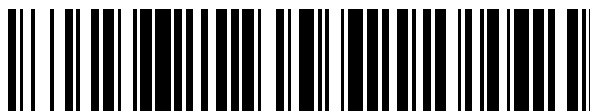


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 976**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06830455 .9**  
96 Fecha de presentación: **07.12.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1960521**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTO Y KIT DE ANÁLISIS PARA LA SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN Y RECUPERACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE CADENA LARGA Y DE CADENA CORTA.**

30 Prioridad:  
**07.12.2005 DE 102005059217**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.02.2012**

73 Titular/es:  
**AJ INNUSCREEN GMBH  
ROBERT-ROESSLE-STRASSE 10  
13125 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:  
**HILLEBRAND, Timo**

74 Agente: **Álvarez López, Fernando**

**ES 2 373 976 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 y kit de análisis para la separación, purificación y recuperación de ácidos nucleicos de cadena larga y de cadena corta

5 La invención se refiere a una novedosa fórmula de tampón para la rápida separación, purificación y altamente eficiente recuperación de ácidos nucleicos de cadena larga y / o de cadena corta.

10 La invención se centra especialmente en aquellas aplicaciones en las que se deben purificar y recuperar de forma altamente eficiente y rápida fragmentos específicos de ácidos nucleicos a partir de mezclas de reacción complejas (PCR, mezclas de restricción, mezclas de secuenciación, mezclas de marcación), para añadirlos a una reacción posterior.

15 Para la purificación y la recuperación de fragmentos específicos de ADN existe en la actualidad un sinnúmero de kits disponibles en el mercado.

20 Todos estos procedimientos se basan en un procedimiento desarrollado y descrito por primera vez por Vogelstein y Gillespie (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 615-619) para la purificación preparativa y analítica de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa. El procedimiento combina la disolución de la agarosa que contiene la banda de ADN que ha de ser aislada, en una solución saturada de una sal caotrópica (NaJ) con la unión de ADN a partículas de vidrio. A continuación se lava el ADN fijado a las partículas de vidrio con una solución de lavado (Tris HCl 20 mM [pH 7,2]; NaCl 200 mM; EDTA 2 mM; 50 % v/v de etanol) y, por último, se separa de las partículas de soporte.

25 El principio físico-químico de los sistemas que actualmente se encuentran disponibles en el mercado y que se usan según el estado conocido de la técnica para el aislamiento de ácidos nucleicos en base a la unión de los ácidos nucleicos a las superficies de soportes minerales deberá consistir en la alteración de estructuras superiores del medio acuoso, por medio de la cual se adsorben los ácidos nucleicos a la superficie de los materiales minerales, especialmente de partículas de vidrio o silicato. La alteración de las estructuras superiores del medio acuoso tiene lugar siempre en presencia de iones caotrópicos y a altas concentraciones de éstos es casi cuantitativa. A partir de  
30 la base físico-química descrita, todos los sistemas disponibles en el mercado para el aislamiento de ácidos nucleicos contienen composiciones de tampón con sales caotrópicas de alta fuerza iónica, para la unión de ácidos nucleicos a una fase sólida que une ácidos nucleicos.

35 Todos los procedimientos descritos para el aislamiento de ácidos nucleicos a través de la unión de los ácidos nucleicos a fases minerales sólidas mediante el uso de soluciones salinas caotrópicas tienen en común que se tengan que utilizar altas concentraciones para la unión de los ácidos nucleicos con los materiales de soporte empleados. Además, precisamente las sales caotrópicas (p. ej. isotiocianato de guanidina, clorhidrato de guanidina, perclorato de sodio o yoduro de sodio) son sustancias que reaccionan de un modo altamente tóxico. Los sistemas de tampón usados con fuerzas iónicas muy altas producen a menudo la transmisión de contaminaciones salinas, lo que puede resultar problemático para una serie de aplicaciones posteriores. Por otra parte, existe un notable riesgo para la salud a la hora de manejar tampones caotrópicos (especialmente en el caso de aplicaciones durante largos periodos de tiempo), así como una considerable contaminación del medio ambiente debido a la carga de sustancias nocivas contenida en las aguas residuales.

45 Curiosamente, se ha demostrado que todos los sistemas disponibles en el mercado a nivel mundial para el aislamiento de ácidos nucleicos que se basan en la unión de ácidos nucleicos con materiales minerales de soporte (partículas magnéticas, membranas, suspensiones portadoras, entre otros), actúan principalmente de acuerdo con el procedimiento descrito. Desde la primera descripción por parte de Vogelstein y Gillespie, los ácidos nucleicos unidos se lavan siempre con alcohol o con soluciones salinas que contienen acetona. Los pasos de lavado constituyen una parte esencial de los protocolos de extracción y sirven siempre, además de para la eliminación de las sustancias inhibitorias no deseadas que se han unido, para la eliminación necesaria de las sales que se precisan para la unión de los ácidos nucleicos.

55 En el documento de patente WO 01/62976 A1 se da a conocer un procedimiento que abarca la purificación de ácidos nucleicos a partir de distintas mezclas de reacción por adición de diferentes alcoholes, su posterior precipitación en fases sólidas especiales (membranas con características físicas específicas), los pasos de lavado con tampones alcohólicos y la elución final de los ácidos nucleicos por medio de agua.

Asimismo, los documentos de patente US 54055951 A y EP 0512767 A1 describen el aislamiento de ácidos

nucleicos mediante la incubación de la muestra que contiene ácidos nucleicos con un alcohol y la posterior incubación de la muestra con un material mineral. La elución de los ácidos nucleicos tiene lugar a través de la adición de agua calentada a 60 °C.

5 En el documento de patente DE 10253351 A1 se da a conocer que la purificación y la recuperación de ácidos nucleicos se produce debido a que la solución que contiene ácidos nucleicos se regula de tal modo que contenga cationes monovalentes y polivalentes, así como un alcohol, que se ponga a continuación en contacto con la fase sólida, se lave el soporte, en caso necesario, y se desprenda el ácido nucleico de la fase sólida. Como componentes salinos monovalentes se emplea el cloruro de amonio, cloruro de sodio y/o cloruro de potasio; y como componente salino polivalente, el cloruro de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de zinc y/o cloruro de manganeso.

10 Se da a conocer que precisamente la combinación de una sal monovalente y de una polivalente conduce a que los ácidos nucleicos se adsorban a las fases sólidas, para lo cual basta con que las fuerzas iónicas requeridas sean muy reducidas. Esto tiene la ventaja de que, en su caso, los pasos de lavado que hasta el momento siempre habían sido necesarios dejarán de serlo, por lo que los procedimientos de aislamiento de los ácidos nucleicos se reducen y se simplifican notablemente.

15 No obstante, queda demostrado que con el empleo de las combinaciones de tampones indicadas en el documento de patente DE 10253351 A1 (p. ej. cloruro de magnesio / cloruro de potasio), si bien la purificación y la recuperación de fragmentos de ADN a partir de mezclas de reacción de PCR tiene lugar con un alto índice de recuperación, lamentablemente no es posible llevar a cabo la eliminación selectiva de subproductos no deseados de la PCR (p. ej. dímeros de cebadores).

20 Con esto únicamente es posible demostrar la posibilidad general de la recuperación de fragmentos de ADN, aunque no así su eficiente purificación. Parece que el motivo de esta observación posiblemente sea el catión polivalente empleado. No obstante, en el caso de que el catión polivalente se elimine de la mezcla de tampones, ya no es entonces posible la recuperación de los ácidos nucleicos con los tampones descritos basados en la reducida fuerza iónica. Pero precisamente el uso de tampones con una fuerza iónica muy reducida ha constituido la disposición conforme a la invención del documento de patente.

25 El documento WO00/34463 A1 describe un procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos en el que los ácidos nucleicos se unen a una fase sólida, para lo que la unión es mediada por tampones de unión basados en las denominadas sales anticaotrópicas y en un componente alcohólico. Los ácidos nucleicos unidos se lavan con tampones de lavado conocidos en sí y finalmente se eluyen mediante la adición de un tampón con bajo contenido en sal. Las fuerzas iónicas de las denominadas sales anticaotrópicas son de al menos 0,1 M – 10 M. Las denominadas sales anticaotrópicas para la unión de ácidos nucleicos con una fase sólida son, sin excepción, cloruros.

30 El documento de patente WO 89/08257 A1 indica que los citratos están incluidos en la categoría de las sales anticaotrópicas. La cualidad caracterizada en este documento se entiende en el contexto de la inmovilización de proteínas y no tiene ninguna relación con los ácidos nucleicos o procedimientos para el aislamiento y la purificación de los ácidos nucleicos.

35 El documento de patente W02005058933 A describe un procedimiento para el aislamiento de ARN a partir de una muestra biológica a través de los siguientes pasos: (a) poner en contacto una mezcla para la desnaturalización de proteínas, compuesta de una sal de litio (2,5 – 4,0 M), un alcohol (25 – 40 % v/v) y una sal de citrato (25 – 100 mM) con una fase sólida, de modo que las proteínas de la fase sólida sean desnaturalizadas; (b) poner en contacto la fase sólida con una muestra compuesta de ARN, de modo que el ARN se una con la fase sólida; (c) lavar la fase sólida para eliminar el material biológico que no represente ningún ARN; y (d) eluir el ARN unido de la fase sólida. La fuerza iónica en el documento W02005058933 A para la unión del ácido nucleico a la fase sólida se encuentra como mínimo a una potencia de diez por encima de 100 mM debido a la alta concentración de cloruro de litio.

40 La publicación para información de solicitud de patente DE 19746874 A1 describe la purificación de ácidos nucleicos adheridos a membranas hidrófobas. Los procedimientos descritos utilizan mezclas de sales y alcoholes para la unión de ácidos nucleicos a las membranas hidrófobas. Bajo las condiciones descritas, los ácidos nucleicos se unen a la membrana hidrófoba, se lavan y luego se extraen de la superficie de la membrana por medio de una pipeta. No existe ningún tipo de indicio de que las sales del ácido cítrico en combinación con un alcohol se empleen para la unión de los ácidos nucleicos con una fase sólida. Se usan las combinaciones ya conocidas de sales / alcoholes (p. ej. soluciones de alta molaridad de sales de guanidina en combinación con un alcohol). Las concentraciones de citrato se encuentran en un intervalo de 0,8 M. Todos los tampones allí expuestos contienen sales con altas fuerzas

iónicas.

5 La publicación de Farrah, S. R. en Applied and environmental microbiology, mar. 1982, vol. 43, nº 3, marzo 1982 (1982-03), páginas 659-663, menciona que las sales anticaotrópicas, como  $MgSO_4$  y los agentes quelantes de metal, como los iones de citrato, favorecen la adsorción de los bacteriófagos MS2 a los filtros de membrana.

S. Lakshmi y A.S. Balasubramanian describen en Biochimica et Biophysica Acta, vol. 567, nº 1, 1979, páginas 184-195, que los citratos aumentan de manera significativa la actividad de la enzima aril-sulfatasa disuelta.

10 La solicitud internacional de patente WO 2004/042058 A da a conocer un procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de una solución a través de la unión a una fase sólida por medio de sales no caotrópicas, caracterizado porque la solución que contiene ácidos nucleicos se regula con aditivos, de tal modo que contenga cationes monovalentes y polivalentes, así como un alcohol y, dado el caso, otros aditivos, los ponga luego en contacto con la fase sólida, a continuación lave, dado el caso, el soporte y libere el ácido nucleico de la fase sólida o  
15 que contenga cationes polivalentes y/o monovalentes, dado el caso, un alcohol y, dado el caso, otros aditivos y se ajuste un determinado valor de pH entre 5 y 10. No se describe el uso de citratos.

20 El documento WO 02/04620 A describe un procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de una solución a través de la unión con una fase sólida por medio de sales no caotrópicas, que se caracteriza por los siguientes pasos: a) adsorción de los ácidos nucleicos contenidos en la solución en presencia de sales alcalinas y / o alcalinotérricas a una superficie que contiene  $SiO_2$ , y b) elución de los ácidos nucleicos con una solución acuosa y, dado el caso, aislamiento de los ácidos nucleicos, caracterizado porque en el paso a) la adsorción de los ácidos nucleicos a la superficie con contenido en  $SiO_2$  tiene lugar en presencia de sales alcalinas y / o alcalinotérricas no caotrópicas de 0,1 a 3 M, y de 37 a 70 % en volumen de un alcohol alifático No se describe el uso de citratos.

25 La publicación de Eon-Ouval Alex y col: en Biotechnology and Bioengineering, vol. 83, nº 5, 5. Septiembre 2003, páginas 544-553 pertenece también al estado de la técnica. En ella se describe una solución de alta concentración salina para la separación del ARN durante un proceso de purificación farmacéutico de ADN plasmídico. También se describe una solución de citrato potásico en una concentración de 1,5 M. Todas las soluciones descritas ahí  
30 contienen sales de elevadas fuerzas iónicas.

La presente invención tenía como objetivo la tarea de eliminar las desventajas mencionadas anteriormente del estado actual de la técnica.

35 El objetivo se ha alcanzado mediante las características de las reivindicaciones. Conforme a la invención se ha facilitado un procedimiento y un kit de análisis que permite una recuperación altamente eficiente de ácidos nucleicos de cadena larga o corta, separa, dado el caso, de forma selectiva los ácidos nucleicos no deseados, y es sencillo y rápido en su ejecución.

40 El procedimiento conforme a la invención para la separación, purificación y recuperación de ácidos nucleicos de cadena larga y / o corta se compone de los pasos siguientes:

- (1) Unión de los ácidos nucleicos con una fase sólida por medio de un tampón de unión  
45 (2) Elución de los ácidos nucleicos unidos de la fase sólida,

donde el tampón de unión

- a) comprende como componente activo una composición de al menos una sal del ácido cítrico con cationes de  
50 carga positiva simple y  
b) al menos un alcohol, y  
c) no contiene ni sales caotrópicas ni una combinación de sales con cationes mono y polivalentes y  
d) las fuerzas iónicas para la unión a la fase sólida en combinación con un alcohol son menores de 100 mM.

Conforme a la invención, podrán ser empleadas las siguientes sales:

- 55 a) hidrogenocitrato de diamonio y / o  
b) dihidrogenocitrato de amonio y / o  
c) citrato de trisodio y / o  
d) hidrogenocitrato de disodio y / o

- e) dihidrogenocitrato de sodio y / o
- f) citrato de tripotasio y / o
- g) hidrogenocitrato de dipotasio y / o
- h) dihidrogenocitrato de potasio

5 Las concentraciones de alcohol de los tampones de unión se encuentran entre el 20 % y el 90 %, preferiblemente entre el 40 % y el 70 %. Como alcoholes pueden emplearse el metanol, etanol, propanol, isopropanol, etilenglicol, polietilenglicol o glicerol.

10 Conforme a la invención, las fuerzas iónicas para la unión con la fase sólida en combinación con un alcohol son inferiores a 100 mM, preferiblemente inferiores a 50 mM.

La fase sólida puede estar compuesta de materiales de fibra de vidrio, geles de sílice, suspensiones de soportes minerales, partículas magnetizadas; preferiblemente materiales de fibra de vidrio de 0,7 µm a 2 µm.

15 El procedimiento conforme a la invención para la separación, purificación y recuperación de ácidos nucleicos de cadena larga y / o corta está caracterizado por los pasos siguientes:

- Adición de los tampones de unión de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 a las mezclas de reacción que contienen ácidos nucleicos
- Traslado de la mezcla formada por las mezclas de reacción y los tampones de unión a una fase sólida
- Elución de los ácidos nucleicos unidos a la fase sólida.

25 Se suprime el lavado de los ácidos nucleicos unidos a la fase sólida.

Objeto de la invención es también un kit de análisis, que comprende al menos un alcohol, al menos una sal del ácido cítrico, una fase sólida y tampones de elución conocidos.

30 El uso conforme a la invención de sales del ácido cítrico en combinación con al menos un alcohol es la separación, la purificación y la recuperación de ácidos nucleicos de cadena larga y / o corta, especialmente de productos de la PCR, mezclas de la restricción o mezclas de la secuencia.

35 Sorprendentemente se ha demostrado que las diferentes sales del ácido cítrico en combinación con un alcohol se encuentran en disposición de unir y volver a liberar los ácidos nucleicos de cadena larga y corta de los materiales de soporte conocidos, especialmente materiales de fibra de vidrio.

40 Sorprendentemente se ha demostrado también que las fuerzas iónicas necesarias para la unión de los ácidos nucleicos igualmente sólo tienen que darse en concentraciones milimolares. El empleo de soluciones de tampones basados en un alcohol y una sal del ácido cítrico permite una recuperación altamente eficiente de los ácidos nucleicos a partir de las mezclas de reacción al mismo tiempo que la separación eficiente de los subproductos no deseados. Esto se da especialmente durante la purificación de productos de la PCR derivados de mezclas de reacción de PCR, donde en especial los cebadores o los dímeros de cebadores deben ser separados de los productos de amplificación específicos.

45 Las sales del ácido cítrico más preferidas son p. ej. hidrogenocitrato de diamonio, citrato de tripotasio monohidrato o citrato de trisodio dihidrato. También pueden emplearse hidrogenocitrato de amonio, hidrogenocitrato de disodio, dihidrogenocitrato de sodio, hidrogenocitrato de dipotasio, dihidrogenocitrato de potasio. Las fuerzas iónicas necesarias para la unión son inferiores a 100 mM, preferiblemente inferiores a 50 mM. Las concentraciones de alcohol requeridas para los tampones de unión se encuentran entre el 20 % y el 90 %, preferiblemente entre el 40 % y el 70 %. Pueden emplearse diferentes alcoholes, preferiblemente se utiliza el isopropanol.

55 El procedimiento conforme a la invención para la purificación y la recuperación de fragmentos de ADN a partir de mezclas de reacción es extremadamente rápido y sencillo en su ejecución. Las mezclas de reacción, a partir de las cuales los ácidos nucleicos deberán ser purificados, se mezclan con el tampón de unión de conformidad con la invención y a continuación se trasladan a una columna de centrifugado (p. ej. con un material de fibra de vidrio) y se centrifugan. Después se transporta la columna de centrifugado a un nuevo recipiente colector y se eluyen los fragmentos de ADN de la superficie de la columna tras la adición de agua o de un tampón de baja concentración salina (Tris.HCl 10 mM).

A diferencia de los procedimientos (kits) que encuentran aplicación en el mercado, no se requiere ningún paso de lavado. Además, el procedimiento renuncia por completo a las sales caotrópicas perjudiciales para la salud o el medio ambiente, como se llevan utilizando hasta ahora en los procedimientos comerciales disponibles.

- 5 Por otra parte, el tiempo requerido para una reacción de purificación puede ser reducido drásticamente. Por norma general, una purificación puede concluirse en alrededor de 3 min.

El procedimiento permite la purificación y la recuperación de un amplio espectro de tamaños de fragmentos de ADN con un índice muy alto de recuperación.

- 10 Sorprendentemente, también se ha demostrado que la combinación de las sales del ácido cítrico conforme a la invención, en cuanto a la fuerza iónica con la respectiva concentración de alcohol, influye tanto en la eficacia de la recuperación como en la selectividad, en relación con los fragmentos de ADN que deben ser purificados y con la longitud de sus fragmentos. Esta observación puede utilizarse perfectamente para explotar nuevos campos de aplicación. De este modo, el procedimiento conforme a la invención permite también una purificación eficiente de los productos de la PCR, mezclas de restricción o de secuenciación. En el caso de las mezclas de secuenciación, se plantea la tarea de la separación eficiente de terminadores marcados con colorante a la vez que se recuperan de modo eficiente los fragmentos de ADN de un amplio espectro de peso molecular, en especial también la recuperación de fragmentos muy pequeños de ácido nucleico. La realización de esta tarea precisa asimismo de tan sólo 3 min, por lo que se trata de un procedimiento notablemente más rápido y sencillo que todos los demás que han encontrado aplicación hasta el momento.

- 25 La diferencia entre la presente invención y la solución propuesta en el documento WO00/34463 A1 radica, entre otras cosas, en que las fuerzas iónicas son inferiores a 0,1 M, y preferiblemente inferiores a 0,05 M. En el documento WO00/34463 A1 no se describe el uso de las sales del ácido cítrico. Esto también tiene su explicación, ya que las aplicaciones expuestas en este documento con las sales del ácido cítrico no son en absoluto factibles. Sin embargo, la invención presentada se refiere exclusivamente a las sales del ácido cítrico. El documento WO00/34463 A1 describe sin excepción los procedimientos para el aislamiento y la purificación de los ácidos nucleicos genómicos, que son aislados a partir de muestras biológicas complejas. Sin embargo, no describe ningún procedimiento que permita la purificación y la recuperación de un ácido nucleico ya presente. Por este motivo, el aislamiento de los ácidos nucleicos siempre tiene lugar con tampones que, además de un componente salino, también contienen detergentes, enzimas proteolíticas, así como otros aditivos, cuya función consiste en la desintegración (lisis) de la muestra biológica.

- 35 La presente invención no se refiere al aislamiento de ácidos nucleicos genómicos procedentes de muestras biológicas complejas. El objeto de la presente invención es la purificación de mezclas de reacción, p. ej. mezclas de reacción de la PCR, en la que a continuación se deberá recuperar p. ej. un fragmento de ADN amplificado con un alto índice de recuperación. No tiene lugar la lisis de ninguna muestra biológica, como la que se lleva a cabo con los tampones del documento WO00/34463 A1. EL documento WO00/34463 A1 describe sin excepción un procedimiento para el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos genómicos, que contiene como paso obligatorio el lavado (lavado repetido) de los ácidos nucleicos unidos a la fase sólida. El lavado no sólo es necesario para eliminar las sustancias inhibitoras de las muestras biológicas, sino también para retirar las altas concentraciones de sal de los tampones de unión empleados. El análisis de los ejemplos de realización muestra que, por norma general, los tampones de lisis/unión expuestos presentan fuerzas iónicas superiores a 1,5 M. La presente invención utiliza concentraciones de sal notablemente inferiores (por debajo de 0,1 M). Por este motivo, la ventaja conforme con la invención también radica en poder prescindir de los pasos de lavado necesarios hasta ahora y, con ello, simplificar considerablemente el procedimiento y abreviar el proceso.

- 50 Por otro lado, según el estado de la técnica, en general no existe ningún indicio de que para la unión de los ácidos nucleicos con fases sólidas minerales conocidas en sí, se haga uso de las sales del ácido cítrico. Sin embargo, la invención se basa precisamente en esta observación, tanto más cuando precisamente dichas sales permiten realizar una unión de los ácidos nucleicos también con fuerzas iónicas presentes inferiores a 100 mM, en especial, inferiores a 50 mM. Las sales mencionadas en el documento WO00/34463 A1 no permiten ninguna unión de ácidos nucleicos así como tampoco su recuperación cuantitativa en el caso de ser empleadas con estas fuerzas iónicas tan bajas.

- 55 El documento WO 89/08257 A1 indica que los citratos están incluidos en la categoría de las sales anticaotrópicas. La cualidad caracterizada en este documento se entiende en el contexto de la inmovilización de proteínas y no tiene ninguna relación con los ácidos nucleicos o con los procedimientos para el aislamiento y la purificación de los ácidos nucleicos.

5 También otros documentos, además del documento WO/0034463 A1 ya descrito con detalle, describen el empleo de las denominadas sales anticaotrópicas, así como de las caotrópicas, para el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos. En este sentido, tampoco es el objetivo de la presente invención el aprovechar las sales anticaotrópicas y su empleo para el aislamiento de ácidos nucleicos, sino más bien el de facilitar la posibilidad de aprovechar por primera vez la combinación de las sales del ácido cítrico con un alcohol, con fuerzas iónicas extremadamente bajas, para una purificación eficiente y la posterior recuperación cuantitativa de los ácidos nucleicos, y, por tanto, también de los fragmentos de ácidos nucleicos. Y esto no se había dado a conocer hasta el momento.

10 La invención se describirá a continuación a partir de un ejemplo de realización.

**Ejemplo de realización**

15 La purificación y la recuperación de un producto de PCR de 98 pares de bases a partir de una mezcla de reacción de PCR. Empleo de distintos tampones de unión.

- 20 Tampón 1: hidrogenocitrato de diamonio 50 mM / 62 % isopropanol
- Tampón 2: citrato de trisodio dihidrato 50 mM / 62 % isopropanol
- Tampón 3: citrato de tripotasio monohidrato 50 mM / 62 % isopropanol
- Tampón 4: hidrogenocitrato de diamonio 25 mM / 62 % isopropanol
- Tampón 5: citrato de trisodio dihidrato 25 mM / 62 % isopropanol
- Tampón 6: citrato de tripotasio monohidrato 25 mM / 62 % isopropanol

25 Se mezclaron respectivamente 500 µl del tampón de unión con 50 µl de una mezcla de la PCR provisto de un fragmento amplificado de 98 pares de bases.

30 La mezcla se introdujo posteriormente en una columna de centrifugado con un filtro de fibra de vidrio (AF; empresa Pall) para la unión del fragmento de ácido nucleico deseado y se centrifugó durante 1 minuto a 10.000 x g. A continuación, la columna de centrifugado se introdujo en un nuevo recipiente de reacción de 1,5 ml y se centrifugó de nuevo durante 1 minuto a 8.000 x g tras la adición de un medio de elución (Tris-HCl 10 mM).

35 Los fragmentos de la PCR eluidos se evaluaron posteriormente por medio de un bioanalizador Agilent y se determinó tanto la pureza como el índice de recuperación con respecto a la mezcla de reacción de la PCR no purificada.

No se ha podido detectar ya ningún cebador o dímero de cebadores no específico.

40 La siguiente tabla recoge los índices de recuperación para los distintos tampones de unión correspondientes P1 – P6.

Fragmento inicial; no purificado	Tampón de unión P1	Tampón de unión P2	Tampón de unión P3	Tampón de unión P4	Tampón de unión P5	Tampón de unión P6
100 %	83,5 %	78,5 %	76,9 %	87,8 %	74,4 %	82,6 %

El ejemplo muestra claramente que con ayuda de los tampones de unión conforme a la invención es posible obtener unos índices de recuperación muy altos.

45 **DEFINICIONES**

Sales caotrópicas:

50 Sales que destruyen la estructura regular, basada en la formación de enlaces de tipo puentes de hidrógeno, del agua en estado líquido, al impedir la formación de las estructuras de jaula de H<sub>2</sub>O necesarias para la solvatación. Ejemplos de componentes caotrópicos son los tiocianatos, los yoduros o los percloratos.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para la separación, purificación y recuperación de ácidos nucleicos de cadena larga y / o corta con los siguientes pasos:
- Unión de los ácidos nucleicos a una fase sólida por medio de un tampón de unión
  - Elución de los ácidos nucleicos unidos de la fase sólida,
- 10 caracterizado porque el tampón de unión
- a) comprende como componente activo una composición de al menos una sal del ácido cítrico con cationes de carga positiva simple y
  - b) al menos un alcohol, y
  - c) no contiene ni sales caotrópicas ni una combinación de sales con cationes mono y polivalentes, y
  - 15 d) porque las fuerzas iónicas para la unión a la fase sólida en combinación con un alcohol son inferiores a 100 mM.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las sales del ácido cítrico representan sales con cationes de carga positiva simple.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque como sales del ácido cítrico se emplean hidrogenocitratos o dihidrogenocitratos.
- 25 4. Procedimiento según las reivindicaciones 2 o 3, caracterizado porque se emplean las siguientes sales:
- a) hidrogenocitrato de diamonio y / o
  - b) dihidrogenocitrato de amonio y / o
  - c) citrato de trisodio y / o
  - d) hidrogenocitrato de disodio y / o
  - 30 e) dihidrogenocitrato de sodio y / o
  - f) citrato de tripotasio y / o
  - g) hidrogenocitrato de dipotasio y / o
  - h) dihidrogenocitrato de potasio.
- 35 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque las concentraciones de alcohol de los tampones de unión oscilan entre un 20 % y un 90 %.
- 40 6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque las concentraciones de alcohol de los tampones de unión oscilan entre un 40 % y un 70 %.
7. Procedimiento según la reivindicación 5 o 6, caracterizado porque como alcoholes se emplean el metanol, el etanol, el propanol, el isopropanol, el etilenglicol, el polietilenglicol o el glicerol.
- 45 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque las fuerzas iónicas para la unión a la fase sólida en combinación con un alcohol se encuentran por debajo de 50 mM.
- 50 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque como fase sólida se emplean materiales de fibras de vidrio, geles de sílice, suspensiones de soportes minerales, partículas magnetizadas; preferiblemente materiales de fibra de vidrio de 0,7 µm a 2 µm.
- 55 10. Procedimiento para la separación y recuperación de ácidos nucleicos de cadena larga y / o corta, caracterizado por los siguientes pasos:
- Adición de los tampones de unión según una de las reivindicaciones 1 a 8 a las mezclas de reacción que contengan ácidos nucleicos
  - Traslado de la mezcla formada por las mezclas de reacción y los tampones de unión a una fase sólida
  - Elución de los ácidos nucleicos unidos a la fase sólida.



11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado porque** se prescinde del lavado de los ácidos nucleicos unidos a la fase sólida.

5 12. Uso del procedimiento según las reivindicaciones 1 a 11 para la purificación de productos de la PCR, mezclas de restricción o mezclas de secuenciación.