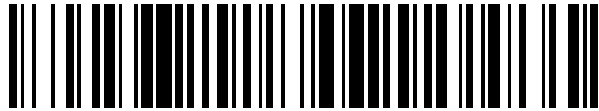


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 469 816**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2009 E 09784897 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 2329019**

54 Título: **Aislamiento de ácido nucleico**

30 Prioridad:

**08.08.2008 GB 0814570**

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

**20.06.2014**

73 Titular/es:

**CAMBRIDGE ENTERPRISE LIMITED (100.0%)  
The Old Schools Trinity Lane  
Cambridge Cambridgeshire CB2 1TN, GB**

72 Inventor/es:

**CHUA, YII LENG y  
RITCHIE, ALLYSON VICTORIA**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 469 816 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

Aislamiento de ácido nucleico

5 **[0001]** La presente invención se refiere a procedimientos mejorados para el aislamiento de ácido nucleico, y a las soluciones, composiciones y kits para utilizar en los procedimientos.

10 **[0002]** Los procedimientos convencionales para el aislamiento de ácido nucleico utilizan agentes caotrópicos, tales como tiocianato de guanidinio, y disolventes orgánicos para lisar las células, y desnaturalizar las proteínas (incluyendo nucleasas, que de otro modo degradan el ácido nucleico). Por ejemplo, Boom et al. (Journal of Clinical Microbiology, 1990, vol. 28 (3): 495-503) describe un procedimiento en el que se pone en contacto una muestra que contiene suero u orina humana con partículas de sílice en presencia de un tampón de lisis/unión que contiene tiocianato de guanidinio. El ácido nucleico liberado se une a las partículas de sílice, que a continuación se lavan con un tampón de lavado que contiene tiocianato de guanidinio, a continuación con etanol, y después con acetona. El ácido nucleico unido se eluye posteriormente en un tampón acuoso bajo en sal (Tris-HCl, EDTA, pH 8,0).

15 **[0003]** Sin embargo, una desventaja de dichos procedimientos es que los agentes caotrópicos y disolventes orgánicos son muy inhibidores en las reacciones enzimáticas. Las cantidades residuales de estas sustancias transportadas en la muestra eluida pueden interferir con el posterior procesamiento enzimático del ácido nucleico aislado, por ejemplo en la secuenciación o amplificación de ácido nucleico. El uso de agentes caotrópicos y disolventes orgánicos también es indeseable debido a que estos reactivos son tóxicos y difíciles de manipular, y requieren una disposición especial para su eliminación. Una desventaja adicional del uso de agentes caotrópicos es que requieren molaridades elevadas y tienden a precipitar fuera de la solución durante el almacenamiento, especialmente el almacenamiento refrigerado. Las soluciones que contienen estos agentes pueden requerir un calentamiento para volver a disolver el agente caotrópico antes de su uso.

20 **[0004]** El requisito para las sales caotrópicas y los disolventes orgánicos se evita en un procedimiento descrito por Hourfar et al, (Clinical Chemistry, 2005, 51 (7): 1217-1222). La muestra de plasma se mezcla con partículas de sílice magnéticas en presencia de un tampón de unión/lisis que contiene una sal cosmotrópica (sulfato de amonio) antes de la adición de proteinasa K. Después de la separación, las partículas magnéticas se lavan con tampón de lavado que contiene proteinasa K, y se eluyen en tampón de elución (Tris-HCl, pH 8,5) a 80°C. Mientras que el ácido nucleico se puede obtener en rendimientos razonables utilizando dichos procedimientos, se desea obtener un rendimiento incluso mayor de ácido nucleico. También se desea proporcionar procedimientos que se pueden llevar a cabo sin ningún requisito para las enzimas, tales como proteinasa K. El uso de enzimas aumenta el coste de llevar a cabo los procedimientos, y es necesario almacenar las enzimas por separado en condiciones especiales (por ejemplo, a temperatura reducida, o en forma liofilizada) para mantener su estabilidad.

30 **[0005]** El documento WO 2004/055207 describe procedimientos para aislar ácidos nucleicos de muestras biológicas utilizando un material de soporte inorgánico. La unión de los ácidos nucleicos al material de soporte tiene lugar en condiciones ácidas y la elución tiene lugar en condiciones básicas. En los ejemplos 1 y 2 de este documento, el tampón de unión utilizado es Tris acetato 200 mM pH 4,0, NP40 al 0,5%, sulfato de amonio 200 mM, el tampón de lavado es Tris-HCl 10 mM pH 6,6, y el tampón de elución es Tris/HCl 10 mM pH 8,5.

35 **[0006]** El documento WO 99/23111 describe un proceso para la producción de componentes de alta seguridad viral para formar un enganche de fibrina a partir de una recogida de plasma humano. El precipitado formado durante el procedimiento se lava con una solución de Tris-HCl al 0,1 % de pH 4,5-5,0 o a pH 9,50-10,50 producida en agua pura.

40 **[0007]** Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para aislar un ácido nucleico, que comprende:  
 50 (i) unir el ácido nucleico a una fase sólida a un primer pH en presencia de un tampón de unión, en el que el primer pH es un pH ácido;  
 (ii) lavar el ácido nucleico unido con una solución de lavado; y  
 (iii) eluir el ácido nucleico de la fase sólida a un segundo pH que es más elevado que el primer pH, en el que el segundo pH está en el intervalo de 6,5-10;  
 55 en el que la solución de lavado comprende un tampón con un intervalo de tamponamiento que comprende un pH que es más elevado que el primer pH, y la solución de lavado está a un pH que está dentro de un intervalo de tamponamiento del tampón de unión, pero inferior al intervalo de tamponamiento del tampón de la solución de lavado (es decir, el tampón de lavado) y en el que el pH de la solución de lavado es pH 6,0 o inferior.

60 **[0008]** Se ha encontrado que los procedimientos de la presente invención proporcionan sorprendentes aumentos en el rendimiento de ácido nucleico obtenido en comparación con los procedimientos de la técnica anterior, por ejemplo el procedimiento descrito por Hourfar et al. Se cree que el rendimiento mejorado obtenido usando procedimientos de la presente invención es debido a que se eliminan cantidades reducidas de ácido nucleico de la fase sólida durante la etapa de lavado, y/o se liberan cantidades incrementadas de ácido nucleico de la fase sólida durante la etapa de elución, en comparación con los procedimientos de la técnica anterior.

5 **[0009]** La mejora de los rendimientos de ácido nucleico pueden obtenerse utilizando los procedimientos de la presente invención sin ningún requisito para la enzima (tal como, proteasa) de que esté presente en la solución de lavado, o para el uso de disolventes orgánicos o agentes caotrópicos. La solución de lavado se simplifica de esta manera en comparación, por ejemplo, con la solución de lavado requerida para el procedimiento de Hourfar et al., y no hay ningún requisito para el almacenamiento separado de la proteasa u otra enzima. Debido a que no hay ningún requisito para agentes caotrópicos o disolventes orgánicos, puede evitarse la inhibición del posterior procesamiento enzimático del ácido nucleico aislado por tales agentes o disolventes.

10 **[0010]** Preferiblemente, el primer pH está en el intervalo de pH 3-6 o pH 3-5. Preferiblemente, el segundo pH es por lo menos pH 7,0 o un pH alcalino. De manera adecuada, el segundo pH está en el intervalo de pH 7-9. Dichos valores de pH son habituales de los que se utilizan con fases sólidas, tales como fases sólidas a base de sílice que son capaces de unirse a ácido nucleico a un pH más bajo y liberar el ácido nucleico a un pH más elevado. Los extremos de pH se evitan ya que de otro modo podrían dañar el ácido nucleico.

15 **[0011]** Preferiblemente, el intervalo de tamponamiento del tampón de lavado es más elevado que el primer pH (es decir, un extremo inferior del intervalo de tamponamiento del tampón de lavado es superior que el primer pH). Preferiblemente, el intervalo de tamponamiento del tampón de lavado es más elevado que pH 5,0. Preferiblemente, el segundo pH está dentro del intervalo de tamponamiento del tampón de lavado. Esto se prefiere porque se cree que el pH de la solución de lavado residual presente en la fase sólida después de la etapa de lavado se puede convertir a continuación de manera más eficiente al segundo pH durante la etapa de elución maximizando de ese modo la cantidad de ácido nucleico que se libera de la fase sólida.

20 **[0012]** Preferiblemente, el pH de la solución de lavado es de pH 6,3 a 6,0. El uso de solución de lavado a un pH dentro de este intervalo preferido es compatible con intervalos de tamponamiento de los tampones de unión y de lavado preferidos.

25 **[0013]** Preferiblemente, el primer pH está dentro del intervalo de tamponamiento del tampón de unión de manera que el pH de la etapa de unión se controla mediante el tampón de unión. Preferiblemente, un extremo inferior del intervalo de tamponamiento del tampón de unión es a un pH de 3,0 o superior, de manera que se evitan los extremos de pH en la etapa de unión.

30 **[0014]** Los intervalos de tamponamiento de tampones utilizados habitualmente en los tampones de lisis, unión, lavado, y elución son conocidos por los expertos en la materia. En la tabla 1 siguiente se proporciona el valor de pKa y el intervalo de tamponamiento de algunos tampones biológicos importantes, ordenados por el intervalo de tamponamiento (tomado de Sigma-Aldrich).

Tabla 1

Intervalo de pH eficaz	pKa 25°C	Tampón
1,2-2,6	1,97	maleato (pK1)
1,7-2,9	2,15	fosfato (pK1)
10,0-11,4	10,70	CABS
10,5-12,0	11,12	piperidina
2,2-3,6	2,35	glicina (pK1)
2,2-6,5	3,13	cittrato (pK1)
2,5-3,8	3,14	glicilglicina (pK1)
2,7-4,2	3,40	malato (pK1)
3,0-4,5	3,75	formiato
3,0-6,2	4,76	cittrato (pK2)
3,2-5,2	4,21	succinato (pK1)
3,6-5,6	4,76	acetato
3,8-5,6	4,87	propionato
4,0-6,0	5,13	malato (pK2)
4,9-5,9	5,23	piridina
5,0-6,0	5,33	piperazina (pK1)
5,0-7,4	6,27	cacodilato
5,5-6,5	5,64	succinato (pK2)
5,5-6,7	6,10	MES
5,5-7,2	6,40	cittrato (pK3)
5,5-7,2	6,24	maleato (pK2)
5,5-7,4	1,70, 6,04, 9,09	histidina
5,8-7,2	6,46	bis-tris
5,8-8,0	7,20	fosfato (pK2)
6,0-12,0	9,50	etanolamina

6,0-7,2	6,59	ADA
6,0-8,0	6,35	carbonato (pK1)
6,1-7,5	6,78	ACES
6,1-7,5	6,76	PIPES
6,2-7,6	6,87	MOPSO
6,2-7,8	6,95	imidazol
6,3-9,5	6,80, 9,00	BIS-TRIS propano
6,4-7,8	7,09	BES
6,5-7,9	7,14	MOPS
6,8-8,2	7,48	HEPES
6,8-8,2	7,40	TES
6,9-8,3	7,60	MOBS
7,0-8,2	7,52	DIPSO
7,0-8,2	7,61	TAPSO
7,0-8,3	7,76	trietanolamina (TEA)
7,0-9,0	0,91, 2,10, 6,70, 9,32	pirofosfato
7,1-8,5	7,85	HEPPSO
7,1-9,0		Tris-HCl
7,2-8,5	7,78	POPSO
7,4-8,8	8,05	tricina
7,5-10,0	8,10	hidracina
7,5-8,9	8,25	glicilglicina (pK2)
7,5-9,0	8,06	Trizma (tris)
7,6-8,6	8,00	EPPS, HEPPS
7,6-9,0	8,26	VICIEN
7,6-9,0	8,30	HEPBS
7,7-9,1	8,40	TAPS
7,8-9,7	8,80	2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (AMPD)
8,2-9,6	8,90	TABS
8,3-9,7	9,00	AMPSO
8,4-9,6	9,06	taurina (AES)
8,5-10,2	9,23, 12,74, 13,80	borato
8,6-10,0	9,50	CHES
8,7-10,4	9,69	2-amino-2-metil-1-propanol (AMP)
8,8-10,6	9,78	glicina (pK2)
8,8-9,9	9,25	hidróxido de amonio
8,9-10,3	9,60	CAPSO
9,5-11,1	10,33	carbonato (pK2)
9,5-11,5	10,66	metilamina
9,5-9,8	9,73	piperazina (pK2)
9,7-11,1	10,40	CAPS
	12,33	fosfato (pK3)

**[0015]** Los procedimientos de la presente invención se pueden llevar a cabo usando tampones de unión y/o tampones de elución convencionales para su uso con una fase sólida que es capaz de unirse al ácido nucleico en presencia de tampón de unión en el primer pH, y de la cual se puede eluir el ácido nucleico en el segundo pH.

5

**[0016]** La fase sólida comprende preferiblemente un grupo ionizable, el cual cambia de carga de acuerdo a las condiciones ambientales. El pKa del grupo ionizable es apropiado para las condiciones en las que se desea unir el ácido nucleico a la fase sólida y liberarlo de la misma. Generalmente, el ácido nucleico se unirá a la fase sólida a un pH inferior o aproximadamente igual al pKa, y se liberará a un pH más elevado (normalmente por encima del pKa). Las fases sólidas adecuadas para la unión de un ácido nucleico a un primer pH, y la elución del ácido nucleico unido a un segundo pH que es más elevado que el primer pH, son bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, en el primer pH la fase sólida puede comprender una carga positiva, y en el segundo pH la fase sólida puede tener una carga menos positiva, neutra o negativa. Alternativa o adicionalmente, en el primer pH la fase sólida puede comprender una carga neutra o menos negativa, y en el segundo pH la fase sólida puede tener una carga negativa o más negativa. Dichos cambios en la carga permiten que el ácido nucleico se adsorba a la fase sólida en el primer pH, y se libere en el segundo pH.

10

15

**[0017]** Por ejemplo, la fase sólida puede comprender un grupo negativamente ionizable con un pKa entre el primer y segundo pH. El ácido nucleico se unirá a la fase sólida cuando la fase sólida sea neutra o esté menos cargada negativamente, y se liberará cuando la fase sólida esté negativamente cargada o más negativamente cargada.

20

**[0018]** Alternativamente, o adicionalmente, la fase sólida puede comprender un grupo positivamente ionizable con un pKa entre el primer y segundo pH. El ácido nucleico se unirá a la fase sólida cuando la fase sólida esté cargada positivamente, y se liberará cuando la fase sólida sea neutral o esté menos cargada positivamente.

5 **[0019]** Los ejemplos de fases sólidas que se pueden utilizar según la presente invención incluyen fases sólidas que comprenden óxidos inorgánicos, tales como sílice o vidrio (por ejemplo, tal como se describe en Boom et al, o Hourfar et al.), u óxido de aluminio, polímeros de azúcar, o materiales de cambio de carga (por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 02/48164).

10 **[0020]** La fase sólida puede estar en cualquier forma adecuada, por ejemplo comprendiendo una membrana, gel, o partículas, por ejemplo partículas magnéticas. La membrana o gel de sílice, y las partículas magnéticas de sílice son ejemplos preferidos. La membrana de sílice es particularmente preferida. Es menos cara que las partículas magnéticas de sílice (utilizadas por ejemplo por Hourfar, et al.) y no requieren almacenamiento refrigerado, a diferencia de las partículas magnéticas de sílice.

15 **[0021]** Mientras que la unión del ácido nucleico a la fase sólida puede mejorarse por la presencia de un agente caotrópico, cantidades residuales de dichos agentes inhiben el procesamiento enzimático del ácido nucleico aislado y son tóxicos, por lo que se prefiere que los procedimientos de la presente invención se lleven a cabo en ausencia de un agente caotrópico.

20 **[0022]** Preferiblemente la fase sólida es una fase sólida en la que se mejora la unión del ácido nucleico por la presencia de un agente cosmotrópico. Preferiblemente, la unión del ácido nucleico a la fase sólida se lleva a cabo en presencia de un agente de cosmotrópico. Dichos agentes son conocidos por mejorar la unión del ácido nucleico a fases sólidas, tales como fases sólidas a base de sílice.

25 **[0023]** Los términos de agente "caotrópico" y "cosmotrópico" se originan de la serie de Hofmeister (Cacace et al., Q Rev Biophys 1997;. 30:241-77), que divide estos agentes dependiendo de su influencia sobre la estructura de macromoléculas y agua. Un agente caotrópico se puede definir como una sustancia que rompe la estructura del disolvente, y un agente cosmotrópico como una sustancia que mejora la estructura del disolvente. La figura 1 de Cacace et al. muestra la serie de Hofmeister y los solutos orgánicos habituales con efectos sobre la estructura/función de la proteína. Los ejemplos de agentes caotrópicos son conocidos por los expertos en la materia, e incluyen yoduro de sodio, perclorato de sodio, tiocianato de guanidinio y clorhidrato de guanidinio. Los ejemplos de agentes cosmotrópicos son conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen sulfato de amonio y cloruro de litio.

30 **[0024]** Según la presente invención se proporciona también un procedimiento para aislar un ácido nucleico de una célula, que comprende la lisis de la célula para liberar el ácido nucleico de la célula, y aislar el ácido nucleico liberado usando un procedimiento de la presente invención.

35 **[0025]** La lisis se lleva a cabo preferiblemente utilizando el tampón de unión. Los tampones de unión que se pueden utilizar para la lisis celular son conocidos por los expertos en la materia. El tampón de lisis utilizado por Boom et al. comprende tiocianato de guanidinio, clorhidrato de Tris, pH 6,4, EDTA (ajustado a pH 8), y Triton X-100. Sin embargo, se prefiere que el tampón de lisis no incluya un agente caotrópico. Los tampones de lisis/unión preferidos para utilizar según la presente invención comprenden un agente cosmotrópico. Preferiblemente, el tampón es un tampón ácido, de manera adecuada un tampón de ácido fuerte con un pKa (25°C) en el intervalo 3-5.

40 **[0026]** Un rendimiento aún mejor de ácido nucleico se puede obtener mediante elución del ácido nucleico de la fase sólida a una temperatura por encima de temperatura ambiente, por ejemplo, 50-90°C, 60-85°C, o 70-80°C.

45 **[0027]** Preferiblemente, el ácido nucleico se eluye de la fase sólida en presencia de un tampón de elución. Preferiblemente, el segundo pH está dentro de un intervalo de tamponamiento del tampón de elución, de manera que el pH de elución está controlado por el tampón de elución.

50 **[0028]** En una realización preferida, el intervalo de tamponamiento del tampón de elución se solapa con el intervalo de tamponamiento del tampón de lavado, lo comprende o está comprendido por el mismo. Esto ayuda a asegurar que el pH de la solución de lavado residual en la fase sólida después de la etapa de lavado se incremente fácilmente hacia el segundo pH durante la elución.

55 **[0029]** Se puede obtener un mejor rendimiento de ácido nucleico utilizando los procedimientos de la presente invención incluso sin la inclusión de una proteasa en la solución de lavado. Preferiblemente, la solución de lavado no incluye una proteasa.

60 **[0030]** Según la presente invención, se proporciona también un kit para aislar un ácido nucleico, que comprende:  
i) un tampón de unión para unir el ácido nucleico a una fase sólida a un primer pH, en el que el primer pH es un pH ácido;  
65 ii) una solución de lavado que comprende un tampón con un intervalo de tamponamiento que comprende un pH que es más elevado que el primer pH, en el que la solución de lavado está a un pH que está dentro de un intervalo de

tamponamiento del tampón de unión, pero inferior al intervalo de tamponamiento del tampón de la solución de lavado, y en el que el pH de la solución de lavado es pH 6,0 o inferior; y opcionalmente

iii) una solución para eluir el ácido nucleico de la fase sólida, en el que la solución está a un segundo pH que es más elevado que el primer pH, y en el que el segundo pH está en el intervalo de pH 6,5-10.

**[0031]** Según la presente invención, se proporciona también un kit para aislar un ácido nucleico, que comprende:

i) un tampón de unión para unir el ácido nucleico a una fase sólida un primer pH, en el que el primer pH es un pH ácido;

ii) una composición en forma seca que cuando se disuelve en un líquido proporciona una solución de lavado que comprende un tampón con un intervalo de tamponamiento que comprende un pH que es más elevado que el primer pH, en el que la solución de lavado está a un pH que está dentro de un intervalo de tamponamiento del tampón de unión, pero inferior al intervalo de tamponamiento del tampón de la solución de lavado, y en el que el pH de la solución de lavado es pH 6,0 o inferior; y opcionalmente

iii) una composición en forma seca que cuando se disuelve en un líquido proporciona una solución para eluir el ácido nucleico de la fase sólida, en el que la solución está a un segundo pH que es más elevado que el primer pH, y en el que el segundo pH está en el intervalo de pH 6,5-10.

**[0032]** Dichos kits se pueden utilizar para llevar a cabo un procedimiento de la presente invención.

**[0033]** El tampón de unión se puede disponer como una solución o en forma seca (por ejemplo, como un liofilizado) para disolverse en un líquido.

**[0034]** La composición en forma seca que cuando se disuelve en un líquido proporciona una solución de lavado y/o la composición en forma seca que cuando se disuelve en un líquido proporciona una solución de elución, puede ser un liofilizado. El liofilizado se puede preparar, por ejemplo, mediante la disposición de la solución de lavado o la solución de elución y la liofilización de la solución para formar la composición en forma seca.

**[0035]** El líquido para la disolución del tampón de unión, o una composición de la presente invención es de manera adecuada agua, o una solución acuosa.

**[0036]** La solución de lavado de un kit de la presente invención es preferiblemente una solución que comprende un tampón para lavar una fase sólida a la que se une un ácido nucleico a un primer pH y se eluye a un segundo pH más elevado, en el que el pH de la solución es pH 6,0 o inferior, más preferiblemente de pH 3,0 a pH 6,0, y es inferior a un intervalo de tamponamiento del tampón.

**[0037]** Preferiblemente, la solución de lavado no incluye un agente caotrópico. Preferiblemente, la solución de lavado no incluye un disolvente orgánico.

**[0038]** Preferiblemente el intervalo de tamponamiento del tampón de lavado o cada uno de ellos es más elevado que pH 6,0. Preferiblemente el intervalo de tamponamiento del tampón se solapa con el intervalo de pH 6,5-10, está comprendido por el mismo o lo comprende. En algunas realizaciones preferidas, el intervalo de tamponamiento del tampón es más elevado que pH 7,0.

**[0039]** Preferiblemente, el pH de la solución de lavado es pH 5,0 o inferior, preferiblemente desde pH 3,5 a 5.

**[0040]** Entre los ejemplos de tampones preferidos para la solución de lavado se incluyen un tampón Tris, preferiblemente Tris-HCl, y un tampón de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES). El intervalo de tamponamiento para el tampón Tris-HCl es pH 7,1 a 9. El intervalo de tamponamiento para el tampón MES es pH 5,5-6,7.

**[0041]** En una realización preferida, la solución de lavado comprende además un detergente. El detergente puede ayudar en la eliminación de inhibidores que podrían interferir con el posterior procesamiento del ácido nucleico aislado. Los ejemplos adecuados son detergentes iónicos, tales como dodecilsulfato de litio (LDS) o detergentes no iónicos, tales como NP-40 y Triton-X.

**[0042]** Se entenderá que el detergente no estará presente en la composición seca. Si se desea incluir un detergente en una solución preparada utilizando una composición en forma seca, éste se puede añadir después de que la composición se haya disuelto en solución acuosa.

**[0043]** Preferiblemente, el kit no comprende un agente caotrópico, ni un disolvente orgánico. Preferiblemente, el tampón de unión del kit comprende un agente cosmotrópico. Los ejemplos de agentes cosmotrópicos adecuados incluyen sulfato de amonio y cloruro de litio. Se prefiere el sulfato de amonio.

**[0044]** Un kit de la presente invención puede comprender además una fase sólida a la que el ácido nucleico es capaz de unirse. Las fases sólidas adecuadas se describen anteriormente. Una fase sólida preferida comprende un grupo negativamente ionizable con un pKa entre un primer pH en el que el ácido nucleico es capaz de unirse a la

fase sólida, y un segundo pH en el que el ácido nucleico es capaz de eluirse de la fase sólida. Preferiblemente, la fase sólida comprende un óxido inorgánico, preferiblemente sílice.

5 [0045] Un kit de la presente invención puede comprender además una proteasa para utilizar con el tampón de unión. Preferiblemente, la proteasa está en forma liofilizada, separada del tampón de unión (y separada de los componentes del kit).

10 [0046] Un kit de la presente invención puede incluir instrucciones para llevar a cabo el aislamiento de ácido nucleico utilizando los componentes del kit.

[0047] Un kit de la presente invención puede comprender además reactivos necesarios para la amplificación y/o detección de ácido nucleico una vez aislado.

15 [0048] Un kit de la presente invención estará dispuesto habitualmente con los componentes del kit (es decir, el tampón de unión, la solución de lavado (o la composición en forma seca que cuando se disuelve en un líquido proporciona la solución de lavado), y (si está presente) la solución de elución (o la composición en forma seca que cuando se disuelve en un líquido proporciona la solución de elución) envasados por separado, o almacenados en compartimentos separados de un recipiente en el que se dispone el kit.

20 [0049] El solicitante ha observado que durante la etapa de lavado, el tampón de lavado debe permanecer próximo al primer pH cuando se mezcla con tampón de unión residual retenido en la fase sólida, de manera que el ácido nucleico permanece unido a la fase sólida y no se desprende con el lavado. Sin embargo, durante la fase de elución, el tampón de lavado residual debe cambiar hacia el segundo pH cuando se mezcla con la solución de elución para una liberación eficaz del ácido nucleico de la fase sólida. Sin relacionarse con ninguna teoría, se cree que el mejor rendimiento obtenible utilizando los procedimientos de la presente invención surge porque: (i) la solución de lavado no extrae cantidades significativas de ácido nucleico de la fase sólida durante la etapa de lavado (porque el pH de la solución de lavado se encuentra en el intervalo de tamponamiento del tampón de unión); y (ii) el pH del tampón de lavado residual retenido en la fase sólida cambia fácilmente hacia el segundo pH cuando se mezcla con una solución de elución (debido al intervalo de tamponamiento del tampón de lavado).

30 [0050] También se proporciona, según la presente invención, la utilización de un kit de la invención para aislar un ácido nucleico.

35 [0051] También se proporciona la utilización de una solución de lavado para aislar un ácido nucleico, en la que la solución de lavado comprende un tampón para lavar una fase sólida a la que se une ácido nucleico a un primer pH y se eluye a un segundo pH más elevado, en la que el pH de la solución es pH 6,0 o inferior, preferiblemente de pH 3,0 a pH 6,0, y el intervalo de tamponamiento del tampón o cada uno de ellos es más elevado que pH 6,0.

40 [0052] También se proporciona la utilización de una composición en forma seca que cuando se disuelve en un líquido proporciona dicha solución de lavado para aislar un ácido nucleico.

45 [0053] Los presentes inventores han observado que los procedimientos de la presente invención son capaces de extraer como mínimo 25 copias de ácido nucleico, en particular ARN viral, de una muestra biológica. A concentraciones bajas del virus el rendimiento de ácido nucleico obtenido utilizando los procedimientos de la presente invención es tan bueno, incluso más reproducible, que el procedimiento de extracción de ácido nucleico habitual, que utiliza sales caotrópicas y disolventes orgánicos.

50 [0054] Los procedimientos de la presente invención se pueden realizar con formulaciones de tampones que no son peligrosas y no requieren una disposición especial, a diferencia de algunos procedimientos habituales de extracción de ácido nucleico que utilizan sales caotrópicas y/o disolventes orgánicos. Las formulaciones de tampones utilizadas son estables y no requieren la refrigeración o el calentamiento antes de la utilización para redissolver los componentes que han precipitado durante el almacenamiento. Los procedimientos se pueden utilizar en el aislamiento de ácido nucleico y el análisis en hospitales y laboratorios, y son especialmente importantes para el análisis in situ de ácido nucleico en el exterior y el análisis de ácido nucleico de diagnóstico inmediato.

55 [0055] A continuación se describen las realizaciones de la presente invención, a modo de ejemplo únicamente, con referencia a los dibujos que se acompañan en que:

la figura 1 muestra una comparación del rendimiento de ácido nucleico obtenido utilizando tampones de lavado ácidos y alcalinos a pH 4 y pH 5;

60 la figura 2 muestra el efecto del tampón de lisis residual sobre el pH del tampón de lavado y el efecto del tampón de lavado residual sobre el pH del tampón de elución;

la figura 3 muestra una comparación del rendimiento de ácido nucleico obtenido a diferentes pH de tampón de lavado (utilizando el tampón de lavado que comprende MES); y

65 la figura 4 muestra los resultados de la recuperación de ARN obtenido utilizando un procedimiento de la presente invención en comparación con el procedimiento de aislamiento de ácido nucleico Qiagen.

**Ejemplo 1**Comparación del rendimiento de ácido nucleico obtenido utilizando tampones de lavado ácidos y alcalinos a pH 4 y pH 5

[0056] Se aisló ARN viral de VIH utilizando un tampón de lisis de base acuosa (que comprende Tris acetato, pH 4,0), se unió a una fase sólida a base de sílice y se lavó con tampones de lavado que comprendía Tris-HCl 10 mM (intervalo de tamponamiento, pH 7,1 a 9), a pH 4 ó 5, citrato de sodio 10 mM (intervalo de tamponamiento, pH 3,0 a 6,2), a pH 4 ó 5, o Tris Acetato 10 mM (intervalo de tamponamiento, pH 3,6-5,6), a pH 4 ó 5. Las soluciones de Tris-HCl 10 mM a pH 4 y 5 son realizaciones de una solución de la presente invención.

[0057] Se eluyó el ácido nucleico lavado unido a la fase sólida con tampón de elución (que comprende Tris-HCl, pH 8,5). El ácido nucleico aislado se amplificó y detectó. La figura 1 muestra la intensidad de señal de detección promedio, las barras de error indican el error estándar del promedio.

[0058] La figura 1 muestra que el rendimiento de ácidos nucleicos obtenidos con Tris-HCl 10 mM, pH 4 y pH 5 fue significativamente superior que con citrato de sodio 10 mM, pH 4 y 5, y con Tris Acetato 10 mM, pH 4 y 5.

[0059] Se cree que los tampones de lavado ácidos no fueron tan eficaces como Tris-HCl 10 mM, pH 4 ó 5, porque el tampón residual restante en la fase sólida disminuye el pH del tampón de elución, haciendo que la elución de ácido nucleico sea menos eficaz y por tanto reduciendo el rendimiento.

**Ejemplo 2**Efecto del tampón de lisis residual sobre el pH del tampón de lavado y efecto del tampón de lavado residual sobre el pH del tampón de elución

[0060] Se investigaron las interacciones entre el tampón de lisis residual y el tampón de lavado, y entre el tampón de lavado residual y el tampón de elución, mezclando estos tampones. Se mezclaron 20 ml de tampón de lisis (que comprende Tris acetato, pH 4) con 500 ml de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH 4, Tris-HCl 10 mM, pH 6, o citrato de sodio 10 mM, pH 4), y se mezclaron 20 ml de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH 4, Tris-HCl 10 mM, pH 6, o citrato de sodio 10 mM, pH 4) con 120 ml de tampón de elución (que comprende Tris-HCl, pH 8,5), para ilustrar las interacciones de los diversos tampones. El pH de las mezclas se midió con papel de pH. Los resultados se muestran en la figura 2.

[0061] Los resultados muestran que Tris-HCl 10 mM, pH 4, y Tris-HCl 10 mM, pH 6, permanecen ácidos cuando se mezclaron con tampón de lisis. Cuando Tris-HCl, pH 4, o Tris-HCl, pH 6, se mezclaron con tampón de elución, la mezcla se mantuvo a pH 8,5. Sin embargo, cuando se mezcló el citrato de sodio 10 mM con tampón de elución, la solución resultante tenía un pH ácido.

**Ejemplo 3**Comparación del rendimiento de ácido nucleico obtenido a diferentes pH del tampón de lavado (utilizando tampón de lavado que comprende MES)

[0062] Se aisló ARN viral de VIH utilizando un tampón de lisis de base acuosa (que comprende Tris acetato, pH 4,0), se unió a una fase sólida a base de sílice y se lavó con MES 10 mM (intervalo de tamponamiento, pH 5,5 a 6,7) a pH 4, 5 ó 6. Se eluyó el ácido nucleico con tampón de elución (Tris-HCl 10mM, pH 8,5). El ácido nucleico aislado se amplificó y se detectó. La figura 3 muestra la intensidad de señal de detección promedio, las barras de error indican el error estándar del promedio.

[0063] Los resultados muestran que el rendimiento de ácido nucleico obtenido a pH 4 y 5 (inferior al del intervalo de tamponamiento del tampón de MES) es significativamente superior que a pH 6 (dentro del intervalo de tamponamiento del tampón de MES).

[0064] Se concluye que se obtiene un mejor rendimiento mediante la utilización de un tampón de lavado a pH ácido que es inferior que al intervalo de tamponamiento del tampón de lavado.

**Ejemplo 4**Comparación de la recuperación de ARN obtenido utilizando un procedimiento de la presente invención en comparación con un procedimiento de Qiagen de aislamiento de ácido nucleico

[0065] Se aisló ARN viral de muestras de plasma positivas en VIH utilizando un procedimiento de la presente invención y un procedimiento de Qiagen de aislamiento de ácido nucleico. A continuación se amplificó y detectó el ácido nucleico aislado.



El procedimiento, según una realización de la presente invención, fue el siguiente:

5 [0066] Se mezcló el tampón de lisis (que comprende citrato de sodio, pH 4,5) con una muestra de plasma y se incubó antes de añadir la proteinasa K. Esta mezcla se incubó, a continuación se cargó sobre una fase sólida de sílice o fibra de vidrio. El ácido nucleico unido se lavó con tampón de lavado (Tris-HCl, pH 3,8), y se eluyó con tampón de elución (que comprende Tris-HCl, 8,5) a 75-80°C.

10 [0067] La figura 4 muestra la intensidad de señal promedio, las barras de error indican el error estándar del promedio. Los resultados para el procedimiento según una realización de la presente invención se muestran en las columnas negras, y los resultados para el procedimiento de Qiagen se muestran en las columnas blancas.

15 [0068] Los resultados mostrados en la figura 4 demuestran que los procedimientos de la presente invención son capaces de extraer como mínimo 25 copias de ácido nucleico, en particular ARN viral, de una muestra biológica. A concentraciones bajas del virus el rendimiento de ácido nucleico obtenido utilizando el procedimiento según una realización de la presente invención es tan bueno, incluso más reproducible, que el procedimiento de extracción de ácido nucleico habitual, que utiliza sales caotrópicas y disolventes orgánicos.

20 [0069] Las formulaciones de tampones utilizadas no son peligrosas y no requieren una disposición especial, a diferencia de algunos procedimientos habituales de extracción de ácido nucleico que utilizan sales caotrópicas y/o disolventes orgánicos. Las formulaciones de tampones utilizadas son estables y no requieren la refrigeración. Los procedimientos se pueden utilizar en el aislamiento de ácido nucleico y el análisis en hospitales y laboratorios, y son especialmente importantes para el análisis in situ de ácido nucleico en el exterior y el análisis de ácido nucleico de diagnóstico inmediato.

25

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para aislar un ácido nucleico, que comprende:  
 5 (i) unir el ácido nucleico a una fase sólida a un primer pH en presencia de un tampón de unión, en el que el primer pH es un pH ácido;  
 (ii) lavar el ácido nucleico unido con una solución de lavado; y  
 (iii) eluir el ácido nucleico de la fase sólida a un segundo pH que es más elevado que el primer pH, en el que el  
 10 segundo pH está en el intervalo de 6,5-10;  
 en el que la solución de lavado comprende un tampón con un intervalo de tamponamiento que comprende un pH  
 que es más elevado que el primer pH, y la solución de lavado está a un pH que está dentro de un intervalo de  
 tamponamiento del tampón de unión, pero inferior al intervalo de tamponamiento del tampón de la solución de  
 lavado, y en el que el pH de la solución de lavado es pH 6,0 o inferior.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el intervalo de tamponamiento del tampón de lavado es más  
 15 elevado que el primer pH, preferiblemente más elevado que pH 5,0.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, en el que el segundo pH está dentro del intervalo de tamponamiento  
 del tampón de lavado, preferiblemente en el intervalo de pH 7-9.
- 20 4. Procedimiento, según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el pH de la solución de lavado es  
 desde pH 3,0 a pH 6,0.
5. Procedimiento, según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el primer pH está dentro del intervalo  
 de tamponamiento del tampón de unión, preferiblemente en el intervalo de pH 3-6, o pH 3-5.
- 25 6. Procedimiento, según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el extremo inferior del intervalo de  
 tamponamiento del tampón de unión es a pH 3,0 o más elevado.
7. Procedimiento, según cualquiera de las realizaciones anteriores, que se lleva a cabo en ausencia de un agente  
 caotrópico y un disolvente orgánico.
- 30 8. Procedimiento, según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la unión del ácido nucleico a la fase  
 sólida se lleva a cabo en presencia de un agente cosmotrópico, preferiblemente sulfato de amonio.
- 35 9. Procedimiento, según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que la fase sólida comprende un grupo  
 ionizable negativamente con un pKa entre el primer y el segundo pH o en el que la fase sólida comprende un óxido  
 inorgánico, preferiblemente sílice.
- 40 10. Procedimiento para aislar un ácido nucleico de una célula, que comprende lisar la célula para liberar el ácido  
 nucleico de la célula, y aislar el ácido nucleico liberado utilizando el procedimiento, según cualquiera de las  
 realizaciones anteriores.
- 45 11. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que la lisis se lleva a cabo utilizando el tampón de unión, que  
 comprende preferiblemente un agente cosmotrópico.
12. Procedimiento, según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el ácido nucleico se eluye de la fase  
 sólida a una temperatura por encima de la temperatura ambiente.
- 50 13. Procedimiento, según cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que el ácido nucleico se eluye de la fase  
 sólida en presencia de un tampón de elución, en el que el segundo pH está dentro de un intervalo de tamponamiento  
 del tampón de elución, y preferiblemente el intervalo de tamponamiento del tampón de elución se solapa con el  
 intervalo de tamponamiento del tampón de lavado o está comprendido por el mismo.
14. Kit para el aislamiento de un ácido nucleico, que comprende:  
 55 i) un tampón de unión para unir el ácido nucleico a una fase sólida a un primer pH, en el que el primer pH es un pH  
 ácido; y  
 ii)  
 a) una solución de lavado que comprende un tampón con un intervalo de tamponamiento que comprende un pH que  
 es más elevado que el primer pH, en el que la solución de lavado está a un pH que está dentro de un intervalo de  
 60 tamponamiento del tampón de unión, pero inferior al intervalo de tamponamiento del tampón de lavado, y en el que  
 el pH de la solución de lavado es pH 6,0 o inferior; y opcionalmente  
 b) una solución para eluir el ácido nucleico de la fase sólida, en el que la solución está a un segundo pH que es más  
 elevado que el primer pH, y en el que el segundo pH está en el intervalo de pH 6,5-10; o  
 iii)  
 65 a) una composición en forma seca que cuando se disuelve en un líquido proporciona una solución de lavado según  
 (ii)(a);

y opcionalmente

b) una composición en forma seca que cuando se disuelve en un líquido proporciona una solución según (ii)(b).

- 5 15. Kit, según la reivindicación 14, en el que el intervalo de tamponamiento del tampón en la solución de lavado o cada uno de ellos es más elevado que el pH 6,0, y preferiblemente se solapa con el intervalo de pH 6,5-10, está comprendido por el mismo o lo comprende, o en el que la composición en forma seca que cuando se disuelve en un líquido proporciona una solución de lavado tal como se define en la reivindicación 14(ii)(a), en el que el intervalo de tamponamiento del tampón en la solución de lavado o cada uno de ellos es más elevado que el pH 6,0, y preferiblemente se solapa con el intervalo de pH 6,5-10, está comprendido por el mismo o lo comprende.
- 10 16. Kit, según la reivindicación 15, en el que el tampón de lavado comprende un tampón Tris, preferiblemente Tris-HCl.
- 15 17. Kit, según la reivindicación 15 ó 16, en el que la solución de lavado no incluye una proteasa y/o comprende además un detergente.
- 20 18. Kit, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que el kit no comprende un agente caotrópico, y el kit no comprende un disolvente orgánico y/o el tampón de unión comprende un agente cosmotrópico.
- 25 19. Kit, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, que comprende además una fase sólida a la que es capaz de unirse el ácido nucleico en presencia del tampón de unión al primer pH, y desde la que el ácido nucleico se puede eluir al segundo pH, en el que la fase sólida comprende preferiblemente un grupo ionizable negativamente con un pKa entre un primer pH en el que el ácido nucleico es capaz de unirse a la fase sólida y un segundo pH en el que al ácido nucleico se puede eluir de la fase sólida, o un óxido inorgánico, preferiblemente sílice.
- 30 20. Kit, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, que comprende además una proteasa, preferiblemente en forma liofilizada, separada del tampón de unión.
21. Utilización del kit, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, para el aislamiento de un ácido nucleico.

Figura 1

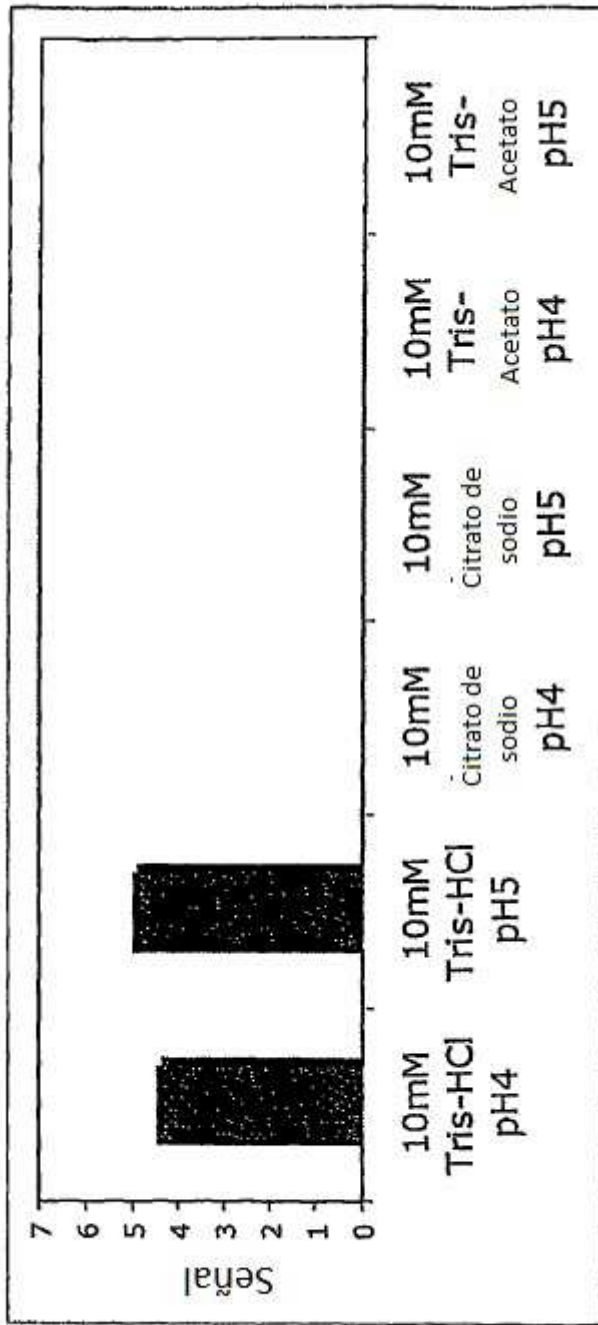


Figura 2

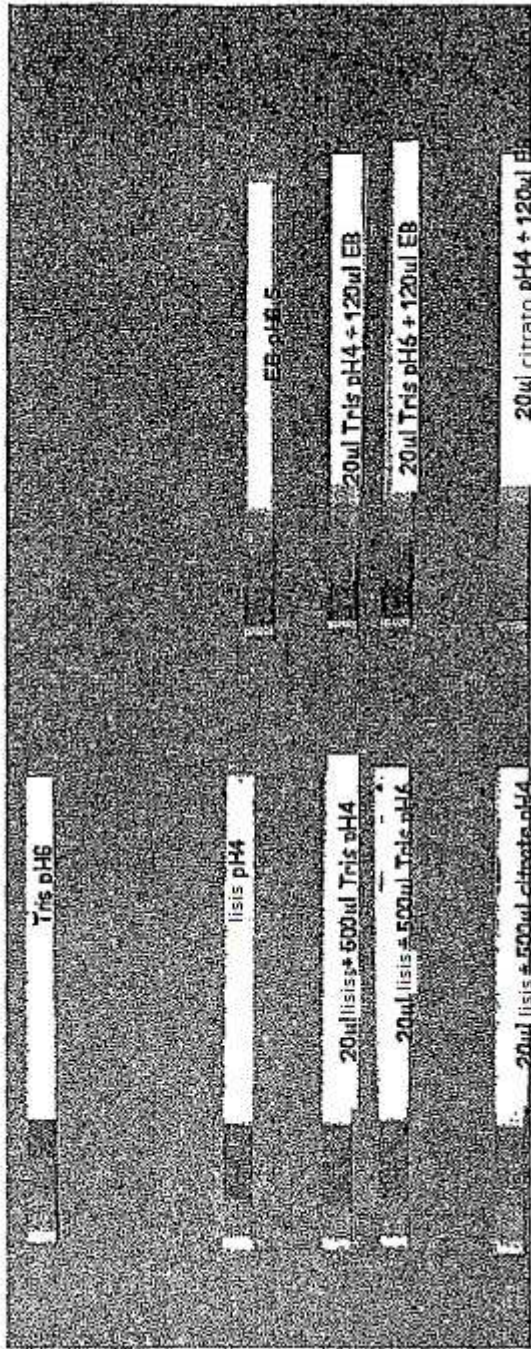


Figura 3

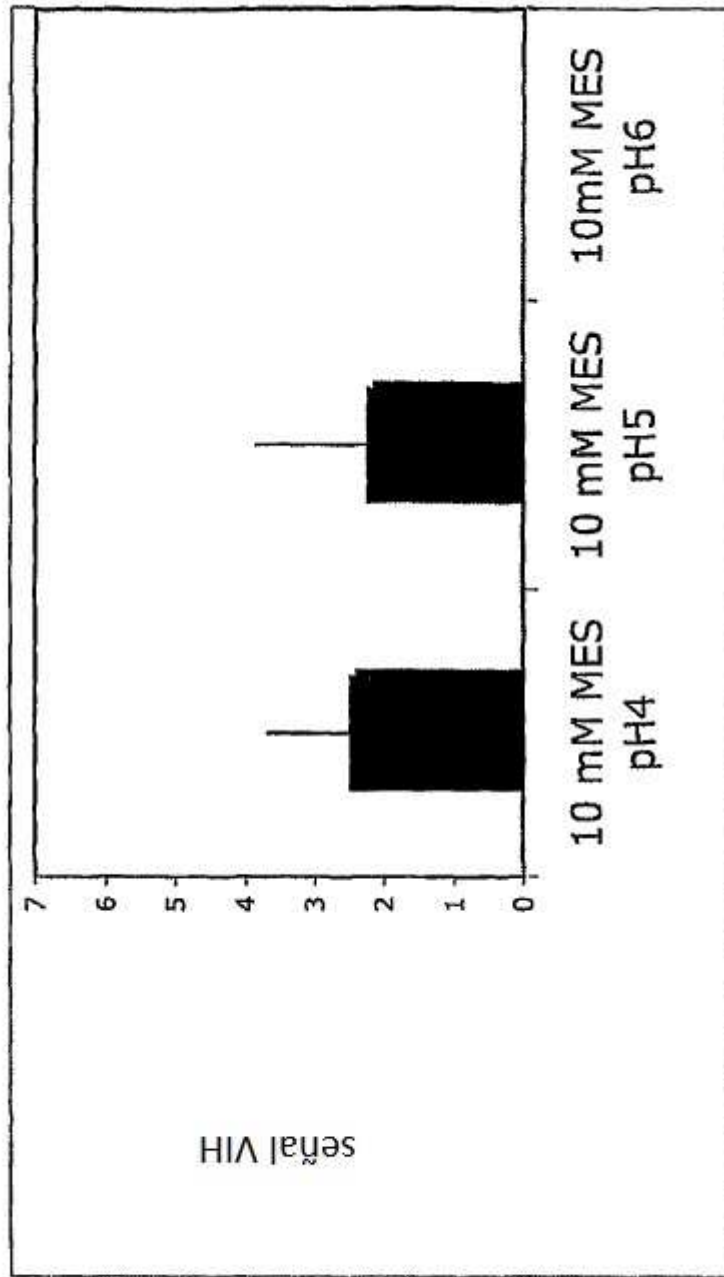


Figura 4

