

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 182 667**

21 Número de solicitud: 200002971

51 Int. Cl.7: **C12Q 1/68**

G01N 33/50

B01D 15/00

B01D 39/06

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **01.12.2000**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2003**

Fecha de la concesión: **05.05.2004**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.06.2004**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.06.2004

73 Titular/es: **Universidade Da Coruña
Oficina Transferencia Resultados Investigación
(OTRI) Esc. Caminos-Campus Elviña
15071 A Coruña, ES**

72 Inventor/es: **Pásaro Méndez, Eduardo José;
Méndez Felpeto, Josefina;
Beyer, Katrin y
Lao Villadóniga, José Ignacio**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Método universal de extracción de ADN de alta calidad.**

57 Resumen:

Método universal de extracción de ADN de alta calidad. El aislamiento y purificación de ADN es el paso inicial para la mayoría de los protocolos empleados en biología molecular por lo que resulta esencial disponer de métodos sencillos y rápidos para su realización. La presente metodología permite la purificación rápida y económica de ADN genómico a partir de células procariotas (bacterias) y eucariotas (humanos, animales: a partir de muestras de sangre, plasma, saliva, semen, líquido amniótico, vellosidades coriales, células en cultivo, y de plantas: a partir de tallos, hojas, flores, frutos y raíces frescas), así como a partir de preparados como harinas o congelados. También permite purificar ADN extraído de geles de agarosa.

ES 2 182 667 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Método universal de extracción de ADN de alta calidad.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un único método de extracción universal de ADN, a partir de cualquier tipo de muestra biológica.

Antecedentes de la invención

Los kits de extracción de ADN genómico de alta calidad, para amplificación por PCR, más utilizados y de mayor calidad entre los existentes en el mercado (WizardTM Plus^{Promega Corporation}, Dneasy Tissue System^{Qiagen}, GFX Genomic Blood DNA Purification Kit^{Amersham-Pharmacia}, Agarose Gel DNA Extraction Kit^{Bulk}) sólo son utilizables para extraer ADN a partir de una fuente determinada (animal o vegetal; sangre, tejidos, agarosa). El que se presenta puede utilizarse para extraer ADN genómico bicatenario a partir de cualquiera de estas fuentes indistintamente. Los kits mencionados y el resto de los existentes en el mercado exceden en tiempo de realización al presente ya que todos necesitan de tiempos de centrifugación de 1 a 2 minutos (el presente 30 segundos en cada paso), lisis inicial y centrifugado para obtener pellets celulares con posterior lisis y lavados (el presente sólo una lisis inicial), tiempos de incubación de 3-5 minutos (el presente 1 minuto de incubación en buffer de lisis), incubaciones posteriores con tampones de neutralización (pasos eliminados en el presente kit).

La presente innovación resuelve un problema técnico importante, dado que según el tipo de muestra biológica de la que se quiere extraer ADN, es precisa una metodología diferente.

Este método es el más rápido de los existentes en la actualidad y el más universal (aplicable a humanos, animales y plantas sin cambios en su procedimiento). No requiere de reactivos ni de equipamiento especial por lo que resulta aplicable en cualquier laboratorio bajo cualquier condición. A pesar de que la metodología aquí presentada puede comercializarse como kit industrial, la sencillez en la elaboración, tanto de sus componentes como de los tampones necesarios para aislar el ADN, hace posible que sea manufacturado totalmente por el manipulador sin repercutir en la rapidez ni en la complejidad del proceso total. La presente metodología puede ser empleada por cualquier individuo, independientemente de sus conocimientos y experiencia, lo que la hace apta incluso para personal no cualificado.

En su proceder se elimina la necesidad de desproteínizar (tratamiento con proteinasa K) o cualquier otra incubación. Esta diferencia respecto a los métodos existentes le confieren rapidez en su realización convirtiéndolo en el método de extracción idóneo a la hora de obtener ADN para análisis por PCR a partir de material tanto fresco como congelado. En el caso de que la fuente de obtención de ADN sea material congelado el rendimiento en la cantidad y la calidad del ADN obtenido no se ve afectada con la antigüedad de dicho material, algo que si afecta el rendimiento al aplicar los otros métodos existentes.

El ADN obtenido es estable a 4°C por lo menos durante 1 año y congelado (-20°C) por más

de 3 años.

De lo mencionado se deduce que la metodología que se presenta tiene por objeto resolver el problema técnico consistente en disponer de un procedimiento de calidad (obtención de ADN de doble cadena íntegro y limpio) de una forma sencilla (sólo consta de 3 pasos básicos: lisis, lavado, precipitación), económica y rápida (duración de cada paso de 0,5 a 1 minuto), pilares esenciales a considerar de acuerdo al ritmo alcanzado en la actualidad en los procedimientos que utilizan técnicas de Biología Molecular.

Descripción de la invención

La presente invención tiene como objeto la purificación rápida y económica de ADN genómico de humanos, animales (a partir de muestras de sangre, plasma, saliva, semen, líquido amniótico, vellosidades coriales, células en cultivo), plantas (a partir de tallos, hojas, flores, frutos y raíces frescas y a partir de preparados como harinas o congelados) y a partir de fragmentos bicatenarios obtenidos de geles de agarosa.

El método consiste en los siguientes pasos: lisis de la muestra durante cinco minutos, aplicación de la muestra en una columna y fijación del ADN en la matriz sólida de la columna mediante centrifugación, tres lavados mediante centrifugación de 30 segundos y elución del ADN total de la muestra también mediante centrifugación en un volumen suficiente para realizar entre 10 y 50 determinaciones diferentes en dependencia del volumen necesario para cada análisis. Se obtienen 160 µl de ADN genómico en solución acuosa de en tan sólo 15 minutos. Es el método más rápido de los existentes en la actualidad y el más universal (aplicable a humanos, animales y plantas sin cambios en su procedimiento). No requiere de reactivos ni de equipamiento especial por lo que resulta aplicable en cualquier laboratorio bajo cualquier condición. En su proceder se elimina la necesidad de desproteínizar (tratamiento con proteinasa K) o cualquier otra incubación. Esta diferencia respecto a los métodos existentes le confieren rapidez en su realización convirtiéndolo en el método de extracción idóneo a la hora de obtener ADN para análisis por PCR a partir de material tanto fresco como congelado. En el caso de que la fuente de obtención de ADN sea material congelado el rendimiento en la cantidad y la calidad del ADN obtenido no se ve afectada con la antigüedad de dicho material algo que si afecta el rendimiento al aplicar los otros métodos existentes.

El ADN obtenido es estable a 4°C por lo menos durante 1 año y congelado (-20°C) por más de 3 años.

El método es aplicable en el sector del diagnóstico genético tanto a nivel prenatal (a partir de líquido amniótico, vellosidades coriales o sangre fetal obtenida por cordocentesis) como a nivel postnatal.

La facilidad con que se obtiene ADN a partir de material fresco, congelado o procesado procedente de plantas y animales lo convierten en un método idóneo a la hora de obtener material genético para análisis de transgénicos y denominaciones de origen. Aplicación que resultará de utilidad a la industria de alimentos a la hora de analizar sus productos para cumplir con la nor-

mativa europea de etiquetado de productos manipulados genéticamente.

También es aplicable a la hora de obtener material genético con calidad y cantidad suficiente para *análisis por PCR con fines de investigación básica* y en *medicina forense* durante investigaciones de criminalística.

Descripción de la Figura

Para completar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, se acompaña a la presente memoria descriptiva, como parte integral de la misma, una figura en la que, con carácter ilustrativo y no limitativo, se representa una muestra de ADN genómico extraído a partir de muestras de 200 μ l de sangre venosa total en EDTA que se había conservado durante 1 año a -20°C.

Modos de realización de la invención

Ejemplo 1

(A partir de sangre venosa total)

Tomamos 200 μ l de sangre total a partir de una muestra contenida en tubos con EDTA (aunque no es desdeñable la contenida en tubos con heparina de litio) y la trasvasamos a un microtubo de 1.5 ml. Añadimos 300 μ l del tampón de lisis 1 y seguidamente 200 μ l del tampón de lisis 2. Agitamos manualmente y la dejamos reposar el tiempo que nos lleve colocar la columna filtrante (microtubo de 1.5 ml decapitado al que le hacemos un agujero de 0.5 mm de diámetro en su vértice donde colocamos un embudo confeccionado con 1/4 de filtro de microfibras de vidrio Whatman GF-C) dentro del tubo colector (microtubo de 2 ml) en una centrífuga de mesa.

Añadimos la sangre en solución de lisis a la columna filtrante y centrifugamos al máximo de revoluciones (preferiblemente por encima de 10000 rpm) durante 30 segundos. Desechamos el filtrado y volvemos a colocar la columna filtrante y la colector según lo descrito pasando a añadir 200 μ l del tampón de lavado. Centrifugamos 30 segundos y añadimos 200 μ l más del tampón de lavado volviendo a centrifugar otros 30 segundos. Desechamos el microtubo colector con su contenido y lo sustituimos por otro igual pero limpio. Mantenemos el microtubo con filtro al que colocaremos dentro de este nuevo microtubo colector en la centrífuga. Añadimos 200 μ l del tampón de lavado y centrifugamos otros 30 segundos al máximo de revoluciones. Añadimos 20 μ l de agua bidestilada desionizada estéril (agua para PCR) y centrifugamos otros 30 segundos. Retiramos el microtubo inferior manteniendo el superior (filtrante) al que colocaremos en otro microtubo de 1.5 ml estéril en el rotor de la centrífuga. Añadimos 60 μ l de agua desionizada estéril (agua para PCR) y centrifugamos al máximo de revoluciones posible durante 30 segundos. Repetimos este último paso una vez más. Al final, dese-chamos el microtubo con filtro y conservamos el microtubo inferior en el que tendremos ADN genómico en solución acuosa listo para emplear en cualquier reacción de amplificación por PCR.

Podemos realizar la comprobación de la presencia de ADN en nuestra solución tomando 6 μ l de dicha solución previamente mezclada con 4 μ l de tampón de carga al que aplicamos en un gel de

agarosa al 1 % y lo corremos en una electroforesis a 150 voltios.

Visualizaremos nuestro ADN genómico como una banda única y limpia de más de 1500 pares de base al poner el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en un transiluminador UV.

Ejemplo 2

(A partir de vellosidades coriónicas)

Auxiliándonos de una punta de micropipeta estéril tomamos varias muestras sólidas del material colectado y lo trasvasamos a un microtubo de 1.5 ml.

Añadimos 300 μ l del tampón de lisis 1 agitando vigorosamente (sin emplear vórtex mecánico) y seguidamente agregamos 200 μ l del tampón de lisis 2. Agitamos manualmente con vigor y lo dejamos reposar el tiempo que nos lleve colocar la columna filtrante (microtubo de 1.5 ml decapitado al que le hacemos un agujero de 0.5 mm de diámetro en su vértice donde colocamos un embudo confeccionado con 1/4 de filtro de microfibras de vidrio Whatman GF-C) dentro del tubo colector (microtubo de 1.5 ml) en una centrífuga de mesa.

Añadimos la mezcla a la columna filtrante y centrifugamos al máximo de revoluciones (preferiblemente por encima de 10000 rpm) durante 30 segundos. Desechamos el filtrado y volvemos a colocar la columna filtrante y la colector según lo descrito pasando a añadir 200 μ l del tampón de lavado. Centrifugamos 30 segundos y añadimos 200 μ l más del tampón de lavado volviendo a centrifugar otros 30 segundos. Desechamos el microtubo colector con su contenido y lo sustituimos por otro igual pero limpio. Mantenemos el microtubo con filtro al que colocaremos dentro de este nuevo microtubo colector en la centrífuga. Añadimos 200 μ l del tampón de lavado y centrifugamos otros 30 segundos al máximo de revoluciones. Añadimos 20 μ l de agua bidestilada desionizada estéril (agua para PCR) y centrifugamos otros 30 segundos. Retiramos el microtubo inferior manteniendo el superior (filtrante) al que colocaremos en otro microtubo de 1.5 ml estéril en el rotor de la centrífuga. Añadimos 60 μ l de agua desionizada estéril (agua para PCR) y centrifugamos al máximo de revoluciones posible durante 30 segundos. Repetimos este último paso una vez más. Al final, dese-chamos el microtubo con filtro y conservamos el microtubo inferior en el que tendremos ADN genómico en solución acuosa listo para emplear en cualquier reacción de amplificación por PCR.

Podemos realizar la comprobación de la presencia de ADN en nuestra solución tomando 6 μ l de dicha solución previamente mezclada con 4 μ l de tampón de carga al que aplicamos en un gel de agarosa al 1 % y lo corremos en una electroforesis a 150 voltios.

Visualizaremos nuestro ADN genómico como una banda única y limpia de más de 1500 pares de base al poner el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en un transiluminador UV.

Ejemplo 3

(A partir de ADN bicatenario separado por electroforesis en geles de agarosa)

Preparamos el gel de agarosa a la concentración apropiada según el tamaño del fragmento

de interés utilizando tampones estériles y en las condiciones de mayor esterilidad posible. A partir de una solución stock de bromuro de etidio a 10 mg/ml lo utilizamos en gel al 0,01 %.

La muestra a someter a electroforesis debe ser preparada de la siguiente forma: 12 μ l de la solución de ADN (ya sea genómico total o producto amplificado) al que añadimos 4 μ l de tampón de carga (confeccionado con materiales estériles. Este tampón será utilizado sólo para estos fines).

Corremos la electroforesis al voltaje apropiado y una vez terminada la misma (tiempo programado de acuerdo al fragmento a analizar).

Empleando guantes y gafas protectoras colocamos el gel en un transiluminador UV que previamente hemos de limpiar con agua bidestilada y etanol absoluto y lo visualizamos utilizando la menor potencia de iluminación posible. Auxiliándonos de una punta de micropipeta estéril, al que ampliamos el vértice mediante un corte con un bisturí estéril, tomarnos varias muestras del fragmento de interés y lo trasvasamos a un microtubo de 1.5 ml.

Añadimos 300 μ l del tampón de lisis 1 agitando vigorosamente (sin emplear vórtex mecánico) y seguidamente agregarnos 200 μ l del tampón de lisis 2. Agitamos manualmente con vigor y lo dejamos reposar durante 1 minuto. Mientras, colocamos la columna filtrante (microtubo de 2 ml decapitado al que le hacemos un agujero de 0.5 mm de diámetro en su vértice donde colocamos un embudo confeccionado con 1/4 de filtro de microfibras de vidrio Whatman GF-C) dentro del tubo colector (microtubo de 1.5 ml) en una centrifuga de mesa.

Añadimos la mezcla a la columna filtrante y

centrifugamos al máximo de revoluciones (preferiblemente por encima de 10000 rpm) durante 30 segundos. Desechamos el filtrado y volvemos a colocar la columna filtrante y la colectora según lo descrito pasando a añadir 200 μ l del tampón de lavado. Centrifugamos 30 segundos y añadimos 200 μ l más del tampón de lavado volviendo a centrifugar otros 30 segundos. Desechamos el microtubo colector con su contenido y lo sustituimos por otro igual pero limpio. Mantenemos el microtubo con filtro al que colocaremos dentro de este nuevo microtubo colector en la centrifuga. Añadimos 10 μ l de agua bidestilada desionizada estéril (agua para PCR) y centrifugamos otros 30 segundos. Retiramos el microtubo inferior manteniendo el superior (filtrante) al que colocaremos en otro microtubo de 1.5 ml estéril en el rotor de la centrifuga. Añadimos 30 μ l de agua desionizada estéril (agua para PCR) y centrifugamos al máximo de revoluciones posible durante 1 minuto. Repetimos este último paso una vez más. Al final, desechamos el microtubo con filtro y conservamos el microtubo inferior en el que tendremos ADN genómico en solución acuosa listo para emplear en cualquier reacción de amplificación por PCR.

Podemos realizar la comprobación de la presencia de ADN en nuestra solución tomando 6 μ l de dicha solución previamente mezclada con 4 μ l de tampón de carga al que aplicamos en un gel de agarosa al 1 % y lo corremos en una electroforesis a 150 voltios.

Visualizaremos nuestro ADN genómico como una banda única y limpia de más de 1500 pares de base al poner el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en un transiluminador UV.

REIVINDICACIONES

1. Método universal de extracción de ADN de alta calidad, **caracterizado** por la utilización de una matriz sólida (embudo de microfibras de vidrio) en el interior de un microtubo.

2. Método universal de extracción de ADN de alta calidad, según reivindicación primera, sin necesidad de emplear resinas especiales para cada tipo de muestra.

3. Método universal de extracción de ADN de alta calidad, según reivindicaciones primera y segunda, que se puede utilizar tomando como fuente cualquier muestra biológica, tanto en estado

líquido (sangre, semen, orina, líquido amniótico, células en cultivo y otros), como sólido (vellosidades coriónicas, partes de vegetales, células disgregadas, sangre desecada en papel de filtro, sudor en papel, muestras sobre tejidos textiles y otras) y, tanto en muestras frescas como conservadas (congelación, parafina y otras), independientemente del tipo de muestra o tiempo de conservación.

4. Método universal de extracción de ADN de alta calidad, según reivindicaciones primera, segunda y tercera, que permite obtener ADN genómico total en solución acuosa, listo para su empleo en reacciones de PCR.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

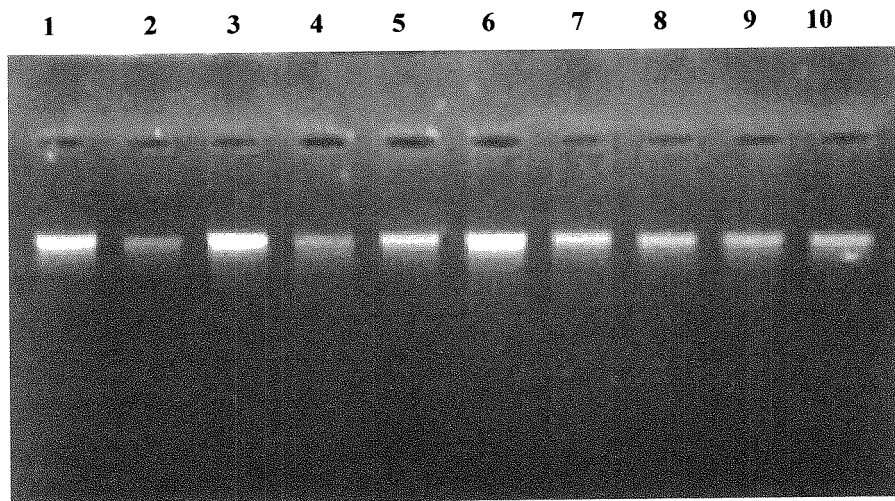


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 182 667

② Nº de solicitud: 200002971

③ Fecha de presentación de la solicitud: **01.12.2000**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.7:** C12Q 1/68, G01N 33/50, B01D 15/00, 39/06

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2128265 A1 (EUROESPES, S.L.) 01.05.1999, columnas 18,20,23.	1-4
X	ES 2035077 T3 (BIOTRACK, INC.) 16.04.1993, reivindicaciones; página 4, líneas 42-43; página 5, líneas 25-32.	1-3
X	ES 2063902 T3 (AKZO NOBEL N.V.) 16.01.1995, columna 3, líneas 35-38,60-68; columna 4, líneas 1-8.	1-3
Y	ES 2006841 A6 (VALMET PAPER MACHINERY INC.) 16.05.1989, columna 3, líneas 1-5,20-25.	1,3
Y	ES 2083853 T3 (CELSIS INTERNATIONAL PLC) 16.04.1996, columna 3.	1,3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

10.02.2003

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/1