(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 251 307**

(21) Número de solicitud: 200402365

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

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO B2

(22) Fecha de presentación: **05.10.2004**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2006**

Fecha de la concesión: **27.11.2006**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **16.12.2006**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **16.12.2006**

(73) Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid**
Rectorado - Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES

(72) Inventor/es: **Dunner Boxberger, Susana y**
Cañón Ferreras, Javier

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Solución para el mantenimiento indefinido de los ácidos nucleicos en su célula de origen.**

(57) Resumen:
Solución para el mantenimiento indefinido de los ácidos nucleicos en su célula de origen.
La invención se refiere a un producto cuyas características permiten mantener una muestra biológica obtenida de un individuo en condiciones tales que la calidad de los ácidos nucleicos extraídos con posterioridad no se vea afectada garantizando su integridad independientemente del tiempo que pase desde la obtención de la muestra hasta la extracción del ácido nucleico. Para ello, se mezcla una muestra biológica ya sea sólida (órgano) o líquida (sangre, semen, cultivo celular, etc) de un eucarionte o procarionte en una solución que consiste en la mezcla de EDTA (ácido ethylen-diamine-tetraacetico) en su forma trisódica, de Fluoruro sódico (NaF) y la saturación con Timol (extraído de *Thymus vulgaris L.*) para evitar la contaminación y el crecimiento bacteriano y su ajuste a un pH equivalente a 8. Esta solución permite la recogida de muestras y su permanencia a temperatura ambiente en ella durante tiempo indefinido para su posterior extracción de ácidos nucleicos y PCR, clonado, secuenciación, hibridación o mutagénesis, con garantías suficientes de integridad y fiabilidad.

ES 2 251 307 B2

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Solución para el mantenimiento indefinido de los ácidos nucleicos en su célula de origen.

Objeto de la invención

La presente invención se encuadra dentro del sector de la biología molecular, en concreto sobre técnicas genéticas. De forma más específica, la presente invención tiene que ver con los métodos, reactivos y sistemas que mantienen los ácidos nucleicos (ADN, ARN, ADNc, ADNmit) en su célula de origen procedente de tejidos tanto sólidos (órganos) como líquidos (fluidos corporales) durante un tiempo indefinido y a temperatura ambiente manteniendo una calidad óptima.

Estado de la técnica

Los análisis o pruebas diagnósticas basados en los ácidos nucleicos (ADN y ARN) son cada vez más frecuentes en laboratorios clínicos, hospitales, clínicas veterinarias, etc, y permiten identificar genéticamente cualquier individuo, establecer sus relaciones genéticas con familiares (madre, padre, hijo) o con individuos de otras poblaciones (dentro de razas, especie, género, familia, clase), detectar si es portador de una mutación en un determinado gen, analizar la presencia de un agente infeccioso, conocer el tipo de tumor que padece, etc.

Muchas de éstas pruebas se han llevado a cabo de forma indirecta analizando marcadores genéticos concretos, pero en los últimos años la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (Mullis y col, Patentes Nº US4, 683,195, US4,683,202, US4,800,159, y US4,965,188) ha permitido análisis más específicos, sensibles y baratos desde una perspectiva molecular.

Para llevar a cabo estos análisis, se requiere un ácido nucleico de buena calidad, es decir un ácido nucleico de doble cadena, íntegro, no degradado ni fragmentado.

Son muchos los factores que afectan la calidad de las muestras de ADN (tipo de tejido almacenado, aditivo utilizado, tiempo y forma de transporte hasta el laboratorio) y la estabilidad de los marcadores analizados y por lo tanto es importante decidir cuál será el método de conservación antes de iniciar un banco de ADN.

Existen numerosas referencias bibliográficas de la conservación del ADN sin aditivo a temperatura ambiente: en muestras de líquido amniótico durante 8 días (Casareale y col., 1992. PCR Methods Appl. Nov;2(2):149-53), en sangre los resultados varían desde 24h (Polakova y col, 1989. Bratisl Lek Listy. Nov; 90(11):844-7.) hasta un máximo de 4 semanas (Joss y Do, 1997. J Med Microbiol. Jan; 46(1):92-6), sangre depositada y secada sobre un porta de cristal (Aggarwal, 1992. Genet Anal Tech Appl. Apr;9 (2):54-7), en enjuagues bucales mantenidos durante más de 60-90 días a temperatura ambiente (Andrisin, 2002. Pharmacotherapy. Aug;22(8):954-60) que arrojan todos unos resultados negativos. Los experimentos realizados a temperaturas superiores (a 23ºC durante una semana (Madisen y col, 1987. Am J Med Genet. Jun;27(2):379-90) o a 37ºC (Cushwa y Medrano, 1993. Biotechniques,14(2):204-7) también resultan en un ácido nucleico degradado. En caso de añadir un aditivo, el ADN se mantiene en buenas condiciones después de 72 semanas cuando la muestra se ha mezclada con fenol (Albarino y Romanowski, 1994. Mol Cell Probes. Oct;8(5):423-7), con otro aditivo denominado LST (Low cost Storage and Transportantion buffer) que mantiene la muestra por un máximo de cuatro semanas a temperatura ambiente antes de proceder a congelarla si se quiere mantener mas tiempo (Schultz, 1999. Am J Clin Pathol. Jun;111(6):748-52). Fukatsu (1999. Mol Eco. Nov;8(11):1935-45.) observa una buena calidad de ADN después de seis meses de conservación de las muestras en acetona, etanol, 2-propanol, diethyl ether y ethyl acetate.

Hay también una manera de conservar el ADN en las células manteniendo la sangre recogida en un soporte en forma de tarjeta de papel. Existen en el mercado diferentes tipos de tarjetas: las tarjetas FTA de las que hay muchas referencias con resultados poco homogéneos. Así Natarajan y col, 2000 (Biotechniques. Dec;29(6):1328-33) sin especificar tiempo de almacenamiento consiguen resultados satisfactorios de calidad de ADN pero otros autores muestran que pierde sensibilidad con el tiempo para detectar la presencia de ADN de patógenos como la malaria (Zhong y col, 2001. J Clin Microbio. Mar;39(3):1195-6); lo mismo ocurre en las tarjetas IsoCode STIX también disponibles comercialmente. Un tercer trabajo, refleja que la sangre recogida en tarjetas FTA mantiene la muestra de sangre incluso para extraer ARN al cabo de un año cuando la temperatura de conservación es de -20ºC y dos a tres meses a temperatura ambiente (Natarajan y col, 2000. Biotechniques. Dec;29 (6):1328-33). Las tarjetas Guthrie son tarjetas de papel de filtro en las que se deposita la sangre de los recién nacidos para realizar estudios metabólicos y según Makowski (2003. Ann Clin Lab Sci. Summer;33 (3):243-50) pueden servir de fuente de ADN ya que permiten almacenar sangre durante varios años pero el tamaño de la muestra es muy pequeño y no se conoce la calidad del ADN extraído después de mucho tiempo. Sierra Diagnostics utiliza un método basado en una mezcla de un quelante de metales bivalente que puede ser EDTA, EGTA o BAPTA a baja molaridad (de 0,001 M a 0,1 M) acompañados de cloruro de litio o guanidina o sodio salicilato o sodio perclorato o sodio tiocianato para la conservación de muestras de orina durante unas horas. Con este método patentado (US006458546B1) mantienen las muestras de orina desde su recogida hasta la extracción de ADN durante un periodo máximo de diez días.

A pesar de todas estas alternativas, el procedimiento más empleado para mantener muestras durante largos periodos sin perder calidad de ADN es el de la congelación a diferentes temperaturas: a -18ºC entre 7 dias y 3 meses, 6 meses a -70ºC después de descongelar en varias ocasiones (Naber, 1996. Diagn Mol Pathol. Dec;5(4):253-9.), al menos dos meses a -70ºC (Madisen y col, 1987. Am J Med Genet. Jun;27 (2):379-90) y se recomienda el uso de esta última temperatura para el mantenimiento de tejidos y sangre y solo se extrae el ADN cuando surge la necesidad (Holland y col, 2002. Mutation Res. 7702:1-18).

La recogida de muestras de sangre en condiciones de campo solo se puede realizar con un anticoagulante (generalmente EDTAK3 - Nielsen, 1985. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C]. Apr;93(2):49-52) a temperatura ambiente y recortando al máximo el tiempo de llegada al laboratorio y de extracción de ADN. Este tiempo puede alargarse unas horas si la muestra así tomada es refrigerada alcanzando una temperatura de 5ºC. En esas condiciones, la extrac-

ción de ADN debe ser inmediata para evitar su degradación o la muestra debe ser congelada para permitir mantener la integridad de los ácidos nucleicos que contiene. Por todo ello, en los laboratorios se tiende a extraer el ácido nucleico de interés de la muestra a su llegada para impedir su degradación y asegurar la fiabilidad de los análisis. Estas necesidades de extracción casi inmediata implican una incertidumbre en la asignación de tareas en el laboratorio al estar condicionadas por la llegada de un número desconocido y variable de muestras.

La adición de un producto antiséptico en la solución de recogida, permitiría alargar la vida media de los ácidos nucleicos en su célula a temperatura ambiente, al impedir el crecimiento bacteriano y la actividad de las enzimas nucleasas responsables de su degradación. Sin embargo, no existe ninguna referencia que aluda a esta posibilidad. El timol es un antiséptico y un desinfectante que destruye la vitalidad de fermentos vivos, anulando las enzimas presentes en el medio, previene la aparición de la putrefacción y la frena cuando ésta ya se ha iniciado. Una cantidad pequeña de timol añadida al albumen, leche, gelatina la mantiene durante meses (Harvey Wickes Felter, M.D., and John Uri Lloyd, Phr. M., Ph. D., 1898).

El timol se ha usado como desinfectante disuelto en agua (Giraldes, M.), como base para llevar a cabo inhalaciones en afecciones respiratorias (Bouillhon y Paquet), para tratar la difteria y otras enfermedades producidaspor microorganismos, el reuma articular, el tifus, la ftisis y la pielitis, también como helmíntico y para tratar afecciones cutáneas, en el caso de excema, psoriasis o quemaduras. En la actualidad se utiliza casi exclusivamente en soluciones colutorias para el tratamiento de la gingivitis, preparados para inhalar asociado a camphor, linimentos de uso tópico, anestésico tópico (http://www.uhecom/thymol htm) y en general como un componente antiséptico y antioxidante en la práctica médica y en la industria como estabilizador de diferentes agentes terapeúticos como el halotano para la anestesia (Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle. Szentandrássy *et al*., BMC *Pharmacology* 2003, **3**:9), y finalmente en el tratamiento de la varroasis en la abeja, siendo un producto que daña menos los insectos que un acaricida sintético como es el ácido oxálico (Imdorf, A. *et al*., 1995. Toxicity of thymol, camphor, menthol and eucalyptol in Varroa jacobsoni and Apis mellifera in laboratory tests. Apidologie 26, p.27-31).

En muchos casos la toma de muestras se realiza en lugares muy alejados de los laboratorios que se van a encargar de su procesado, en condiciones difíciles (altas temperaturas, dificultad para disponer de un aparato refrigerador) que dificultan no ya la congelación de la muestra, sino también la inmediata refrigeración de ésta.

Parece por lo tanto necesario disponer de un aditivo que mezclado con cualquier tipo de tejido (ya sea un fragmento de órgano, un frotis recogido con un hisopo, etc) o de cualquier fluido (sangre, semen, líquido amniótico, etc) va a mantener las muestras en unas condiciones en las que los ácidos nucleicos incluidos en las células permanecerán íntegros durante un tiempo indefinido, incluso a temperatura ambiente.

Explicación de la invención

Solución para el mantenimiento indefinido de los ácidos nucleicos en su célula de origen.

La presente invención se refiere a un producto cuyas características permiten mantener una muestra obtenida de un individuo en condiciones tales que la calidad de los ácidos nucleicos extraídos con posterioridad no se vea afectada, garantizando su integridad independientemente del tiempo que pase desde la obtención de la muestra hasta la extracción del ácido nucleico y de la temperatura a la que se ha mantenido la muestra. En concreto se trata de una solución para el mantenimiento indefinido de los ácidos nucleicos en su célula de origen que permite mantener cualquier muestra biológica obtenida de un individuo ya sea este un eucarionte o un procarionte, a temperatura ambiente o siempre igual o superior a 5ºC.

Esto se ha conseguido mezclando la muestra en una solución que contiene EDTA, NaF y Timol y equilibrando la mezcla a pH = 8. EDTA es un potente quelante divalente de metales que actúa eliminando cationes que componen enzimas metalo-dependientes como DNAsas susceptibles de provocar la degradación de los ácidos nucleícos; su presencia por lo tanto inactiva estas enzimas. NaF es el segundo componente presente en la solución siendo otro quelante que ayuda a la inactivación de enzimas como son ligasas, polimerasas, exonucleasas, quinasas, nucleasas y su presencia mejora la capacidad quelante del EDTA. El tercer componente que integra la solución es Timol que es un aceite esencial que se extrae del tomillo (*Thymus vulgaris L.*) y que tiene un alto poder antiséptico, antifúngico y antihelmíntico. El timol (o camphor del tomillo) también llamado isopropyl-metacresol, 6-isopropyl-m-cresol, 3-hydroxy-p-cymene, isopropyl cresol, 2-isopropyl-5-methylphenol, tiene una fórmula molecular C10H14O y es un fenol cristalino obtenido de los aceites volátiles de *Thymus vulgaris*, Linn. (N.O. Labiatae), Monarda punctata, Linn. (N.O. Labiatae), *Carum copticum*, Benth. and Hook. f. (N.O. Umbelliferae), y de otras plantas.

El timol se parece al fenol en su modo de acción a pesar de que debido a su insolubilidad en los fluidos corporales, se absorbe de manera mucho más lenta. Es menos irritante, y su acción germicida es mayor que el fenol. El timol es un potente bactericida muy superior a los demás fenoles ("Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents". Juven *et al*., Appl Bacteriol. 1994 Jun;76(6):626-31). El timol actúa sobre la membrana celular produciendo una pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana por cambio en sus propiedades físicas. Esta acción sobre las membranas es común a todos los fenoles y es debida a la coexistencia de una parte hidrófila y otra lipófila. El timol produce proteinatos insolubles debido a la inactivación enzimática y la desnaturalización proteíca, y es el factor que impide la degradación de los ácidos nucleicos por la presencia de enzimas y por lo tanto permite su integridad a largo plazo. El metilo y la cadena isopropilo aumenta la actividad antiséptica de manera más eficiente que en el caso del fenol ya que su toxicidad es menor en comparación con el fenol.

De esta forma el producto se obtiene mezclando en una solución una cantidad de un quelante divalente de metales EDTA (ácido ethylen-diamine-tetraacetico) a una molaridad que varía entre 0,39 M y 0,56 M en su forma trisódica, un compuesto que mejora la capacidad quelante del EDTA que es el Fluoruro sódico (NaF) a una molaridad que varía entre 0,33 M y 0,48 M y la saturación de esta solución con Timol (menos de 0,0001 M) para impedir el crecimiento de micro-

organismos en la muestra mientras ésta es mantenida a temperaturas igual o superiores a +5ºC y el equilibrado del pH a un valor de 8.

La solución actúa sobre la membrana celular produciendo cambios en las propiedades físicas que le hacen perder la permeabilidad, también inactiva las enzimas degradadotas quelando sus cationes y contribuye a la desnaturalización proteica dando proteinatos insolubles.

La solución añadida a cualquiera de los tejidos o fluidos corporales: órganos, tejidos tumorales, piel, médula ósea, pluma, pelo, sangre, suero sanguíneo, líquido amniótico, huevo, semen, saliva, fluido vaginal, sudor, permite el almacenamiento de la muestra y el mantenimiento de los ácidos nucleicos incluidos en ella durante un tiempo indefinido y a cualquier temperatura superior a 5ºC. Esta solución impide la destrucción enzimática de los ácidos nucleicos e impide que aparezca un crecimiento bacteriano, fúngico o helmíntico cuyo origen es ajeno a la muestra y que aparece acompañado de enzimas que degradan los ácidos nucleicos de interés además de añadir su propio ADN cuya presencia sesgaría los resultados que se lleven a cabo posteriormente sobre esa muestra.

La invención revela que para mantener un ácido nucleico en su tejido de origen (un fragmento de tejido de un órgano, de piel, de pluma, sangre, semen, líquido amniótico, fluido vaginal etc) es necesario sumergir la muestra en una solución que contenga EDTA (ácido ethylen-diamine-tetraacetico) en su forma trisódica a una concentración no menor de 0,39 M, Fluoruro sódico (NaF) a una concentración no menor de 0,33 M y con la saturación de la mezcla con Timol y su equilibrado a pH = 8. Los ácidos nucleícos a los que se refiere la invención son cualquier ácido nucleico: ácido desoxiribonucleico (ADN), ácido ribonucleíco (ARN), ácido desoxiribonucleíco codificante (ADNc) y ácido desoxiribonucleíco mitocondrial (ADNmit) contenido en cualquier célula tanto eucarionte como procarionte.

La mezcla de la solución con la muestra biológica permite mantener ésta en condiciones tales que la calidad del ácido nucleico extraído unas horas o varios años después no se vea afectada, garantizando su integridad independientemente del tiempo que pase desde la obtención de la muestra hasta la extracción del ácido nucleico y garantizando que los procesos que se lleven a cabo ya sean amplificación mediante PCR, secuenciación, clonado, hibridación, mutagénesis o técnicas similares de forma óptima o técnicas similares, tengan una calidad y fiabilidad elevada, prácticamente del 100%. Esta mezcla puede prepararse en forma líquida, sólida o micronizada y permite mantener indefinidamente el ácido nucleico en muestras de tejido y fluidos biológicos tanto en todos los eucariontes, especialmente en vertebrados superiores, como en procariontes.

La capacidad del procedimiento descrito para mantener en la célula, un ácido nucleico en condiciones de realizar cualquier tipo de análisis independientemente del tiempo que haya transcurrido desde la toma de la muestra, se observa al comparar muestras que incorporan la mezcla objeto de la invención y muestras que no la incorporan mantenidas todas ellas a +5ºC, empleando la absorbancia que arrojan los ácidos nucleicos después de extraídos en diferentes momentos a partir de la toma de la muestra, como parámetro de calidad. Se puede comprobar que independientemente del tiempo transcurrido, las muestras conservadas en la solución objeto de la invención tendrán cifras equivalentes de cantidad de ADN, mientras que cuando no están mantenidas en esa solución, la cantidad de ADN aumenta en un principio debido al crecimiento bacteriano y se degrada y cae hasta cero en unas semanas (figura 1).

Descripción de las figuras

La invención se acompaña de las siguientes figuras que con carácter ilustrativo representan lo siguiente:

Figura 1 muestra la absorbancia de los ADN extraídos de muestras conservadas o no en la solución para el mantenimiento indefinido de ácidos nucleicos, y mantenidas a +5ºC hasta 8 años.

Figura 2 muestra el ADN extraído a las 48 h y a los 8 meses de muestras de sangre conservadas o bien en la solución obtenida, que contiene EDTA, NaF y Timol, según se describe en el contenido de esta memoria, o bien en EDTA K_3 mantenidas a +5ºC o en EDTA K_3 a -20ºC.

Calle 1: λ,

Calle 2-7: sangre + invención

Calle 8-22: sangre + EDTA K_3 en refrigeración

Calle 23-36: sangre + EDTA K_3 en congelación.

Figura 3 muestra el resultado cuando las muestras son extraídas (la sangre con lisis alcalina y el tejido con fenol cloroformo) después de mantener la muestra durante 8 meses a +5ºC en la solución que describe el contenido de esta memoria y que contiene EDTA, NaF y Timol y pH 8.

Calle 1: λ

Calle 2-6: sangre

Calle 7-11: músculo

Calle 12-15: pelo

Calle 16-20: cartílago.

Figura 4 muestra el ADN extraído de las muestras de diferentes tejidos conservadas sin aditivo a las 48h (calle 1-7) y sin aditivo y en congelación (calles 8-12), visualizadas en gel de agarosa 0,6%.

Calle 1: λ

Calle 2-3: sangre

Calle 4-5: músculo

Calle 6: pelo

Calle 7: cartílago

Calle 8-9: sangre

Calle 10: músculo

Calle 11: pelo

Calle 12: cartílago

Figura 5 es el ADN extraído de diferentes muestras (sangre, músculo, cartílago, pelo) mantenidas durante 8 meses en EDTA K_3 a -20ºC.

Calle 1: λ

Calle 2-8: sangre

Calle 9-14: músculo

Calle 15-21: cartílago

Calle 22-24: pelo

Modo de realización de la invención

Como resultado de la eficacia de la solución para el mantenimiento indefinido de los ácidos nucleicos, se han llevado a cabo unos experimentos en los que se han considerado como efectos principales diferentes tejidos biológicos, diferentes tipos de tratamiento, uno de los cuales era la solución objeto de la invención, y diferentes tiempos desde el momento de obtención de la muestra biológica.

El material biológico ha consistido en sangre, cartílago de oreja, pelo, músculo.

Para cada tejido, se han analizado 50 individuos diferentes, y para cada una de las muestras se han llevado a cabo 5 réplicas.

La conservación de las muestras se realizó a tres temperaturas (Temperatura ambiente, Refrigeración entre 5ºC y 7ºC y Congelación a -20ºC) y con tres tratamientos diferentes (Sin aditivo, con EDTA K3 y con el aditivo objeto de la reivindicación).

Las muestras se mantuvieron durante un mínimo de 48 horas y un máximo de 8 meses en las diferentes condiciones de conservación. La extracción de ADN en las condiciones que se detallan a continuación se realizó tanto a las 48 horas desde la toma de la muestra biológica, como al finalizar el período de 8 meses.

Ejemplo 1

Se presenta un método de extracción de ADN genómico realizado a partir de muestras de sangre mantenida a temperatura ambiente y con el aditivo de la solución para el mantenimiento indefinido de ácidos nucleícos, objeto de esta invención.

La solución aquí descrita consistente en 1 gr de EDTA trisódico, 100 mgrs de NaF y 0,1 mgr de Timol y pH 8, es introducida en un tubo de 5 ml de capacidad al que se ha aplicado vacío. Se recogen 5 ml de sangre por venopunción, a continuación se agita suavemente el tubo por inversión para mezclar los reactivos y la sangre. El tubo se mantiene a temperatura ambiente durante una semana y se almacena durante tiempo indefinido a 5ºC. Cuando se decide extraer el ADN, se deja el tubo a temperatura ambiente durante la noche anterior para conseguir una homogeneización de la sangre y la solución.

Para extraer cantidades grandes de ADN (más de 5 μg de ADN), se toman entre 1 ml y 3 ml de sangre + la solución. Se añade el mismo volumen de Tris ClH 10 mM + EDTA 10 mM, se agita y centrifuga durante 3 minutos y se retira el sobrenadante cuidando de no apurar el fondo para no perder el sedimento que contiene las células. Se repite la operación, se añade el mismo volumen de Tris ClH 10 mM + EDTA 1 mM, a continuación se agita y centrifuga durante 3 minutos y se retira el sobrenadante. Se añade una solución de lisis consistente en 250 μl de una mezcla de NaCl 0,1 M y EDTA 25 mM, 12,5 pl de SDS al 10%, 0,1 mg de Proteinasa K y se incuba a 37ºC durante dos o más horas, se añade fenol + cloroformo + alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1. Finalmente se centrifuga durante 10 minutos y recoge el sobrenadante, se precipita el ADN con etanol al 100% después de añadir 40 μl de NaAc 3 M a pH=5,2.(figura 2 y 3).

Ejemplo 2

Para este ejemplo las cantidades de tejido de las que se partieron fueron de 500 mgr de músculo, de 50 mgr de cartílago. Los distintos tejidos se trataron con una solución que contiene NaCl 0,14 M; MgAc 1,5 mM; ClK 5 mM; SDS 1% y un tratamiento manual de homogeneización dejando además macerar el tejido durante unos minutos. A esta mezcla se añade fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1. Después de agitar durante 10 minutos, se centrifuga 5 minutos, se recoge el sobrenadante (la fase acuosa) y a éste se añade NaAc 3M (pH=5,2) y se precipita con etanol absoluto, recogiendo el ovillo que forman los ácidos nucleicos al precipitar.

El resultado de esta extracción se puede ver en la figura 4.

Ejemplo 3

Se presenta un método de extracción de ADN genómico a partir de una muestra de sangre contenida en la solución objeto de la invención.

La solución aquí descrita consistente en 1 gr de EDTA trisódico, 100 mgrs de NaF y 0,1 mgr de Timol es introducida en un tubo de 5 ml de capacidad al que se ha aplicado vacío.

Se recogen 5 ml de sangre por venopunción, se agita suavemente el tubo por inversión para mezclar los reactivos y la sangre, el tubo se almacena a temperatura ambiente durante tiempo indefinido. Al llegar al laboratorio, se recomienda su almacenamiento a 5ºC. Cuando se decida extraer el ADN, es necesario dejar el tubo a temperatura ambiente durante la noche anterior para conseguir una homogeneización de la sangre y la solución obtenida. Se retira con una pipeta la cantidad que se necesita para realizar el análisis (por ejemplo para una amplificación de uno o varios genes: 50 μl; para un test de hibridación, 100 μl). Esa cantidad de sangre + solución se pasa a un tubo limpio y se añade 100 μl de H_2O destilada. Se agita y centrifuga durante 3 minutos, se retira el sobrenadante, se repite la operación dos veces más y se añade al sedimento 100 μl de NaOH 0,25 M y se incuba durante 15 minutos, pasado ese tiempo se añade 100 μl de ClH 0,25 M, se mezcla y se añade 100 μl de Tris ClH 0,1 M y pH =8,5; a continuación se centrifuga y se cogen entre 2 a 5 μl del sobrenadante para una PCR. Ver Figuras 2 y 3.

REIVINDICACIONES

1. Solución para el mantenimiento indefinido de los ácidos nucleicos en su célula de origen **caracterizada** porque se compone de:

• EDTA (ácido ethylen-diamine-tetraacético) en una cantidad que varía entre 0,39 M y 0,56 M en su forma trisódica (Na_3).

• Fluoruro sódico (NaF) a una molaridad que varía entre 0,33 M y 0,48 M.

• la saturación de esta solución con Timol (extraído de *Thymus vulgaris L* aproximadamente 0,0001 M).

• El equilibrado del pH con ClH hasta alcanzar un valor de 8.

2. Solución para el mantenimiento indefinido de los ácidos nucleicos en su célula de origen, según reivindicación anterior, **caracterizada** porque la cantidad de EDTA en un litro de solución varía entre 140 gr y 200 gr.

3. Solución para el mantenimiento indefinido de los ácidos nucleicos en su célula de origen, según reivindicación 1, **caracterizada** porque la cantidad de NaF en un litro de solución varía de 14 gr a 20 gr.

4. Solución para el mantenimiento indefinido de los ácidos nucleicos en su célula de origen, según reivindicación 1, **caracterizada** porque la cantidad de Timol en un litro de solución varía entre 5 y 10 mg.

5. Solución para el mantenimiento indefinido de los ácidos nucleicos en su célula de origen, según reivindicación 1, **caracterizada** porque el pH es igual a 8.

6. Solución para el mantenimiento indefinido de los ácidos nucleicos en su célula de origen, según reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque al agregarse a una muestra biológica obtenida de un individuo ya sea éste un eucarionte, un procarionte, ésta se mantiene a temperaturas igual o superiores a +5ºC y en condiciones tales que la calidad de los ácidos nucleicos extraídos con posterioridad no se vea afectada, garantizando su integridad independientemente del tiempo que pase desde la obtención de la muestra hasta la extracción del ácido nucleico.

7. Solución para el mantenimiento indefinido de los ácidos nucleicos en su célula de origen, según reivindicación anterior, donde la muestra biológica puede ser sangre, un órgano o fragmento, un tejido sano o no (tumoral, inflamatorio), piel, pluma, médula ósea, huevo, suero sanguíneo, líquido amniótico, semen, saliva, fluido vaginal, sudor, heces, orina, pelo o un cultivo celular.

8. Solución para el mantenimiento indefinido de los ácidos nucleicos en su célula de origen , según reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque puede ser una solución acuosa, sólida o micronizada.

Figura 1

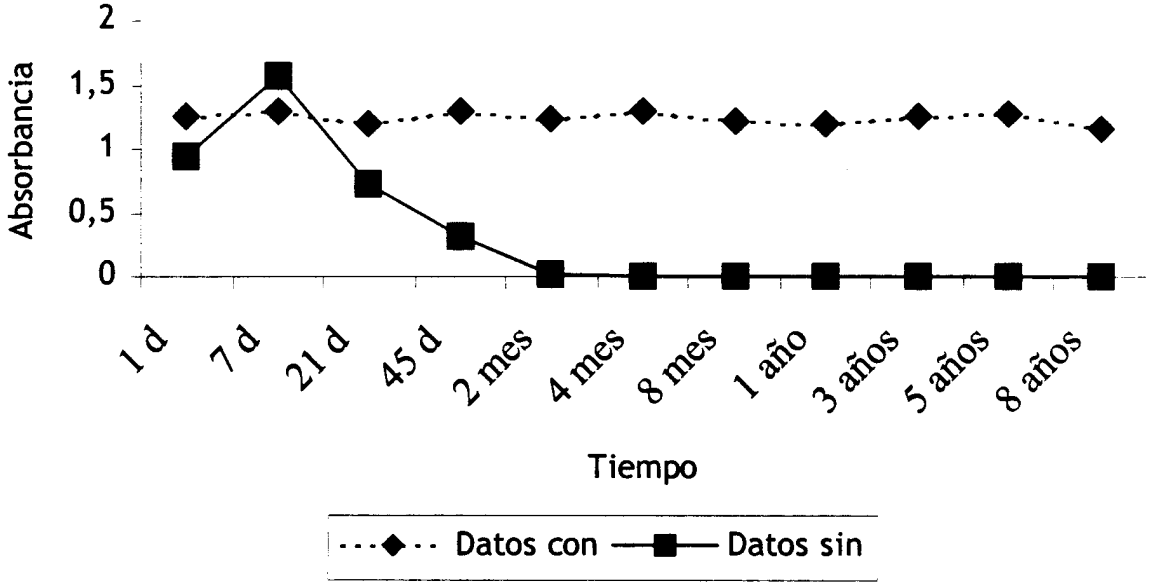

Absorbancia
2
1,5
1
0,5
0
1 d
7 d
21 d
45 d
2 mes
4 mes
8 mes
1 año
3 años
5 años
8 años
Tiempo
Datos con
Datos sin

Figura 2

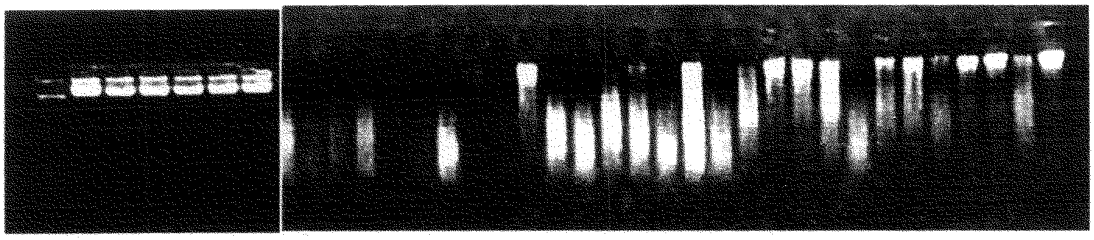
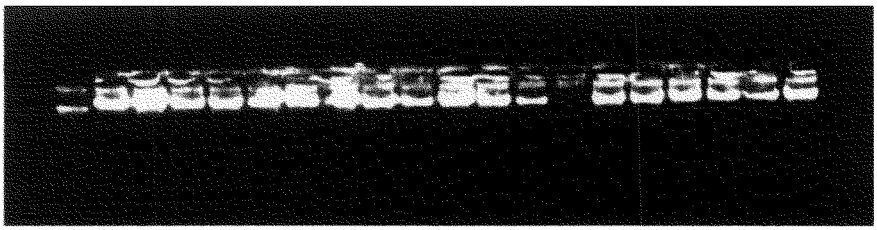

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 2728 29 30 31 32 33 34 35 36

Figura 3



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Figura 4

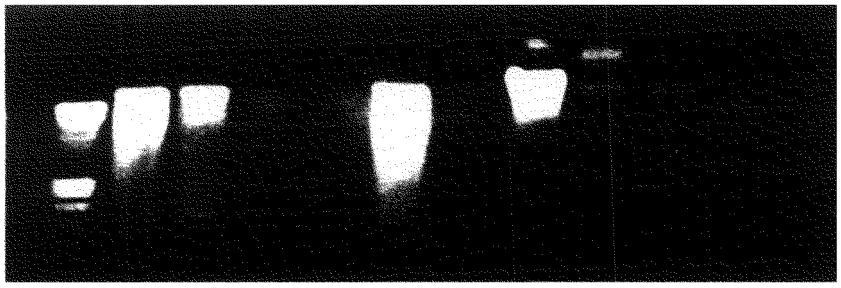
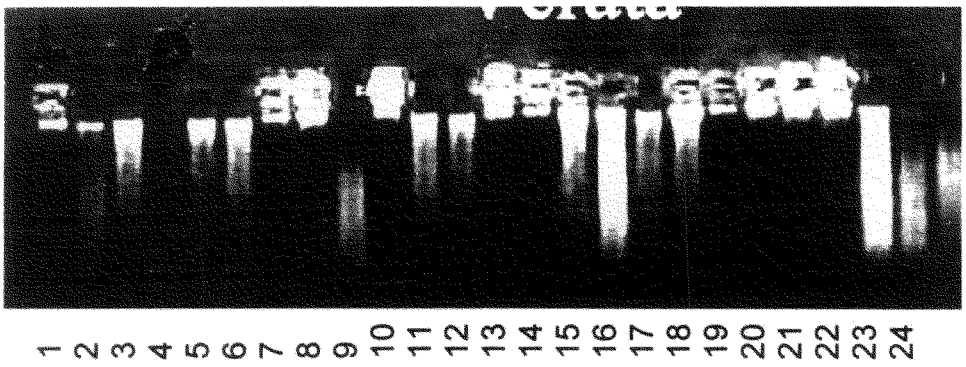


Figura 5



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 251 307

(21) Nº de solicitud: 200402365

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **05.10.2004**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

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

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 1391520 A1 (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 25.02.2004, página 2, línea 5 - página 3, línea 50.	1
A	US 3813465 A (IRWIN S. LERNER) 28.05.1974, columna 2, línea 45 - columna 4, línea 62.	1

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	Examinador	Página
05.01.2006	A. Collados Martín Posadillo	1/1