 ml de extractos mediante espectrofotometría de nanodrop y los resultados se muestran a continuación en la Tabla 5.

Número de replicado	Concentración de ácido nucleico (ng/µl)	A260/A280	A260/A230
1	179,5	2,06	2,28
2	95,5	2,12	2,71
3	107,7	2,04	2,23

Tabla 5

REIVINDICACIONES

1. Un método de aislamiento de ácidos nucleicos que comprenden ADN de material biológico, comprendiendo el método las etapas que consisten en:

- (i) efectuar un lisado del material biológico con una solución acuosa que comprende litio a una concentración de 0,05 a menos de 1 M, un agente quelante, y un tensioactivo para producir una composición acuosa lisada,
- (ii) tratar la composición lisada con un soporte sólido en presencia de un agente caotrópico disuelto a una concentración de 0,05 a 2 M y del 25 % al 60 % en volumen en el líquido de un alcohol C₁₋₃ disuelto, siendo dicho soporte sólido capaz de inmovilizar ADN,
- (iii) separar el soporte sólido del líquido,
- (iv) tratar el soporte sólido con una primera solución de lavado que contiene litio a una concentración de 0,05 a 1 M, conteniendo dicha primera solución de lavado del 20 % al 90 % en volumen de un alcohol C₁₋₃ disuelto,
- (v) separar el soporte sólido del primer líquido de lavado,
- (vi) tratar el soporte sólido con un segundo líquido de lavado que comprende al menos el 80 % en volumen de un alcohol C₁₋₃, siendo el resto, si lo hubiera, agua,
- (vii) separar el soporte sólido de la segunda solución de lavado, y
- (viii) eluir el ADN del soporte sólido.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la solución acuosa descrita en la etapa (i) comprende el litio a una concentración de 0,05 a 0,9 M.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la solución de lisis consiste esencialmente en agua, cloruro de litio a una concentración de 0,7 a 0,9 M, EDTA o una sal de sodio del mismo a una concentración de 5 a 15 mM, y del 0,9 al 1,1 % en peso de SDS, opcionalmente en donde en la etapa (ii) el agente caotrópico es cloruro de guanidinio a una concentración de 0,6 a 0,7 M y el alcohol es el etanol presente en una cantidad del 35-40 % en volumen del líquido.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la solución de lisis consiste esencialmente en agua, cloruro de litio a una concentración de 0,2 a 0,3 M, EDTA o una sal de sodio del mismo a una concentración de 1 a 5 mM, cloruro de guanidinio a una concentración de 0,6 a 0,7 M, SDS en una cantidad del 0,2 al 0,4 % en peso y del 35-40 % en volumen de etanol.

5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el primer líquido de lavado consiste esencialmente en a) agua, cloruro de litio a una concentración de 0,3 a 0,6 M, y del 45 % al 55 % en volumen de etanol; o b) agua, cloruro de litio a una concentración de 0,6 a 1 M, y del 45 % al 55 % en volumen de etanol.

6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde a) el segundo líquido de lavado consiste esencialmente en del 80 % al 95 % en volumen de etanol y agua y/o b) el soporte sólido comprende sílice; y/o c) la etapa (iii) se efectúa en un tubo de centrifugación en el que dicho soporte sólido es un filtro y las etapas (iii), (v), (vii) y (viii) se efectúan con centrifugación.

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 (c), en donde el filtro comprende fibras de vidrio de borosilicato, opcionalmente en donde una pluralidad de dichos filtros se proporcionan en el tubo de centrifugación, opcionalmente en donde además se proporcionan cuatro filtros.

8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 a), que se efectúa completamente a temperatura ambiente; y/o b) que se efectúa sin agitación con formación de vórtice; y/o c) en donde el material biológico del que se van a aislar los ácidos nucleicos que comprenden ADN comprende células aisladas, opcionalmente en donde las células están en forma de un sedimento.

9. Un kit para extraer ácidos nucleicos que comprenden ADN de las células, comprendiendo el kit en combinación:

(A)

- (i) una solución acuosa que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en agua, cloruro de litio a una concentración de 0,7 a 0,9 moles por litro, EDTA o una sal de sodio del mismo a una concentración de 5 a 15 mM, y del 0,9 al 1,1 % en peso de SDS,
- (ii) una solución acuosa de una sal de guanidinio, (preferentemente de aproximadamente 2 M),
- (iii) etanol,
- (iv) un primer líquido de lavado que contiene cloruro de litio en una concentración de 0,3 a 0,6 M, conteniendo dicho primer líquido etanol en una cantidad del 45 % al 55 % en volumen,
- (v) un segundo líquido de lavado que comprende al menos el 80 % en volumen de etanol, siendo el resto, si lo hubiera, agua,
- (vi) un tampón de elución, y
- (vii) una columna de centrifugación que tiene un filtro para inmovilizar ADN;

O
(B)

- 5 (i) una solución acuosa que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en cloruro de litio en una concentración de 0,2 a 0,3 moles por litro, EDTA o una sal de sodio del mismo en una concentración de 1 a 5 milimoles por litro, SDS en una cantidad del 0,2-0,4 % en peso, una sal de guanidinio que tiene una concentración de 0,6 a 0,7 M y etanol en una cantidad del 35-45 % en volumen,
- 10 (ii) un primer líquido de lavado que contiene cloruro de litio en una concentración de 0,3 a 0,6 M, conteniendo dicho primer líquido etanol en una cantidad del 45 % al 55 % en volumen,
- (iii) un segundo líquido de lavado que comprende al menos el 80 % en volumen de etanol, siendo el resto, si lo hubiera, agua,
- (iv) un tampón de elución, y
- 15 (v) una columna de centrifugación que tiene un filtro para inmovilizar ADN.
10. Un kit de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el filtro comprende al menos una lámina de fibras de borosilicato.
11. Un kit de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el filtro comprende cuatro láminas de fibras de borosilicato.

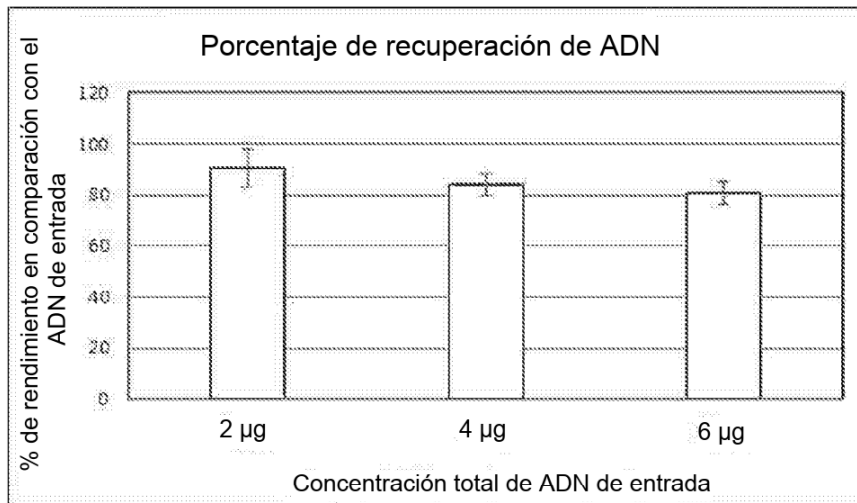


Figura 1. Porcentaje de recuperación de ADN del Método_A con barras de error

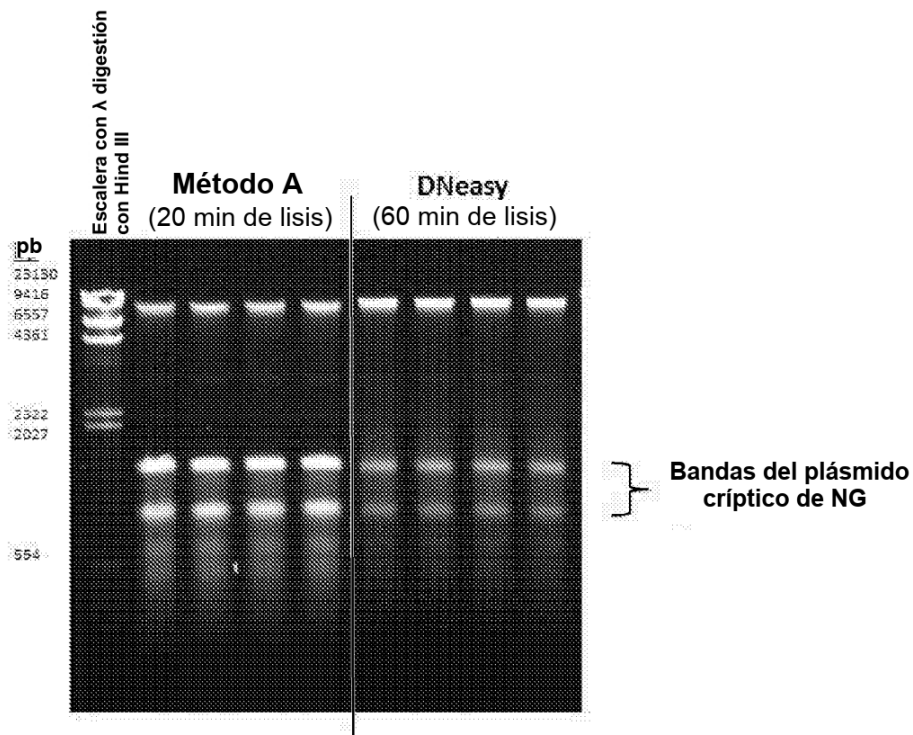


Figura 2. Gel de agarosa al 0,8 % de los extractos de ADN cuadruplicados del Método_A y de DNeasy. El uso del Método_A dio como resultado un mayor rendimiento del ADN plasmídico.

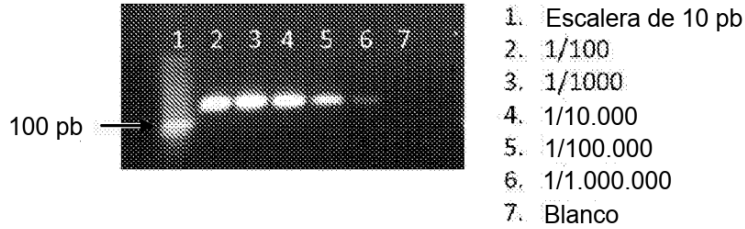


Figura 3. Gel de agarosa al 2 % de un experimento de titulación de NG representativo en un antecedente de 300.000 células HeLa. Los extractos de ADN del Método_A son amplificables a una dilución de 1/1.000.000 (~ 30 células producen una banda débil).

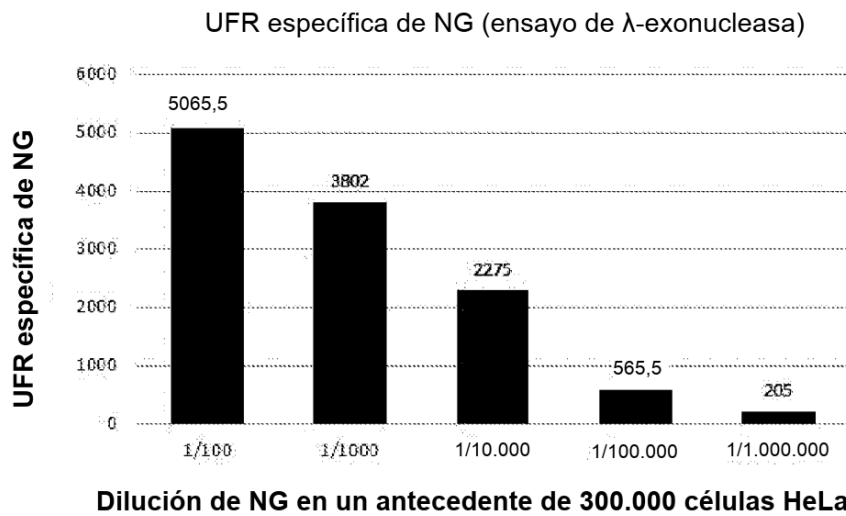


Figura 4. Los amplicones de PCR se usaron como analitos en el ensayo de λ -exonucleasa. La señal específica de NG se produce a lo largo de la curva de titulación a una dilución de 1/1.000.000 (~ 30 células).

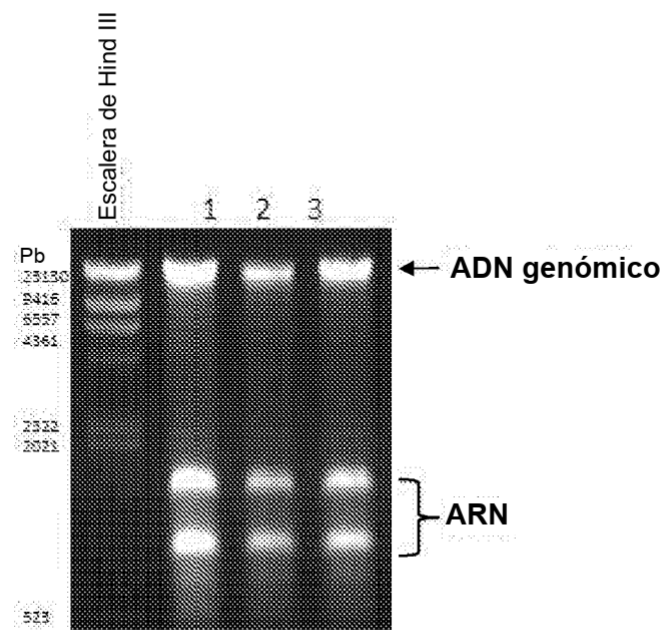


Figura 5.