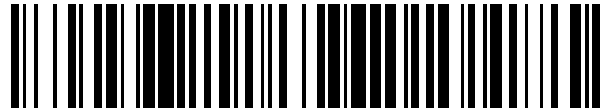


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 449**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2006 E 06819803 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 1960520**

54 Título: **Procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de cualquier material de partida**

30 Prioridad:

28.11.2005 DE 102005057334

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.05.2014

73 Titular/es:

**AJ INNUSCREEN GMBH (100.0%)
ROBERT-ROESSLE-STRASSE 10
13125 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:

TIMO, HILLEBRAND

74 Agente/Representante:

ÁLVAREZ LÓPEZ, Fernando

ES 2 463 449 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 de ácidos nucleicos a partir de cualquier material de partida.

5 El objeto de la invención es un procedimiento universal y considerablemente simplificado para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de diversos materiales de partida que contienen ácidos nucleicos, que garantice una gran calidad de los ácidos nucleicos que se aíslan, así como su aislamiento con rendimientos cuantitativos.

10 En las condiciones clásicas, el aislamiento de ADN a partir de células y tejidos tiene lugar de modo que los materiales de partida que contienen los ácidos nucleicos se disgregan en condiciones fuertemente desnaturalizantes y reductoras, en parte también con el uso de enzimas que degradan las proteínas, la fracción de los ácidos nucleicos liberada se purifica mediante etapas de extracción con fenol y cloroformo y los ácidos nucleicos se obtienen de la fase acuosa mediante diálisis o precipitación con etanol (Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., 1989, CSH, "Molecular Cloning").

15 Estos "procedimientos clásicos" para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de células y especialmente de tejidos consumen mucho tiempo (a veces más de 48 h), requieren un gasto considerable en aparatos y además no pueden llevarse a cabo en las condiciones existentes sobre el terreno. Adicionalmente, debido a los productos químicos usados como fenol y cloroformo, estos procedimientos conllevan riesgos no despreciables para la salud.

20 Distintos procedimientos alternativos para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de diversos materiales de partida biológicos permiten evitar la extracción de dichos ácidos nucleicos mediante fenol y cloroformo, proceso laborioso y perjudicial para la salud, así como lograr una reducción del tiempo necesario.

25 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 aislarse en una disolución saturada de una sal caotrópica (NaJ) con la unión del ADN a partículas de vidrio. A continuación, el ADN fijado a las partículas de vidrio se lava con una disolución de lavado (Tris HCl 20 mM [pH 7,2], NaCl 200 mM, EDTA 2 mM, etanol al 50% v/v) y después se separa de las partículas de soporte.

30 Hasta la fecha, este procedimiento ha sufrido numerosas modificaciones y actualmente se emplea en distintos procedimientos de extracción y purificación de ácidos nucleicos de diversas procedencias (Marko, M. A., Chipperfield, R. y Birnboim, H. G., 1982, Anal. Biochem., 121, 382-387).

35 Además, en la actualidad existen en todo el mundo numerosos sistemas de reactivos, sobre todo para la purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa y para el aislamiento de ADN plasmídico a partir de lisados bacterianos, pero también para el aislamiento de ácidos nucleicos de cadenas más largas (ADN genómico, ARN total celular) a partir de sangre, tejidos o también de cultivos celulares.

40 Todos estos kits disponibles comercialmente se basan en el principio suficientemente conocido de la unión de los ácidos nucleicos a soportes minerales en presencia de disoluciones de distintas sales caotrópicas y usan como materiales de soporte suspensiones de polvo de vidrio finamente molido (por ejemplo, Glasmlilk, BIO 101, La Jolla, CA, EE. UU.), tierra de diatomeas (Sigma) o también geles de sílice (Diagen, documento DE 4139664 A1).

45 Un procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos practicable para numerosas aplicaciones diferentes se describe en el documento US 5.234.809 (Boom). En dicho documento se describe un procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de materiales de partida que contienen ácidos nucleicos mediante la incubación del material de partida con un tampón caotrópico y una fase sólida que se une al ADN. Los tampones caotrópicos son responsables de la lisis del material de partida así como de la unión de los ácidos nucleicos a la fase sólida. El procedimiento es adecuado para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de pequeñas cantidades de muestra y encuentra aplicación práctica especialmente en el campo del aislamiento de ácidos nucleicos víricos.

50 Algunas modificaciones específicas de este procedimiento afectan al empleo de nuevos materiales de soporte, que muestran ventajas de aplicación para determinados planteamientos (documento WO-A 95/34569).

55 En documentos de patente más recientes se desvela que para la adsorción de los ácidos nucleicos a los materiales silicatados conocidos y empleados por los expertos, pueden emplearse también de manera muy eficiente y satisfactoria las denominadas sales anticaotrópicas como componentes de los sistemas de tampones de lisis y de unión (documento EP 1135479). La ventaja de este procedimiento es que al evitar el uso de sales caotrópicas, los sistemas de extracción suponen un riesgo considerablemente inferior para la salud. Sin embargo, para una extracción eficiente de los ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica compleja, especialmente con respecto a la obtención de los ácidos nucleicos con el mayor rendimiento posible, se necesitan a su vez grandes concentraciones de sales en el tampón de lisis (> 1,5 M). Así, el documento de patente desvela que los tampones de lisis que se usan contienen concentraciones de sales entre 1,5 M y 3 M.

En el documento de patente DE 4321904 se describe un procedimiento en el que es posible un aislamiento eficiente de ácidos nucleicos mediante la combinación de un tampón caotrópico de alta concentración de sales con componentes alcohólicos. A este respecto, los tampones de lisis indicados en el documento de patente contienen siempre concentraciones de sales de 4 M a 8 M y como sales se emplean especialmente clorhidrato de guanidinio, tiocianato de guanidinio o yoduro de potasio. Es sabido que estas sales son responsables de la lisis del material de partida, así como de una potente inactivación de enzimas nucleolíticas. Después de la lisis del material de partida, se añade un alcohol. El documento de patente desvela que la adición de componentes alcohólicos a un tampón de lisis con alta concentración de sales da lugar a una unión especialmente eficiente de los ácidos nucleicos a los materiales filtrantes silicatados que se emplean. Sin embargo, la desventaja del uso de tampones de lisis con sales caotrópicas de alta fuerza iónica es siempre el empleo solo limitado y además ineficiente de enzimas proteolíticas adicionales para la disgregación eficiente de muestras biológicas complejas, ya que las propias enzimas quedan dañadas por la acción desnaturalizante de proteínas de los tampones caotrópicos. Además, son necesarias exhaustivas etapas de lavado posteriores para eliminar las altas concentraciones de sales del material de adsorción empleado. El experto sabe que las sales caotrópicas ejercen un fuerte efecto inhibitor sobre numerosas aplicaciones posteriores.

El análisis del estado de la técnica aclara de manera convincente que existen numerosas posibilidades para unir ácidos nucleicos a materiales de soporte sólidos, especialmente materiales de soporte minerales a base de silicio, que a continuación se lavan para volver a separar los ácidos nucleicos de dicho material de soporte. En ello, queda muy claro que para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas complejas se emplean tanto las denominadas sales caotrópicas como las denominadas sales anticaotrópicas.

En el documento WO 2005/007895 A1 se describe un procedimiento para la purificación de ácidos nucleicos en un ensayo en fase sólida. Se desvela un procedimiento y kits para la preparación de un ácido nucleico y su unión a una fase sólida que comprenden una disolución de proteasa (tampón de lisis) que puede contener además una primera sal caotrópica y un detergente. La disolución de unión que ha de aplicarse a la fase sólida se obtiene por adición de una segunda sal caotrópica.

El documento WO 91/07422 A1 desvela un reactivo de lisis con un tampón de lisis que contiene la sal caotrópica clorhidrato de guanidinio 0,5-5 M, y además proteinasa K y detergentes como Triton X. La muestra lisada con este tampón se aplica sobre una fase sólida previamente preparada con una disolución de baja fuerza iónica. Después de la unión se llevan a cabo etapas de lavado y elución. La muestra en el tampón de lisis se diluye con un tampón de unión para disminuir la fuerza iónica antes de su aplicación a la columna.

Las ventajas del uso de sales caotrópicas para procesos de aislamiento y purificación de ácidos nucleicos residen en que estas sales y los tampones derivados de las mismas producen una eficiente desnaturalización de las proteínas. Esto permite el aislamiento de ácidos nucleicos también a partir de muestras biológicas complejas, dado el caso, sin el uso de enzimas proteolíticas. Otra ventaja, especialmente en el aislamiento de ARN, consiste en que las sales caotrópicas como componentes de tampones de lisis ejercen también un potente efecto de inactivación de ARNasas. Sin embargo, es desventajoso que el uso de procedimientos de extracción de ADN y ARN a base de sales caotrópicas esté siempre ligado a altas fuerzas iónicas. A bajas concentraciones, no es posible una unión eficiente de los ácidos nucleicos a los materiales cromatográficos usados hasta ahora. Esto tiene como consecuencia, por ejemplo, que las etapas de lavado conocidas por el experto sean muy laboriosas, ya que tienen por objeto separar las altas concentraciones de sales del ADN o ARN que se aísla finalmente. También es sabido que los componentes caotrópicos ejercen un fuerte efecto inhibitor sobre numerosas aplicaciones posteriores. Además, las sales caotrópicas son nocivas para la salud y, en último término, también muy costosas.

Las ventajas del empleo de las denominadas sales anticaotrópicas o sales no caotrópicas (por las que se entiende en los documentos de patente mencionados el grupo de sales que se encuentran al otro extremo de la lista con respecto a las sales caotrópicas en la serie de Hofmeister) consisten en que las formulaciones de tampones derivados de estas sales también pueden emplearse para el aislamiento de ácidos nucleicos. Sin embargo, dado que estas sales son sales denominadas estabilizantes de proteínas, la disgregación de muestras biológicas complejas se realiza siempre solo en presencia de enzimas proteolíticas. En ello, por lo general, la eficiencia de los procesos de lisis es siempre peor que cuando se usan sales caotrópicas como componentes de los tampones de lisis. Además, también es desventajoso que, especialmente en el aislamiento de ARN a partir de muestras biológicas complejas, no tenga lugar una inactivación de ARNasas. Esto tiene como consecuencia que no sea posible un aislamiento eficiente de ARN mediante sistemas de tampones no caotrópicos. En el análisis del estado de la técnica anterior se observa que también en los procedimientos anticaotrópicos para el aislamiento de ácidos nucleicos deben emplearse fuerzas iónicas superiores a 1 M para conseguir un aislamiento eficiente y cuantitativo de los ácidos nucleicos.

Por lo tanto, la invención tiene como objetivo la preparación de tampones de lisis y de unión que superen las desventajas mencionadas en el estado de la técnica.

El objetivo se consigue mediante las características de las reivindicaciones de la patente.

Las formulaciones de acuerdo con la invención para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de materiales que contienen ácidos nucleicos comprenden

- 5
- al menos un tampón con componentes caotrópicos
 - al menos una enzima proteolítica
 - al menos un tampón con componentes no caotrópicos
 - al menos un alcohol
 - detergentes conocidos de por sí.

10 De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, la concentración del tampón con componentes caotrópicos es inferior a 100 mM y la concentración del tampón con componentes no caotrópicos es inferior a 1 M, preferentemente inferior a 500 mM.

15 El componente alcohólico consta de alcoholes solubles en agua como metanol, etanol, propanol, isopropanol, etilenglicol, polietilenglicol o glicerina, en lo que la proporción del componente alcohólico es del 20 al 80 %, preferentemente del 45 al 55 %.

20 Como componente detergente puede emplearse una de las sustancias polivinilpirrolidona, CTAB, Triton X-100, *N*-laurilsarcosina, citrato de sodio, DDT o Tween 20.

25 Como fase sólida puede usarse cualquier material de soporte, tanto superficies funcionales negativas conocidas como membranas de nilón cargadas positivamente, membranas de polisulfona, membranas de polietersulfona, membranas de PVDF, membranas de polímeros acrílicos, membranas intercambiadoras de iones, fritas de polietileno e simples papeles de filtro, así como partículas de óxido de hierro magnéticas o partículas de silicato.

El procedimiento de acuerdo con la invención para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de materiales que contienen ácidos nucleicos mediante el uso de formulaciones de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 comprende las etapas siguientes:

- 30
- Lisis del material de partida

Las formulaciones de acuerdo con la invención para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de materiales que contienen ácidos nucleicos comprenden

35 - al menos un tampón de lisis con sales caotrópicas como componentes que contiene adicionalmente al menos una enzima proteolítica y al menos un detergente y

40 - al menos un tampón de unión con sales no caotrópicas como componentes que contiene adicionalmente al menos un alcohol y al menos un detergente,

en que la concentración de las sales caotrópicas componentes del tampón de lisis es inferior a 100 mM y la concentración de las sales no caotrópicas componentes del tampón de unión es inferior a 1 M.

45 De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, la concentración del tampón con componentes no caotrópicos es inferior a 500 mM.

El procedimiento de acuerdo con la invención para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de materiales que contienen ácidos nucleicos mediante el uso de formulaciones de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9 comprende las etapas siguientes:

- 50
- lisis del material de partida mediante el uso del tampón de lisis de acuerdo con la reivindicación 1,
 - dado el caso, prefiltración, unión de los ácidos nucleicos a una fase sólida mediante el uso del tampón de unión de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2,
 - lavado de los ácidos nucleicos unidos,
 - elución de los ácidos nucleicos unidos.
- 55

- Dado el caso, prefiltración, unión de los ácidos nucleicos a una fase sólida,
 - lavado de los ácidos nucleicos unidos,
 - elución de los ácidos nucleicos unidos.
- 60

De acuerdo con una forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, para el lavado de los ácidos nucleicos unidos se emplea una mezcla de tampones con componentes caotrópicos y no caotrópicos de acuerdo con la reivindicación 1.

65 El procedimiento de acuerdo con la invención tiene la ventaja de que se emplea el mismo material filtrante para la prefiltración y para la adsorción final de los ácidos nucleicos.

Asimismo es un objeto de esta invención el uso de combinaciones de tampones con componentes caotrópicos y no caotrópicos para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de materiales de partida que contienen ácidos nucleicos.

5 De acuerdo con la invención se ha proporcionado un procedimiento para el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos a partir de muestras complejas que puede emplearse de manera universal, con independencia del material de partida de que se trate, y que debe llevarse a cabo en tampones de lisis y de unión sin las altas concentraciones de sales que hasta ahora eran siempre necesarias para la unión de los ácidos nucleicos a los materiales de soporte. Además, en el caso de muestras biológicas complejas (por ejemplo, tejidos), el procedimiento permite una lisis
10 eficiente y rápida del material de partida.

Era de suponer que la combinación de las sales caotrópicas y las sales no caotrópicas o anticaotrópicas descritas exhaustivamente como componentes de las formulaciones de tampones para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas complejas no mostraría ningún efecto.

15 De manera sorprendente se observó que, para la disgregación de numerosas muestras biológicas complejas totalmente diferentes (células, tejidos, plantas, bacterias, etc.), el uso de tampones de lisis a base de concentraciones muy bajas de sales caotrópicas en combinación con enzimas proteolíticas (por ejemplo, proteinasa K o lisozima), así como un detergente, producía un efecto claramente más eficiente y más rápido que los tampones de lisis disponibles hasta ahora, en particular los comercializados como componentes de kits de purificación de ácidos nucleicos. No obstante, es desventajoso que las bajas concentraciones de las sales caotrópicas (< 100 mM) no permitan después una unión eficiente de los ácidos nucleicos que han de aislarse a los materiales cromatográficos conocidos por el experto y también, en particular, que la pureza de los ácidos nucleicos que han de aislarse sea muy baja. Sin embargo, si se combina la preparación del tampón de lisis, compuesto de una sal caotrópica, un detergente, una enzima proteolítica y, dado el caso, otros componentes (polivinilpirrolidona, EDTA, Tris HCl, etc.) con un tampón de unión, que contiene una sal no caotrópica como componente, un alcohol y un detergente, y a continuación se pone esta disolución en contacto con una fase sólida que se une a ácidos nucleicos (aquí se usan los materiales conocidos por el experto a base de vidrio o sílice), es posible un aislamiento y una purificación eficientes de los ácidos nucleicos. Sorprendentemente, las concentraciones de sales no caotrópicas necesarias para la unión de los ácidos nucleicos son eficaces aún siendo muy inferiores a las que se emplean en los procedimientos conocidos por el experto. Así, son suficientes concentraciones de sales inferiores a 500 mM para una unión eficiente de los ácidos nucleicos que han de aislarse. El efecto esperado, es decir, que la acción de sales diametralmente opuestas desde el punto de vista funcional se contrarrestaría, no se produce.

35 La combinación de acuerdo con la invención de un tampón de lisis con una sal caotrópica como componente, además de otros ingredientes, con un tampón de unión con una sal no caotrópica como componente aúna de manera ideal las ventajas de las dos tecnologías básicas conocidas por el experto (química de sustancias caotrópicas y química de sustancias anticaotrópicas). El tampón de lisis descrito permite una disgregación altamente eficiente y rápida del material de partida. Además, el componente caotrópico permite la inactivación de las enzimas que degradan los ácidos nucleicos durante la lisis del material de partida. La adición subsiguiente de un tampón de unión, que contiene una sal no caotrópica como componente, así como otros ingredientes, facilita a continuación una unión altamente eficiente de los ácidos nucleicos a materiales de soporte. En ello, la muy pequeña proporción de la sal caotrópica componente, inferior a 100 mM, y la solo pequeña proporción de una sal no caotrópica componente, inferior a 1 M, significan que las concentraciones de sales que han de emplearse para el aislamiento y la purificación son considerablemente inferiores a las conocidas hasta ahora por el experto. Esto resulta en una posible reducción de las etapas de lavado (y con ello, de las tareas laboriosas) durante la extracción de los ácidos nucleicos, reduce los costes (especialmente en cuanto a sales caotrópicas), supone un menor riesgo para la salud y reduce también el problema del arrastre de las sales caotrópicas, con sus conocidos efectos inhibidores, a aplicaciones posteriores. En ello, los rendimientos de los ácidos nucleicos que se aíslan son muy altos. Y esto se extiende también a su pureza.
50 Una combinación de sales caotrópicas y no caotrópicas para procedimientos para el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos no se conocía hasta ahora.

Después de la lisis del material de partida y la mezcla subsiguiente con el tampón de unión descrito, la muestra se pone en contacto con un material de soporte (por ejemplo, una tela de vidrio como componente de un filtro de centrifugación).
55

El ácido nucleico unido al material del filtro puede lavarse con los tampones de lavado conocidos de por sí, secarse brevemente a continuación y volver a disolverse del material de fibra de vidrio tras la adición de agua, Tris HCl 10 mM u otros tampones con baja concentración de sales. Sorprendentemente, también se observó que el uso de un tampón de lavado compuesto de mezclas de los tampones de lisis y de unión de acuerdo con la invención permite mejorar todavía más el rendimiento final del ácido nucleico y la pureza del ácido nucleico aislado.
60

Dado que los tampones de lisis empleados en el procedimiento de acuerdo con la invención no contienen ningún componente que permita una eficiente adsorción de los ácidos nucleicos, también es posible, por ejemplo, llevar a cabo los procesos de prefiltrado necesarios sobre los mismos materiales filtrantes que se emplean también finalmente para la adsorción de los ácidos nucleicos. Esto supone una gran simplificación de la tecnología del
65

procedimiento. Así por ejemplo, después de la lisis de una muestra vegetal, el lisado se centrifuga a través de una matriz de fibra de vidrio como componente de una columna de centrifugación para eliminar el material vegetal sin lisar y componentes inhibidores. A continuación, al filtrado se le añade el tampón de unión y se transfiere a otra columna de centrifugación con matriz de fibra de vidrio. Los ácidos nucleicos se unen a las fibras de la matriz de fibra de vidrio, se lavan con un tampón de lavado con contenido alcohólico y los ácidos nucleicos unidos se eluyen finalmente de la matriz de fibra de vidrio tras la adición, por ejemplo, de agua.

Esto se aplica igualmente para muestras biológicas complejas tales como muestras de heces o en ciertos casos, también de sangre entera. Con los sistemas y procedimientos conocidos hasta ahora, en los que los tampones de lisis también contienen como componentes las sales necesarias para la adsorción de los ácidos nucleicos, no puede llevarse a cabo una simplificación semejante.

El procedimiento de acuerdo con la invención muestra sorprendentemente otro efecto totalmente nuevo.

El procedimiento de acuerdo con la invención se diferencia del procedimiento de los documentos WO 2005/007895 A1 y WO 91/07422 A1 por una concentración especialmente baja de un componente caotrópico en el tampón de lisis. Además, el tampón de unión en el procedimiento del estado de la técnica mencionado anteriormente no contiene ningún alcohol. Solo el tampón de lavado del documento WO 2005/007895 A1 contiene un alcohol. Aunque el documento WO 2005/007895 A1 describe una concentración relativamente baja de GuHCl en el tampón de lisis, que contiene la proteasa, esta concentración aumenta antes de la aplicación a la columna por la adición de una segunda sal caotrópica (500 µl de GuSCN 5 M).

Es sabido que los materiales de soporte empleados para el aislamiento y la purificación (en combinación con los tampones con alto contenido de sales conocidos y, dado el caso, alcoholes) son vidrio, cerámica, cuarzo, geles de sílice, aerosiles, tierra de diatomeas, etc. Estos materiales pueden ser porosos y no porosos. Pueden estar presentes como suspensiones o también como componentes en forma de fibras, geles, lana o tapices, por ejemplo, de dispositivos de centrifugación (columnas filtrantes de centrifugación), etc. El experto sabe también es posible la unión de polianiones, como por ejemplo, ADN, a superficies funcionales negativas. Estos conocimientos básicos constituyen la base científica del uso de fases sólidas negativas o potencialmente negativas para la unión de ácidos nucleicos con los tampones con alto contenido de sales conocidos.

Sorprendentemente, la combinación descrita en el procedimiento de acuerdo con la invención de un tampón de lisis con una sal caotrópica como componente y un tampón de unión con una sal no caotrópica como componente, demuestra que también es posible una unión eficiente de los ácidos nucleicos a numerosos materiales de soporte no empleados hasta ahora para el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos. Además de la posibilidad del uso de materiales de soporte de por sí conocidos (en particular con cargas funcionales negativas), también pueden emplearse materiales de soporte totalmente diferentes desde el punto de vista físico-químico para el aislamiento y la purificación de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, pueden mencionarse a este respecto:

membranas de nilón cargadas positivamente, membranas de polisulfona, membranas de polietersulfona, membranas de PVDF, membranas de polímeros acrílicos, membranas intercambiadoras de iones, fritas de polietileno e incluso simples papeles de filtro (por ejemplo, filtros de papel). Esto también es muy sorprendente, ya que muchas de las membranas descritas presentan superficies neutras, químicamente inertes y, de hecho, se emplean en la práctica para filtraciones con el objetivo de que no muestren ninguna afinidad de unión por biomoléculas.

Además, para la unión de los ácidos nucleicos con el procedimiento descrito también son adecuadas partículas (por ejemplo, partículas de óxido de hierro magnéticas funcionalizadas, partículas de silicato, etc.).

En ello, la unión de los ácidos nucleicos a estos materiales de soporte totalmente diferentes y su desorción final de los mismos puede tener lugar en las mismas condiciones de tampones de lisis y de unión.

Esta observación permite deducir un mecanismo totalmente nuevo por el que se realiza el proceso de aislamiento y purificación de los ácidos nucleicos.

Sin embargo, queda claro que la posibilidad de emplear diversos materiales de soporte permitirá el desarrollo de productos totalmente nuevos en el campo del aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos. La práctica combinación de tampones de lisis y de unión con materiales de soporte específicos ofrece a partir de ahora la posibilidad de plantear soluciones totalmente nuevas para el aislamiento de ácidos nucleicos. Esto es tanto más interesante en cuanto que los procedimientos de preparación de muestras moleculares en el contexto del diagnóstico molecular, que se está desarrollando a pasos agigantados, cobran cada vez más importancia en prácticamente todos los ámbitos de nuestras vidas.

A continuación, la invención se explicará en más de detalle mediante un ejemplo de realización. En ello, el ejemplo no supone ninguna limitación de la invención. Los ejemplos de realización 2-4 sirven como demostración de que el efecto positivo según la invención de la combinación de tampones caotrópicos y no caotrópicos no solo se limita a la

combinación de urea 90 mM en el tampón de lisis y cloruro de magnesio 250 mM en el tampón de unión.

Ejemplos de realización

5 **Ejemplo 1: Comparación del aislamiento de ADN genómico a partir de muestras de tejido mediante el uso de tampones de lisis y de unión a base solo de sales caotrópicas, solo de sales no caotrópicas y del procedimiento de acuerdo con la invención**

10 Se incubaron respectivamente 10 mg de material tisular (hígado de cerdo) en 400 µl del tampón de lisis A (tiocianato de guanidinio 4 M, *N*-laurilsarcosina al 1 %, EDTA 2 mM), el tampón de lisis B (cloruro de amonio 1,5 M, CTAB al 2 %, Tris HCl 10 mM, PVP al 2 %) y el tampón de lisis C (SDS al 0,5 %, Tris HCl 10 mM, EDTA 2 mM, urea 90 mM) en un tubo de reacción de 1,5 ml con la adición de 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y ARNasa A a 50 °C durante 30 min con agitación continua. Después de la lisis del material de partida, la preparación de lisis se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min para separar los componentes sin lisar. El sobrenadante se trató de la manera siguiente:

- 15
1. La preparación de lisis con el tampón de lisis A se transfirió directamente a una columna filtrante de centrifugación con material de fibra de vidrio.
 2. A la preparación de lisis con el tampón de lisis B se le añadieron 200 µl de un tampón de unión (Triton X-100 e isopropanol) y después la preparación se transfirió directamente a una columna filtrante de centrifugación con material de fibra de vidrio.
 - 20 3. A la preparación de lisis con el tampón de lisis C se le añadieron 400 µl de un tampón de unión (MgCl₂ 250 mM, Tween e isopropanol) y después la preparación se transfirió directamente a una columna filtrante de centrifugación con material de fibra de vidrio.

25 A continuación las disoluciones se centrifugaron a través del filtro de fibra de vidrio.

Después, el filtrado se desechó y, en las variantes del tampón de lisis A y el tampón de lisis B, así como en la variante del tampón de lisis C, el material filtrante se lavó dos veces con 750 µl de un tampón de lavado (NaCl 50 mM; Tris HCl 10 mM; EDTA 1 mM; etanol al 70 % v/v). En otra variante de extracción con el procedimiento de acuerdo con la invención (tampón de lisis C), los filtros se lavaron una vez con 500 µl de una mezcla del tampón de lisis C empleado y el correspondiente tampón de unión y a continuación se lavaron otra vez con el tampón de lavado estándar.

35 Después de eliminar el etanol mediante una breve etapa de centrifugación (12.000 rpm durante 2 min), se llevó a cabo la elución del ácido nucleico mediante la adición de 200 µl de un tampón de elución (Tris HCl 10 mM, pH 8,5) y centrifugación durante 1 min a 10.000 rpm. A continuación se llevó a cabo una medición espectrofotométrica del ADN.

40 Los resultados se representan en la tabla siguiente. En cada caso se realizaron tres extracciones y se obtuvo la media de los valores determinados por medición espectrofotométrica.

Tampón de lisis/tampón de unión	Rendimiento	Relación A ₂₆₀ :A ₂₈₀
Sales caotrópicas (variante del tampón de lisis A)	8,2 µg	1,4
Sales no caotrópicas (variante del tampón de lisis B)	21,2 µg	1,5
Combinación de sales caotrópicas y no caotrópicas (variante del tampón de lisis C)	28,4 µg	1,7
Combinación de sales caotrópicas y no caotrópicas (variante del tampón de lisis C) con un tampón de lavado formado por una mezcla del tampón de lisis y el tampón de unión empleados	36,2 µg	1,8

45 Para el experto es evidente que los tampones de lisis A y B empleados son conocidos de documentos de patente y ejemplares de las dos tecnologías básicas (química de sustancias caotrópicas y química de sustancias no caotrópicas).

Se demuestra claramente la superioridad de la extracción de acuerdo con la invención. Después de un tiempo de lisis de 30 min, las muestras de tejido tratadas por medio del procedimiento de acuerdo con la invención estaban totalmente lisadas, mientras que por el contrario las otras muestras solo estaban parcialmente lisadas.

50 Los resultados demuestran que el aislamiento de ácidos nucleicos mediante el procedimiento de acuerdo con la invención como combinación de sales caotrópicas y sales no caotrópicas (en el tampón de lisis y el tampón de unión) es muy eficiente, la lisis del material de partida se produce mucho más rápidamente y pueden conseguirse a la vez mayor pureza y mayor rendimiento. Si en lugar del tampón de lavado alcohólico estándar empleado hasta ahora se emplea para el lavado una mezcla del tampón de lisis y el tampón de unión de acuerdo con la invención, esta combinación conduce a una mejora adicional del resultado de la extracción.

Ejemplo 2: Combinación de un tampón de lisis con tampones de unión que, además de cloruro de magnesio, contienen otras sales no caotrópicas diferentes. Uso del tampón correspondiente al procedimiento de acuerdo con la invención para el aislamiento de ADN genómico a partir de una muestra biológica compleja (tejido)

- 5 **Tampones de lisis y de unión empleados**
- Tampón de lisis: urea 90 mM, SDS al 0,5 %
- 10 Tampón de unión H1: cloruro de magnesio 250 mM, isopropanol al 50 %, Tween 20 al 40 %
 Tampón de unión H2: cloruro de litio 250 mM, isopropanol al 50 %, Tween 20 al 40 %
 Tampón de unión H3: cloruro de potasio 250 mM, isopropanol al 50 %, Tween 20 al 40 %
 Tampón de unión H4: cloruro de amonio 250 mM, isopropanol al 50 %, Tween 20 al 40 %

15 **Protocolo de extracción**

1. A aproximadamente 40 mg de tejido hepático (ratón) se añadieron 400 µl del tampón de lisis y 25 µl de proteinasa K por preparación y las preparaciones se lisaron a 50 °C.
2. Después de la lisis se añadieron en cada caso 400 µl del tampón de unión (H1, H2, H3, H4). Las preparaciones de lisis y los tampones de unión se mezclaron cuidadosamente con la pipeta.
- 20 3. Las muestras se transfirieron a una columna de centrifugación con material de fibra de vidrio y se centrifugaron a 10.000 x g durante 1 min. El filtrado se desechó.
4. A continuación, se lavaron dos veces con un tampón de lavado con etanol (etanol al 70 %, cloruro de sodio, Tris HCl).
- 25 5. La columna se secó por centrifugación durante 2 min a 10.000 x g.
6. El ADN se eluyó mediante la adición de 200 µl de un tampón de elución (Tris HCl 10 mM) y centrifugación a 5.000 x g durante 1 min.

30 A continuación, el ADN aislado se midió mediante espectrofotometría. Los valores de medida obtenidos son valores medios de tres preparaciones para cada tampón de unión usado.

Resultado

Combinación tampón de lisis/tampón de unión	Relación $A_{260}:A_{280}$	Rendimiento total de ADN
Tampón de lisis: urea 90 mM, SDS al 0,5 % Tampón de unión: H1	2,0	68 µg
Tampón de lisis: urea 90 mM, SDS al 0,5 % Tampón de unión: H2	1,95	69 µg
Tampón de lisis: urea 90 mM, SDS al 0,5 % Tampón de unión: H3	1,95	65 µg
Tampón de lisis: urea 90 mM, SDS al 0,5 % Tampón de unión: H4	1,96	64 µg

35 **Conclusión:**

La combinación del presente tampón de lisis con distintos tampones de unión (los tampones de unión se diferencian en las sales no caotrópicas empleadas) conduce al resultado de que todas las sales no caotrópicas usadas son excelentemente adecuadas para el aislamiento de ácidos nucleicos. Con ello, este resultado demuestra también que no solo el cloruro de magnesio produce el positivo efecto de acuerdo con la invención de la combinación de un tampón de lisis con una sal caotrópica y un tampón de unión con una sal no caotrópica, sino que también otras sales no caotrópicas (por ejemplo, cloruro de litio, cloruro de potasio, cloruro de amonio) apoyan el efecto de acuerdo con la invención y pueden usarse igualmente como sales no caotrópicas en tampones de unión.

45 **Ejemplo 3: Uso de tampones de lisis que se diferencian en la sal caotrópica empleada y combinación de estos tampones de lisis con dos tampones de unión diferentes para demostrar que la invención no solo se refiere al uso de urea como sal caotrópica en el tampón de lisis. Se emplearon las dos sales caotrópicas urea y perclorato de sodio.**

50 **Tampones de lisis y de unión empleados**

Tampón de lisis A: urea 90 mM, SDS al 0,5 %
 Tampón de lisis B: perclorato de sodio 90 mM, SDS al 0,5 %

- 55 Tampón de unión H1: cloruro de magnesio 250 mM, isopropanol al 50 %, Tween 20 al 40 %
 Tampón de unión H3: cloruro de potasio 250 mM, isopropanol al 50 %, Tween 20 al 40 %

Protocolo de extracción

1. A aproximadamente 25 mg de tejido hepático (ratón) se añadieron 400 µl de tampón de lisis (tampón de lisis A, tampón de lisis B) y 25 µl de proteinasa K por preparación y las preparaciones se lisaron a 50 °C.
 2. Después de la lisis se añadieron en cada caso 400 µl del tampón de unión (H1, H3). Las preparaciones de lisis y los tampones de unión se mezclaron cuidadosamente con la pipeta.
 3. Las muestras se transfirieron a una columna de centrifugación con material de fibra de vidrio y se centrifugaron a 10.000 x g durante 1 min. El filtrado se desechó.
 4. A continuación, se lavaron dos veces con un tampón de lavado con etanol (etanol al 70 %, cloruro de sodio, Tris HCl).
 5. La columna se secó por centrifugación durante 2 min a 10.000 x g.
 6. El ADN se eluyó mediante la adición de 200 µl de un tampón de elución (Tris HCl 10 mM) y centrifugación a 5.000 x g durante 1 min.
- 15 A continuación, el ADN aislado se midió mediante espectrofotometría. Los valores de medida obtenidos son valores medios de tres preparaciones para cada tampón de unión usado.

Resultado

Combinación tampón de lisis/tampón de unión	Relación $A_{260}:A_{280}$	Rendimiento total de ADN
Tampón de lisis: urea 90 mM, SDS al 0,5 % Tampón de unión: H1	1,96	41 µg
Tampón de lisis: urea 90 mM, SDS al 0,5 % Tampón de unión: H3	1,98	39 µg
Tampón de lisis: perclorato de sodio 90 mM, SDS al 0,5 % Tampón de unión: H1	1,94	37 µg
Tampón de lisis: perclorato de sodio 90 mM, SDS al 0,5 % Tampón de unión: H3	1,98	41 µg

Conclusión:

Los dos tampones de lisis empleados se diferencian en la sal caotrópica usada. Ambos tampones de lisis llevan a cabo el aislamiento de ADN genómico de manera excelente cuando se emplean en combinación con tampones de unión que contienen sales no caotrópicas. A este respecto, en este ejemplo también pueden emplearse otras sales no caotrópicas distintas de cloruro de magnesio como componentes del tampón de unión. Las ventajas de acuerdo con la invención no se limitan al uso de urea en el tampón de unión.

Ejemplo 4: Combinación de un tampón de lisis que contiene una sal caotrópica y tampones de unión que contienen sales no caotrópicas, en que la fuerza iónica de las sales no caotrópicas que se emplean en el tampón de unión se ha reducido notablemente. El experimento tiene como objetivo resaltar que la combinación expuesta en el procedimiento de acuerdo con la invención de sales caotrópicas y no caotrópicas en el tampón de lisis y en el tampón de unión permite el aislamiento de ácidos nucleicos incluso con concentraciones de sales extremadamente bajas.

Tampones de lisis y de unión empleados

Tampón de lisis: urea 90 mM, SDS al 0,5 %

- 40 Tampón de unión H5: cloruro de magnesio 100 mM, isopropanol al 50 %, Tween 20 al 40 %
 Tampón de unión H6: cloruro de litio 100 mM, isopropanol al 50 %, Tween 20 al 40 %
 Tampón de unión H7: cloruro de potasio 100 mM, isopropanol al 50 %, Tween 20 al 40 %

Protocolo de extracción

1. A aproximadamente 25 mg de tejido hepático (ratón) se añadieron 400 µl de tampón de lisis y 25 µl de proteinasa K por preparación y las preparaciones se lisaron a 50 °C.
2. Después de la lisis se añadieron en cada caso 400 µl del tampón de unión (H5, H6, H7). Las preparaciones de lisis y los tampones de unión se mezclaron cuidadosamente con la pipeta.
3. Las muestras se transfirieron a una columna de centrifugación con material de fibra de vidrio y se centrifugaron a 10.000 x g durante 1 min. El filtrado se desechó.
4. A continuación, se lavaron una sola vez con un tampón de lavado con etanol (etanol al 70 %, cloruro de sodio, Tris HCl).
5. La columna se secó por centrifugación durante 2 min a 10.000 x g.
6. El ADN se eluyó mediante la adición de 200 µl de un tampón de elución (Tris HCl 10 mM) y centrifugación a 5.000 x g durante 1 min.

A continuación, el ADN aislado se midió mediante espectrofotometría. Los valores de medida obtenidos son valores medios de tres preparaciones para cada tampón de unión usado.

Resultado

5

Combinación tampón de lisis/tampón de unión	Relación $A_{260}:A_{280}$	Rendimiento total de ADN
Tampón de lisis: urea 90 mM, SDS al 0,5 % Tampón de unión: H5	1,73	43 µg
Tampón de lisis: urea 90 mM, SDS al 0,5 % Tampón de unión: H6	1,80	42 µg
Tampón de lisis: urea 90 mM, SDS al 0,5 % Tampón de unión: H7	1,71	44 µg

Conclusión:

10 La combinación del presente tampón de lisis con distintos tampones de unión (los tampones de unión se diferencian en las sales no caotrópicas empleadas) conduce al resultado de que todas las sales no caotrópicas usadas son excelentemente adecuadas para el aislamiento de ácidos nucleicos. Con ello, este resultado demuestra también que no solo el cloruro de magnesio produce el positivo efecto de acuerdo con la invención de la combinación de un tampón de lisis con una sal caotrópica y un tampón de unión con una sal no caotrópica, sino que igualmente pueden usarse otras sales no caotrópicas. Además, el resultado aclara de manera convincente que, de acuerdo con el
15 procedimiento de acuerdo con la invención, para el aislamiento de ácidos nucleicos mediante el principio conocido por el experto de la unión de los ácidos nucleicos a materiales minerales sólidos se necesitan fuerzas iónicas mucho menores que las conocidas hasta ahora del estado de la técnica. De este modo, la combinación de los tampones de lisis y de unión de acuerdo con la invención permite un aislamiento extremadamente eficiente de ácidos nucleicos sin las altas concentraciones de sales necesarias hasta ahora en los sistemas de tampones empleados. Esto
20 permite también, al igual que en el experimento descrito, reducir las etapas de lavado necesarias.

Definiciones

Componentes caotrópicos:

25 Sustancias que destruyen la estructura regular del agua líquida, basada en la formación de enlaces de puentes de hidrógeno, al impedir la formación de las estructuras de clatrato de H_2O necesarias para la solvatación. Algunos ejemplos de componentes caotrópicos son tiocianatos, yoduros o percloratos.

Componentes anticaotrópicos:

30 Sustancias que refuerzan la estructura regular del agua líquida, basada en la formación de enlaces de puentes de hidrógeno. Algunos ejemplos de componentes anticaotrópicos son sales de amonio, sodio o potasio.

Componentes alcohólicos:

35 Los componentes alcohólicos en el sentido de la invención son todos los alcoholes solubles en agua como metanol, etanol, propanol, isopropanol, etilenglicol, polietilenglicol o glicerina.

REIVINDICACIONES

1. Formulaciones para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de materiales que contienen ácidos nucleicos que comprenden
- 5 • al menos un tampón de lisis con sales caotrópicas como componentes que contiene adicionalmente al menos una enzima proteolítica y al menos un detergente y
 • al menos un tampón de unión con sales no caotrópicas como componentes que contiene adicionalmente al menos un alcohol y al menos un detergente,
- 10 **caracterizado porque** la concentración de las sales caotrópicas componentes del tampón de lisis es inferior a 100 mM y la concentración de las sales no caotrópicas componentes del tampón de unión es inferior a 1 M.
2. Formulaciones de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas porque** la concentración de las sales no caotrópicas componentes del tampón de unión es inferior a 500 mM.
- 15 3. Formulaciones de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas porque** el componente alcohólico consta de alcoholes solubles en agua como metanol, etanol, propanol, isopropanol, etilenglicol, polietilenglicol o glicerina.
- 20 4. Formulaciones de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizadas porque** la proporción del componente alcohólico es del 20 al 80 %, preferentemente del 45 al 55 %.
5. Formulaciones de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas porque** como componente detergente se emplea al menos una de las sustancias polivinilpirrolidona, CTAB, Triton X-100, *N*-laurilsarcosina, citrato de sodio, DDT o Tween 20.
- 25 6. Formulaciones de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas porque** adicionalmente comprenden una fase sólida.
- 30 7. Formulaciones de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizadas porque** como fase sólida se emplean membranas de nilón cargadas positivamente, membranas de polisulfona, membranas de polietersulfona, membranas de PVDF, membranas de polímeros acrílicos, membranas intercambiadoras de iones, fritas de polietileno, simples papeles de filtro, partículas de óxido de hierro magnéticas o partículas de silicato.
- 35 8. Procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de materiales que contienen ácidos nucleicos mediante el uso de formulaciones de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las etapas siguientes:
- 40 - lisis de los materiales de partida mediante el uso del tampón de lisis de acuerdo con la reivindicación 1,
 - dado el caso, prefiltración,
 - unión de los ácidos nucleicos a una fase sólida mediante el uso del tampón de unión de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2,
 - lavado de los ácidos nucleicos unidos,
 - elución de los ácidos nucleicos unidos.
- 45 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado porque** para el lavado de los ácidos nucleicos unidos se emplea una mezcla de tampones con sales caotrópicas y con sales no caotrópicas como componentes de acuerdo con la reivindicación 1.
- 50 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque para la prefiltración y la adsorción final de los ácidos nucleicos se usa el mismo material.