



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 005**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)
B01J 20/281 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05019940 .5**
96 Fecha de presentación : **13.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1693453**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **Procedimiento para el aislamiento y la separación de ácidos nucleicos de cadena sencilla y doble, así como columna de separación para llevar a cabo el procedimiento.**

30 Prioridad: **16.09.2004 DE 10 2004 045 332**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.07.2011

73 Titular/es: **MACHEREY, NAGEL GmbH & Co.**
HANDELSGESELLSCHAFT
Valencienner Strasse 11
52355 Düren, DE

72 Inventor/es: **Radmacher, Edmund;**
Möller, Klaus;
Meusel, Markus y
Kirsch, Christoph

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 363 005 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

Procedimiento para el aislamiento y la separación de ácidos nucleicos de cadena sencilla y doble, así como columna de separación para llevar a cabo el procedimiento

5 La invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento y la separación de ácidos nucleicos de cadena sencilla y doble a partir de una sonda que contiene estos ácidos nucleicos, en donde el ácido nucleico de doble cadena es ADN y el ácido nucleico de cadena sencilla es ARN, y los ácidos nucleicos de cadena sencilla y doble se unen a un material de soporte del que los ácidos nucleicos de doble cadena se eluyen con una primera disolución de elución y los ácidos nucleicos de cadena sencilla se eluyen a continuación con una segunda disolución de elución.

15 La preparación de ácidos nucleicos adquiere importancia de forma creciente. Así, ARN y ADN se requieren en laboratorios médico-analíticos, bioquímicos y que trabajan en biología molecular. Los sectores de aplicación abarcan desde la tecnología genética, medicina, veterinaria, medicina forense, biología molecular hasta bioquímica, así como desde la investigación básica hasta el diagnóstico rutinario aplicado.

20 Las muestras con contenidos en ácidos nucleicos se disgregan habitualmente en una primera etapa. Esto es estado conocido de la técnica y puede tener lugar, por ejemplo, de forma conocida por medios mecánicos, químicos, enzimáticos o mediante tratamiento con detergentes. A la disgregación de las células se une entonces el aislamiento de los ácidos nucleicos. Procedimientos clásicos son la centrifugación en gradiente de densidad con cloruro de cesio o la extracción con fenol. Sin embargo, estos métodos presentan una manipulación compleja, llevan tiempo o utilizan fenol tóxico, lo cual es problemático en la manipulación. Por estos motivos, en los últimos años se han abierto paso nuevos métodos para el aislamiento de ácidos nucleicos. A ellos pertenecen técnicas a base de intercambiadores de sílice y aniones. Mientras que los intercambiadores de aniones siguen representando el patrón dorado para preparaciones de ADN particularmente puras (por ejemplo para experimentos de transfección), las técnicas basadas en sílice se han aconsejado como métodos sencillos y económicos para una pluralidad de aplicaciones.

30 Desde los años 50 es sabido que el ADN se une de forma reversible a silicatos en presencia de sales caótopas (Sambrock, J. y Russel, D. W., 2001, Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, páginas 1.62 y siguientes). Las sales determinan la destrucción de la envoltura de hidratos de los ácidos nucleicos y crean un microentorno hidrófobo. Bajo estas condiciones, los ácidos nucleicos se unen entonces a la matriz de sílice, mientras que las proteínas y otros contaminantes no se unen y se separan por lavado. Si entonces la disolución de unión es reemplazada por un tampón con bajo contenido en sales o agua, tiene lugar una rehidratación de los ácidos nucleicos los cuales se desprenden entonces voluntariamente de la matriz de sílice y pueden ser eluidos.

40 A la preparación de los ácidos nucleicos se unen entonces, por norma general, reacciones consecutivas tales como, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR – siglas en inglés), la secuenciación, el ligamiento o un análisis de restricción. Las reacciones consecutivas requieren una determinada cantidad y, en particular, calidad en la que deben estar presentes los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos deben estar ampliamente intactos, presentarse con una elevada pureza y estar exentos de proteínas y metabolitos celulares.

45 Habitualmente, las condiciones de unión en el caso de preparaciones basadas en sílice están ajustadas de modo que solamente se une, a ser posible de forma selectiva, una forma de ácido nucleico (ya sea de cadena sencilla o doble) (véase el documento WO 97/30062). Para el aislamiento selectivo de ADN de doble cadena genómico se emplean, por ejemplo, sales caótopas tales como, por ejemplo, isotiocianato de guanidina, tiocianato de guanidina, hidrocloreuro de guanidinio, perclorato de sodio o yoduro de sodio, en concentraciones de 0,1 a 10 M, y alcoholes alifáticos con 1 a 5 átomos de carbono en concentraciones de 1-90% en volumen. Otras condiciones de unión selectivas tales como disoluciones con sustancias que forman complejo con iones metálicos alcalinotérreos, y la ausencia de alcoholes son asimismo adecuadas y conocidas por el documento EP 0 743 950.

55 En calidad de soportes minerales sirven preferiblemente materiales porosos y no porosos tales como, por ejemplo, óxidos de metales, geles de sílice, partículas de vidrio, suspensión de vidrio en agua, cuarzo, zeolitas, tierra de diatomeas o dióxido de titanio con tamaños de partículas de 0,1 a 1.000 μm . Si se utilizan soportes porosos, entonces el tamaño de los poros asciende preferiblemente a 2 hasta 1000 μm . El material poroso o no poroso puede presentarse en forma de material suelto o estar configurado como una capa de filtro. Las capas de filtro pueden consistir en vidrio, cuarzo o material cerámico y/o en una membrana. Esta última puede estar configurada, de nuevo, a base de partículas y/o fibras de soportes minerales y tejidos. De preferencia, en calidad de soportes minerales se emplean, por ejemplo, membranas de fibras de vidrio. Preferiblemente, las capas de filtro se

disponen en cuerpos huecos con una abertura de entrada y de salida.

La discriminación entre ADN de doble cadena y ácidos nucleicos de cadena sencilla, en particular ARN, puede reforzarse adicionalmente mediante disoluciones de lavado adecuadas. La elución del ADN ligado tiene lugar entonces bajo condiciones de baja salinidad o con agua.

Si debe aislarse de forma selectiva ARN, entonces se ajustan mediante el empleo de sales caótopras y alcohol, las condiciones de unión bajo las cuales ácidos nucleicos de cadena sencilla se unen cuantitativamente al soporte mineral. En este caso, es inevitable que también se una una parte de ADN genómico. Con el fin de eliminar esta contaminación, el ADN genómico se digiere habitualmente mediante DNasa. Es particularmente importante en la preparación de ARN la inactivación de RNasa, lo cual se asegura ya mediante las condiciones de lisis o se refuerza todavía mediante aditivos tales como β -mercaptoetanol. Al igual que el ADN genómico, el ARN previamente ligado y ahora liberado de contaminaciones de ADN, se eluye bajo condiciones de baja salinidad o, preferiblemente, con agua exenta de RNasa.

Para una pluralidad de investigaciones, es ahora particularmente ventajoso aislar simultáneamente tanto el ARN como también al ADN a partir del mismo material de ensayo. Así, p. ej. a partir de cantidades limitantes del material se pueden aislar los dos ácidos nucleicos. El aislamiento simultáneo permite, además, a través del ADN, el examen de genes y, a través del ARN, su expresión. El hallazgo de correlaciones entre las secuencias de ADN y la expresión de estos genes permite, p. ej., inspecciones en procesos de regulación. Es de particular importancia el aislamiento simultáneo de ADN y ARN, en particular en el examen de procesos de corte y empalme, un importante mecanismo en la regulación génica.

Un protocolo muy extendido para el aislamiento simultáneo de ADN y ARN se orienta en el método de Chomzynski (Chomzynski P.: A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples, BioTechniques 15, 532-534, 1993). En este caso, se lisan células con una disolución monofásica a base de isotiocianato de guanidina y fenol. La adición de cloroformo conduce a la formación de una segunda fase orgánica en la que se enriquecen el ADN y proteínas, mientras que el ARN se encuentra en el sobrenadante acuoso. El ADN puede separarse a partir de la fase orgánica de las proteínas mediante precipitación secuencial con etanol e isopropanol. Lo desventajoso de este método es la contaminación del ARN con ADN que hace necesario un tratamiento posterior. Es desventajoso, además, la duración de la preparación para el aislamiento simultáneo de ARN y ADN (en el caso más favorable de 3 horas), así como de la complejidad técnica de trabajo. Además, también es problemática la manipulación con el fenol tóxico.

Un planteamiento alternativo se conoce a partir de los documentos DE 195 06 887 y EP 0 880 535 (Testkit *Invisorb TwinPrep DNA/RNA* de la razón social Invitex GmbH). En este procedimiento, ADN genómico se une a un soporte mineral en presencia de sales caótopras, mientras que el ARN permanece en disolución. A partir de éste, se aísla seguidamente mediante extracción con fenol/cloroformo y se precipita con isopropanol. El ADN ligado se encuentra disponible después de etapas de lavado y de elución para aplicaciones ulteriores. Este procedimiento permite la preparación, ampliamente exenta de ADN, de ARN con un tiempo razonable (< 2 horas) y tampoco aquí se puede renunciar a las etapas problemáticas y laboriosas de las extracciones y precipitaciones.

El procedimiento que se describe en los documentos EP 0 743 950 B1 y US 6.180.778 trabaja por completo sin extracción líquido-líquido ni precipitaciones secuenciales. El documento EP 0 743 950 B1 da a conocer en las tres primeras formas de realización conforme a la reivindicación 1, la unión selectiva de ácidos nucleicos de cadena sencilla o doble a un soporte mineral. En la primera forma de realización, se liga selectivamente ARN, mientras que el ADN permanece en el sobrenadante y, a partir de éste, se liga a un segundo soporte mineral en presencia de sales caótopras y alcohol. En la segunda forma de realización es el ADN el que se liga al soporte mineral en la primera etapa, en presencia de sustancias para la formación de complejos de iones metálicos alcalinos (p. ej. EDTA) y la ausencia de alcoholes. El ARN que permanece en solución se liga entonces, bajo la adición de alcohol, a un segundo soporte mineral y se procesa ulteriormente. La tercera forma de realización describe una modificación de la segunda, en la que se renuncia a las sustancias para la formación de complejos de iones metálicos alcalinotérreos y se reemplazan éstas por agentes de humectación, detergentes o dispersantes. También aquí, el ARN permanece en el sobrenadante y se purifica con un segundo soporte mineral.

Un planteamiento diferente lo ofrece la cuarta forma de realización, en la que tanto el ADN como también el ARN se unen en principio conjuntamente al soporte mineral y, a continuación, se eluyen de forma selectiva. Para la elución de ADN, el material de soporte se trata con una disolución de intensidad de iones reducida y concentración de alcohol. El ARN permanece en el soporte, mientras que el ADN se desprende. Éste se une entonces, para la purificación ulterior, a un segundo soporte mineral. Después de etapas de lavado adicionales, el ADN puede eluirse en última instancia del segundo soporte bajo condiciones de baja salinidad o con agua, y se encuentra entonces a

disposición para las aplicaciones consecutivas. El ARN que permanece en el primer soporte puede lavarse y eluirse análogamente al ADN. Finalmente, también se encuentra a disposición para aplicaciones consecutivas.

5 Alternativamente, después de la cuarta forma de realización, también el ARN puede ser eluido primeramente del primer soporte. Esto tiene lugar mediante la adición de agentes humectantes, detergentes o dispersantes y/o el empleo de sustancias para la formación de complejos de iones metales alcalinotérreos. El ARN, así eluido, debe entonces ser purificado ulteriormente, al ligarlo a un segundo soporte mineral y, finalmente, después del lavado y la elución, se encuentra a disposición para aplicaciones consecutivas. El ADN que permanece en el primer soporte mineral se lava asimismo y, finalmente, se eluye. Con ello, también se encuentra a disposición para aplicaciones consecutivas.

10 También cuando se renuncia a extracciones y precipitaciones y el planteamiento es muy variable, entonces el inconveniente del procedimiento según el documento EP 0 743 950 B1 es ciertamente el transcurso muy laborioso mediante incorporación de dos soportes minerales, en particular cuando deban aislarse tanto ADN como también ARN.

15 Por consiguiente, todas las soluciones técnicas descritas presentan una o varias de las siguientes desventajas: son laboriosas, requieren tiempos de preparación muy largos, los ácidos nucleicos aislados deben ser purificados posteriormente en etapas adicionales con el fin de encontrarse a disposición para aplicaciones consecutivas, o se utilizan sustancias tóxicas tales como, por ejemplo, fenol.

20 La misión de la presente invención consiste en la mejora del procedimiento del tipo mencionado al comienzo, es decir de la cuarta forma de realización según el documento EP 0 743 950 B1, de modo que los ácidos nucleicos, después de su aislamiento a partir de la muestra y de la subsiguiente separación entre sí se presenten de manera que sea superflua una purificación ulterior para la mayoría de las aplicaciones consecutivas y, por consiguiente, sean directamente posibles. Otra misión estriba en proporcionar una columna de separación particularmente adecuada para la realización del procedimiento.

25 De acuerdo con la invención, el primer problema se resuelve debido a que la elución de los ácidos nucleicos de doble cadena se lleva a cabo en presencia de al menos un ión metálico divalente de este tipo en una concentración al menos tan elevada que durante la elución de los ácidos nucleicos de doble cadena no se eluyan ácidos nucleicos de cadena sencilla, en donde la primera disolución de elución es un tampón de baja salinidad o agua y, la segunda disolución de elución es una disolución con baja salinidad o agua, y en donde el al menos un ión metálico divalente se elige del grupo de los metales alcalinotérreos y su concentración no es mayor que 200 mM.

30 La ventaja del procedimiento de acuerdo con la invención estriba en que los ácidos nucleicos se encuentran a disposición, sin purificación ulterior ni tratamientos, directamente para aplicaciones consecutivas. Por consiguiente, el procedimiento según la invención no sólo se puede llevar a cabo de forma sencilla y rápida, sino que los ácidos nucleicos aislados y separados tales como ADN y ARN, también pueden utilizarse directamente para los fines más diversos.

35 El procedimiento según la invención puede aplicarse a todas las muestras con contenido en ácidos nucleicos. En este caso, se puede tratar de células, tejido, sangre, material vegetal, alimentos, muestras forenses u otro material con contenido en ácidos nucleicos tal como, p. ej., tandas de transcripción *in vitro* u otras mezclas a base de ARN y ADN. Al procedimiento le preceden, por norma general, en el caso de que estén presentes células, una disgregación y una lisis de las mismas. En este caso, tal como se conoce por el estado de la técnica, pasan a emplearse, p. ej., agentes químicos, enzimáticos o mecánicos. Un procedimiento preferido prevé la lisis de las células mediante sales caótropas. Una adición subsiguiente de alcohol crea condiciones bajo las cuales todos los ácidos nucleicos se unen al material de soporte, p. ej. a una matriz de sílice propuesta, preferiblemente membranas de sílice. Sin embargo, para el experto en la materia resulta evidente que el procedimiento de acuerdo con la invención no se limita a estos soportes, sino que puede encontrar uso cualquiera de los materiales de soporte conocidos para este fin.

40 El procedimiento según la invención puede aplicarse a todas las muestras con contenido en ácidos nucleicos. En este caso, se puede tratar de células, tejido, sangre, material vegetal, alimentos, muestras forenses u otro material con contenido en ácidos nucleicos tal como, p. ej., tandas de transcripción *in vitro* u otras mezclas a base de ARN y ADN. Al procedimiento le preceden, por norma general, en el caso de que estén presentes células, una disgregación y una lisis de las mismas. En este caso, tal como se conoce por el estado de la técnica, pasan a emplearse, p. ej., agentes químicos, enzimáticos o mecánicos. Un procedimiento preferido prevé la lisis de las células mediante sales caótropas. Una adición subsiguiente de alcohol crea condiciones bajo las cuales todos los ácidos nucleicos se unen al material de soporte, p. ej. a una matriz de sílice propuesta, preferiblemente membranas de sílice. Sin embargo, para el experto en la materia resulta evidente que el procedimiento de acuerdo con la invención no se limita a estos soportes, sino que puede encontrar uso cualquiera de los materiales de soporte conocidos para este fin.

45 Los ácidos nucleicos de doble cadena, en particular ADN, se eluyen entonces del material de soporte según el procedimiento de acuerdo con la invención, utilizando la primera disolución de elución en presencia de al menos un ion metálico divalente. En este caso, se encontró, sorprendentemente, que la concentración de este o de estos iones metálicos divalentes puede elegirse desde pequeña a muy pequeña. Igualmente, se garantiza que solamente sean eluidos los ácidos nucleicos de doble cadena, mientras que los ácidos nucleicos de cadena sencilla permanecen en el material de soporte. Sólo en el caso de concentraciones muy bajas del ion metálico divalente existe el riesgo de que también sea eluido conjuntamente ácido nucleico de cadena sencilla, p. ej. ARN. El límite inferior se puede establecer mediante ensayos sencillos.

La concentración máxima del ion metálico divalente no debería rebasar 200 mM, preferiblemente 100 mM. Cuanto menor sea la concentración del al menos un ion metálico divalente, tanto menos se perturban las aplicaciones consecutivas. Esto se cumple también para los ácidos nucleicos de cadena sencilla eluidos en la etapa siguiente. Concentraciones particularmente preferidas son 5 a 10 mM. Los ácidos nucleicos de doble cadena, así eluidos, se encuentran, p. ej., en forma de ADN, absolutamente apropiados para la PCR, sean digeribles con enzimas de restricción, están exentos de ARN y presentan una relación $A_{260/280}$ de 1,9 a 2,3.

El al menos un ion metálico divalente no puede ser reemplazado por uno o varios iones metálicos monovalentes, dado que con iones tales como Na^+ y Li^+ , una elución de solamente el ácido nucleico de doble cadena tiene lugar sólo a concentraciones superiores a 200 mM. En el caso de este elevado intervalo de concentraciones no pueden, sin embargo, llevarse a cabo a continuación de forma directa aplicaciones consecutivas con el ácido nucleico de doble cadena eluido, de modo que no pueden alcanzarse las ventajas del procedimiento según la invención. Si se emplean concentraciones inferiores a 200 mM, tiene lugar una co-elución de ácido nucleico de cadena sencilla y de doble cadena. No es posible una diferenciación.

Según la invención, se prevé, además, que el material de soporte sea tratado con una disolución de lavado después de la unión de los ácidos nucleicos y antes de la elución de los ácidos nucleicos de doble cadena. Esta medida, en sí conocida, es conveniente cuando deban eliminarse de la matriz de unión contaminaciones o, eventualmente, sales caótropas utilizadas manteniendo la unión de los ácidos nucleicos.

La provisión del al menos un ion metálico divalente en la etapa de la elución del ácido nucleico de doble cadena puede tener lugar de diferente manera, dado que para conseguir las ventajas del procedimiento de acuerdo con la invención no son determinantes el instante y/o el modo de incorporación del ion metálico divalente. El o los iones metálicos divalentes pueden ser componente de la primera disolución de elución y/o de la disolución de lavado. Además, el al menos un ion metálico divalente puede ser liberado a través de una matriz o de un soporte sólido tal como, p. ej., un papel de filtro o similar, o se aporta en forma de una disolución adicional. Sin embargo, también es posible que el o los iones metálicos divalentes estén presentes en la disolución de lavado, pero no en la primera disolución de elución. En este caso, se produce aparentemente un tipo de efecto de arrastre, que es suficiente para llevar a cabo la elución del ácido nucleico de doble cadena con agua o un tampón de bajo contenido en sales, sin que se produzca una elución simultánea del ácido nucleico de cadena sencilla. El contenido en iones metálicos en la disolución de lavado debería en este caso ser tan elevada que, a través del efecto de arrastre, tuviera lugar una elución exclusivamente el ácido nucleico de doble cadena.

La incorporación de los iones metálicos divalentes tiene lugar en forma de iones metálicos alcalinotérreos, en particular en forma de Ca^{2+} y/o Mg^{2+} , pero también en forma de iones bario y/o estroncio. Los iones conjugados tienen una influencia desde nula a escasa sobre el procedimiento según la invención. Son bien adecuados MgCl_2 y/o CaCl_2 , preferiblemente en el intervalo de concentraciones de 5 a 10 mM.

En lugar de en forma líquida, los iones metálicos divalentes también pueden incorporarse en el procedimiento en forma sólida, p. ej. en forma de sulfato de calcio. Este sólido puede disponerse en la columna de separación, en la matriz de la columna de separación o en un papel de filtro. En virtud de la solubilidad en agua del sulfato de calcio, los iones divalentes son entregados sucesivamente a las disoluciones durante la aplicación del líquido sobre la columna de separación. En la medida en que se disponga suficiente sulfato de calcio, los iones metálicos no son separados por lavado por completo por parte de la muestra que contiene los ácidos nucleicos y el tampón de lavado eventualmente utilizado, de modo que entonces, en la entrega de la primera disolución de elución son entregados a ésta todavía suficientes iones calcio, con el resultado de que únicamente se eluye ácido nucleico de doble cadena. Mediante etapas de lavado sucesivas puede separarse el sulfato de calcio, antes que se eluya luego en la segunda etapa de elución el ácido nucleico de cadena sencilla.

En lugar de mediante sulfato de calcio, los iones metálicos pueden proporcionarse también mediante el uso de sal de bario, p. ej. cloruro de bario. Esta sustancia se adecua ante todo cuando a la disolución de elución con los ácidos nucleicos de doble cadena se les establece requisitos particularmente elevados, en particular a lo que concierne al contenido en cationes divalentes. A saber, éstos pueden precipitarse en un tratamiento posterior después de la elución de los ácidos nucleicos de doble cadena, de modo que a la disolución de elución se añaden iones sulfato, por ejemplo en forma de sulfato de sodio. La disolución, así tratada, ya no contiene entonces prácticamente cationes divalentes sino el cloruro de sodio ligeramente soluble que ya apenas perturba o no lo hace en absoluto en aplicaciones consecutivas, p. ej. aplicaciones enzimáticas.

La disolución de lavado puede comprender un alcohol, p. ej. etanol u otro alcohol alifático de cadena corta. Es ventajoso utilizar una disolución tamponada en calidad de disolución de lavado y primera disolución de elución. El valor del pH debería oscilar entre 4,5 y 9,5, siendo preferido un valor del pH de 7. El valor del pH influye sobre el

rendimiento del ácido nucleico de doble cadena que se puede alcanzar en la tercera etapa, mientras que el rendimiento en ácido nucleico de cadena sencilla en la purificación subsiguiente no se ve ampliamente afectado por el valor del pH de la primera disolución de elución. Como sustancia tampón puede utilizarse cualquier tampón adecuado en el intervalo del tampón en cuestión. Es bien adecuado BisTris Una disolución de lavado adecuada para el procedimiento según la invención puede presentar, p. ej., la siguiente composición: BisTris 10 mM (pH = 7), CaCl₂ 5 mM y/o MgCl₂ 5 mM, etanol al 80%.

Una primera disolución de elución, adecuada para el procedimiento según la invención, puede presentar, p. ej., la siguiente composición: BisTris 10 mM (pH = 7), CaCl₂ 5 mM y/o MgCl₂ 5 mM.

El ácido nucleico de cadena sencilla que permanece sobre el material de soporte después de la primera etapa de elución, p. ej. ARN, puede ser tratado con un tampón de lavado alcohólico que separa los iones metálicos alcalinotérreos. A continuación, el ARN es eluido bajo condiciones de baja salinidad con agua exenta de RNasa. También, el ARN, así eluido, puede ser utilizado directamente sin etapas de purificación ulteriores para aplicaciones consecutivas. Una digestión con DNasa es opcional y puede tener lugar directamente sobre el material de soporte, antes de la adición del tampón de lavado alcohólico. La calidad y cantidad del ARN aislado corresponde a la de después de la purificación con kits de aislamiento de ARN especiales. Está ampliamente exento de ADN genómico y se adecua, por ejemplo, para la RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa).

El segundo problema se resuelve de acuerdo con la invención mediante una columna de separación con un material de soporte que es adecuado para la unión de ácidos nucleicos de cadena sencilla y de doble cadena, debido a que la columna de separación contiene al menos una sal de metal alcalinotérreo en forma sólida, que es soluble en un tampón de baja salinidad o agua y que, bajo la acción de este líquido, proporciona los iones metálicos divalentes en una concentración al menos tan elevada que en la elución de los ácidos nucleicos de doble cadena no se eluyen ácidos nucleicos de cadena sencilla, ascendiendo la concentración de iones metálicos divalentes al menos a 1 mM y no siendo superior a 200 mM. Las sales de metales presentes en forma sólida son solubles bajo la acción del líquido, de modo que los iones metálicos son entregados sucesivamente a la disolución respectiva. Las sales de metales pueden ser el sulfato de calcio y/o cloruro de bario ya antes mencionados. El sólido se añade convenientemente al material de soporte. Sin embargo, en su lugar también entra en consideración la incorporación en un papel de filtro.

La invención se describe y explica más detalladamente en lo que sigue con ayuda de ejemplos.

Ejemplo 1: Aislamiento simultáneo y subsiguiente separación de ADN y ARN a partir de células HeLa, así como a partir de células y tejidos animales y vegetales

Para el aislamiento simultáneo de ADN y ARN se utilizó el kit *NucleoSpin[®]RNA II* de la razón social MACHEREY-NAGEL con un protocolo modificado y ampliado para el aislamiento de ARN. En lo que sigue se describe un protocolo para el aislamiento simultáneo de ADN y ARN a partir de células HeLa. En lugar de estas células pueden emplearse también, sin embargo, preparaciones de ácidos nucleicos o células y muestras de tejidos de origen más diverso. Algunos ejemplos se mencionan en lo que sigue. En lugar de este protocolo pueden también pasar a emplearse otros protocolos.

Lisis y unión de ácidos nucleicos al material de soporte

5 x 10⁶ células HeLa se cosechan mediante centrifugación y se lisan mediante la adición de 350 µl (tampón de lisis RA1 del kit NS RNA II) al sedimento de células (pueden añadirse 3,5 µl de β-mercaptoetanol para el aumento de la protección de ARN). A continuación, se mezcla mediante vórtices. Con el fin de clarificar el lisado, se centrifuga a través de un filtro *NucleoSpin[®]* (1 min., 11.000 g). A continuación, se ajustan las condiciones de unión mediante la adición de 350 µl de etanol al 70%. La disolución se mezcla mediante vórtices y se añade a la columna *NucleoSpin[®]RNA II*. A continuación, se centrifuga durante 30 s a 8.000 g.

Lavado de los ácidos nucleicos sobre la membrana de sílice

A la columna de Spin con los ácidos nucleicos unidos se añaden 500 µl de disolución de lavado (MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 5 mM, BisTris 10 mM, pH 7,0, etanol al 80%) y se centrifuga durante 1 min a 11.000 g. Este proceso se repite una vez más. El material de paso se desecha en cada caso.

Elución del ADN

La columna *NucleoSpin*[®]RNA II se emplea en un recipiente de recogida de 1,5 ml reciente. A continuación, se añaden 100 µl de una primera disolución de elución (MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 5 mM, BisTris 10 mM, pH 7,0) y la columna se centrifuga durante 1 min a 11.000 g. La temperatura de la primera disolución de elución no debería superar 30°C ya que, de lo contrario, se puede producir una co-elución de ARN. El ADN eluido puede utilizarse directamente para aplicaciones posteriores tales como, por ejemplo, PCR.

Digestión en columna de ADN, lavado y elución del ARN

La digestión de ADN es opcional. La disolución de DNasa se prepara y aplica de manera correspondiente al protocolo de *NucleoSpin*[®]RNA II. A continuación, tienen lugar las etapas de lavado y la elución del ARN en agua exenta de RNasa.

Los resultados del aislamiento y separación simultáneos de ADN y ARN a partir de diferentes fuentes, con aplicación del protocolo estándar anterior se representan en las Figuras 1-4.

Figura 1: ADN purificado según el protocolo estándar a partir de 1×10^6 células HeLa, así como en cada caso a partir de 10 mg de hígado de cerdo y riñón de cerdo. El ADN se eluyó en 100 µl y en cada caso 15 µl del mismo se aplicaron sobre el gel de agarosa.

Figura 2: Digestión por restricción de ADN genómico, aislado conforme al protocolo estándar. Electroforesis en gel de agarosa: en cada caso 1 µg de ADN se incubaron durante 1 h a 37°C con 10 U de EcoRI. K: control sin restricción de EcoRI e incubación a 37°C, -RE: incubación a 37°C durante 1 h sin EcoRI; +RE: incubación durante 1 h a 37°C con EcoRI.

Figura 3: Empleo de ADN y ARN aislado y purificado según el protocolo estándar para PCR y RT-PCR. A partir de en cada caso 100 mg de material vegetal se aislaron, según el protocolo estándar, ADN y ARN. La PCR se llevó a cabo con en cada caso 2 µl del ADN eluido en forma de molde y la RT-PCR se llevó a cabo con 1 µl del ARN eluido. Cebador según: *Biotechniques* 23(3) 1997, págs. 494-498: un par de cebadores amplifica ADN ribosomal de subunidades pequeñas procedentes de mitocondrias, plástidos y bacterias.

Figura 4: Análisis del ADN y ARN aislados y purificados según el protocolo estándar mediante electroforesis en gel. El lado de la izquierda muestra un gel de formaldehído para la preparación del ARN, y el lado de la derecha muestra un gel de agarosa para la preparación del ADN. En la parte superior de la figura se incluyeron muestras de los materiales eluidos de ADN, y en la parte inferior se incluyeron muestras de los materiales eluidos de ARN. Todas las muestras que fueron cargadas sobre el gel de ADN fueron tratadas previamente con RNasa, con el fin de visualizar claramente el ADN genómico.

Como lo muestra claramente la Figura 1, tanto a partir de células HeLa como también a partir de otros dos tejidos se aisló ADN genómico de elevado peso molecular (> 20 kpb). La relación $A_{260/280}$ se encontraba en todos los casos por encima de 2,0.

La idoneidad del ADN eluido para aplicaciones consecutivas se representa en la Figura 2. El ADN aislado a partir de tres materiales de muestra diferentes se sometió en este caso a una digestión por restricción con EcoRI. Como demuestra la comparación K/-RE, el ADN aislado es estable durante 1 h a 37°C, lo cual habla en favor de la integridad y pureza del ADN. La comparación -RE/+RE demuestra que el ADN puede ser restringido.

La idoneidad de ADN y ARN aislados para aplicaciones consecutivas, p. ej. PCR también se puede deducir de la Figura 3. En la figura a la izquierda se pueden ver claramente las bandas típicas descritas para los cebadores a aproximadamente 750 y 1200 pb. Como material de muestra se emplearon tres tejidos vegetales diferentes. La Figura 3 muestra, además, la idoneidad del ADN aislado para la importante aplicación consecutiva de la RT-PCR (véase la Figura 3, a la derecha). ARN que fue aislado según el procedimiento de acuerdo con la invención, fue transcrito en ADN mediante transcripción inversa, y éste fue amplificado a continuación mediante PCR. La Figura 3 a la derecha muestra en este caso los patrones de banda típicos y confirma, por consiguiente, la idoneidad del ARN empleado para la RT-PCR.

El análisis de electroforesis en gel de los ADN y ARN aislados se representa en la Figura 4. El material eluido de ADN en el gel de ARN no muestra bandas para el ARN ribosomal, lo que confirma que el ADN está ampliamente exento de ARN. El ADN genómico propiamente dicho sólo se puede reconocer en el gel de formaldehído expuesto para ARN. La misma muestra en el gel de ADN indica, por el contrario, claramente una banda < 20 kpb para ADN

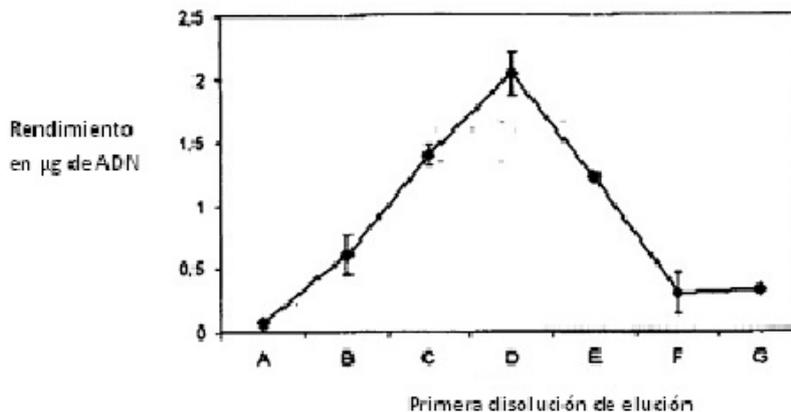
5 genómico intacto. Tampoco aquí se pueden reconocer contaminaciones por ARN. Las bandas para ARN ribosomal de 18S y 28S se pueden ver claramente en el gel de ADN y bajo el empleo de los materiales eluidos de ARN. En este caso, está ausente cualquier indicio de contaminaciones por ADN, el cual está ausente por completo también en el gel de ADN de los materiales eluidos de ARN. Por el contrario, el gel de ADN muestra sólo el ARN degradado (con el fin de visualizar mejor el ADN se llevó a cabo en este caso una digestión con RNasa).

Ejemplo 2: Determinación del intervalo de pH adecuado para la primera disolución de elución

10 Material de muestra: por cada preparación, aprox. 10^6 células HeLa. Aislamiento de los ácidos nucleicos conforme al protocolo estándar del Ejemplo 1. La disolución de lavado era en todos los experimentos la siguiente: BisTris 10 mM (pH = 7), CaCl_2 5 mM, MgCl_2 5 mM, etanol al 80%. En la elución del ADN se testaron las siguientes variantes para la 1ª disolución de elución:

- | | | |
|----|-------------------------------------|--|
| 15 | A. ácido fórmico-NaOH 10 mM, pH = 4 | CaCl_2 5 mM; MgCl_2 5 mM |
| | B. ácido acético-NaOH 10 mM, pH = 5 | CaCl_2 5 mM; MgCl_2 5 mM |
| | C. BisTris 10 mM, pH = 6 | CaCl_2 5 mM; MgCl_2 5 mM |
| | D. BisTris 10 mM, pH = 7 | CaCl_2 5 mM; MgCl_2 5 mM |
| | E. Tris 10 mM, pH = 9 | CaCl_2 5 mM; MgCl_2 5 mM |
| | F. Etanolamina 10 mM, pH = 9,5 | CaCl_2 5 mM; MgCl_2 5 mM |
| 20 | G. Etanolamina 10 mM, pH = 10 | CaCl_2 5 mM; MgCl_2 5 mM |

Se llevaron a cabo determinaciones dobles. Los resultados se representan en el siguiente diagrama.



25 Influencia del valor del pH de las disoluciones de elución A a G sobre el rendimiento de ADN. N = 2, valores medios y errores

30 El rendimiento de ADN depende, conforme al diagrama anterior, claramente del valor del pH de la disolución empleada y sigue una curva de óptimos típica. El valor del pH preferido se encuentra en 7,0.

35 El rendimiento en ARN en la subsiguiente purificación permaneció ampliamente intacto del valor del pH de las disoluciones de elución anteriores, en donde se podía reconocer un determinado deterioro de la calidad del ARN a valores de pH de la 1ª disolución de elución superiores a 8 (análisis a través de electroforesis en gel).

Los resultados anteriores del Ejemplo 2 indican también que puede trabajarse con diferentes sustancias tampón. El valor del pH es decisivo.

Ejemplo 3: Efecto de Ca/MgCl_2 sobre el rendimiento en ácidos nucleicos

40 El objetivo de esta serie de ensayos era investigar la influencia de la presencia y ausencia de Ca/MgCl_2 en la disolución de lavado sobre la concentración necesaria de los iones divalentes en la 1ª disolución de elución. El material de la muestra era en cada caso una preparación de aprox. 10^6 células HeLa. Aislamiento de los ácidos nucleicos conforme al protocolo estándar del Ejemplo 1.

45 En el Experimento 1 se utilizó una disolución de lavado con iones metálicos divalentes: BisTris 10 mM (pH = 7), CaCl_2 5 mM, MgCl_2 5 mM, etanol al 80%. En el caso del Experimento 2 se utilizó una disolución de lavado sin

iones metálicos divalentes: BisTris 10 mM (pH = 7), etanol al 80%.

En los Experimentos 1 y 2 se emplearon las siguientes 9 disoluciones de elución como primera disolución de elución:

5

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| A. BisTris 10 mM, pH = 7 | sin adición de sales |
| B. BisTris 10 mM, pH = 7 | CaCl ₂ 1 mM |
| C. BisTris 10 mM, pH = 7 | CaCl ₂ 5 mM |
| D. BisTris 10 mM, pH = 7 | CaCl ₂ 10 mM |
| E. BisTris 10 mM, pH = 7 | CaCl ₂ 100 mM |
| F. BisTris 10 mM, pH = 7 | MgCl ₂ 1 mM |
| G. BisTris 10 mM, pH = 7 | MgCl ₂ 5 mM |
| H. BisTris 10 mM, pH = 7 | MgCl ₂ 10 mM |
| I. BisTris 10 mM, pH = 7 | MgCl ₂ 100 mM |

10

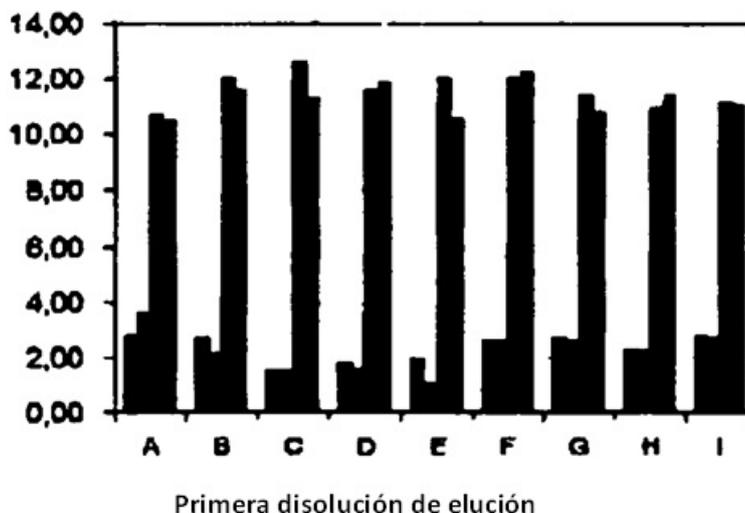
15

En total se testaron 18 preparaciones por cada experimento (preparaciones dobles utilizando las 9 disoluciones de elución diferentes). Los resultados del Experimento 1 se representan en el siguiente diagrama:

20

Experimento 1: Disolución de lavado con iones metálicos. Columnas en negro: ácidos nucleicos en el primer material eluido; columnas claras: ácidos nucleicos en el segundo material eluido, es decir ácidos nucleicos que permanecían en la columna después del tratamiento con la primera disolución de elución.

Rendimiento en ácidos nucleicos [µg]



25

En el caso de la presencia de Ca/MgCl₂ en la disolución de lavado se puede separar por lavado ADN de la columna en la siguiente etapa con todas las variantes testadas de la primera disolución de elución, sin que dicho ADN esté contaminado aparentemente con ARN según electroforesis en gel con TAE y en gel de formaldehído. Esto se cumple particularmente también para la primera disolución de elución A que no contenía iones metálicos divalentes. Esto significa que era posible incluso una elución del ADN con BisTris 10 mM, permaneciendo al mismo tiempo el ARN en la columna. Una concentración de iones lo más baja posible es muy importante para las aplicaciones posteriores. Como explicación de que el ARN permanezca en la columna y ARN/ADN es suficiente como para mantener el ARN en la columna en el caso de adición de una 1ª disolución de elución sin iones metálicos divalentes. El análisis con electroforesis en gel demuestra que los ácidos nucleicos en la primera disolución de elución se componían prácticamente sólo de ADN y el ARN no fue eluido conjuntamente. Los ácidos nucleicos en el material eluido final mostraban, por el contrario, exclusivamente ARN.

35

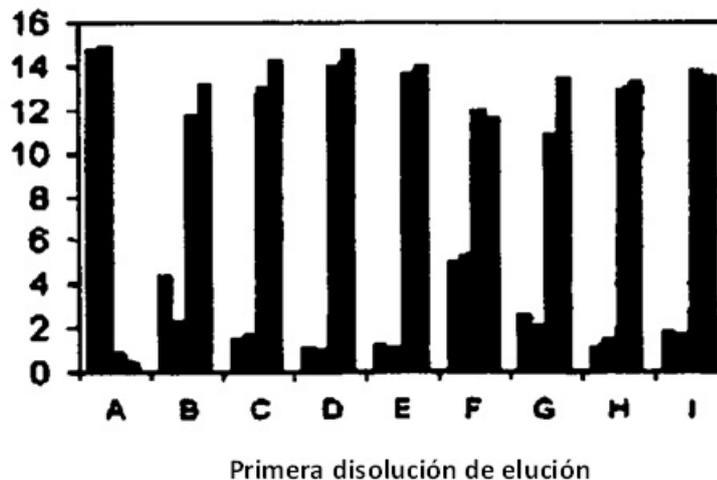
El siguiente diagrama muestra los resultados del Experimento 2.

40

Experimento 2: Disolución de lavado sin iones metálicos. Columnas en negro: ácidos nucleicos en el primer material eluido; columnas claras: ácidos nucleicos en el segundo material eluido, es decir ácidos nucleicos que

permanecían en la columna después del tratamiento con la primera disolución de elución.

Rendimiento en ácidos nucleicos [µg]



En el caso de la ausencia de Ca/MgCl_2 en la disolución de lavado, la subsiguiente entrega de 100 µl de la primera disolución de elución A exenta de iones (BisTris 10 mM, pH 7) conduce a la elución de ADN y ARN, dado que esta elución se llevó a cabo en ausencia de iones metálicos divalentes. La presencia de CaCl_2 1 a 100 mM o MgCl_2 1 a 100 mM en la primera disolución de elución posibilitó una elución de ADN manteniendo el ARN en la columna. El ARN se encontró luego en el segundo material eluido.

Los resultados de los Experimentos 1 y 2 permiten concluir lo siguiente: si se emplea una disolución de lavado sin iones divalentes, p. ej. $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$, la primera disolución de elución debe contener al menos CaCl_2 o MgCl_2 1 mM. La realización preferida prevé en cada caso, 5 mM. Con el fin de no perturbar aplicaciones posteriores, son aconsejables concentraciones lo más bajas posibles. Por el contrario, si en la disolución de lavado ya están presentes iones divalentes, la primera disolución de elución puede estar también exenta de iones metálicos divalentes. El Ejemplo 3 muestra, además, que la presencia de un ion metálico (Ca^{2+} o Mg^{2+}) es suficiente como para mantener al ARN en la columna. Los resultados del Ejemplo 2 confirman que también pueden utilizarse 2 iones metálicos diferentes, tanto en la disolución de lavado como también en la primera disolución de elución.

Ejemplo 4: Test de iones metálicos diferentes

En esta serie de ensayos se emplearon iones metálicos diferentes. Los iones estaban presentes tanto en la disolución de lavado como también en la primera disolución de elución:

Material nº	Sal
1	$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
2	CaCl_2 (anhidro)
3	$\text{BaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
4	NaCl
5	MnCl_2
6	ZnCl_2
7	$\text{CaI}_2 \times \text{H}_2\text{O}$
8	MgSO_4
9	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
10	LiCl
11	CuCl_2
12	$\text{BeSO}_4 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
13	$\text{SrCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

Variantes de la disolución de lavado 1-13: en cada caso BisTris 10 mM, pH 7; sal 5 mM (nº 1-13); etanol al 80%. Variantes de la primera disolución de elución 1-13: en cada caso BisTris 10 mM, pH 7; sal 5 mM (nº 1-13). Se emplearon 13 pares de disoluciones (disolución de lavado/primer disolución de elución) en cada caso en

preparaciones dobles → 26 preparaciones. Por cada preparación, 2 materiales eluidos (material eluido de ADN/material eluido de ARN) → en total 52 materiales eluidos.

Protocolo:

- 5
- recoger células HeLa en 350 µl de RA1, 10⁶ células HeLa por preparado.
 - mezclar a ello en cada caso 350 µl de etanol.
 - aplicar a la columna NS RNA II.
- 10
- + 500 µl de disolución de lavado nº 1-13, centrifugar durante 1 min a 11.000 x g
 - + 500 µl de disolución de lavado nº 1-13, centrifugar durante 1 min a 11.000 x g, después colocar la columna en Eppi reciente.
 - + 100 µl de primera disolución de elución (disoluciones nº 1-13), centrifugar durante 1 min a 11.000 x g (material eluido de ADN).
- 15
- continuar la etapa 7, página 15 (*Digest DNA*) del manual NS RNA II, versión de mayo del 2003, Rev. 02.
 - elución final del ARN con 100 µl de agua (material eluido de ARN), cuantificación mediante A260, electroforesis en gel con TAE al 1% (ADN) y gel de formaldehído desnaturalizante al 1,2% (ARN). Los resultados están representados en la siguiente Tabla. Se recogen todos los iones metálicos testados con los iones conjugados utilizados

Elución de ADN			
	Cl ⁻	I ⁻	SO ₄ ²⁻
Li ⁺	contiene también ARN		
Na ⁺	contiene también ARN		
Be ²⁺			ninguna
Mg ²⁺	muy buena		muy buena
Ca ²⁺	moderada	moderada	
Sr ²⁺	muy buena		
Ba ²⁺	moderada		
Mn ²⁺	apenas		
Cu ²⁺	ninguna		ninguna
Zn ²⁺	ninguna		
Elución con ARN			
	Cl ⁻	I ⁻	SO ₄ ²⁻
Li ⁺	apenas, dado que ya eluye con ADN		
Na ⁺	apenas, dado que ya eluye con ADN		
Ba ²⁺			apenas
Mg ²⁺	muy buena		muy buena
Ca ²⁺	muy buena	muy buena	
Sr ²⁺	buena		
Ba ²⁺	muy buena		
Mn ²⁺	muy buena		
Cu ²⁺	buena		muy buena, pero contaminado con ADN
Zn ²⁺	muy buena, pero claramente contaminado con ADN		
Valoración global para la elución con ADN y con ARN			
	Cl ⁻	I ⁻	SO ₄ ²⁻
Li ⁺	ARN en el material eluido de ADN		
Na ⁺	ARN en el material eluido de ADN		
Be ²⁺			nada de ADN, apenas ARN
Mg ²⁺	muy buena		muy buena
Ca ²⁺	menos ADN que con Mg	menos ADN que con Mg	
Sr ²⁺	menos ARN que con Mg		
Ba ²⁺	poco ADN		
Mn ²⁺	apenas ADN		
Cu ²⁺	nada de ADN		nada de ADN
Zn ²⁺	nada de ADN		

- 5 Como se reconoce de la valoración global, bajo las condiciones aquí elegidas son particularmente adecuados magnesio y calcio, pero también estroncio y bario. Los iones conjugados juegan únicamente un papel subordinado tal como se puede ver en el ejemplo del cloruro (algunos iones metálicos muy bien, algunos muy mal) algo similar se cumple para el sulfato (magnesio muy bien, cobre muy mal). Aun cuando la mayoría de los experimentos se hicieron con Cl^- , los datos demuestran que, de igual manera, también se pueden utilizar otros iones conjugados. Por el contrario, iones metálicos monovalentes (véase litio, sodio) no son adecuados.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para el aislamiento y separación de ácidos nucleicos de cadena sencilla y doble a partir de una muestra que contiene estos ácidos nucleicos, en donde el ácido nucleico de cadena doble es ADN y el ácido nucleico de cadena sencilla es ARN, y los ácidos nucleicos de cadena sencilla y doble son ligados a un material de soporte del cual se eluyen los ácidos nucleicos de doble cadena con una primera disolución de elución y los ácidos nucleicos de cadena sencilla se eluyen a continuación con una segunda disolución de elución, caracterizado porque la elución de los ácidos nucleicos de doble cadena se lleva a cabo en presencia de al menos un ion metálico divalente en una concentración al menos tan elevada que durante la elución de los ácidos nucleicos de doble cadena no se eluyen ácidos nucleicos de cadena sencilla, en donde la primera disolución de elución es un tampón con bajo contenido en sales o agua, y la segunda disolución de elución es una disolución con bajo contenido en sales o agua y en donde el al menos un ion metálico divalente se elige del grupo de los metales alcalinotérreos, y su concentración no es mayor que 200 mM.
- 15 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la primera disolución de elución comprende el al menos un ion metálico divalente con una concentración de al menos 1 mM.
- 20 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el material de soporte se trata con una disolución de lavado después de la unión de los ácidos nucleicos y antes de la elución de los ácidos nucleicos de doble cadena.
- 25 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la disolución de lavado contiene el al menos un ion metálico divalente.
- 30 5.- Procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, caracterizado porque la disolución de lavado comprende un alcohol, preferiblemente un alcohol alifático con 1 a 5 átomos de carbono.
- 35 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado porque la disolución de lavado comprende una sustancia tampón, y el valor del pH de la disolución de lavado se ajusta entre 4,5 y 9,5.
- 40 7.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el valor del pH de la disolución de lavado se ajusta a 7.
- 45 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el al menos un ion metálico divalente se presenta, en la elución de los ácidos nucleicos de doble cadena en una concentración de a lo sumo 100 mM.
- 50 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el al menos un ion metálico divalente se presenta en la elución de los ácidos nucleicos de doble cadena en una concentración de a lo sumo 20 mM.
- 55 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el al menos un ion metálico divalente es un ion calcio, ion magnesio, ion bario y/o ion estroncio.
- 60 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque se incorporan iones calcio en forma de sulfato de calcio.
- 12.- Procedimiento según la reivindicación 10 u 11, caracterizado porque se incorporan iones bario en forma de sales de bario.
- 13.- Procedimiento según la reivindicación 11 ó 12, caracterizado porque el material eluido con los ácidos nucleicos de doble cadena se trata con iones sulfato de modo que en el material eluido precipitan cationes todavía contenidos.
- 14.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque la primera disolución de elución comprende una sustancia tampón, y el valor del pH de la disolución de elución se ajusta entre 4,5 y 9,5.
- 15.- Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque el valor del pH de la primera disolución de elución se ajusta a 7.
- 16.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque después de la elución del ácido

nucleico de doble cadena y antes de la elución del ácido nucleico de cadena sencilla se lleva a cabo una digestión con ADN de posible ADN residual.

5 17.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque después de la elución de los ácidos nucleicos de doble cadena y antes de la elución de los ácidos nucleicos de cadena sencilla, el material de soporte se lava con un tampón de lavado alcohólico.

10 18.- Columna de separación para llevar a cabo el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 17, con un material de soporte que es adecuado para la unión de ácidos nucleicos de cadena sencilla y doble, caracterizada porque la columna de separación contiene al menos una sal de metal alcalinotérreo en forma sólida, que es soluble en un tampón con bajo contenido en sales o agua y que, bajo la acción de este líquido, proporciona los iones metálicos divalentes en al menos una concentración tan elevada que durante la elución de los ácidos nucleicos de doble cadena no se eluyen ácidos nucleicos de cadena sencilla, ascendiendo la concentración en iones metálicos divalentes a al menos 1 mM y no siendo mayor que 200 mM.

15 19.- Columna de separación según la reivindicación 18, caracterizada porque las sales de metales son sulfato de calcio y/o cloruro de bario.

20 20.- Columna de separación según la reivindicación 18 ó 19, caracterizada porque el sólido está asociado al material de soporte.

21.- Columna de separación según una de las reivindicaciones 18 a 20, caracterizada porque el sólido está presente en un papel de filtro.

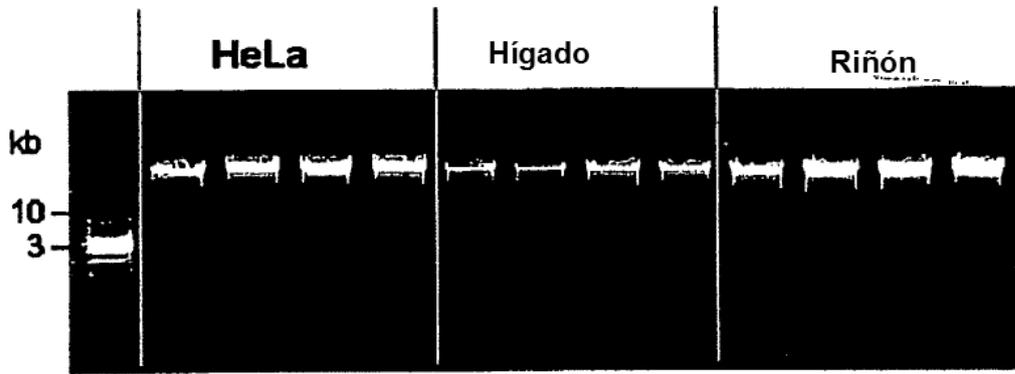


Fig. 1



Fig. 2

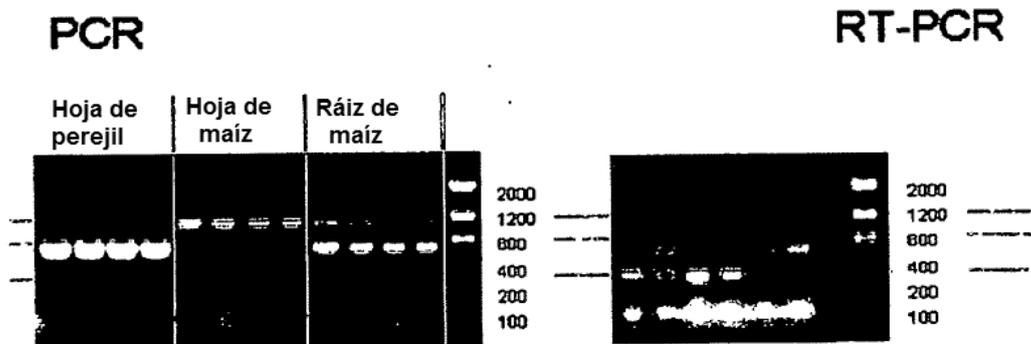


Fig. 3

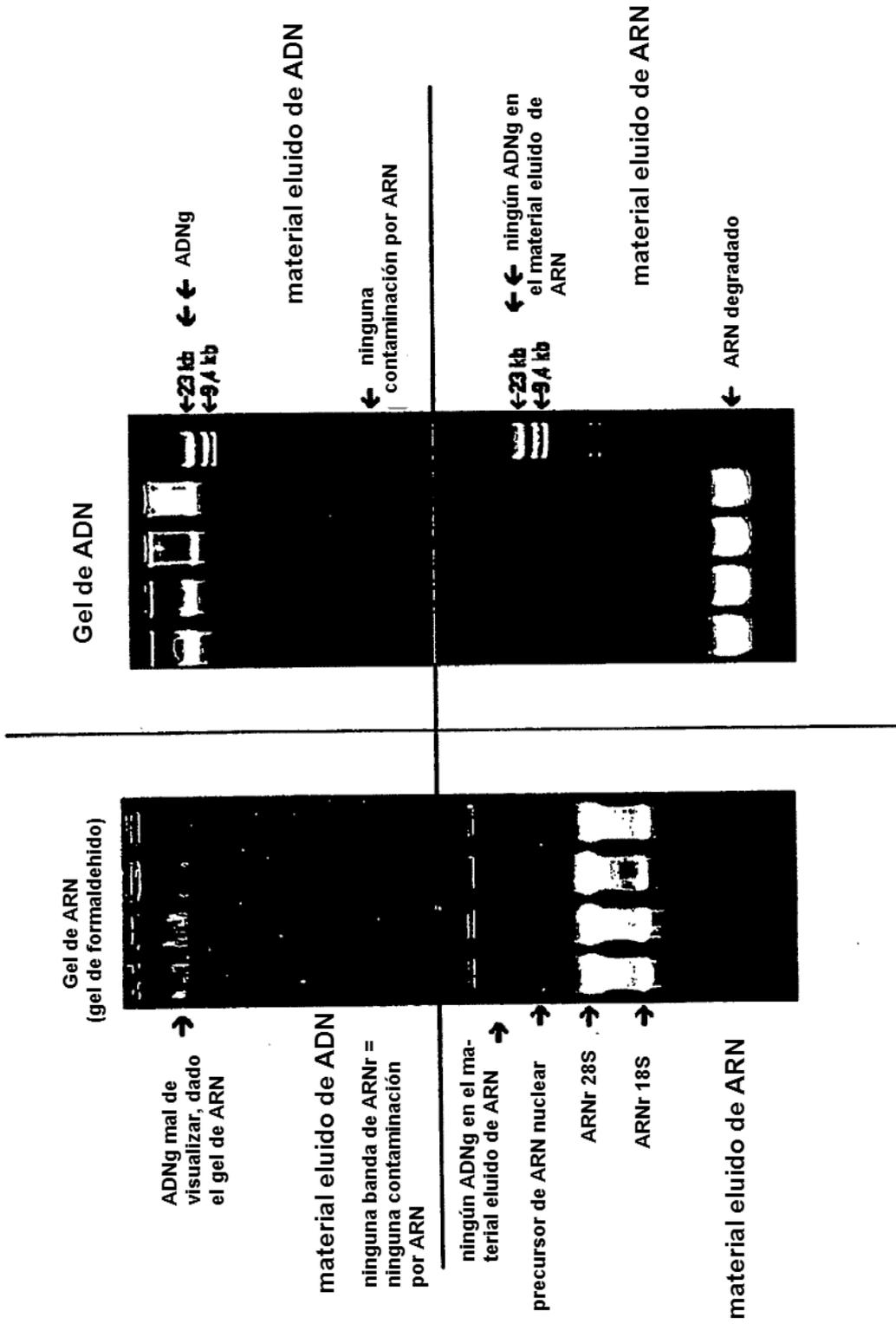


Fig. 4