



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 875**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03770642 .1**  
96 Fecha de presentación : **03.10.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1563091**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2005**

54 Título: **Procedimientos y materiales para utilizar compuestos químicos como herramienta para el almacenamiento de ácidos nucleicos sobre medios de sistemas de purificación de ácidos nucleicos.**

30 Prioridad: **04.10.2002 US 416356 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.05.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.05.2009**

73 Titular/es: **Whatman, Inc.**  
**200 Wells Avenue**  
**Newton, Massachusetts 02459-3304, US**

72 Inventor/es: **Smith, Martin, A.;**  
**Fomovskaia, Galina, N. y**  
**Fomovsky, Mikhail, A.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 320 875 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Procedimientos y materiales para utilizar compuestos químicos como herramienta para el almacenamiento de ácidos nucleicos sobre medios de sistemas de purificación de ácidos nucleicos.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos para almacenar ácidos nucleicos procedentes de una muestra que contenga ácidos nucleicos, tal como una muestra de células o un lisado celular. Los ácidos nucleicos se aíslan y pueden almacenarse de forma eficaz durante periodos extensos de tiempo a temperatura y humedad ambientales sobre una amplia variedad de filtros y otros tipos de medios en fase sólida. La invención proporciona procedimientos para almacenar muestras que contengan ácidos nucleicos sobre una amplia gama de medios en fase sólida en muchos tipos de tubos, columnas o placas de múltiples pocillos, muchos de los cuales están disponibles en el mercado.

**Antecedentes de la invención**

La genotipificación es la disciplina de identificar el genoma de un individuo con relación a alelos y/o mutaciones específicos de enfermedades que se producen como efecto de los lazos familiares. La purificación rápida del ADN genómico humano es una parte esencial de un proceso de genotipificación; el ADN genómico de un individuo es la unidad estructura para la secuencia de ADN completa de todos los alelos expresados.

La secuenciación del ADN humano es una operación compleja. Para realizar el análisis de la secuencia en regiones de los cromosomas que puedan contener porciones de mutaciones o secuencias específicas de enfermedades se amplifican porciones seleccionadas, por ejemplo, mediante PCR, y los productos amplificados se secuencian. Las porciones seleccionadas de los cromosomas que se amplifican son impuestas por la secuencia específica de los cebadores utilizados en la amplificación mediante PCR, como los utilizados en estudios de unión para determinar si una secuencia que porta una enfermedad se encuentra en un cromosoma concreto. Los conjuntos de cebadores que se utilizan en los estudios de genotipificación están disponibles en el mercado y son representativos del cromosoma que se está estudiando. Debido a la extensa longitud de los cromosomas se realizan muchas reacciones de PCR sobre el molde de ADN genómico procedente de un único paciente.

Aunque se han desarrollado procedimientos relativamente rápidos y convenientes para la purificación de diversos tipos de ácidos nucleicos (tales como ADN genómico, ADN complementario (ADN), ADN mitocondrial o cloroplástico, o diversos tipos de ARN) en agarosa, la extracción de los ácidos nucleicos directamente de muestras de partida más complejas, como células y lisados celulares, sigue siendo una operación relativamente difícil. En conjunto, la mayoría de los procedimientos que se practican en la actualidad para purificar ácidos nucleicos de muestras que contienen ácidos nucleicos que comprenden células o lisados celulares sigue requiriendo mucho tiempo y trabajo. Además, la conservación de los ácidos nucleicos aislados normalmente implica mantener un vial de los ácidos nucleicos en disolución en una nevera o, preferiblemente, en un congelador. La conservación a largo plazo de numerosas muestras requiere una gran cantidad de espacio en el congelador. Estos requerimientos de conservación dan como resultado un alto consumo de energía y muchos gastos, y hacen que el aislamiento de ácidos nucleicos sobre el terreno sea difícil o incluso, en algunas circunstancias, imposible.

Se han intentado minimizar las etapas laboriosas y largas de los procedimientos previamente utilizados para aislar ácidos nucleicos a partir de estas muestras más complejas. Uno de estos procedimientos se describe en el documento EP 0389063. El procedimiento descrito en el documento EP 0389063 implica mezclar la muestra de células (tal como sangre completa) con una sustancia caotrópica y una fase sólida en partículas de unión a ácidos nucleicos que comprende sílice o un derivado de éste. Se sabe que, en presencia de una sustancia caotrópica, los ácidos nucleicos se liberan de las células y se unen a fases sólidas de unión a ácidos nucleicos con una base de sílice. Posteriormente, la mezcla se centrifuga para sedimentar la fase sólida con los ácidos nucleicos unidos a ella, y el sobrenadante se rechaza. El material sedimentado se somete a varias etapas de lavado con el agente caotrópico y con disolventes orgánicos. Por último, el ADN se eluye de la fase sólida en un tampón de bajo contenido en sales.

El procedimiento descrito en el documento EP 0389063 no resulta ventajoso porque es un procedimiento en múltiples etapas con mucho trabajo manual. En vista del hecho de que el procedimiento implica una serie de etapas de centrifugación y de transferencia de recipientes, este procedimiento no resulta adecuado para su automatización. Además, el ADN eluido aún requiere su conservación en disolución a baja temperatura.

Las patentes de EEUU nº 5.187.083 y 5.234.824 describen cada una un procedimiento para obtener con rapidez ADN sustancialmente puro a partir de una muestra biológica que contenga células. Los procedimientos implican lisar suavemente las membranas de las células para producir un lisado que contenga ADN genómico en una forma de alto peso molecular. El lisado se hace pasar a través de un filtro poroso para atrapar, de forma selectiva, el ADN de alto peso molecular sobre el filtro. El ADN se libera del filtro utilizando una disolución acuosa.

Se ha intentado facilitar la purificación de ADN genómico humano utilizando una diversidad de procedimientos (Molecular Cloning, Sambrook *et al.* (1989)). Por consiguiente, muchos fabricantes de kits comerciales proporcionan productos para estas técnicas: AmpReady™ (Promega, Madison, Wisconsin), DNeasy™ (Qiagen, Valencia, Califor-

nia) y Split Second™ (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, Indiana). Estos productos se basan en el uso de matrices especializadas o sistemas de tampones para el aislamiento rápido de la molécula de ADN genómico.

En fechas más recientes se han intentado utilizar técnicas basadas en filtros microporosos como herramientas para la purificación de ADN genómico, así como de una gran multitud de ácidos nucleicos. La ventaja de las matrices basadas en filtros es que pueden diseñarse en muchos formatos que incluyen tubos, tubos de centrifugación, láminas y placas de múltiples pocillos. Las membranas de filtros microporosos como matrices de soporte para la purificación tienen otras ventajas en la técnica. Proporcionan un sistema compacto y fácil de manipular que permite la captura de las moléculas deseadas y la eliminación de componentes no deseados en una fase fluida con un mayor rendimiento y unos tiempos de procesamiento más rápidos que los que se consiguen con una cromatografía en columna. Esto es debido a las rápidas velocidades de difusión que son posibles sobre las membranas de filtros.

Las moléculas de ácidos nucleicos se han capturado sobre membranas de filtros, en general mediante la simple adsorción o mediante una reacción química entre grupos reactivos complementarios presentes sobre la membrana de filtro o sobre un ligando unido al filtro dando como resultado la formación de un enlace covalente entre el ligando y el ácido nucleico deseado.

Los materiales de membranas de filtros porosos utilizados para la inmovilización de ácidos nucleicos no covalente incluyen materiales como el nailon, la nitrocelulosa, el poli(fluoruro de vinilidino) (PVDF) hidrófobo y las microfibras de vidrio. También se ha desarrollado una serie de procedimientos y de reactivos para permitir el acoplamiento directo de los ácidos nucleicos sobre soportes sólidos, tales como oligonucleótidos y cebadores. También se ha indicado el entrecruzamiento del ADN con UV (Church *et al.*, PNAS, vol. 81, p. 1991, 1984), el kit de captura en columna Generation (Gentra Systems, Minneapolis, MN) y la unión de ARN a membranas de nailon.

Se han utilizado muchos procedimientos químicos para la inmovilización de moléculas, tales como ácidos nucleicos, sobre membranas de filtros. Por ejemplo, papel activado (TransBind™, Schleicher & Schuell Ltd., Keene, N.H.), membranas de PVDF revestidas con hidrogel activado con carbodiimidazol (Immobilin-IAV™, Millipore Corp., Bedford, Mass.), papel de MAP (Amersham, Littlechalfont Bucks, Wisconsin), nailon activado (BioDyne™, Pall Corp., Glen Cove, N.Y.), y nitrocelulosa activada con DVS y bromuro de cianógeno. También se conocen membranas unidas con ligandos específicos, como la membrana de captura de biotina SAM2™ (Promega) que se une a moléculas biotiniladas basándose en su afinidad por la estreptavidin, o el sistema de membranas de afinidad MAC (proteína A/G) (Amicon, Bedford, Massachusetts). Algunas de las desventajas de la unión covalente de biomoléculas sobre membranas activadas son:

a) La inmovilización de las moléculas a menudo es lenta, requiriendo 20-180 minutos para que se complete la reacción.

b) Se necesita una alta concentración de ligandos y de biomoléculas para una inmovilización rápida.

c) Se necesita agitación constante durante el proceso de inmovilización, que puede dar como resultado la desnaturalización y la desactivación de las biomoléculas.

d) Cuando se termina el proceso de inmovilización, a menudo se requiere una etapa de bloqueo (formación de casquetes) para eliminar la capacidad de unión covalente residual.

e) Las moléculas unidas covalentemente no pueden retirarse de la membrana de filtro.

En diversas áreas concretas, tales como la medicina forense, resultan necesarios medios y procedimientos para la inmovilización de ácidos nucleicos que muestren la alta especificidad de inmovilización covalente sobre la membrana de filtro sin el uso de reacciones químicas fuertes y largos tiempos de incubación, que también puedan utilizarse en escenarios de crímenes, con el archivo de muestras de sangre y otros usos relacionados. En particular resulta necesaria la captura y la separación de ácidos nucleicos a partir de una mezcla en fase fluida sobre una matriz de membrana de filtro en la medicina forense.

De interés especial es la capacidad para almacenar o archivar los ácidos nucleicos unidos sobre la matriz de membrana de filtro para diversos usos. Como alternativa, los filtros que permiten la elución de los ácidos nucleicos tienen uso en aplicaciones que requieren formatos líquidos. En la presente invención aparecen realizaciones de ambos tipos.

Basándose en las patentes de EEUU 5.496.562, 5.756.126 y 5.807.527, se ha demostrado que los ácidos nucleicos o el material genético puede inmovilizarse sobre un soporte sólido seco con una base de celulosa o filtro (filtro FTA®). El soporte sólido descrito se acondiciona con una composición química que es capaz de realizar varias funciones: (i) lisar el material celular intacto tras ponerse en contacto con él, liberando el material genético, (ii) permitir y posibilitar las condiciones que facilitan la inmovilización del material genético sobre el soporte sólido (bien puede ser mediante una combinación de propiedades mecánicas y caotrópicas), (iii) mantener el material genético inmovilizado en un estado estable sin daños debidos a la degradación, la actividad de endonucleasas, la interferencia de UV y el ataque microbiano, y (iv) mantener el material genético como una molécula unida al soporte que no se libere del soporte sólido

durante ninguna etapa de procesamiento corriente abajo (como se demuestra en Del Rio *et al.* (1995), *BioTechniques*, vol. 20: 970-974).

Los filtros de FTA<sup>®</sup> permiten la conservación estable a largo plazo de ácidos nucleicos, tales como sobre una tarjeta de FTA<sup>®</sup> para archivar muestras de ADN a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo. La utilidad del denominado material de filtro celulósico FTA<sup>®</sup> descrito en las patentes de EEUU 5.496.562, 5.756.126 y 5.807.527 se ha ilustrado para varias técnicas con ácidos nucleicos, tales como la ribotipificación bacteriana (Rogers, C. y Burgoyne, L. (1997), *Anal. Biochem.*, vol. 247:223-227), la detección de diferencias en una sola base en ADN vírico y humano (Ibrahim *et al.* (1998), *Anal. Chem.*, vol. 70:2013-2017), la formación de bases de datos de ADN (Ledray *et al.* (1997), *J. Emergency Nursing.*, vol. 23, n° 2:156-158), el procesamiento automático para electroforesis STR (Belgrader, B. y Marino, M. (1996), *L.R.A.*, vol. 9:3-7; Belgrader *et al.* (1995), *BioTechniques.*, vol. 19, n° 3:427-432), y el ensayo de acoplamiento de oligonucleótidos para el diagnóstico (Baron *et al.* (1996), *Nature Biotech.*, vol. 14:1279-1282).

En fechas más recientes se ha demostrado que las microfibras de vidrio se unen específicamente a ácidos nucleicos procedentes de una diversidad de fuentes que contienen ácidos nucleicos de una manera muy eficaz (por ejemplo, véase Itoh *et al.* (1997), *Simple and rapid preparation of plasmid template by filtration method using microtiter filter plates*, *NAR*, vol. 25, n° 6:1315-1316; Andersson, B. *et al.* (1996), *Method for 96-well M13 DNA template preparations for large-scale sequencing*: *BioTechniques*, vol. 20:1022-1027). Bajo unas condiciones correctas de sales y tampón, los ácidos nucleicos se unen al vidrio o al sílice con alta especificidad. Puede utilizarse una matriz de microfibras de vidrio en forma de filtro, que incluya si es posible un ligante o un revestimiento, tal como FTA<sup>®</sup>, para el aislamiento y la elución de ácidos nucleicos.

Como alternativa, sílice, gel de sílice, partículas de vidrio o mezclas de vidrio que no estén en forma de filtro pueden suspenderse en una suspensión y cargarse en una columna o en tubo de centrifugación. El material para cargar en la columna también puede obtenerse mediante la homogeneización de fibras de vidrio o de filtros de microfibras que tengan ligantes de eliminación, seguido de una suspensión como un "lodo", una "resina" o una "suspensión espesa" (véase, por ejemplo, la patente de EEUU n° 5.658.548).

En la técnica se sabe que estos tipos de columnas, como las columnas de fraccionamiento de proteínas, deben mantenerse húmedas y no permitir que se sequen, y que los ácidos nucleicos y las proteínas atrapadas en las columnas secas a menudo no pueden eluirse. Esta limitación necesita la cuidadosa conservación de las columnas cargadas bajo condiciones que eviten que se sequen (por ejemplo, se sellan para evitar la exposición al aire y si es posible se conservan en una nevera o en una habitación fría). También hace necesario realizar un experimento de aislamiento dentro de un marco de tiempo relativamente inmediato, durante el cual debe mantenerse una vigilancia cuidadosa y constante para evitar que la columna se seque, tanto en los extremos como en el interior debido a las burbujas de aire. Un aislamiento largo puede requerir que el trabajo se realice en una habitación fría con la adición frecuente de tampón a lo largo de muchas horas.

El documento WO-A-00/53807 describe un procedimiento para almacenar material genético, en el que el material genético se inmoviliza sobre un soporte que se ha pretratado con una composición química, en el que el soporte y el revestimiento actúan juntos para inmovilizar y estabilizar el material genético que se encuentra sobre ellos.

Resultaría útil proporcionar procedimientos para la conservación de muestras que comprendan ácidos nucleicos con diversos tipos de medios en una columna, por el cual la columna con la muestra capturada sobre el medio se seca y se conserva durante días, semanas o meses a temperatura y humedad ambientes, seguido del aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de la muestra.

### Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para aislar y almacenar ácidos nucleicos, que comprenden:

- a. proporcionar un medio en fase sólida;
- b. aplicar una muestra que comprenda células que contienen ácidos nucleicos al medio en fase sólida;
- c. retener las células con el medio en fase sólida como un retenido celular y eliminar los contaminantes;
- d. poner en contacto el retenido celular con una disolución que comprende un tensioactivo o detergente;
- e. lisar el retenido celular para formar un lisado celular mientras se retiene el lisado celular en el medio, comprendiendo el lisado celular los ácidos nucleicos;
- f. secar el medio en fase sólida con el lisado celular que comprende los ácidos nucleicos; y
- g. almacenar el medio en fase sólida secado con los ácidos nucleicos.

## ES 2 320 875 T3

En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para aislar y almacenar ácidos nucleicos, que comprenden:

- 5 a. proporcionar un medio en fase sólida;
- b. aplicar una muestra que comprenda células que contienen ácidos nucleicos al medio en fase sólida;
- c. retener las células con el medio en fase sólida como un retenido celular y eliminar los contaminantes;
- 10 d. poner en contacto el retenido celular con una disolución que comprende:
  - i. una base débil;
  - 15 ii. un agente quelante; y
  - iii. un tensioactivo o detergente aniónico;
- e. lisar el retenido celular para formar un lisado celular mientras se retiene el lisado celular en el medio, comprendiendo el lisado celular los ácidos nucleicos;
- 20 f. secar el medio en fase sólida con el lisado celular que comprende los ácidos nucleicos;
- g. almacenar el medio en fase sólida secado con los ácidos nucleicos; y
- 25 h. eluir los ácidos nucleicos del medio en fase sólida.

En una realización, la disolución de la etapa d comprende además ácido úrico o una sal urato.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para aislar y almacenar ADN, que comprenden:

- a. proporcionar un medio en fase sólida, en el que el medio en fase sólida comprende un filtro que comprende una pluralidad de fibras, en el que las fibras comprenden:
  - 35 i. fibras de vidrio o con una base de sílice;
  - ii. fibras con una base de plástico; o
  - 40 iii. fibras de nitrocelulosa o con una base de celulosa;
- b. aplicar una muestra que comprenda células que contienen ADN al medio en fase sólida;
- c. retener las células con el medio en fase sólida como un retenido celular y eliminar los contaminantes;
- 45 d. poner en contacto el retenido celular con una disolución que comprende:
  - i. una base débil;
  - 50 ii. un agente quelante; y
  - iii. un tensioactivo o detergente aniónico;
- e. lisar el retenido celular para formar un lisado celular mientras se retiene el lisado celular en el medio, conteniendo el lisado celular el ADN;
- 55 f. secar el medio en fase sólida con el lisado celular que comprende el ADN;
- g. almacenar el medio en fase sólida secado con el ADN a una temperatura de 5°C a 40°C;
- 60 h. calentar el ADN con el medio en fase sólida hasta una temperatura elevada de 65°C a 125°C; y
- i. eluir el ADN del medio en fase sólida.

65 En una realización, la disolución de la etapa d comprende además ácido úrico o una sal urato.

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1A es un análisis de una electroforesis en gel de agarosa de la calidad del ADN extraído a partir de sangre completa humana congelada y recuperado a partir de un medio de fibra de vidrio después de un día de conservación a temperatura y humedad ambientes (M = patrón de peso molecular).

La figura 1B es un análisis de una electroforesis en gel de agarosa de la calidad del ADN extraído a partir de sangre completa humana congelada y recuperado a partir de un medio de fibra de vidrio después de 5 días de conservación a temperatura y humedad ambientes (M = patrón de peso molecular).

La figura 2 es un análisis de una electroforesis en gel de agarosa de la calidad del ADN extraído a partir de sangre completa humana fresca y recuperado a partir de un medio de fibra de vidrio después de 20 días de conservación a temperatura y humedad ambientes (M = patrón de peso molecular).

La figura 3 es un análisis de una electroforesis en gel de agarosa de la calidad del ADN extraído a partir de sangre completa humana fresca y recuperado a partir de un medio de fibra de vidrio después de 3,5 meses de conservación a temperatura y humedad ambientes (M = patrón de peso molecular).

La figura 4 es un análisis de una electroforesis en gel de agarosa de la calidad del ADN aislado después de un mes de conservación a temperatura ambiente sobre los medios de fibra de vidrio GF/L-6<sup>TM</sup> y DBS<sup>TM</sup> (Whatman), control frente a tratado con FTA (M = patrón de peso molecular).

La figura 5 es un análisis de una electroforesis en gel de agarosa de la calidad del ADN aislado después de tres meses y medio de conservación a temperatura ambiente sobre el medio en columna de fibra de vidrio GF/L<sup>TM</sup> GenFast (Whatman), control (abajo) frente a tratado con FTA<sup>®</sup> (arriba) (PM = patrón de peso molecular).

La figura 6 es un análisis de una electroforesis en gel de agarosa de la calidad del ADN aislado después de cinco meses de conservación a temperatura ambiente sobre una columna de tipo GenFast con medio de fibra de vidrio GF/L-6<sup>TM</sup> (Whatman), control frente a una disolución de tipo FTA<sup>®</sup> (tratado con FTA<sup>®</sup>) (PM = patrón de peso molecular).

La figura 7 es un análisis de una electroforesis en gel de agarosa de la calidad del ADN aislado después de tres meses y medio de conservación a temperatura ambiente sobre una columna de gel de sílice QIAamp Mini Kit (Qiagen).

La figura 8 es un análisis de una electroforesis en gel de agarosa de la calidad del ADN aislado después de tres meses de conservación a temperatura ambiente sobre una membrana de poli(fluoruro de vinilidino) (PVDF) hidrófila con un diseño basado en columnas (Whatman), control frente a tratado con FTA<sup>®</sup> frente a tratado con FTA<sup>®</sup> modificado (PM = patrón de peso molecular; carriles 1-2: controles; carril 3: sin muestra (blanco); carriles 4-5: muestras tratadas con FTA<sup>®</sup>; carriles 6-9: muestras tratadas con FTA<sup>®</sup> modificado).

**40 Descripción detallada de la invención**

En líneas generales, la presente invención proporciona compuestos y procedimientos para utilizar los compuestos, como los de la tecnología FTA<sup>®</sup> (Whatman, Inc.), para la conservación y el almacenaje de ácidos nucleicos (AN) procedentes de sangre u otras muestras biológicas sobre el medio de cualquier sistema de purificación de ácidos nucleicos con una base sólida (incluyendo los kits comerciales y los dispositivos de utilización interna). Por ejemplo, en una realización, este resultado se logra aplicando y secando productos químicos de FTA<sup>®</sup> sobre el medio en fase sólida después de cargar la muestra o después de una etapa concreta de un procedimiento de extracción de ácidos nucleicos.

La presente invención también proporciona compuestos y procedimientos para aumentar una cantidad de AN conservado en cantidades en exceso que se consideran óptimas para los sistemas de purificación de ácidos nucleicos. No limita la tecnología FTA<sup>®</sup> a los intervalos de tiempo y temperatura del procedimiento de conservación de muestras dado.

El procedimiento es rápido, requiere sólo unos pocos tampones y una sencilla etapa de elución con calor para recuperar el ADN. El procedimiento no se basa en procedimientos con sales caotrópicas, de intercambio iónico ni de extracción por afinidad.

En algunos casos, el medio en fase sólida puede atrapar físicamente al retenido. Sin embargo, como alternativa, el retenido puede interactuar químicamente con el medio. Es posible que se produzca una combinación de adsorción y absorción.

El presente procedimiento proporciona un procedimiento rápido, simplificado y barato para almacenar y, posteriormente, aislar ácidos nucleicos utilizando una amplia gama de medios en fase sólida disponibles en el mercado, que hasta la fecha no se han considerado apropiados para la conservación. La técnica no requiere un gran trabajo manual ni depende de técnicas y no utiliza productos químicos peligrosos. Los ácidos nucleicos producidos según la presente invención son capaces de múltiples procesamientos corriente abajo.

## ES 2 320 875 T3

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para aislar y almacenar ácidos nucleicos, que comprende:

- 5 a. proporcionar un medio en fase sólida;
- b. aplicar una muestra que comprenda células que contienen ácidos nucleicos al medio en fase sólida;
- c. retener las células con el medio en fase sólida como un retenido celular y eliminar los contaminantes;
- 10 d. poner en contacto el retenido celular con una disolución que comprende un tensioactivo o detergente;
- e. lisar el retenido celular para formar un lisado celular mientras se retiene el lisado celular en el medio, comprendiendo el lisado celular los ácidos nucleicos;
- 15 f. secar el medio en fase sólida con el lisado celular que comprende los ácidos nucleicos; y
- g. almacenar el medio en fase sólida secado con los ácidos nucleicos.

En una realización preferida, el procedimiento comprende además:

- 20 h. eluir los ácidos nucleicos del medio sólido.

En una realización preferida, antes de la etapa de secado f, el medio en fase sólida con los ácidos nucleicos se lava para eliminar los contaminantes mientras se retienen los ácidos nucleicos en el medio en fase sólida.

En otra realización preferida, antes de la etapa de elución h, el medio en fase sólida con los ácidos nucleicos se lava para eliminar los contaminantes mientras se retienen los ácidos nucleicos en el medio en fase sólida.

30 En una realización preferida, el medio en fase sólida con los ácidos nucleicos de la etapa g se mantiene sustancialmente a una temperatura de 5°C a 40°C.

Preferiblemente, la conservación de los ácidos nucleicos en la etapa g tiene una duración de al menos una semana. Más preferiblemente, tiene una duración de al menos un mes; aún más preferiblemente, tiene una duración de al menos tres meses. Todavía más preferiblemente, la conservación de los ácidos nucleicos en la etapa g tiene una duración de al menos cinco meses.

En una realización preferida, el medio en fase sólida comprende un filtro que comprende una pluralidad de fibras. Preferiblemente, el filtro tiene una estructura sustancialmente desordenada. Preferiblemente, los diámetros de las fibras están en el intervalo de 1  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, el filtro comprende uno o más poros que tienen un tamaño de poro de aproximadamente 0,2  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2,7  $\mu\text{m}$ .

En una realización preferida, el medio en fase sólida comprende:

- 45 a. un medio en fase sólida de vidrio o con una base de sílice;
- b. un medio en fase sólida con una base de plástico; o
- c. un medio en fase sólida con una base de celulosa.

Preferiblemente, el medio en fase sólida se selecciona de uno de los siguientes: vidrio, fibra de vidrio, microfibras de vidrio, sílice, gel de sílice, óxido de sílice, celulosa, nitrocelulosa, carboximetilcelulosa, poliéster, poliamida, polímeros de carbohidratos, polipropileno, politetrafluoroetileno, poli(fluoruro de vinilidino), lana o cerámica porosa.

55 En una realización preferida, el tensioactivo o detergente de la etapa d comprende un tensioactivo o detergente aniónico, preferiblemente dodecilsulfato de sodio, aún más preferiblemente en el que la concentración de dodecilsulfato de sodio está entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 5% en peso/volumen (p/v).

60 En otra realización preferida, la disolución de la etapa d comprende además:

- ii. una base débil; y
- iii. un agente quelante.

65

## ES 2 320 875 T3

Preferiblemente, además de lo anterior, la disolución de la etapa d comprende además:

iv. ácido úrico o una sal urato.

5 En una realización preferida, el retenido celular comprende material condensado procedente del núcleo.

En una realización particularmente preferida, el retenido celular comprende células enteras intactas, y la etapa e comprende:

10 i. romper las células enteras intactas retenidas por el medio en fase sólida para dejar el material condensado procedente del núcleo retenido por el medio; y

15 ii. lisar el material condensado procedente del núcleo para formar el lisado celular que contiene los ácidos nucleicos.

20 En una realización preferida, la composición y las dimensiones del medio en fase sólida se seleccionan de forma que los ácidos nucleicos son retenidos por el medio en la etapa e sustancialmente mediante interacciones no iónicas, preferiblemente interacciones dipolo-dipolo, interacciones dipolo-dipolo inducido, fuerzas de dispersión o enlaces de hidrógeno.

25 Preferiblemente, la etapa de retención e se define también como el retraso físico del movimiento de los ácidos nucleicos a través del medio en fase sólida.

Preferiblemente, el medio en fase sólida es capaz de retener las células y los ácidos nucleicos en ausencia de un caotropo.

30 Preferiblemente, la etapa b comprende además concentrar las células en el medio en fase sólida.

En una realización preferida, los ácidos nucleicos se calientan hasta una temperatura elevada de 65°C a 125°C antes de la etapa de elución h, y más preferiblemente hasta una temperatura elevada de 80°C a 95°C antes de la etapa de elución h.

35 Preferiblemente, las células se seleccionan del grupo que consiste en leucocitos, células epiteliales, células bucales, células en cultivos de tejidos, semen, células vaginales, células del tracto urinario, células vegetales, células bacterianas y células colorrectales.

40 En una realización particularmente preferida, las células son leucocitos y el procedimiento comprende además aplicar sangre completa al medio en fase sólida, opcionalmente lisando los eritrocitos que se encuentren presentes, opcionalmente lavando el medio en fase sólida para eliminar los contaminantes, y obtener el lisado celular de leucocitos.

45 Más preferiblemente, la muestra comprende células sanguíneas, y las dimensiones del medio en fase sólida se seleccionan de manera que la mayoría de las células retenidas en la etapa c comprendan leucocitos.

En una realización preferida, los ácidos nucleicos comprenden ADN o ARN, más preferiblemente ADN genómico.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para aislar y almacenar ácidos nucleicos, que comprende:

a. proporcionar un medio en fase sólida;

b. aplicar una muestra que comprenda células que contienen ácidos nucleicos al medio en fase sólida;

55 c. retener las células con el medio en fase sólida como un retenido celular y eliminar los contaminantes;

d. poner en contacto el retenido celular con una disolución que comprende:

60 i. una base débil;

ii. un agente quelante; y

iii. un tensioactivo o detergente aniónico;

65 e. lisar el retenido celular para formar un lisado celular mientras se retiene el lisado celular en el medio, comprendiendo el lisado celular los ácidos nucleicos;

f. secar el medio en fase sólida con el lisado celular que comprende los ácidos nucleicos;

## ES 2 320 875 T3

g. almacenar el medio en fase sólida secado con los ácidos nucleicos; y

h. eluir los ácidos nucleicos del medio en fase sólida.

5

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para aislar y almacenar ADN, que comprende:

a. proporcionar un medio en fase sólida, en el que el medio en fase sólida comprende un filtro que comprende una pluralidad de fibras, en el que las fibras comprenden:

10

i. fibras de vidrio o con una base de sílice;

ii. fibras con una base de plástico; o

15

iii. fibras de nitrocelulosa o con una base de celulosa;

b. aplicar una muestra que comprenda células que contienen ADN al medio en fase sólida;

c. retener las células con el medio en fase sólida como un retenido celular y eliminar los contaminantes;

20

d. poner en contacto el retenido celular con una disolución que comprende:

i. una base débil;

25

ii. un agente quelante; y

iii. un tensioactivo o detergente aniónico;

30

e. lisar el retenido celular para formar un lisado celular mientras se retiene el lisado celular en el medio, conteniendo el lisado celular el ADN;

f. secar el medio en fase sólida con el lisado celular que comprende el ADN;

35

g. almacenar el medio en fase sólida secado con el ADN a una temperatura de 5°C a 40°C;

h. calentar el ADN con el medio en fase sólida hasta una temperatura elevada de 65°C a 125°C; y

i. eluir el ADN del medio en fase sólida.

40

Se prefiere que el retenido se lise mientras se mantiene atrapado dentro del medio en fase sólida. Sin embargo, debe entenderse que el procedimiento según la presente invención incluye también una realización en la que sustancialmente todo o parte del retenido se lista mientras se está retenido por el medio en fase sólida, pero no atrapado en su interior, incluyendo sobre la superficie del medio.

45

En un aspecto de la presente invención, el retenido celular comprende células enteras intactas así como, o en lugar de éstas, residuos celulares. De forma ventajosa, las células enteras intactas pueden tratarse, mientras son retenidas por el medio en fase sólida, mediante la aplicación de un detergente al medio. Puede utilizarse cualquier detergente, con la condición de que produzca el efecto de romper o “pelar” la membrana celular. El material nuclear condensado o los ácidos nucleicos son retenidos por el medio. Preferiblemente, el detergente se selecciona de dodecilsulfato de sodio (en particular 0,5%-5% de peso en volumen de SDS), laurilsarcosinato de sodio (en particular 0,5%-5% en p/v de SLS) u otros detergentes disponibles en el mercado, tal como TWEEN™ 20 (en particular 0,5%-5% de volumen en volumen de TWEEN™ 20), laurildodecilsulfato (en particular 0,5%-5% de p/v de LDS) o TRITON™, por ejemplo, TRITON™ X-100 (en particular 0,5%-5% de v/v de TRITON™). Como alternativa puede utilizarse 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propansulfonato (“CHAPS”). La cantidad de detergente empleado será suficiente para lisar las membranas celulares, pero no tanto como para desnaturalizar el ADN. Las cantidades adecuadas son, en general, del 0,1% al 10% en peso (p/v) o en volumen (v/v), y preferiblemente del 0,2% al 7% en p/v o en v/v, y más preferiblemente del 0,5% al 5% en p/v o en v/v de SDS, TWEEN™ o TRITON™. Lo más preferiblemente, el detergente es SDS del 0,5% al 5% en p/v.

60

Aunque es preferible la adición del detergente al retenido, el presente procedimiento puede realizarse sin la adición de un detergente utilizando otros agentes lisantes conocidos, tales como disoluciones no isotónicas de bajo contenido en sales, tales como etanol o sacarosa. Sin embargo, la aplicación de un detergente al retenido mientras el retenido está retenido por el medio en fase sólida aumenta el rendimiento y la pureza del producto de ADN.

65

Además de romper las células enteras intactas, el detergente también actúa para eliminar las proteínas y el hem mediante lavado que pudieran ser retenidos por el medio en fase sólida.

## ES 2 320 875 T3

Con respecto a la lisis de los núcleos celulares, en un aspecto de la invención los núcleos se lisan, se hacen explotar o se rompen para formar un lisado que contiene ácidos nucleicos mediante la adición de un tampón no isotónico de bajo contenido en sales, tal como un tampón hipotónico. Preferiblemente, el tampón de bajo contenido en sales es Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6-8 (“AE”); Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8 (“TE<sup>-1</sup>”); o agua.

5 Para un litro:

- se miden 500 ml de agua purificada,

10 - se añaden 10,0 ml (9,9-1,1 ml) de Tris 1 M (Whatman WB420003),

- se añaden 0,596 g (0,595-0,597 g) de KCl (Whatman WB410015),

15 - se añaden 0,29 g (0,28-0,30 g) de MgCl<sub>2</sub> (Whatman WB410014),

- se mezcla para disolver,

- se añaden 10,0 ml de NFB (como alternativa puede utilizarse suero de ternero fetal) y se mezcla,

20 - se añaden 0,5 g (0,49-0,51 g) de metabisulfito de Na (Whatman WB410055) y se mezcla,

- se añade agua hasta 1000 ml y se mezcla bien,

25 - se filtra la disolución de forma aséptica a través de un filtro de 0,2 μm en una cabina de seguridad de clase II,

- se conserva a temperatura ambiente.

30 Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6-8 (“AE”); Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8 (“TE<sup>-1</sup>”); o agua. Otras disoluciones de lisis adecuadas incluyen cualquier disolución que contenga detergente, en la que el detergente puede ser catiónico, aniónico o neutro. También pueden utilizarse disoluciones que contengan caotropos, preferiblemente tampones. La disolución de lisis lisa o hace estallar el material nuclear condensado para liberar los ácidos nucleicos. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que el lisado de los núcleos para formar un lisado que contenga ácidos nucleicos también puede lograrse por otros procedimientos, por ejemplo, mediante calentamiento.

35 Como alternativa, después de la lisis el retenido comprende ácidos nucleicos liberados.

40 La lisis, tanto de células como de núcleos, y la eliminación de los materiales contaminantes procedentes de la lisis puede realizarse de forma secuencial, tal como la lisis de las células seguida de la eliminación de los materiales o contenidos que no son ácidos nucleicos, o la lisis de los núcleos seguida de la eliminación de los materiales que no son ácidos nucleicos. Como alternativa, las etapas de lisis y de eliminación pueden producirse de modo simultáneo o pueden solaparse.

45 La composición química de la disolución, que comprende preferiblemente un tensioactivo o detergente, y más preferiblemente comprende una base débil, un agente quelante, y un tensioactivo o detergente aniónico, facilita la lisis de las células enteras y la posterior captura de los ácidos nucleicos liberados. La composición química ayuda además en su conservación a largo plazo. La composición de la disolución es tal que la purificación rápida de los ácidos nucleicos capturados puede realizarse. Es decir, la disolución, en sí misma, permite la liberación de los ácidos nucleicos mediante una etapa de elución, proporcionando, con ello, una fracción de ácidos nucleicos soluble. Como se analizará más a fondo a continuación y se ejemplifica en los siguientes ejemplos, la presente invención es más eficaz con respecto a la elución del ADN total procedente de una muestra. Sin embargo, los ácidos nucleicos y las poblaciones de ácidos nucleicos pueden eluirse de manera específica.

50 En las realizaciones que comprenden una membrana de filtro, se prefiere que la disolución comprenda una composición química que sea capaz de adsorberse a la membrana de filtro anteriormente mencionada. La composición de la disolución es preferiblemente como se ha descrito y está relacionada con la indicada en las patentes de EEUU 5.756.126, 5.807.527 y 5.496.562.

60 En una realización, la disolución preferida incluye un agente desnaturizante de proteínas y una trampa de radicales libres. El reactivo desnaturizante puede ser un tensioactivo que desnaturalice las proteínas y la mayoría de los organismos patógenos en la muestra. Los detergentes aniónicos son ejemplos de estos reactivos desnaturizantes, y pueden utilizarse por sí solos. La disolución química puede incluir una base débil, un agente quelante, y el tensioactivo o detergente aniónico, y opcionalmente ácido úrico y una sal urato como se analiza en detalle en la patente de EEUU 5.807.527 mencionada anteriormente. Más preferiblemente, la base débil puede ser un Tris, tris-hidroximetilmetano, como base libre o como carbonato, y el agente quelante puede ser EDTA, y el detergente aniónico puede ser dodecilsulfato de sodio. Otras disoluciones que tengan una función similar también pueden utilizarse según la presente invención.

## ES 2 320 875 T3

En una realización preferida, la disolución utilizada en este aspecto de esta invención comprende lo siguiente:

- (i) una base débil monovalente (tal como "Tris", tris-hidroximetilmetano, como base libre o como carbonato);
- (ii) un agente quelante (tal como EDTA, ácido etilendiaminotetraacético); y
- (iii) un detergente aniónico (tal como SDS, dodecilsulfato de sodio); y opcionalmente
- (iv) ácido úrico o una sal urato.

Un ejemplo de una realización preferida de la disolución es una disolución FTA<sup>®</sup> (Whatman, Inc.) que comprende Tris, EDTA, SDS y ácido úrico.

Aunque no es vital para la conservación a corto plazo del ADN sobre el medio sólido, se ha descubierto que el uso de ácido úrico o una sal urato según esta invención resulta particularmente importante para la conservación a largo plazo de ADN, puesto que este componente realiza una serie de funciones, incluyendo actuar como una trampa de "radicales libres" y un ácido débil. Como trampa de radicales libres acepta preferentemente radicales libres que, de otra forma, dañarían la base de guanina en el ADN.

Como se ha descrito previamente, la composición puede incluir una base, opcionalmente una base débil monovalente, para imponer un pH alcalino entre 8,0 y 9,5 a la sangre que se coloca sobre la matriz. Esto se hace para asegurar la acción apropiada del agente quelante en la unión de metales divalentes. También es para prevenir la acción de las nucleasas ácidas que no son tan dependientes de metales divalentes. La base puede ser una base orgánica débil, tal como Tris. Como alternativa, puede utilizarse una base inorgánica, tal como un carbonato o bicarbonato de metal alcalino, por ejemplo carbonato o bicarbonato de litio o potasio.

El agente quelante es preferiblemente un agente quelante fuerte, tal como EDTA; sin embargo en el mercado está disponible una amplia gama de agentes quelantes fuertes adecuados. La función del agente quelante es unir los iones de metales divalentes, magnesio y calcio, y también unir los iones de metales de transición, en particular hierro. Se sabe que el calcio y el magnesio estimulan la degradación del ADN actuando como cofactores para enzimas. Los iones metálicos, como el hierro, que sufren una oxidación y una reducción con facilidad, también dañan los ácidos nucleicos mediante la producción de radicales libres.

El tensioactivo o detergente aniónico se incluye en la composición de este aspecto de la invención como agente desnaturizante principal. El detergente aniónico puede utilizarse por sí solo o en combinación con la base libre, el agente quelante y, opcionalmente, el ácido úrico o una sal urato.

Cualquier detergente aniónico fuerte que se una y desnaturalice las proteínas resulta adecuado y, además del SDS mencionado anteriormente, también pueden utilizarse otros detergentes, como el laurilsarcosinato de sodio. Este detergente aniónico provoca que la mayoría de los patógenos se inactiven debido a la destrucción no específica de la estructura secundaria de sus proteínas de la envuelta, sus proteínas internas y cualquier membrana de la que puedan depender. Existe excepciones, puesto que el detergente aniónico no inactiva las esporas bacterianas más resistentes, ni inactiva algunos viriones entéricos extremadamente estables. Sin embargo, estas excepciones son agentes que es probable que ya hayan sido trasferidos mediante el contacto normal y en la actualidad no resulta preocupante que estos agentes constituyan un riesgo de la sangre.

El detergente aniónico puede seleccionarse del grupo que incluye dodecilsulfato de sodio (SDS). El SDS puede obtenerse en diversas formas, tal como la forma C<sub>12</sub> y el laurilsulfato. Pueden utilizarse otros detergentes aniónicos, tales como arilsulfonatos de alquilo, tetradecilsulfato de sodio, sulfatos de alcoholes de cadena larga (grasos), 2-etilhexisulfato de sodio, sulfatos de olefinas, sulfosuccinatos o ésteres fosfato. El detergente aniónico, tal como SDS, puede aplicarse a la matriz de filtro en diversas concentraciones.

En general, puede utilizarse SDS al 0,1%-10% según la presente invención. Por ejemplo, unas concentraciones mayores de SDS, de hasta 10%, que no puedan incluirse en un cóctel de FTA<sup>®</sup>, como se indica en las patentes analizadas anteriormente, proporcionan una mayor concentración de micelas críticas, lo cual genera una mayor capacidad de lisis y, por tanto, un mayor rendimiento de los ácidos nucleicos diana, según se demuestra en la sección de ejemplos que aparece a continuación. Una concentración de SDS preferida se logra en el intervalo de concentración de SDS al 0,5%-5% para microfibras de vidrio para enriquecer y purificar diferentes poblaciones de plásmidos directamente a partir de cultivos líquidos, tales como en una columna cargada, una columna de filtro o un formato de múltiples pocillos, siendo dichos formatos muy conocidos en la técnica.

Los materiales adecuados para los medios en fase sólida incluyen fibra de vidrio o cualquier medio en fase sólida con una base de sílice o derivado de éste, y medios en fase sólida con una base de plástico, por ejemplo medios basados en poliéster y polipropileno.

Ciertos materiales, incluyendo microfibras de vidrio, polietileno, poliéster o polipropileno, permiten aislar ácidos nucleicos en ausencia de un caotrope. Se prefiere que la composición y las dimensiones se seleccionen de forma que el

## ES 2 320 875 T3

medio en fase sólida sea capaz de retener las células y los ácidos nucleicos sustancialmente en ausencia de un caotropo. El inventor ha descubierto, de forma sorprendente, que con ciertos materiales de filtro, incluyendo microfibras de vidrio, polietileno, poliéster o polipropileno tejido, es posible aislar ácidos nucleicos en ausencia de un caotropo. Esto contradice el conocimiento convencional de los expertos en la técnica de la invención.

Preferiblemente, el medio en fase sólida tiene una profundidad suficientemente grande como para atrapar las células y los ácidos nucleicos dentro del medio sin pérdida sustancial. El presente procedimiento puede ajustarse a escala, de manera que pueda utilizarse cualquier área superficial del filtro y, por tanto, cualquier diámetro de filtro.

El medio en fase sólida de la presente invención puede ser capaz de liberar el material genético inmovilizado sobre él mediante elución con calor. En una realización preferida, esta elución con calor se logra mediante la exposición del medio con el material genético almacenado sobre él a una disolución de elución o a agua calentados, estando la disolución de elución o el agua exentos de nucleasas. En realizaciones preferidas, el medio en fase sólida es poroso y presenta una vasta área superficial sobre la cual se unen los ácidos nucleicos.

El medio en fase sólida de la invención es tal que, en cualquier momento de un régimen de conservación, permite la purificación rápida de los ácidos nucleicos inmovilizados. Los ácidos nucleicos inmovilizados se recogen en forma de una fracción soluble después de un proceso de elución simplificado, durante el cual los ácidos nucleicos inmovilizados se liberan del medio en fase sólida de la invención. El medio en fase sólida de la invención produce ácidos nucleicos con una calidad suficiente que no perjudique los análisis corriente abajo, tal como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la reacción en cadena de ligasa (LCR), la amplificación mediada por transcripción (TMA), la PCR iniciada por transcriptasa inversa, o las técnicas de hibridación, secuenciación, etc. de ADN o ARN.

En una realización, el medio en fase sólida comprende un filtro o una membrana de filtro. Si el filtro es fibroso, la disolución anterior preferiblemente reviste las fibras del filtro, en lugar de revestir simplemente la superficie del filtro. Como alternativa, la disolución puede impregnar las fibras.

Los términos y expresiones “filtro”, “membrana de filtro” o “matriz”, tal como se emplean en la presente, significan un material poroso o un medio de filtro formados, total o parcialmente, de vidrio, sílice, gel de sílice, óxido de sílice o cuarzo, incluyendo sus fibras o sus derivados, pero no se limitan a estos materiales. Otros materiales de la que puede estar compuesta la membrana de filtro también incluyen, pero no se limitan a una base de celulosa (por ejemplo, celulosa, nitrocelulosa, carboximetilcelulosa), polímeros hidrófilos que incluyen polímeros hidrófilos sintéticos (por ejemplo, poliéster, poliamida, polímero de carbohidratos), politetrafluoroetileno, cerámicas porosas, Sephacryl S-500, lana y tierra de diatomeas (óxido de sílice). Como alternativa, uno o más filtros pueden triturarse, romperse, homogeneizarse o similares, y utilizarse para cargar un tubo, una columna o una placa de múltiples pocillos. En este caso, el material de filtro puede utilizarse para formar un lodo o una suspensión, por ejemplo en un tampón o en otra disolución.

Los ejemplos preferidos de los medios en fase sólida para ser utilizados en la presente invención incluyen, pero no se limitan a medio de fibra de vidrio GF/L-6<sup>TM</sup> (Whatman, Inc.), medio de fibra de vidrio DBS-1000<sup>TM</sup> (Whatman, Inc.), columnas GenFast (Whatman, Inc.), medio PVDF (Whatman, Inc.), columnas QiaAmp<sup>®</sup> (Qiagen GmbH), columnas Wizard<sup>®</sup> (Promega), y columnas Generation<sup>®</sup> (Genra). Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a membranas de nitrocelulosa (Whatman, Inc.; Toronto; Schleicher & Schuell), membranas de nitrato de celulosa (Arbor Tech), membranas de acetato de celulosa (Toronto), y membranas de nailon (Whatman, Inc.; Standard and SP; Osmonics). En la técnica se conocen otros ejemplos, por ejemplo, el documento WO 00/21973, la patente de EEUU 5.234.809, y la patente europea n° 0.389.063.

Otras realizaciones preferidas incluyen, pero no se limitan a kits de preparación de plásmidos, en formato de columna o en formato de placas de 96 pocillos de alto rendimiento (al vacío o centrifugación), que comprenden una amplia gama de materiales. Los ejemplos de kits de preparación de plásmidos de alto rendimiento disponibles en el mercado incluyen, pero no se limitan a matrices de unión a ADN (kit DNace 96 Plasmid (Bioline); Perfectprep-96 Spin (Eppendorf Scientific, Inc.)), membranas de sílice (kit Aurum Plasmid 96 (Bio-Rad Laboratories); Nucleospin Multi-96 (Clontech Laboratories, Inc.); Perfectprep 96 Vac DB (Eppendorf Scientific, Inc.), sistema de purificación de ADN Wizard SV 96 Plasmid (Promega Corp.)), membranas de gel de sílice (kit QIAprep 96 Turbo Miniprep (Qiagen)); matrices de sílice (96-pocillos prep Express (Qbiogene); kit RPM Turbo 96 (Qbiogene)); y membranas de intercambio aniónico (kit QIAwell 96 Ultra Plasmid (Qiagen)).

Puede utilizarse un dispositivo de preparación de plásmidos automático para facilitar el rápido aislamiento de los ácidos nucleicos antes de la conservación, o para facilitar la elución después de la conservación, además de reducir la posibilidad de la contaminación de la muestra. Los ejemplos de dispositivos de preparación de plásmidos automáticos incluyen, pero no se limitan a AutoGenprep 960 (AutoGen, Inc.), plataforma de procesos PERFECTprep (Brinkmann), RevPrep (GeneMachines), Miniprep Workstation (Hudson), AutoPrep-12 (ThennoHybaid), Miniprep 24 (MacConnell Research), RoboPrep 2500/3500/4800 (MWG Biotech, Inc.).

De forma similar, el equipo y las técnicas de elución o aislamiento automáticas de alto rendimiento pueden utilizarse para aislar ADN genómico y ARN.

## ES 2 320 875 T3

Preferiblemente, el medio utilizado para la membrana de filtro de la invención incluye cualquier material que no inhiba la disolución descrita anteriormente y que no inhiba la conservación, la elución y el posterior análisis del material que contiene ácidos nucleicos añadido a él. Esto incluye matrices secas planas o una matriz combinada con un ligante. Los ejemplos de ligantes incluyen, pero no se limitan a polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona (PVP) y otros alcoholes de cadena larga.

Se prefiere que la membrana de filtro de la invención sea de naturaleza porosa para facilitar la inmovilización de los ácidos nucleicos. En una realización preferida, el filtro comprende una pluralidad de fibras y tiene una estructura sustancialmente desordenada. Preferiblemente, los diámetros de las fibras están en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ . Preferiblemente, la matriz de fibras comprende uno o más poros que tienen un tamaño de poro de aproximadamente 0,2  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2,7  $\mu\text{m}$ .

En una realización preferida, la composición y las dimensiones del filtro se seleccionan de forma que los ácidos nucleicos son retenidos por el filtro sustancialmente en ausencia de interacción iónica, más preferiblemente mediante el retraso físico del movimiento de los ácidos nucleicos a través del filtro.

En una realización preferida, la composición y las dimensiones del filtro se seleccionan de forma que los ácidos nucleicos son retenidos por el filtro en forma de una red.

Los “materiales nucleicos” y los “materiales procedentes del núcleo” incluyen la envuelta nuclear y los contenidos del núcleo, incluyendo ADN genómico (“ADNg”) o ADN plasmídico. Los “contenidos del núcleo que no son ácidos nucleicos” incluyen los componentes de la envuelta nuclear y cualquier otra proteína o sustancia del núcleo que no sea ácidos nucleicos.

Los “ácidos nucleicos” incluyen ácidos desoxirribonucleicos (ADN) y ácidos ribonucleicos (ARN) de diversos tipos. El “material genético” comprende ADN genómico (“ADNg”), que es un tipo de ADN y codifica información genética.

Se prefiere que el ácido nucleico comprenda un polinucleótido.

Aunque el procedimiento es aplicable a cualquier ácido nucleico, se prefiere que el ácido nucleico comprenda ADN, en especial ADN genómico. Aunque en este procedimiento preferido se indica que el ADN genómico es el compuesto diana deseado, es posible utilizar el procedimiento de la presente invención para aislar ARN a partir de una muestra que contenga ARN.

Aparte de las etapas de elución descritas a continuación, la temperatura para las etapas que no implican elución es normalmente la temperatura ambiente, de forma típica en el intervalo de 5°C a 40°C, preferiblemente en el intervalo de 10°C a 40°C, más preferiblemente en el intervalo de 15°C a 30°C.

En una realización preferida, la etapa de conservación es a temperatura y humedad ambientes. De forma típica, la temperatura está en el intervalo de 5°C a 40°C, preferiblemente en el intervalo de 10°C a 40°C, más preferiblemente en el intervalo de 15°C a 30°C.

La conservación de los ácidos nucleicos con el medio en fase sólida secado puede mantenerse durante días, semanas o meses. En una realización preferida, los ácidos nucleicos son capaces de almacenarse durante al menos una semana con el medio en fase sólida secado. Más preferiblemente, los ácidos nucleicos pueden almacenarse durante un mes, aún más preferiblemente durante tres meses, y todavía más preferiblemente durante cinco meses.

También se prefiere que la composición y las dimensiones del medio en fase sólida se seleccionen de forma que los ácidos nucleicos sean capaces de ser eluidos a un pH de pH 5 a 11, o preferiblemente de pH 5,8 a 10. Esto resulta ventajoso en el presente procedimiento, porque la elución del producto de los ácidos nucleicos en un medio más alcalino puede degradar potencialmente el producto. Por consiguiente, un pH preferido para la elución es de 7 a 9.

Cualquier disolución a cualquier pH que sea adecuado para eluir los ácidos nucleicos desde el presente filtro puede funcionar. Las disoluciones de elución preferidas incluyen hidróxido de sodio (NaOH) (de 1 mM a 1 M), acetato de sodio (acetato de Na) (de 1 mM a 1M), ácido 2-[N-morfolino]etansulfónico (MES) 10 mM (pH 5,6), ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propansulfónico (CAPS) 10 mM (pH 10,4), TE (Tris HCl 10 mM (pH 8) + EDTA 1 mM), TE<sup>-1</sup> (Tris 10 mM; EDTA 0,1 mM; pH 8), dodecilsulfato de sodio (SDS) (en particular SDS al 0,5%), TWEEN<sup>TM</sup> 20 (en particular TWEEN<sup>TM</sup> 20 al 1%), LDS (en particular laurildodecilsulfato al 1% (LDS)) o TRITON<sup>TM</sup> (en particular TRITON<sup>TM</sup> al 1%), agua y Tris 10 mM. En aplicaciones típicas, estas disoluciones producen aproximadamente la misma cantidad de ácidos nucleicos. Los rendimientos totales de los ácidos nucleicos son mayores cuando se eluyen en un volumen alto de disolución de elución.

La elución de los ácidos nucleicos, en otras palabras, la liberación de los ácidos nucleicos del medio en fase sólida, puede realizarse de varias formas. La eficacia de la elución puede mejorarse introduciendo energía al sistema durante una etapa de incubación para liberar los ácidos nucleicos antes de la elución. Esto puede realizarse en forma de energía física (por ejemplo, mediante agitación) o energía térmica. El tiempo de incubación o liberación puede disminuirse aumentando la cantidad de energía introducida al sistema.

## ES 2 320 875 T3

Es posible eluir los ácidos nucleicos del medio en fase sólida a temperatura ambiente, pero la eficacia de la elución puede mejorarse introduciendo energía al sistema durante la etapa de incubación para liberar los ácidos nucleicos antes de la elución. Esto puede realizarse en forma de energía térmica. Preferiblemente, la energía térmica se introduce en el sistema calentando los ácidos nucleicos hasta una temperatura elevada durante un tiempo predeterminado, mientras son retenidos por el medio en fase sólida, antes de la elución, pero no a una temperatura lo suficientemente alta o durante un tiempo tan largo que los dañe. Más preferiblemente, los ácidos nucleicos se calientan hasta una temperatura elevada en el intervalo de 40°C a 125°C, aún más preferiblemente en el intervalo de 80°C a 95°C. Lo más preferiblemente, los ácidos nucleicos se calientan hasta una temperatura elevada de aproximadamente 90°C, de forma ventajosa durante aproximadamente 10 minutos.

Como alternativa, puede utilizarse un tampón de elución ya ha sido calentado hasta una temperatura elevada en lugar de la elución a una temperatura elevada o, más preferiblemente, además de ésta.

En una realización preferida, la etapa de elución descrita anteriormente se realiza como sigue:

- (a) se calienta un tampón de elución hasta una temperatura elevada de 40°C a 125°C;
- (b) se añade el tampón de elución al medio en fase sólida;
- (c) se calienta el medio en fase sólida y el tampón de elución hasta una temperatura elevada de 40°C a 125°C;
- (d) se eluyen los ácidos nucleicos; y
- (e) se repiten las etapas (a)-(d) al menos una vez.

Más preferiblemente, la temperatura elevada está en el intervalo de 80°C a 95°C. Más preferiblemente, los ácidos nucleicos se calientan hasta una temperatura elevada de aproximadamente 90°C, de forma ventajosa durante aproximadamente 10 minutos.

Debe advertirse que se producirá un material predominantemente monocatenario a partir del presente sistema. Sin embargo, la proporción entre ADN bicatenario a monocatenario depende de las condiciones experimentales y puede ser controlada por éstas. Mediante la modificación del régimen de incubación utilizando los parámetros de tiempo y temperatura se altera esta proporción, y una menor temperatura de elución a lo largo de un periodo de tiempo más largo producirá una mayor proporción de ADN bicatenario. Una mayor temperatura de elución a lo largo de un periodo de tiempo más corto también producirá una mayor proporción de ADN bicatenario.

Después de que los ácidos nucleicos hayan sido calentados hasta una temperatura elevada mientras están retenidos por el filtro, no resulta necesario mantener los ácidos nucleicos a la temperatura elevada durante la elución. La elución, en sí misma, puede realizarse a cualquier temperatura. Para facilitar el procesamiento, se prefiere que cuando los ácidos nucleicos se calientan hasta una temperatura elevada mientras están retenidos por el filtro, la elución se realice a una temperatura menor que la temperatura elevada. Esto es porque cuando se detiene el calentamiento, la temperatura de los ácidos nucleicos disminuirá a lo largo del tiempo y también disminuirá como resultado de la aplicación al filtro de cualquier disolución de elución a temperatura ambiente.

Se prefiere que el procedimiento se realice sustancialmente en ausencia de un caotropeo.

En muchos casos, las muestras sanguíneas se aplican a una columna que comprende un medio en fase sólida. En una realización preferida, las muestras sanguíneas se tratan con una disolución de lisis de eritrocitos. Las disoluciones de lisis de eritrocitos típicas que pueden utilizarse en el procedimiento de la invención incluyen las indicadas en la tabla 1. Una disolución preferida es cloruro de amonio al 0,83% en p/v; carbonato de amonio al 0,16% en p/v; EDTA 0,1 mM. La lisis de eritrocitos no es absolutamente necesaria, puesto que el filtro permitiría que los eritrocitos intactos pasaran a través de él. Sin embargo, la inclusión de una disolución de lisis de eritrocitos conduce a un producto final más limpio.

Los reactivos adecuados para el análisis del ADN liberado pueden incluir cualquier reactivo adecuado para la PCR, el procesamiento del ADN, la digestión o subclonación del ADN o de porciones del mismo, la secuenciación de ADN, el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción ("RFLP"), el análisis de la transferencia Southern y cualquier otra aplicación corriente abajo que se encuentre, en general, dentro del alcance del análisis del ADN. Los reactivos incluyen, pero no se limitan a sondas, cebadores, enzimas de restricción, tampones, proteínas, indicadores y cualquier otro reactivo útil para el análisis del ADN.

Los reactivos adecuados para el análisis del ARN liberado, tal como ARNm, pueden incluir cualquier reactivo adecuado para la transcripción inversa, el procesamiento, el análisis de la transferencia Northern y cualquier otra aplicación corriente abajo que se encuentre, en general, dentro del alcance del análisis del ARN. Los reactivos incluyen, pero no se limitan a sondas, cebadores, enzimas de restricción, tampones, proteínas, indicadores y cualquier otro reactivo útil para el análisis del ARN.

## ES 2 320 875 T3

Se ha descubierto que el presente procedimiento mejora sustancialmente el rendimiento y la pureza del producto de los ácidos nucleicos. Además, el presente procedimiento proporciona un procedimiento rápido, simplificado y barato para la purificación de ácidos nucleicos que no necesita un gran trabajo manual ni depende de técnicas y que no utiliza productos químicos peligrosos. Los ácidos nucleicos producidos según una realización de la presente invención son capaces de múltiples procesamientos corriente abajo. Opcionalmente, los ácidos nucleicos retenidos por el filtro pueden lavarse con cualquier disolución de lavado adecuada. Preferiblemente, los ácidos nucleicos retenidos por el filtro se lavan con un tampón que tenga un pH en el intervalo de 5,8 a 10, más preferiblemente en el intervalo de 7 a 8. En particular, se prefiere un lavado con agua o con un tampón de bajo contenido en sales, tal como  $TE^{-1}$  (Tris HCl 10 mM (pH 8) con EDTA 100  $\mu$ m). La etapa de lavado puede producirse antes o al mismo tiempo que la elución. El lavado aumenta el rendimiento y la pureza del producto de los ácidos nucleicos. La etapa de lavado elimina cualquier resto de material celular o de disolución de lisis que pueda resultar problemático en el procesamiento corriente abajo.

Como alternativa, un tampón de lavado apropiado puede seleccionarse del grupo que incluye Tris/EDTA; etanol al 70%; STET (NaCl 0,1 M; Tris-Cl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0; Triton X-100 al 5%); SSC (20 x SSC = NaCl 3 M; citrato de sodio 0,3 M; pH 7,0 con NaOH); SSPE (20 x SSPE = NaCl 3 M;  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  0,2 M; EDTA 0,02 M; pH 7,4); reactivo de purificación FTA<sup>TM</sup> y similares. En particular, se prefiere un lavado con agua o con un tampón de bajo contenido en sales, tal como  $TE^{-1}$  (Tris HCl 10 mM (pH 8) con EDTA 100  $\mu$ m).

Puede realizarse una etapa de lavado, tal como con los diversos tampones indicados en la sección de ejemplos, pero no limitados a éstos, antes o después de la lisis celular. Cuando se realice la etapa de lavado después de la lisis celular, el medio en fase sólida entonces captura los ácidos nucleicos de modo físico dentro de sus intersticios. Además, puede realizarse una etapa de lavado después de la conservación justo antes de la elución.

En una realización preferida, el procedimiento incluye una etapa de lavado antes de la etapa de lisis celular para eliminar los contaminantes, tales como residuos, incluyendo residuos celulares. En otra realización preferida, el procedimiento incluye una etapa de lavado seguida de la etapa de lisis celular y anterior a la etapa de secado de la membrana en fase sólida, de forma similar para eliminar los contaminantes. En otra realización preferida, el procedimiento incluye una etapa de lavado después de la etapa de conservación y anterior a la etapa de elución.

La fuente de los ácidos nucleicos puede ser una muestra biológica que contenga células enteras. Las células enteras pueden ser, pero no se restringen a sangre, cultivos bacterianos, colonias bacterianas, células en cultivos de tejidos, saliva, orina, agua potable, plasma, muestras de excrementos, semen, muestras vaginales, esputo y muestras de células vegetales. Las muestras pueden recogerse mediante diversos medios conocidos en la técnica, transportarse al medio en fase sólida, y después aplicarse a éste. Como alternativa, el medio en fase sólida puede estar en forma de un dispositivo de toma de muestras, tal como una torunda, un material en láminas, una bola o similares, y la muestra puede obtenerse directamente de la fuente. En otras palabras, el medio en fase sólida puede estar en forma de un dispositivo que pueda arrastrar u obtener de otra forma la muestra celular de una fuente. La fuente puede ser un tubo para muestras que contenga una muestra líquida; un órgano, tal como la boca, el oído u otra parte de un ser humano o un animal; una reunión de muestras, tal como una muestra de sangre en el escenario de un crimen o similares; sangre completa o sangre con reducción de leucocitos; o diversas otras fuentes de células conocidas en la técnica científica, forense y en otras técnicas. La etapa de aplicación puede lograrse aplicando las células enteras al medio en fase sólida. Los ácidos nucleicos pueden ser de eucariotas o de procariotas y también pueden incluir ADN plasmídico.

En general, el presente procedimiento puede aplicarse de modo ventajoso a cualquier suspensión de células enteras. Las células particularmente susceptibles de ser utilizadas en el presente procedimiento incluyen células bacterianas, células de levadura, células vegetales y células de mamífero o de otro animal, tales como leucocitos, células epiteliales, células bucales, células en cultivos de tejidos, semen, células vaginales, células del tracto urinario y células colorrectales. El ADN se ha obtenido con éxito de torundas, disolución salina y colutorios de sacarosa y muestras de la capa leucocítica.

Cuando las células comprendan leucocitos, se prefiere que el procedimiento comprenda además aplicar sangre completa a la fase sólida, opcionalmente lisando los eritrocitos presentes en ella, opcionalmente lavando la fase sólida para eliminar los contaminantes y obtener el lisado celular de las células sanguíneas. La sangre completa puede ser fresca o congelada. La sangre que contenga Na/EDTA, K/EDTA y la sangre citrada producen rendimientos similares. Una muestra de 100  $\mu$ l de sangre completa produce un rendimiento de aproximadamente 2-5  $\mu$ g de ácidos nucleicos, una muestra de 500  $\mu$ l produce un rendimiento de aproximadamente 15-40  $\mu$ g de ácidos nucleicos, y una muestra de 10 ml produce un rendimiento de aproximadamente 200-400  $\mu$ g de ácidos nucleicos.

La presente invención puede encontrar utilidad en muchas áreas de la genómica. Por ejemplo, la presente invención proporciona la capacidad de eluir material genético unido para la purificación rápida del material genético para ser utilizado en una amplia variedad de medios en fase sólida disponibles en el mercado, tales como medios en fase sólida en una columna, un tubo o una placa de múltiples pocillos.

65

ES 2 320 875 T3

TABLA 1  
Disoluciones

Referencia bibliográfica	Volumen de la sangre	Volumen de la disolución de lisis	Composición	Tratamiento
5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 Millar et al. (1988), N.A.R., 16:1215		3 ml	Tris-HCl 10 mM, pH 8,2, NaCl 400 mM, EDTA 2 mM	Trat. o/n prot. K
Nelson y Krawetz (1992), Anal. Biochem., 207:197-201	1 vol.	5 vol.	Tris-HCl 17 mM, pH 7,65, NH <sub>4</sub> Cl 140 mM	37°C durante 5 min
Ramirez-Solis et al. (1992), Anal. Biochem., 201:331-335	1 ml	3 ml	NH <sub>4</sub> Cl 155 mM, NaHCO <sub>3</sub> 10 mM	4°C durante 10-15 min
Douglas et al. (1992), Anal. Biochem., 201:362-365	1 ml	1 ml de 2 x lisis de eritrocitos	1x:- sacarosa al 11%, MgCl <sub>2</sub> 10 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, Triton X-100 al 1%	sedimentación y lavado con 1 x
Linblom y Holmlund (1988), Gene Anal. Techn., 5:97-101	5 ml	10 ml	Triton X-100 al 1%, sacarosa 320 mM, Tris-HCl 1 mM, pH 7,5, MgCl <sub>2</sub> 5 mM	sedimentación/urea y fenol
	0,2-2 ml	20 ml	Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 5 mM	utilizado con carga de tipo Leukosorb
Herrmann y Frischauf (1987) en Guide to Molecular Cloning, pp. 180-183	10 ml	30 ml	NH <sub>4</sub> Cl 155 mM, NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub> 10 mM, EDTA 0,1 mM	hielo 15 min, centrifugación

## ES 2 320 875 T3

### Ejemplos

Se procesaron muestras de sangre completa humana (400-1000  $\mu$ l) utilizando las versiones original y modificada del sistema de purificación de ADN genómico de Whatman GenFast. Se aplicaron 25-50  $\mu$ l de disolución FTA<sup>®</sup> (Whatman) a cada columna después de la etapa de captura de células nucleadas y de lisis de eritrocitos. Después las columnas se dejaron a temperatura ambiente para su secado, conservación y posterior extracción de ADN.

Se aplicó el protocolo de GenFast para recuperar el ADN conservado, como se describe a continuación.

#### 10 *Diseño del estudio para los ejemplos 1-4*

- se aplicaron 0,5-1 ml de sangre completa humana fresca o congelada sobre columnas fabricadas en el laboratorio cargadas con diferentes tipos de medio de fibra de vidrio Leukoreduction (LR);

15 - se eliminaron mediante lavado la Hb y otros componentes sanguíneos no deseados junto con la disolución de lisis de eritrocitos disolución 1 de GenFast (Whatman, Inc.) [disolución 1 = cloruro de amonio 155,2 mM, carbonato de amonio 10 mM, EDTA 0,10 mM];

20 - se aplicó una disolución FTA<sup>®</sup> (Whatman, Inc.) [Tris 160 mM; EDTA 7,8 mM; SDS al 2% en p/v, ácido úrico al 0,672% en p/v] en un volumen de 25-50  $\mu$ l al medio con los leucocitos capturados sobre él (excepto si se indica lo contrario);

- las columnas se secaron a temperatura ambiente o a 37°C;

25 - las columnas se almacenaron a condiciones ambiente (temperatura y humedad ambientes) durante 1, 5 ó 20 días o durante 3,5 meses;

30 - en diferentes puntos de la conservación se aisló el ADN a partir del medio utilizando la química de GenFast (disoluciones 2, 3, 4 de GenFast) (Whatman, Inc.) [disolución 2 = laurilsulfato de sodio al 0,5% (p/v); disolución 3 = cloruro de potasio 8,0 ( $\pm$  0,1) mM, cloruro de magnesio 3,0 ( $\pm$  0,1) mM; Tris/HCl 10 ( $\pm$  0,1) mM (pH 8,0), FCS al 1% (v/v), metabisulfito de sodio al 0,05% (p/v); disolución 4 = Tris/HCl 10 mM; EDTA 1 mM];

- se evaluó la calidad y la cantidad del ADN utilizando espectrometría de UV/Vis, tinte fluorescente PicoGreen y electroforesis en gel de agarosa.

35

Los siguientes ejemplos demuestran la viabilidad de extraer hasta 78% del rendimiento de ADN esperado (8-12  $\mu$ g de ADN a partir de 500  $\mu$ l de sangre) estando hasta 75% en forma bicatenaria después de 3,5 meses de conservación de la muestra a temperatura ambiente. La estabilidad del ADN en el proceso de conservación se presenta en las figuras que muestran fotografías de las electroforesis en gel de agarosa después de 1 día (figura 1A), 5 días (figura 1B) o 20 días (figura 2) y 3,5 meses (figura 3) de conservación de la muestra.

#### Ejemplos 1 y 2

45 Se aplicó una muestra de 0,5 ml de sangre congelada (n° 1) sobre el medio de fibra de vidrio GF/L-6<sup>TM</sup> en columnas fabricadas en el laboratorio. El tiempo de conservación fue de 1 y 5 días. Los resultados aparecen en la tabla 2 y en las figuras 1A-1B.

50

TABLA 2

*Rendimiento de ADN procedente de muestras sanguíneas después de 1 día (I) y de 5 días (II) de conservación sobre el medio GF/L-6<sup>TM</sup> a temperatura ambiente, detectado mediante espectroscopia de UV/Vis*

55

I. Extracción de ADN después de un día de conservación de las muestras a temperatura ambiente				II. Extracción de ADN después de cinco días de conservación de las muestras a temperatura ambiente			
Muestra	ADN ng/ $\mu$ l	ADN extr., $\mu$ g	Rendim., % esperado	Muestra	ADN ng/ $\mu$ l	ADN extr., $\mu$ g	Rendim., % esperado

65

## ES 2 320 875 T3

1	40	10	72	5	41	10	73
2	43	10	76	6	42	10	75
3	47	11	84	7	44	11	78
Media	43,1	10,3	77,2	Media	42,1	10,1	75,5
DE	2,74	0,66	4,91	DE	1,27	0,31	2,28

Las figuras 1A y 1B muestran la calidad del ADN extraído a partir de muestras sanguíneas después de 1 día (I) (figura 1A) y 5 días (II) (figura 1B) de conservación sobre el medio GF/L-6<sup>TM</sup> a temperatura ambiente, detectado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,78% (M = patrón de peso molecular).

### Ejemplo 3

Se aplicó una muestra de 0,5 ml de sangre fresca (n° 2) sobre el medio de fibra de vidrio DBS-1000<sup>TM</sup> en una columna fabricada en el laboratorio. El tiempo de conservación fue de 20 días. Los resultados aparecen en la tabla 3 y en la figura 2.

TABLA 3

*Rendimiento de ADN procedente de muestras sanguíneas después de 20 meses de conservación sobre el medio DBS-1000<sup>TM</sup> a temperatura ambiente, detectado mediante espectroscopia de UV/Vis y PicoGreen*

Muestra	ADNbc µg/ml	ADN total µg/ml	ADNbc µg/columna	ADN total µg/columna	ADNbc % espera.	ADN total % espera.
1	8,4	14,8	2,1	3,7	16	27
2	6,8	9,8	1,7	2,4	13	18
3	10,2	12,8	2,6	3,2	19	24
5	10,1	18	2,5	4,5	19	33
Media	9	14	2	3	16	26
DE	1,41	3	0,35	0,75	2,61	5,55

La figura 2 muestra la calidad del ADN extraído a partir de muestras sanguíneas después de 20 días de conservación sobre el medio DBS-1000<sup>TM</sup> a temperatura ambiente, detectado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,78% (M = patrón de peso molecular).

### Ejemplo 4

Se aplicó una muestra de 1,0 ml de sangre fresca (n° 3) sobre el medio DBS-1000<sup>TM</sup> en una columna fabricada en el laboratorio. El tiempo de conservación fue de 3,5 meses. Los resultados aparecen en la tabla 4 y en la figura 3.

TABLA 4

*Rendimiento de ADN procedente de muestras sanguíneas después de 3,5 meses de conservación sobre el medio DBS-1000<sup>TM</sup> a temperatura ambiente, detectado mediante espectroscopia de UV/Vis y PicoGreen*

Muestra	Vol. extra. ml	ADNbc µg/ml	ADN total µg/ml	ADNbc pg/columna	ADN total µg/columna	ADN total % espera.	ADNbc % eluid.
1	0,2906	34,6	46	10	13	38	77
2	0,2907	30	64	8,7	19	53	46

## ES 2 320 875 T3

La figura 3 muestra la calidad del ADN extraído a partir de muestras sanguíneas después de 3,5 meses de conservación sobre el medio DBS-1000™ a temperatura ambiente, detectado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,78% (M = patrón de peso molecular).

Basándose en los ejemplos de la presente invención, estos resultados demuestran el uso de una realización de la presente invención para archivar AN a temperatura ambiente para posteriormente utilizar tecnologías de purificación basadas en fases sólidas. Por tanto, la presente invención permite el uso de tecnologías de purificación de AN basadas en fases sólidas para almacenar, trasladar y/o aislar los AN de forma conveniente.

10

### Ejemplo 5

*Composición de FTA® para la conservación y el aislamiento de ADN procedente de sangre utilizando columnas de 1 ml con diferentes tipos de medios de fibra de vidrio*

15

#### *Diseño del estudio*

- se aplicó 1 ml de sangre a columnas de 1 ml con dos tipos diferentes de medios de fibra de vidrio LR GF/L-6™ y DBS™ (Whatman, Inc.);

20

- se eliminaron mediante lavado la Hb y otros componentes sanguíneos no deseados con la disolución de lavado;

- se aplicó una disolución FTA® a un grupo de columnas (marcadas como GF/L-6-FTA® o DBS-FTA® a continuación); no se aplicó disolución FTA® a otro grupo de columnas (marcadas como GF/L-6™-control o DBS™-control a continuación);

25

- las columnas se almacenaron a condiciones ambiente (temperatura y humedad ambiente) durante 1 mes;

- el ADN se aisló del medio utilizando el protocolo convencional de GenFast;

30

- se evaluó la calidad y la cantidad del ADN utilizando espectrometría de UV/Vis, tinte fluorescente PicoGreen (tablas 5 y 6) y electroforesis en gel de agarosa (figura 4).

#### *Resultados*

35

La figura 4 muestra la calidad del ADN aislado después de un mes de conservación a temperatura ambiente sobre el medio GF/L-6™ y DBS™, el control frente al tratado con FTA®, detectado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,78% (M = patrón de peso molecular).

40

Los resultados presentados en la figura 4 y en las tablas 5 y 6 demuestran la excelente calidad y cantidad del ADN aislado a partir del medio tratado con FTA®. La proporción de DO fue de 1,8, y aproximadamente 80% del ADN se encontraba en forma bicatenaria (bc). El ADN aislado a partir del medio control no tratado con medio se encontraba significativamente deteriorado. La proporción de DO fue de 1,5-1,2, y menos de 20% se encontraba en forma bc. La cantidad de ADN aislado a partir de las muestras control era 3-4 veces menor que el aislado a partir de las columnas tratadas con FTA®.

45

TABLA 5

*Rendimiento de ADN procedente de 1 ml de sangre después de un mes de conservación sobre el medio GF/L-6™ (tratado con FTA® frente al control) a temperatura ambiente, detectado mediante espectroscopia de UV/Vis*

50

Muestra	ADN total µg/columna	Proporción de DO <sub>260</sub> /DO <sub>280</sub>	Proporción de bc/mc, %
<b>GF/L-6™-control</b>			
Media	6,2	1,55	22,7
DE	0,8	0,04	1,08
<b>GF/L-6™-FTA®</b>			
Media	20	1,78	74
DE	1,9	0,03	2,1

55

60

65

## ES 2 320 875 T3

TABLA 6

*Rendimiento de ADN procedente de 1 ml de sangre después de un mes de conservación sobre el medio DBS™ (tratado con FTA® frente al control) a temperatura ambiente, detectado mediante espectroscopia de UV/Vis*

Muestra	ADN total µg/columna	Proporción de DO <sub>260</sub> /DO <sub>280</sub>	Proporción de bc/mc, %
<b>DBS™-control</b>			
Media	4,4	1,34	20
DE	1,3	0,05	6
<b>DBS™-FTA®</b>			
Media	16	1,79	80
DE	0,31	0,01	1,7

### Ejemplo 6

*Calidad de las muestras de ADN extraídas de un sistema de columnas de fibra de vidrio después de una conservación a temperatura ambiente durante tres meses y medio*

#### *Diseño del estudio*

- se aplicó 1 ml de sangre completa congelada sobre el medio de filtro de columnas Spin de 1 ml con fibra de vidrio LR GF/L-6™;

- se eliminaron mediante un lavado la Hb y otros componentes sanguíneos no deseados con la disolución de lavado (disolución 1 de GenFast);

- se aplicó una disolución FTA® al medio con las células capturadas en las columnas experimentales, mientras que no se aplicó disolución FTA® al grupo control;

- las columnas se secaron y se almacenaron a condiciones ambiente (temperatura y humedad ambiente) durante 3,5 meses;

- el ADN se aisló del medio utilizando el protocolo convencional de GenFast (Whatman, Inc.), como se describió anteriormente;

- se evaluó la calidad y la cantidad del ADN utilizando electroforesis en gel de agarosa (figura 5) y tinte fluorescente PicoGreen.

#### *Resultados*

La figura 5 muestra la calidad del ADN aislado después de 3,5 meses de conservación a temperatura ambiente sobre el medio GF/L-6™, el control (abajo) frente al tratado con FTA® (arriba), detectado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (PM = patrón de peso molecular).

Los resultados demuestran la excelente calidad (figura 5) y cantidad del ADN aislado a partir del medio tratado con FTA®, siendo una media de 11 µg/columna, y aproximadamente 80% del ADN se encontraba en forma bc (tinte fluorescente PicoGreen). El ADN aislado a partir del medio control no tratado mostraba signos significativos de deterioro (figura 5).

### Ejemplo 7

*Calidad de las muestras de ADN extraídas de un sistema de columnas de fibra de vidrio después de una conservación a temperatura ambiente durante cinco meses*

#### *Diseño del estudio*

- se aplicó 1 ml de sangre completa congelada sobre el medio de filtro de columnas Spin de 1 ml de tipo GenFast con el medio de fibra de vidrio GF/L-6™ y se cargaron mediante filtración al vacío;

## ES 2 320 875 T3

- se eliminaron mediante un lavado la Hb y otros componentes sanguíneos no deseados con la disolución de lavado (disolución 1 de GenFast);

5 - se aplicó una disolución de tipo FTA<sup>®</sup> (sin ácido úrico) (Whatman, Inc.) al medio con las células capturadas en las columnas experimentales (comprendiendo la disolución de tipo FTA<sup>®</sup> SDS al 2% para dos muestras, y comprendiendo la disolución de tipo FTA<sup>®</sup> SDS al 4% para dos muestras), mientras que no se aplicó disolución de tipo FTA<sup>®</sup> al grupo control;

10 - las columnas se secaron y se almacenaron a condiciones ambiente (temperatura y humedad ambiente) durante 5 meses;

- el ADN se aisló del medio utilizando el protocolo convencional de GenFast (Whatman, Inc.), como se describió anteriormente;

15 - se evaluó la calidad y la cantidad del ADN utilizando electroforesis en gel de agarosa (figura 6) y tinte fluorescente PicoGreen.

### *Resultados*

20 La figura 6 muestra la calidad del ADN aislado después de 5 meses de conservación a temperatura ambiente sobre las columnas Spin de tipo GenFast con el medio de fibra de vidrio GF/L-6<sup>TM</sup>, el control (Control) frente al tratado con disolución de tipo FTA<sup>®</sup> (Tratado con FTA), detectado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,78% (PM = patrón de peso molecular). De los cuatro carriles tratados con FTA, los dos carriles a la izquierda tratados con FTA (junto a los carriles control) se trataron con una disolución de tipo FTA<sup>®</sup> que comprende SDS al 4%, mientras que los  
25 carriles tratados con FTA a la derecha se trataron con una disolución de tipo FTA<sup>®</sup> que comprende SDS al 2%. La cantidad de ADN en los carriles tratados con una disolución de tipo FTA<sup>®</sup> (Tratados con FTA) es aproximadamente 100 ng ADN/banda.

30 Los resultados demuestran la excelente calidad (figura 6) y cantidad del ADN aislado a partir del medio tratado con FTA<sup>®</sup>, siendo una media de 16  $\mu\text{g}$ /columna de rendimiento de ADN total. El ADN aislado a partir del medio control no tratado mostraba signos significativos de deterioro (figura 6).

### *Ejemplo 8*

35 *Calidad de las muestras de ADN extraídas de un sistema de columnas de gel de sílice después de una conservación a temperatura ambiente durante tres meses y medio*

### *Diseño del estudio*

40 - se aplicaron 0,2 ml de sangre completa congelada sobre el medio de filtro de columnas Spin de 0,2 ml de gel de sílice QIAamp Mini Kit (Qiagen);

45 - se eliminaron mediante lavado la Hb y otros componentes sanguíneos no deseados con la disolución de lavado (disolución 1 de GenFast);

- se aplicó una disolución FTA<sup>®</sup> al medio con las células capturadas en las columnas experimentales, mientras que no se aplicó disolución FTA<sup>®</sup> al grupo control;

50 - las columnas se secaron y se almacenaron a condiciones ambiente (temperatura y humedad ambiente) durante 3,5 meses;

- el ADN se aisló del medio utilizando el protocolo convencional de GenFast (Whatman, Inc.), como se describió anteriormente;

55 - se evaluó la calidad y la cantidad del ADN utilizando electroforesis en gel de agarosa (figura 7) y tinte fluorescente PicoGreen.

### *Resultados*

60 La figura 7 muestra la calidad del ADN aislado después de 3,5 meses de conservación a temperatura ambiente sobre el medio QIAamp tratado con FTA<sup>®</sup> detectado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (PM = patrón de peso molecular).

65 Los resultados demuestran la excelente calidad (figura 7) y cantidad del ADN aislado a partir del medio tratado con FTA<sup>®</sup>, siendo una media de 3,4  $\mu\text{g}$ /columna, y estando aproximadamente 70% del ADN en forma bc (tinte fluorescente PicoGreen).

## ES 2 320 875 T3

### Ejemplo 9

Calidad de las muestras de ADN extraídas de un sistema de columnas de PVDF después de una conservación a temperatura ambiente durante tres meses y medio

#### Diseño del estudio

- se aplicaron 0,4 ml de una suspensión de leucocitos (LEUC; 10.000 células/ $\mu$ l) sobre el medio del filtro de membranas hidrófilas de PVDF (poli(fluoruro de vinilidino)) de 1,2  $\mu$ m (Whatman) en un diseño basado en columnas de GenFast (Whatman, Inc.) mediante filtración al vacío;

- las columnas se lavaron una vez con la disolución de lavado (disolución 1 de GenFast);

- se aplicó una disolución FTA<sup>®</sup> (con ácido úrico) o una disolución de FTA<sup>®</sup> modificada (sin ácido úrico) al medio con las células capturadas en las columnas experimentales, mientras que no se aplicó disolución FTA<sup>®</sup> al grupo control;

- las columnas se secaron y se almacenaron a condiciones ambiente (temperatura y humedad ambiente) durante 3,5 meses;

- el ADN se aisló del medio utilizando el protocolo convencional de GenFast (Whatman, Inc.), como se describió anteriormente;

- las muestras de ADN se diluyeron 10 veces y se evaluó la calidad y la cantidad del ADN utilizando electroforesis en gel de agarosa (figura 8) y tinte fluorescente PicoGreen.

#### Resultados

La figura 8 muestra la calidad del ADN aislado después de 3 meses de conservación a temperatura ambiente sobre el medio de PVDF detectado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,78% (PM = patrón de peso molecular; carriles 1-2: controles; carril 3: sin muestra (blanco); carriles 4-5: muestras tratadas con FTA<sup>®</sup>; carriles 6-9: muestras tratadas con FTA<sup>®</sup> modificado).

Los resultados demuestran la excelente calidad (figura 8) y cantidad del ADN aislado a partir del medio tratado con FTA<sup>®</sup> y del medio tratado con FTA<sup>®</sup> modificado, siendo una media de 15  $\mu$ g/columna (aproximadamente 60% de la cantidad esperada), y estando aproximadamente 75% del ADN en forma bc (tinte fluorescente PicoGreen). El ADN aislado a partir del medio control no tratado mostraba signos significativos de deterioro (figura 8).

La invención se ha descrito de manera ilustrativa y debe entenderse que la terminología que se ha empleado pretende ser sólo palabras o descripciones, y no limitaciones.

Obviamente, son posibles muchas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las anteriores indicaciones.

#### Bibliografía

1. Patente de EEUU n° 5.496.562, Burgoyne, Medio sólido y procedimiento para la conservación de ADN, 1996.

2. Patente de EEUU n° 5.756.126, Burgoyne, Medio sólido y procedimiento para la conservación de ADN, 1998.

3. Patente de EEUU n° 5.807.527, Burgoyne, Medio sólido y procedimiento para la conservación de ADN, 1998.

4. Documento WO 00/21973 (2000), **Mitchell et al.**, Procedimientos y aparato de aislamiento (documento PCT/GB99/03337 (1999)).

5. Patente de EEUU n° 5.658.548, **Padhye et al.**, Purificación de ácidos nucleicos sobre gel de sílice y mezclas de vidrio, 1997.

## ES 2 320 875 T3

### REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aislar y almacenar ácidos nucleicos, que comprende:
- 5 a. proporcionar un medio en fase sólida;
- b. aplicar una muestra que comprenda células que contienen ácidos nucleicos al medio en fase sólida;
- 10 c. retener las células con el medio en fase sólida como un retenido celular y eliminar los contaminantes;
- d. poner en contacto el retenido celular con una disolución que comprende un tensioactivo o detergente;
- e. lisar el retenido celular para formar un lisado celular mientras se retiene el lisado celular en el medio en fase  
15 sólida, comprendiendo el lisado celular los ácidos nucleicos;
- f. secar el medio en fase sólida con el lisado celular que comprende los ácidos nucleicos; y
- g. almacenar el medio en fase sólida secado con los ácidos nucleicos.
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que, antes de la etapa de secado f, el medio en fase sólida con los ácidos nucleicos se lava para eliminar los contaminantes mientras que los ácidos nucleicos son retenidos en el medio en fase sólida.
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio en fase sólida con los ácidos nucleicos en la etapa g se mantiene sustancialmente a una temperatura de 5°C a 40°C.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
- 30 h. eluir los ácidos nucleicos del medio sólido.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que, antes de la etapa de elución h, el medio en fase sólida secado con los ácidos nucleicos se lava para eliminar los contaminantes mientras que los ácidos nucleicos son retenidos en el  
35 medio en fase sólida.
6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el almacenamiento de los ácidos nucleicos en la etapa g tiene una duración de al menos una semana.
- 40 7. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el almacenamiento de los ácidos nucleicos en la etapa g tiene una duración de al menos un mes.
8. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el almacenamiento de los ácidos nucleicos en la etapa g tiene  
45 una duración de al menos tres meses.
9. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el almacenamiento de los ácidos nucleicos en la etapa g tiene una duración de al menos cinco meses.
- 50 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio en fase sólida comprende un filtro que comprende una pluralidad de fibras.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el filtro tiene una estructura sustancialmente desordenada.
- 55 12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que los diámetros de las fibras están en el intervalo de 1  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$ .
13. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el filtro comprende uno o más poros que tienen un tamaño de poro de aproximadamente 0,2  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 2,7  $\mu\text{m}$ .
- 60 14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio en fase sólida comprende:
- a. un medio en fase sólida de vidrio o con una base de sílice;
- 65 b. un medio en fase sólida con una base de plástico; o
- c. un medio en fase sólida con una base de celulosa.

## ES 2 320 875 T3

15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio en fase sólida se selecciona de uno de los siguientes: vidrio, fibra de vidrio, microfibras de vidrio, sílice, gel de sílice, óxido de sílice, celulosa, nitrocelulosa, carboximetilcelulosa, poliéster, poliamida, polímeros de carbohidratos, polipropileno, politetrafluoroetileno, poli(fluoruro de vinilidino), lana o cerámica porosa.
- 5 16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tensioactivo o detergente de la etapa d comprende un tensioactivo o detergente aniónico.
- 10 17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el tensioactivo o detergente aniónico comprende dodecilsulfato de sodio.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que la concentración de dodecilsulfato de sodio está entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 5% en peso/volumen.
- 15 19. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que la disolución de la etapa d comprende además:
- ii. una base débil; y
  - iii. un agente quelante.
- 20 20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que la disolución de la etapa d comprende además:
- iv. ácido úrico o una sal urato.
- 25 21. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el retenido celular comprende material condensado procedente del núcleo.
- 30 22. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el retenido celular comprende células enteras intactas, y en el que la etapa e comprende:
- i. romper las células enteras intactas retenidas por el medio en fase sólida para dejar el material condensado procedente del núcleo retenido por el medio; y
  - ii. lisar el material condensado procedente del núcleo para formar el lisado celular que contienen los ácidos nucleicos.
- 35 23. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la composición y las dimensiones del medio en fase sólida se seleccionan de forma que los ácidos nucleicos son retenidos por el medio en la etapa e sustancialmente mediante interacciones no iónicas.
- 40 24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que las interacciones no iónicas comprenden interacciones dipolo-dipolo, interacciones dipolo-dipolo inducido, fuerzas de dispersión o enlaces de hidrógeno.
- 45 25. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de retención e se define también como el retraso físico del movimiento de los ácidos nucleicos a través del medio en fase sólida.
- 50 26. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el medio en fase sólida es capaz de retener las células y los ácidos nucleicos en ausencia de un caotropo.
- 55 27. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa b comprende además concentrar las células en el medio en fase sólida.
28. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que los ácidos nucleicos se calientan hasta una temperatura elevada de 65°C a 125°C antes de la etapa de elución h.
- 60 29. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que los ácidos nucleicos se calientan hasta una temperatura elevada de 80°C a 95°C antes de la etapa de elución h.
30. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células se seleccionan del grupo que consiste en leucocitos, células epiteliales, células bucales, células en cultivos de tejidos, semen, células vaginales, células del tracto urinario, células vegetales, células bacterianas y células colorrectales.
- 65 31. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células son leucocitos, y el procedimiento comprende además aplicar sangre completa al medio en fase sólida y obtener el lisado celular de los leucocitos.

## ES 2 320 875 T3

32. El procedimiento de la reivindicación 31, que comprende además lisar los eritrocitos de la sangre completa.

33. El procedimiento de la reivindicación 31 ó la reivindicación 32, que comprende además lavar el medio en fase sólida para eliminar los contaminantes.

5

34. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra comprende células sanguíneas, y las dimensiones del medio en fase sólida se seleccionan de manera que la mayoría de las células retenidas en la etapa c comprenden leucocitos.

10

35. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los ácidos nucleicos comprenden ADN o ARN.

36. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los ácidos nucleicos comprenden ADN genómico.

15

37. Un procedimiento para aislar y almacenar ácidos nucleicos, que comprende:

a. proporcionar un medio en fase sólida;

b. aplicar una muestra que comprenda células que contienen ácidos nucleicos al medio en fase sólida y concentrar las células en el medio en fase sólida;

20

c. retener las células concentradas con el medio en fase sólida como un retenido celular concentrado y eliminar los contaminantes;

d. poner en contacto el retenido celular concentrado con una disolución que comprende:

25

i. una base débil;

ii. un agente quelante; y

30

iii. un tensioactivo o detergente aniónico;

e. lisar el retenido celular concentrado para formar un lisado celular mientras se retiene el lisado celular en el medio en fase sólida, comprendiendo el lisado celular los ácidos nucleicos;

35

f. secar el medio en fase sólida con el lisado celular que comprende los ácidos nucleicos;

g. almacenar el medio en fase sólida secado con los ácidos nucleicos durante al menos una semana; y

h. eluir los ácidos nucleicos del medio en fase sólida.

40

38. Un procedimiento para aislar y almacenar ADN, que comprende:

a. proporcionar un medio en fase sólida, en el que el medio en fase sólida comprende un filtro que comprende una pluralidad de fibras, en el que las fibras comprenden:

45

i. fibras de vidrio o con una base de sílice;

ii. fibras con una base de plástico; o

50

iii. fibras de nitrocelulosa o con una base de celulosa;

b. aplicar una muestra que comprenda células que contienen ADN al medio en fase sólida y concentrar las células en el medio en fase sólida;

55

c. retener las células concentradas con el medio en fase sólida como un retenido celular concentrado y eliminar los contaminantes;

d. poner en contacto el retenido celular concentrado con una disolución que comprende:

60

i. una base débil;

ii. un agente quelante; y

65

iii. un tensioactivo o detergente aniónico;

## ES 2 320 875 T3

e. lisar el retenido celular concentrado para formar un lisado celular mientras se retiene el lisado celular en el medio en fase sólida, conteniendo el lisado celular el ADN;

5 f. secar el medio en fase sólida con el lisado celular que comprende el ADN;

g. almacenar el medio en fase sólida secado con el ADN a una temperatura de 5°C a 40°C durante al menos una semana;

10 h. calentar el ADN con el medio en fase sólida hasta una temperatura elevada de 65°C a 125°C; y

i. eluir el ADN del medio en fase sólida.

15

20

25

30

35

40

45

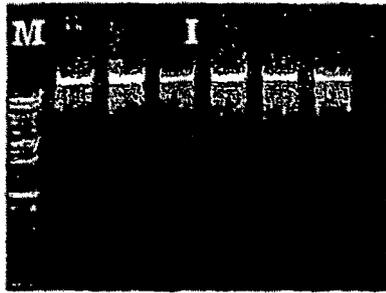
50

55

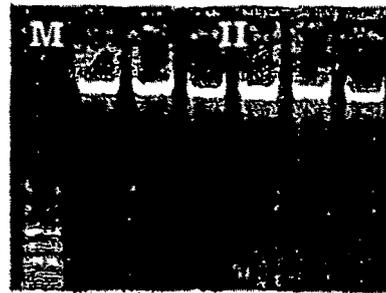
60

65

**Fig. 1A**



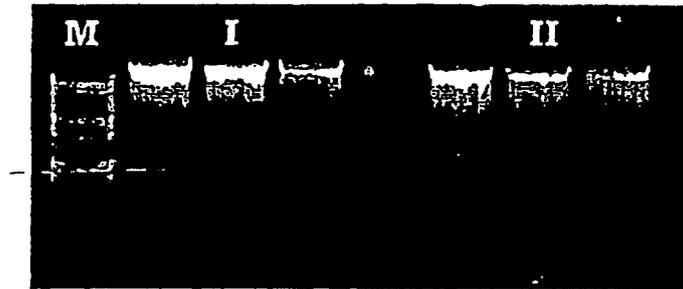
**Fig. 1B**



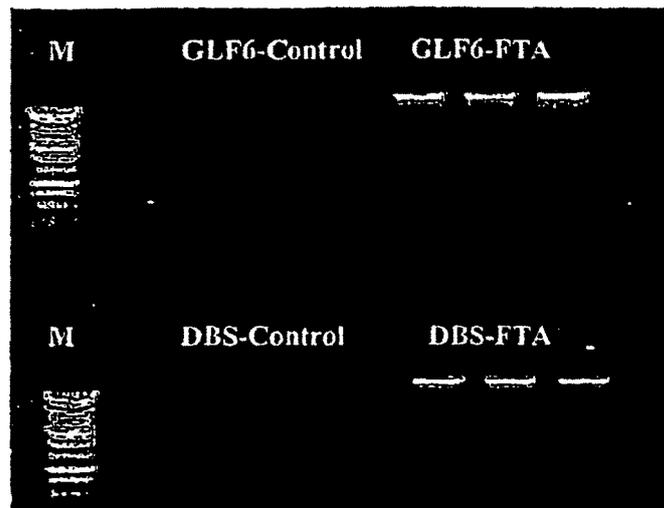
**Fig. 2**



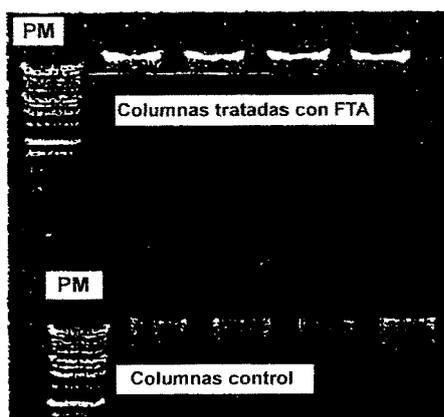
**Fig. 3**



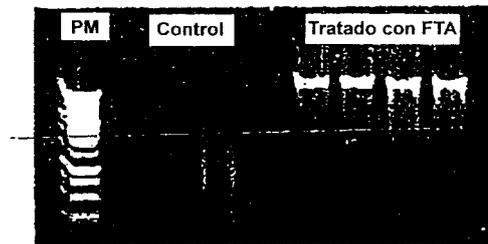
**Fig. 4**



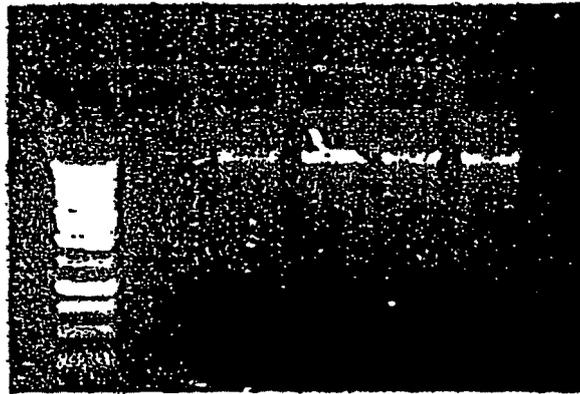
**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**

