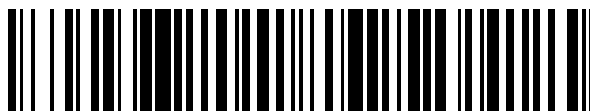


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 044**

51 Int. Cl.:

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2005 E 05856744 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 1756136**

54 Título: **Kits y procedimientos para eliminar contaminantes de ácidos nucleicos en muestras ambientales y biológicas**

30 Prioridad:

21.05.2004 US 573358 P

24.05.2004 US 574179 P

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

16.02.2015

73 Titular/es:

**MO BIO LABORATORIES, INC. (100.0%)
2746 LOKER AVENUE WEST
CARLSBAD, CA 92010, US**

72 Inventor/es:

**BROLASKI, MARK N.;
VENUGOPAL, RAVEENDRAN J. y
STOLOW, DAVID**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 529 044 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

Kits y procedimientos para eliminar contaminantes de ácidos nucleicos en muestras ambientales y biológicas

CAMPO DE LA INVENCION

5 **[0001]** La invención proporciona métodos y composiciones, p.ej., kits, para eliminar los contaminantes de ácidos nucleicos en una muestra, p.ej., muestras biológicas o ambientales como muestras de suelo, alimento, plantas, animales, microorganismos o agua. La invención proporciona métodos y composiciones, p.ej., kits, para aislar los ácidos nucleicos de muestras, incluyendo muestras biológicas o ambientales como muestras de suelo, alimento, plantas, animales, microorganismos o agua. La invención hace referencia a métodos y composiciones para
10 detectar organismos, p.ej., microorganismos, en una muestra, p.ej., una muestra biológica o ambiental. Los ácidos nucleicos aislados usando los kits y métodos de la invención son útiles para llevar a cabo una variedad de procesos aplicables a la agricultura, investigación forense, zoología y combatir el bioterrorismo. Por ejemplo, estos ácidos nucleicos son útiles en las áreas de aplicaciones biológicas moleculares, incluyendo, por ejemplo, analíticas, clonación, diagnóstico y detección en los campos de la agricultura, horticultura, silvicultura, investigación forense, investigación biológica, identificación y caracterización de composición de muestras y
15 organismos.

ANTECEDENTES

[0002] Las secuencias de ácido nucleico presentan una amplia variedad de aplicaciones en el campo de la biología molecular. Son una herramienta valiosa en las técnicas analíticas y de aplicación usadas en el campo de la biología molecular, la salud y la medicina (terapia génica, diagnóstico, expresión de proteína recombinante),
20 bioterrorismo (análisis y detección de agentes), investigación forense, ciencia espacial y ciencia de la alimentación. Algunos ejemplos de estas técnicas incluyen genotipado de microorganismos, obtención de la huella genética de plantas y animales, detección de patógenos y microorganismos beneficiosos en suelos, agua, plantas y animales, identificación forense de muestras biológicas y muestras ambientales contaminadas con diferentes entidades biológicas. Todas estas técnicas se basan en la identificación de una secuencia específica de ácido nucleico bien en una muestra biológica, como un microorganismo, tejido vegetal o tejido animal, o bien en cualquier ambiente capaz de soportar la vida. La identificación de secuencias de ácido nucleico diana directamente en muestras biológicas y en muestras ambientales presenta las ventajas de la rapidez, precisión, alto rendimiento y un bajo límite de detección para cantidades de picogramos o femtogramos de ácidos nucleicos. La secuencia de ácido nucleico diana, para ser usada como herramienta de diagnóstico en tales
30 aplicaciones, debe estar libre de contaminantes que inhiben la PCR y otras aplicaciones posteriores. Estos contaminantes son a menudo de grupos que incluyen polifenoles, polisacáridos y sustancias húmicas.

[0003] El campo de extracción de ácido nucleico y posterior amplificación de este ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha revolucionado el rápido análisis de la composición genética de diversos ecosistemas. Hay disponibles métodos y kits para aislar ADN genómico desde una amplia gama de entidades biológicas y desde el entorno en el que viven estas entidades vivas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica analítica muy poderosa y sensible con aplicaciones en muchos campos diversos, que incluyen la biología molecular, diagnosis clínica, análisis forense y genética de poblaciones. Sin embargo, la tasa de éxito en análisis genómico de plantas y suelo ha sido relativamente baja debido a la baja calidad del ADN aislado. En el análisis de ADN genómico de plantas, el ADN es coextraído de manera invariable con otros
40 componentes vegetales como polifenoles y polisacáridos que inhiben las aplicaciones de la PCR.

[0004] En el campo de ecosistemas del suelo, los métodos de extracción de ácido nucleico sufren ineficiencias compuestas de sorción de ADN a superficies del suelo y coextracción de inhibidores enzimáticos de los suelos. Tanto la arcilla como las fracciones orgánicas del suelo afectan al aislamiento y purificación de ADN. La arcilla tiene una tendencia a unirse al ADN de manera adsorbente, mientras que los polímeros húmicos que se encuentran en la fracción orgánica tienden a copurificar con ADN durante el procedimiento de extracción. Cuanto más contenido hay de montmorillonita y materia orgánica, mayor la capacidad amortiguadora del sistema de suelo y también mayor la cantidad de ADN adsorbido a las partículas de suelo. De ese modo, los métodos desarrollados para un tipo de suelo particular con una ratio de arcilla:materia orgánica pueden no funcionar para ningún otro tipo de suelo con distinta ratio arcilla:materia orgánica. Se ha informado de manera previa que la extracción de fenol de ADN contaminado con sustancias húmicas resultó en una disminución de la eficiencia en la recuperación de ADN. El compost puede tener una variedad de compuestos orgánicos adicionales que pueden copurificarse con el ADN e inhibir las manipulaciones enzimáticas del ADN. Otra preocupación adicional al aislar ADN microbiano de compost en que el material vegetal en diversas etapas de descomposición puede estar presente en concentraciones significativas en el compost.

55 **[0005]** En estudios de organismos superiores como hongos, plantas y animales, el aislamiento de ácido nucleico directo todavía afronta problemas de calidad. En cianobacterias, hongos, algas y plantas, pigmentos y componentes de la pared celular como quitinas y polisacáridos inhibirán la PCR. Estos tipos celulares son ricos

en endonucleasas y exonucleasas y contienen pigmentos fotosintéticos, que pueden inhibir reacciones enzimáticas, especialmente transcripción inversa y PCR.

5 **[0006]** La naturaleza de los contaminantes en preparaciones de ácido nucleico bruto de suelos y sedimentos y sus interacciones con ADN y ARN no se comprende bien. Con mucha frecuencia, estos contaminantes se consideran ácidos húmicos y fúlvicos y una mezcla heterogénea de oligómeros y polímeros fenólicos. Las sustancias húmicas se forman cuando los microbios degradan residuos vegetales y se estabilizan para la degradación por unión covalente de sus sitios reactivos a iones metálicos y minerales arcillosos. Las sustancias húmicas constan de aromáticos policíclicos a los que se unen sacáridos, péptidos y fenoles. Los tipos predominantes de sustancias húmicas en suelos son ácidos húmicos (HA, peso molecular de 300 kDa y superior) y ácidos fúlvicos (FA, peso molecular tan bajo como 0,1 kDa). Los ácidos húmicos son solubles en pH alcalino y precipitan con ácidos sulfúricos o clorhídricos a pH de 1,0 a 2,0, mientras que los ácidos fúlvicos permanecen en solución incluso a pH ácido (Stevenson, 1994). Con frecuencia, los extractos de ADN de suelos que muestran coloración marrón indican la contaminación con sustancias de tipo húmico. Estos compuestos marrones no pueden eliminarse fácilmente de los extractos de ADN. La extracción de solvente de extractos de ADN brutos con solvente como fenol, éter dietílico, acetona, metanol y etanol no tuvo éxito en la eliminación de la coloración marrón, y el ADN fue decolorado aún y era resistente a la digestión mediante endonucleasas de restricción. Algunos de estos compuestos también parecen migrar junto con el ADN durante la ultracentrifugación isopícnica con CsCl-bromuro de etidio, resultando en una coloración marrón clara del ADN recuperado. Estas observaciones implican una íntima asociación entre los contaminantes y el ADN. Aunque la naturaleza de la asociación entre compuestos contaminantes y ADN no ha sido explicada, el enlace reversible e irreversible de polifenoles, como taninos, a proteínas es bien comprendido.

25 **[0007]** La extracción directa de ácido nucleico total de suelos o sedimentos normalmente resulta en la coextracción de otros componentes del suelo, principalmente ácidos húmicos u otras sustancias húmicas, que interfieren de manera negativa en los procesos de detección y transformación de ADN. Se ha afirmado que estas sustancias inhiben las endonucleasas de restricción y polimerasa *Taq*, la enzima clave de la PCR, y disminuyen la eficiencia en las hibridaciones ADN-ADN. La separación de sustancias húmicas de ADN normalmente conlleva mucho tiempo y tediosos pasos. Para evitarlo, se han usado ampliamente la cromatografía de exclusión por tamaño y el uso de columnas de centrifugado de polivinilpirrolidona. La cromatografía de exclusión por tamaño incluye el uso de SEPHADEX G-200™ o MICROSPIN S-400 HR™, aunque también se ha presentado el uso de PVPP insoluble en agua y polivinilpirrolidona (PVP) soluble en agua como agentes de enlace al ácido húmico.

30 **[0008]** La solicitud internacional publicada nº WO02/055737 (Clingenix, Inc.) reveló un método para aislar ADN desde sangre entera que comprende añadir acetato de amonio para precipitar la proteína tras un paso de lisis celular.

35 **[0009]** Dijkmans et al. (1993) *Microbial Releases: Viruses, Bacteria and Fungi* 2, 29-34 revela un método para aislar ADN del suelo usando detergente SDS, después precipitación con acetato de amonio, seguido de filtrado con gel.

40 **[0010]** Braid et al. (2003) *J. Microbial. Methods* 52, 389-393 también revela estudios que buscan aislar ADN del suelo. En un intento de reducir la copurificación de inhibidores de la PCR con ADN diana, los autores intentaron añadir un floculante, sulfato de amonio y aluminio ($\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$), junto con el paso de lisis celular o tras el paso de lisis y antes del paso de purificación de proteínas. Concluyeron que la adición de $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$ junto con el paso de lisis celular dio los mejores resultados. Sin embargo, dicho protocolo todavía puede dejar suficientes impurezas de inhibidores de PCR para interferir con la amplificación por PCR de un ácido nucleico diana.

SUMARIO DE LA INVENCION

45 **[0011]** La presente invención proporciona un método mejorado para aislar ácidos nucleicos desde muestras como muestras de suelo que lleva a la eliminación de contaminantes, incluyendo inhibidores de PCR, mediante el uso de acetato de amonio como un primer floculante seguido del uso de sulfato de amonio y aluminio o sulfato de amonio y aluminio dodecahidratado como segundo floculante en una serie de etapas establecida.

50 **[0012]** Más específicamente, la presente invención proporciona un método para eliminar un contaminante o inhibidor de una muestra que comprende ácido nucleico, donde el contaminante o inhibidor inhibe la amplificación o hibridación del ácido nucleico en la muestra, o inhibe una reacción enzimática que utiliza el ácido nucleico en la muestra, comprendiendo el método los pasos de:

- 55 (a) procesar la muestra para romper, desnaturalizar o alterar la muestra, donde el procesamiento comprende poner en contacto la muestra con una solución que comprende un agente caotrópico, un detergente y un amortiguador;
- (b) poner en contacto la muestra con un primer floculante para formar un precipitado floculante, donde el

primer floculante es acetato de amonio;

(c) aislar el ácido nucleico y restantes contaminantes e inhibidores del primer precipitado floculante en un sobrenadante;

5 (d) poner en contacto el sobrenadante que contiene ácido nucleico con un segundo floculante para formar un segundo precipitado floculante, donde el segundo floculante es sulfato de amonio y aluminio o sulfato de amonio y aluminio dodecahidratado; y

(e) aislar el ácido nucleico del segundo precipitado floculante en un sobrenadante.

10 **[0013]** Dicho método puede usarse para eliminar contaminantes de ácidos nucleicos, por ejemplo, en muestras ambientales o biológicas como muestras de suelo, alimento (p.ej., para inspecciones), plantas, animales, microorganismos o agua. Los métodos de la invención se usan para eliminar aquellos contaminantes en la muestra que pueden impedir o inhibir una reacción de amplificación de ácido nucleico. De este modo, los métodos y composiciones de la invención se usan para aumentar la precisión y/o eficiencia de reacciones de hibridación de ácido nucleico (p.ej., ARN-ADN o ADN-ADN), incluyendo reacciones de amplificación como PCR y RT-PCR). La invención puede usarse con materiales floculantes como se menciona arriba en la purificación de ADN y ARN de una amplia variedad de muestras, p.ej., muestras biológicas o ambientales, como muestras de suelo, alimento (p.ej., carne, verduras y similares; p.ej., para determinar la contaminación del alimento, incluyendo carne, marisco, verdura, fruta y similares), plantas, animales, microorganismos o agua. Los métodos de la invención pueden usarse para aislar ácidos nucleicos de muestras biológicas y ambientales libres de sustancias contaminantes que inhiben la PCR, RT-PCR y cualquier aplicación posterior en biología molecular. El método es escalable y los modos de realización de ejemplo incluyen integrar el método en un proceso de purificación de ácido nucleico y aplicar el método para eliminar contaminantes de ácidos nucleicos purificados existentes. El método tiene aplicaciones en agricultura, diagnóstico, horticultura, silvicultura, investigación forense, el combate contra el bioterrorismo y otras áreas donde se usa el ácido nucleico libre de contaminantes.

25 **[0014]** Los métodos de la invención pueden usarse para obtener ácidos nucleicos de una amplia variedad de muestras biológicas y ambientales de tal forma que los ácidos nucleicos aislados se encuentren libres de materiales contaminantes, principalmente polifenoles, polisacáridos y sustancias húmicas. La invención mejora significativamente la pureza final del ADN y ARN aislado frente a la técnica existente en el uso de materiales floculantes. Hemos proporcionado ejemplos del uso de esta invención en los procesos de purificación implicados en la obtención de ADN y ARN de suelos y otras muestras ambientales.

[0015] El primer floculante puede añadirse a un medio de muestra bruto o no refinado, recién aislado, conservado, procesado o no procesado. Tras separar el ácido nucleico del segundo precipitado floculante en el paso (e) el método opcionalmente comprende además purificar el ácido nucleico.

35 **[0016]** Un método de la invención puede usarse también para eliminar uno o más contaminantes de una muestra que comprende ácido nucleico para facilitar una reacción de detección o enzimática deseada, p.ej., una reacción de fosforilasa o ligasa (p.ej., para eliminar una composición en la muestra que ralentiza, inhibe o interfiere de otro modo en el proceso o reacción de detección o enzimática deseada).

40 **[0017]** El paso de procesamiento (a) para romper, desnaturalizar o alterar la muestra antes de ponerla en contacto con el primer floculante (acetato de amonio) puede comprender mezclar o poner en contacto la mezcla con una solución que comprende un agente caotrópico (p.ej., cloruro de guanidinio), un detergente (p.ej., SDS, véanse más ejemplos a continuación), un amortiguador, un agente homogeneizante o una combinación de los mismos. Poner en contacto la muestra que comprende ácido nucleico con el primer floculante para formar un precipitado floculante puede comprender mezclar o agitar en vortex el floculante y la mezcla. La separación posterior de una solución que comprende ácido nucleico del primer precipitado floculante (paso (c)) puede comprender centrifugar el floculante y la muestra y recoger un sobrenadante que comprende ácido nucleico. Tras poner en contacto la solución que comprende ácido nucleico con el segundo floculante para formar un segundo precipitado floculante (paso (d)), la separación de ácido nucleico del segundo precipitado floculante (paso (e)) puede comprender de nuevo centrifugar el floculante y la muestra y recoger un sobrenadante que comprende ácido nucleico. Como se ha mencionado arriba, el método puede comprender purificar el ácido nucleico tras el paso (e).

55 **[0018]** La invención puede usarse para amplificar, hibridar, aislar o purificar un ácido nucleico a partir de una muestra que comprende ácido nucleico. Los métodos de la invención pueden comprender además detectar o caracterizar un ácido nucleico purificado, aislado, hibridado o amplificado. En un aspecto, el ácido nucleico se detecta mediante una reacción de amplificación de ácido nucleico, inmovilización sobre un soporte sólido, hibridación, digestión con enzimas de restricción, digestión con ARNasa, transcripción inversa, digestión con ADNasa, electroforesis, cromatografía o una combinación de los mismos. En un aspecto la reacción de amplificación de ácido nucleico comprende un método de detección, una reacción en cadena de polimerasa (PCR), una transcripción inversa, una replicación por círculo rodante, una reacción en cadena de la ligasa, reacción de etiquetado o marcado de ácido nucleico, métodos derivados de los mismos o una combinación de

los mismos.

[0019] Los métodos de la invención pueden comprender además la identificación de un organismo o componente de ácido nucleico en la muestra. El organismo puede identificarse mediante la identificación o caracterización del ácido nucleico purificado, aislado, amplificado o hibridado. El componente de ácido nucleico u organismo detectado puede derivarse de un microorganismo, un animal, una planta, un insecto, una levadura, un virus, un fago, un nematodo, una bacteria o un hongo. La bacteria detectada puede comprender bacteria Gram positiva o Gram negativa.

[0020] En un aspecto la muestra comprende una muestra ambiental o biológica. La muestra ambiental o biológica puede comprender una muestra derivada de un animal, restos animales, un alimento, un microorganismo, una planta o sus componentes, suelo, sedimento, roca, arrecife, lodo, compost, materia biológica en descomposición, una biopsia, una muestra histológica, una muestra de semen, una muestra de saliva o sangre, cualquier muestra de fluido corporal, una muestra de pelo, una muestra de piel, una muestra fecal, restos arqueológicos, una turbera, compost, aceite, agua, agua terrestre o agua subterránea, agua industrial o atmosférica, polvo, polvo urbano, mezcla comercial para sembrar o mejoradores del suelo, respiraderos del fondo marino, o aire, donde en un aspecto (opcionalmente) la muestra es procesada por filtración, sedimentación o centrifugación mecánica.

[0021] En cualquier método de la invención, el ácido nucleico comprende un ARN (p.ej., ARNm, ARNt, ARNr, ARNi) o un ADN o una combinación de los mismos.

[0022] En un método de la invención el paso de extraer un ácido nucleico de la muestra puede comprender homogeneizar una muestra procesada, no procesada, recién aislada, conservada, bruta o no refinada. En un aspecto, la muestra en homogeneizada mediante el contacto de la muestra con una fuerza mecánica, fuerza de corte, vibración producida por sonido, vibración mecánica o un vortex o adaptador de vortex (p.ej., Vortex Adapter, MoBio, Carlsbad, CA), donde en un aspecto (opcionalmente) la fuerza mecánica o de corte comprende el uso de un vidrio, cerámica, metal, mineral o un material plástico o una combinación de los mismos, y en un aspecto (opcionalmente) el material se encuentra en forma de una perla. En un aspecto, el método o kit comprende además añadir un material homogeneizante a la muestra para el paso de homogeneización, donde en un aspecto (opcionalmente) el material homogeneizante comprende un vidrio, cerámica, metal, mineral, plástico o una combinación de los mismos.

[0023] Como se ha observado arriba, el ácido nucleico será extraído de la muestra mediante un paso que comprende poner en contacto la muestra con un líquido o una composición que comprende un agente caotrópico, detergente y un amortiguador. El detergente puede seleccionarse del grupo formado por dodecil-sulfato sódico (SDS), sarkosyl, lauril sarcosinato de sodio, bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB), ácido cólico, ácido desoxicólico, benzamidotaurocolato (BATC), octilfenol polietoxilato, monolaurato de sorbitán polioxietileno, terc-octilfenoxi poli(oxietileno)etanol, 1,4-piperazinabis-(ácido etanosulfónico), ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico, polietilenglicol terc-octilfenil eter (Triton[®]X-100), (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol (Triton[®]X-114) y una combinación de los mismos. El ácido nucleico es puesto en contacto con un floculante tras separar una cantidad sustancial del detergente del ácido nucleico.

[0024] En un aspecto, el floculante no precipita sustancialmente el ácido nucleico. En un aspecto, el floculante precipita parte pero no todo el ácido nucleico (p.ej., al menos un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más del ácido nucleico se pierde en el precipitado o, alternativamente, un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más del ácido nucleico permanece en un sobrenadante y es recuperado, amplificado, purificado o hibridado y similares). En un aspecto, el floculante precipita una o más sustancias seleccionadas entre el grupo compuesto por ácido húmico, ácido fúlvico y humina. En un aspecto, el floculante se separa del ácido nucleico poniendo en contacto el floculante y ácido nucleico con un soporte sólido en condiciones en las que el ácido nucleico se une de manera selectiva al soporte sólido.

[0025] En un aspecto, el soporte sólido comprende o consta de un vidrio, agarosa, plástico, sílice, poli(acrilamida), hidrogel o gel.

[0026] En un aspecto, los métodos de la invención pueden comprender además amplificar el ácido nucleico o una parte del mismo tras el paso de separación del segundo precipitado floculante del ácido nucleico. En un aspecto, el ácido nucleico es amplificado usando un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), replicación por círculo rodante, reacción en cadena de la ligasa o métodos derivados de los mismos. En un aspecto, el ácido nucleico separado del segundo precipitado floculante se encuentra sustancialmente libre de una sustancia que inhibe un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa.

[0027] En un aspecto, el ácido nucleico comprende un ARN, y el ARN es transcrito de manera inversa después de que el segundo precipitado floculante haya sido separado del ácido nucleico. En un aspecto, el ácido nucleico

es puesto en contacto con una enzima de restricción una vez que el segundo precipitado floculante haya sido separado del ácido nucleico.

5 **[0028]** En un aspecto, el ácido nucleico (p.ej., aislado, purificado o amplificado mediante o después del uso de un método de la invención) es analizado mediante espectrometría de masas; electroforesis en gel de poliacrilamida, agarosa o capilar; hibridación; matriz; micromatriz; reacción enzimática; un ensayo de fluorescencia; un ensayo de radiación; un ensayo cromatográfico; o una combinación de los mismos. En un aspecto, el ácido nucleico entra en contacto con uno o más oligonucleótidos una vez que el segundo precipitado floculante haya sido separado del ácido nucleico. En un aspecto, uno o más de los oligonucleótidos hibrida con el ácido nucleico. En un aspecto, un ácido nucleico (p.ej., aislado, purificado o amplificado mediante o tras el uso de un método o kit de la invención) es inmovilizado en una superficie sólida o es hibridado con un ácido nucleico inmovilizado sobre una superficie sólida una vez que el segundo precipitado floculante haya sido separado del ácido nucleico.

15 **[0029]** La invención proporciona un método para la purificación posterior al aislamiento de un ácido nucleico aislado mediante un método existente de una muestra biológica o ambiental que no da lugar a un producto de amplificación detectable en una reacción de amplificación como un proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que comprende los pasos del (a) al (e) mencionados arriba.

[0030] La invención también proporciona un método según la invención donde se emplea un kit que comprende (a) un agente caotrópico; (b) acetato de amonio; (c) sulfato de amonio y aluminio o sulfato de amonio y aluminio dodecahidratado; (d) una o más soluciones o amortiguadores; opcionalmente (e) uno o más recipientes de tubo útiles para llevar a cabo el método; y (f) instrucciones que describen un método para su uso según la invención.

20 **[0031]** Dicho kit puede comprender además un detergente o un tensoactivo. El detergente puede seleccionarse entre el grupo formado por dodecil-sulfato sódico (SDS), sarkosyl, lauril sarcosinato de sodio, bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB), ácido cólico, ácido desoxicólico, benzamidotaurocolato (BATC), octilfenol polietoxilato, monolaurato de sorbitán polioxi-etilenado, terc-octilfenoxi poli(oxi-etileno)etanol, polietilenglicol terc-octilfenil eter (Triton[®] X-100), (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol (Triton[®] X-114) y una combinación de los mismos.

[0032] Dicho kit puede comprender además un material homogeneizante (p.ej., una perla). En un aspecto, el kit comprende además una perla, donde en un aspecto (opcionalmente) la perla es una perla homogeneizante.

30 **[0033]** La una o más soluciones o amortiguadores puede ser por ejemplo Tris, MOPS, etc., para llevar a cabo un método según cualquiera de los métodos de la invención. El kit puede comprender instrucciones que describen un método para obtener una muestra para su procesamiento.

[0034] Dicho kit puede comprender además uno o más recipientes o envases, p.ej., recipientes de tubo (p.ej., tubo de ensayo, capilar, Eppendorf) útiles para llevar a cabo el método de uso.

35 **[0035]** Dicho kit comprende además uno o más oligonucleótidos, y en un aspecto (opcionalmente) nucleótidos libres, y en un aspecto (opcionalmente) suficientes nucleótidos libres para llevar a cabo una reacción de PCR, una replicación por círculo rodante, una reacción en cadena de la ligasa, una transcripción inversa, una reacción de marcado o etiquetado de ácido nucleico, o métodos derivados de los mismos.

40 **[0036]** Dicho kit puede comprender además al menos una enzima, donde en un aspecto (opcionalmente) la enzima es una polimerasa. En un aspecto el kit comprende además uno o más oligonucleótidos, nucleótidos libres y al menos una polimerasa o enzima capaz de amplificar un ácido nucleico en una reacción de PCR, una replicación por círculo rodante, una reacción en cadena de la ligasa, una transcripción inversa o métodos derivados de los mismos. El uno o más oligonucleótidos pueden hibridar específicamente con un ácido nucleico de un microorganismo, animal, planta, insecto, levadura, virus, fago, nematodo, bacteria u hongo. El uno o más oligonucleótidos pueden hibridar de manera específica con un ácido nucleico de *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Sporolactobacillus* spp.; *Sporocarcina* spp.; *Filibacter* spp.; *Caryophanum* spp.; *Desulfotomaculum* spp.; *Corynebacterium* spp.; *Micrococcus* spp.; *Mycobacterium* spp.; *Nocardia* spp.; *Peptococcus* spp.; *Peptostreptococcus* spp., o una bacteria Gram negativa de una familia que comprende *Acetobacteriaceae*, *Alcaligenaceae*, *Bacteroidaceae*, *Chromatiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Legionellaceae*, *Neisseriaceae*, *Nitrobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Rhizobiaceae*, *Rickettsiaceae* o *Spirochaetaceae*. El uno o más oligonucleótidos pueden hibridar específicamente con un ácido nucleico de *B. anthracis*, *A. globiformis*, *B. subtilis*, *C. renale*, *C. difficile*, *M. luteus*, o *R. erythropolis*.

[0037] El uno o más oligonucleótidos pueden hibridar específicamente con un ácido nucleico de un virus, p.ej., variola, varicela, reovirus, retrovirus, VIH, VIH-1, fiebres hemorrágicas virales, Ebola, Marburg, Machupo, Lassa, *Variola major*, encefalitis viral, cualquiera de los patógenos enumerados en la Tabla 1.

[0038] Dicho kit puede ser para la detección de una espora o toxina bacteriana; el kit puede usarse para detectar

organismos que producen una espora o toxina, donde opcionalmente la toxina es una toxina bacteriana. Un método de la invención puede emplear un kit para la detección de un peligro biológico; el kit puede usarse para detectar organismos que producen un agente biopeligroso, donde opcionalmente el agente biopeligroso es una toxina bacteriana.

- 5 **[0039]** Los detalles de uno o más modos de realización de la invención se exponen en los dibujos que acompañan y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y dibujos y a partir de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 **[0040]** Los siguientes dibujos son ilustrativos de aspectos de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención según se recoge por las reivindicaciones.

La Figura 1 ilustra una electroforesis en gel de agarosa que muestra ADN purificado por un método de ejemplo de la invención, según se describe en el Ejemplo 1, a continuación.

La Figura 2 ilustra una electroforesis en gel de agarosa que muestra ADN genómico total amplificado por PCR aislado en la Figura 1, según se describe en el Ejemplo 1, a continuación.

- 15 La Figura 3 ilustra una electroforesis en gel de agarosa que muestra una comparación de amplificación por PCR de ADN eubacteriano aislado usando un kit disponible en el mercado representativo de la técnica existente, como se describe en el Ejemplo 1, a continuación.

La Figura 4 ilustra una electroforesis en gel de agarosa que muestra el ADN genómico total aislado de diferentes muestras de suelo, como se describe en el Ejemplo 2, a continuación.

- 20 La Figura 5 ilustra una electroforesis en gel de agarosa que muestra el ADN genómico total amplificado por PCR usando cebadores para *Bacillus* spp., como se describe en el Ejemplo 2 y 3, a continuación.

La Figura 6 ilustra una electroforesis en gel de agarosa que muestra el ADN genómico total amplificado por PCR usando cebadores para *Streptomyces* spp., como se describe en los Ejemplos 2 y 3, a continuación.

- 25 Las Figuras 7 y 8 ilustran electroforesis en gel de agarosa que muestra ácido nucleico aislado de muestras de suelo (véase Tabla 1, Ejemplo 3) y sometido a ensayo por PCR, como se describe en el Ejemplo 3, a continuación.

La Figura 9 ilustra una electroforesis en gel de agarosa que muestra ARN aislado de 8 tipos diferentes de suelo, como se menciona en la Tabla 2, Ejemplo 3, como se describe en el Ejemplo 3, a continuación.

- 30 Las Figuras 10 y 11 ilustran electroforesis en gel de agarosa que muestra amplificación por RT-PCR de ARN total de una muestra de suelo con un conjunto cebador específico para microorganismos que pertenecen al grupo *Bacilli* y *Streptomyces*, respectivamente.

- 35 **[0041]** Los símbolos de referencia iguales en los diversos dibujos indican elementos iguales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 40 **[0042]** La invención hace referencia a métodos para la detección y/o aislamiento de ácidos nucleicos, y/o para la detección de organismos, p.ej., microorganismos, en una muestra, p.ej., una muestra ambiental o biológica. La invención proporciona métodos para aislar ácidos nucleicos de fuentes que contienen sustancias contaminantes que interfieren con el uso del ácido nucleico purificado en aplicaciones posteriores. En un aspecto, la invención proporciona métodos para purificar ácidos nucleicos a partir de muestras ambientales o biológicas para que se encuentren libres de contaminantes que pueden inhibir o normalmente inhiben una reacción enzimática, como una reacción de amplificación, p.ej., PCR. Las muestras biológicas incluyen, sin carácter limitativo, tejidos de seres humanos, animales, plantas, y las muestras ambientales incluyen, sin carácter limitativo, suelo, sedimento, lodo, materia biológica en descomposición, restos arqueológicos, turbera, compost y agua que sea de origen terrestre o subterráneo. Los ácidos nucleicos aislados usando los métodos de la invención pueden ser útiles en las áreas de aplicaciones biológicas moleculares, incluyendo, por ejemplo, analíticas, clonación, diagnóstico y detección en los campos de la agricultura, horticultura, silvicultura, investigación forense, investigación biológica, identificación de composición de muestras y organismos, caracterización y combate del bioterrorismo.

- 50 **[0043]** La invención proporciona métodos para aislar o extraer ácidos nucleicos, p.ej., ADN y/o ARN, mediante la adición de agentes floculantes como se ha afirmado arriba en un paso específico para purificar ADN y ARN de contaminantes en una muestra, p.ej., una muestra ambiental o biológica. En un aspecto, los métodos de la invención combinan las propiedades de dos reactivos, acetato de amonio y sulfato de amonio y aluminio o sulfato de amonio y aluminio dodecahidratado, para eliminar contaminantes de ADN en (al menos) dos pasos diferentes. En el primer paso (véase Ejemplo 1, a continuación), el acetato de amonio es añadido a la muestra biológica o ambiental bruta (p.ej., una mezcla de suelos) elimina la mayoría de contaminantes mientras que deja el ADN presente. El sulfato de amonio y aluminio o sulfato de amonio y aluminio dodecahidratado se añade a

continuación para eliminar el resto de contaminantes, incluyendo sustancias húmicas, p.ej., del suelo y fenólicos de las plantas. Aunque la invención no queda limitada a ningún mecanismo de acción específico, en un aspecto la interacción entre el agente floculante y los componentes distintos a ácido nucleico resultan en una precipitación por acción de masas dirigida del material contaminante. En un aspecto, las perlas de
 5 homogeneización se usan en el procedimiento (observándose también que en un aspecto un procedimiento de la invención no usa homogeneización - lo que puede resultar en una obtención de ADN más baja en comparación con el uso de perlas de homogeneización o equivalentes).

[0044] La invención proporciona métodos para aislar o extraer ADN que comprenden el uso de dos agentes floculantes como se menciona arriba en pasos independientes en un proceso de purificación de ADN para
 10 eliminar sustancias inhibitoras de PCR mientras se mantiene de forma selectiva la concentración de ADN. La invención usa agentes floculantes en un método por pasos: primero usar acetato de amonio (p.ej., como en el paso 5 en el Ejemplo 1, o paso 3, del Ejemplo 2, a continuación) para eliminar la mayoría de sustancias contaminantes y para mejorar la eficiencia de eliminación del segundo agente floculante, se añade a continuación sulfato de amonio y aluminio o sulfato de amonio y aluminio dodecahidratado (p.ej., como en el
 15 paso 6 en el Ejemplo 1, o el paso 4 en el Ejemplo 2, a continuación). De nuevo, se usa sulfato de amonio y aluminio o equivalente como agente floculante para eliminar sustancias húmicas o fenólicas del suelo y plantas en un proceso para purificar ADN a partir de contaminantes en una muestra, como una muestra biológica o ambiental.

[0045] En un aspecto, el ARN es aislado usando métodos de ejemplo de la invención (véase Ejemplo 4, abajo), y la invención utiliza sulfato de amonio y aluminio en el paso 3 (Solución SR3) como floculante antes de la adición de fenol (que contiene cloroformo e isoamil alcohol [25:24:1]). A continuación, el fenol elimina de forma selectiva las proteínas restantes, pero de manera más importante para el suelo y plantas, elimina la arcilla y fenólicos de la solución. La arcilla no es deseada en los pasos posteriores por dos razones, se asocia de manera selectiva con
 20 ARN y puede llevar a pérdidas de purificación e inhibe (bien por asociación con ARN o interacción con enzimas) el uso en aplicaciones posteriores.

[0046] El uso del agente floculante sulfato de amonio y aluminio elimina la mayoría de sustancias contaminantes antes de la adición de fenol para mejorar la eficiencia de eliminación y selectividad de ese agente; dicho proceso elimina sustancias inhibitoras de RT-PCR usando un floculante en un proceso que mantiene la concentración de
 25 ARN.

[0047] El término "suelo" según su uso aquí hace referencia a muestra ambientales de suelo, sedimento, estiércol, compost y similares, p.ej., mezclas comerciales para sembrar o mejoradores comerciales del suelo. El término incluye también una amplia gama de contenido de nitrógeno y carbono orgánico y diferentes composiciones de arcilla, limo y/o arena. "Suelo" incluye cualquier composición que contiene componentes comúnmente asociados a áreas habitables e inhabitables de la tierra y el espacio, incluyendo por ejemplo
 30 distintas descripciones, p.ej., polvo de interior, polvo de exterior, suciedad, barro, mugre, limo, tierra, compost, vertederos de compostaje a diversas profundidades. Los ejemplos de muestras de suelo incluyen, sin carácter limitativo, vertederos (p.ej., de 0-3 pulgadas (0-7,6 cm) de profundidad o 3-6 pulgadas (7,6-15,2 cm) de profundidad); compost en etapa avanzada; compost de café; sedimento marino; sedimento de lago; sedimento de barro; estiércol animal (p.ej., estiércol de caballo); mantillo, p.ej., suelo de superficie de mantillo, fondo oceánico; laderas, cimas de montañas y puede extenderse desde la superficie hasta cualquier profundidad. La muestra puede recogerse por cualquier medio que use cualquier método improvisado o disponible en el mercado y someterse a ensayo directamente. En un aspecto, al ácido nucleico se extrae usando un kit o método de la invención en el sitio de recogida, o la muestra puede almacenarse antes de aislar un ácido nucleico de la misma.

[0048] Por definición, "ambiental" y "muestra ambiental", incluye cualquier material ambiental, p.ej., material contenido en la tierra y el espacio, incluyendo polvo espacial, ubicaciones en el aire y en el agua e incluirá cualquier organismo, estructura y componente considerado vivo, muerto, latente o inactivo, entero, completo, decadente o no decadente que contenga ácido nucleico. "Ambiental" y "muestra ambiental" incluyen material y organismos que pueden ser aislados del entorno como polvo o material suspendido recogido mediante filtración.

[0049] El término "ácido nucleico" según su uso aquí hace referencia a uno o más ácidos nucleicos de cualquier tipo, incluyendo formas monocatenarias o bicatenarias. Un ácido nucleico puede ser ADN y en un aspecto puede ser ARN. En la práctica de los métodos y composiciones de la invención, el ácido nucleico es detectado y/o aislado a partir de uno o más organismos presentes en una muestra, p.ej., una muestra de suelo, ejemplos de los cuales incluyen, sin carácter limitativo, bacterias, (p.ej., Gram positivas o Gram negativas), levadura, hongos, algas, virus (p.ej., VIH) y nematodos. El ácido nucleico, p.ej., ARN y ADN, detectado o aislado usando un kit o
 50 método de la invención puede ser de cualquier organismo, incluyendo, sin carácter limitativo, virus, bacteriófagos, plásmidos, esporas, levaduras, hongos, algas, nematodos, protozoos, células eucarióticas, células procarióticas y en general, formas unicelulares o pluricelulares. El ADN o ARN detectado o aislado usando un método de la invención no está situado necesariamente en una organela específica entre miembros procarióticos, sino que puede encontrarse en el citoplasma, cloroplastos, mitocondria y núcleos de organismos

eucarióticos y multicelulares. El ARN detectado o aislado usando un método de la invención se encuentra en una variedad de organismos, que incluyen, sin carácter limitativo, virus, células eucarióticas, células procarióticas y, en general, formas unicelulares y pluricelulares. El ARN detectado o aislado usando un método de la invención incluye formas encontradas en una multitud de formas biológicas, que incluyen, sin carácter limitativo, ARN mensajero en traducción de proteínas, ARN ribosomal en traducción de proteínas ribosomales, ARN de transferencia en traducción de proteínas, ARN corto de interferencia y microARN en regulación génica.

[0050] Los ejemplos de bacterias Gram negativas que pueden detectarse y/o cuyo ácido nucleico puede aislarse usando los métodos de la invención incluyen, sin carácter limitativo, bacilos Gram negativos (p.ej., anaerobios como bacteroidaceae (p.ej., *Bacteroides fragilis*), anaerobios facultativos, enterobacteriaceae (p.ej., *Escherichia coli*), vibrionaceae (p.ej., *Vibrio cholerae*), pasteurelas (p.ej., *Haemophilus influenzae*), y aerobios como pseudomonadaceae (p.ej., *Pseudomonas aeruginosa*); cocos Gram negativos (p.ej., aerobios como Neisseriaceae (p.ej., *Neisseria meningitidis*) y parásitos intracelulares obligados Gram negativos (p.ej., Rickettsiae (p.ej., *Rickettsia* spp.). Los ejemplos de familias de bacterias Gram negativas que pueden detectarse y/o cuyo ácido nucleico puede aislarse incluyen, sin carácter limitativo, Acetobacteriaceae, Alcaligenaceae, Bacteroidaceae, Chromatiaceae, Enterobacteriaceae, Legionellaceae, Neisseriaceae, Nitrobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Rickettsiaceae y Spirochaetaceae.

[0051] Los ejemplos de bacterias Gram positivas que pueden detectarse y/o cuyo ácido nucleico puede aislarse usando los métodos de la invención incluyen, sin carácter limitativo, *A. globiformis*, *B. subtilis*, *C. renale*, *M. luteus*, *R. erythropolis*, Ea39, Ben-28 y *S. lividans*. Las bacterias Gram positivas que pueden detectarse y/o cuyo ácido nucleico puede aislarse también se encuentran en grupo que incluyen, por ejemplo, Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia; Peptococcus (p.ej., *P. niger*); Peptostreptococcus (p.ej., *Ps. anaerobius*; algunas especies en las formas de grupo de acumulaciones y agrupaciones; algunas especies en la forma de grupo diplococos (el último de los cuales se distingue por su capacidad de formar butirato); y algunas especies en el grupo son capaces de fermentación, reducción de nitrato, producción de indol, ureasa, coagulasa o catalasa); Ruminococcus; Sarcina; Coprococcus; Arthrobacter (p.ej., *A. globiformis*, *A. citreus* o *A. nicotianae*); Micrococcus (p.ej., *M. luteus* (previamente conocido como *M. lysodeikticus*), *M. lylae*, *M. roseus*, *M. agilis*, *M. kristinae* y *M. halobius*); Bacillus (p.ej., *B. anthracis*, *B. azotoformans*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. israelensis*, *B. larvae*, *B. mycoides*, *B. polymyxa*, *B. pumilis*, *B. stearothormophilus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. validus*, *B. weihenstephanensis* y *B. pseudomycoides*); Sporolactobacillus; Sporocarcina; Filibacter; Caryophanum y Desulfotomaculum. Otras bacterias Gram positivas que pueden detectarse y/o cuyo ácido nucleico puede aislarse recaen en el grupo *Clostridium*, que a menudo incluyen flagelación peritrica, a menudo degradan materiales orgánicos a ácidos, alcoholes, CO₂, H₂ y minerales (ácidos, especialmente ácido butírico, son productos frecuentes de la fermentación clostridial), y en un aspecto forman endosporas esféricas o elipsoidales, que pueden o no inflammar el esporangio. Las especies de *Clostridium* que pueden detectarse y/o cuyo ácido nucleico puede aislarse incluyen especies psicrófilas, mesófilas o termófilas, especies sacarolíticas, especies proteolíticas y/o especies especialistas, y aquellas que son tanto especies sacarolíticas como proteolíticas. Las especies sacarolíticas de *Clostridium* que pueden detectarse y/o cuyo ácido nucleico puede aislarse incluyen, sin carácter limitativo, *Cl. aerotolerans*, *Cl. aurantibutyricum*, *Cl. beijerinckii*, *Cl. botulinum B,E,F**, *Cl. butyricum*, *Cl. chauvoei*, *Cl. difficile*, *Cl. intestinale*, *Cl. novyi A*, *Cl. pateurianum*, *Cl. saccharolyticum*, *Cl. septicum*, *Cl. thermoaceticum*, y *Cl. thermosaccharolyticum*.

[0052] Las especies proteolíticas de *Clostridium* que pueden detectarse y/o cuyo ácido nucleico puede aislarse incluyen, sin carácter limitativo, *Cl. argentinense*, *Cl. ghoni*, *Cl. limosum*, *Cl. putrefaciens*, *Cl. subterminale* y *Cl. tetani*. Las especies que son proteolíticas y sacarolíticas que pueden detectarse y/o cuyo ácido nucleico puede aislarse incluyen, sin carácter limitativo, *Cl. acetobutylicum*, *Cl. bifermenans*, *Cl. botulinum A, B, F (prot.) **, *Cl. botulinum C,D **, *Cl. cadaveris*, *Cl. haemolyticum*, *Cl. novyi B,C*, * *Cl. perfringens*, *Cl. putrefaciens*, *Cl. sordelli* y *Cl. sporogenes*. Como se indica mediante un asterisco, *Cl. botulinum* se subdivide en una variedad de tipo según las especificidades serológicas de las toxinas producidas. Las especies *Clostridium* especialistas que pueden detectarse y/o cuyo ácido nucleico puede aislarse incluyen, sin carácter limitativo, *Cl. acidiurici*, *Cl. irregularis*, *Cl. kluyveri*, *Cl. oxalicum*, *Cl. propionicum*, *Cl. sticklandii* y *Cl. villosum*. Estas especificidades se basan en estudios de neutralización. Otras especies *Clostridium* que pueden detectarse y/o cuyo ácido nucleico puede aislarse incluyen aquellas que producen toxinas botulínicas.

[0053] Los ejemplos de hongos que pueden detectarse y/o cuyo ácido nucleico puede aislarse usando los métodos de la invención incluyen, sin carácter limitativo, *Halocyphina villosa*, *Hypoxylon oceanicum*, *Verruculina enalia*, *Nia vibrissa*, *Antennospora quadricornuta*, *Lulworthia* spp. y *Aigialus parvus*. Los ejemplos de algas que pueden detectarse y/o cuyo ácido nucleico puede aislarse incluyen, sin carácter limitativo, algas pardas (p.ej., Phylum Phaeophycota *Dictyota* sp. (Clase Phaeophyceae, Familia Dictyotaceae); algas verdes (p.ej., Phylum Chlorophycota *Chaetomorpha gracilis* (Clase Chlorophyceae, Familia Cladophoraceae); y algas rojas (p.ej., Phylum Rhodophycota, *Catenella* sp. (Clase Rhodophyceae, Familia Rhabdoniaceae).

[0054] Los organismos que pueden detectarse por los métodos de la invención en una muestra, p.ej., un suelo agrícola, incluyen, sin carácter limitativo, *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Bacillus* spp., *Flavobacterium* spp.,

actinomicetos y hongos; en suelos contaminados incluyen, sin carácter limitativo, *Pseudomonas* spp. y *Xanthomonas* spp.; en pantanos/sedimentos incluyen, sin carácter limitativo, *Escherichia* spp., *Proteus* spp., metanógenos y actinomicetos; y en suelos forestales incluyen, sin carácter limitativo, micorrizas, hongos y actinomicetos. Un ejemplo de una bacteria detectada en muestras de suelo para su uso en el combate del bioterrorismo usando método de la invención es *Bacillus anthracis*.

[0055] De este modo, los métodos de la invención tienen numerosas aplicaciones médicas y veterinarias, p.ej., para el diagnóstico, pronóstico, epidemiología, inspección de contaminación de materiales (p.ej., fármacos, vendajes, instrumentos, implantes), alimentos (p.ej., inspecciones de carne, verdura, mariscos, etc.), incluyendo el análisis médico y veterinario de heces (que incluyen análisis de estiércol para animales). Las aplicaciones veterinarias y médicas incluyen la detección de suelos, p.ej., para fines de bioterrorismo, p.ej., ántrax, virus, nematodos y similares. La detección de virus que usa los métodos de la invención puede analizar también estiércol y suelo, agua, aire y similares. Los virus que pueden detectarse por métodos de la invención incluyen variola, varicela, reovirus, retrovirus (p.ej., VIH), fiebres hemorrágicas virales (p.ej., Ebola, Marburg, Machupo, Lassa), *Variola major*, encefalitis viral y similares, según se enumeran en la Tabla 1, a continuación. Los métodos de la invención también pueden usarse para detectar esporas, toxinas y venenos producidos biológicamente, por ejemplo, mediante la detección de *Bacillus anthracis*, también se detectan esporas de ántrax (aunque de manera indirecta), la detección de *Clostridium perferinges* implica la presencia de toxina, etc. Así, los patógenos y toxinas que pueden detectarse mediante métodos de la invención incluyen aquellos enumerados en la Tabla 1, a continuación:

20

25

30

35

40

Tabla 1

| | Enfermedad / Tipo | Organismo / agente | Grupo | | Clase General | Tipo Detección | 1ª Diana |
|----|------------------------------|-----------------------------------|-------|-----------------|---------------|----------------|------------|
| | | | CDC | Tipo específico | | | |
| 5 | Ántrax | Bacillus anthracis | A | Espora G+ | Bacteria | ADN | Ser humano |
| | Plaga | Yersinia pestis | A | Veg G- | Bacteria | ADN | Ser humano |
| | Tularemia | Francisella tularensis | A | Veg G- | Bacteria | ADN | Ser humano |
| | Brucelosis | Brucella spp. | B | Veg G- | Bacteria | ADN | Ser humano |
| | Muermo | Burkholderia mallei | B | Veg G- | Bacteria | ADN | Ser humano |
| 10 | | Burkholderia pseudomallei | B | Veg G- | Bacteria | ADN | Ser humano |
| | Melioidosis | pseudomallei | B | Veg G- | Bacteria | ADN | Ser humano |
| | Psitacosis | Chlamydia psittaci | B | Veg G- | Bacteria | ADN | Ser humano |
| | Fiebre Q | Coxiella burnetii | B | Veg Gv | Bacteria | ADN | Ser humano |
| | Fiebre del tifus | Rickettsia prowazekii | B | Veg Gv | Bacteria | ADN | Ser humano |
| | Viruela | Variola major | A | Virus | Virus | ADN | Ser humano |
| | Fiebres hemorrágicas virales | Ebola | A | Filovirus | Virus | ARN | Ser humano |
| | Fiebres hemorrágicas virales | Marburg | A | Filovirus | Virus | ARN | Ser humano |
| | Fiebres hemorrágicas virales | Machupo | A | Arenavirus | Virus | ARN | Ser humano |
| | Fiebres hemorrágicas virales | Lassa | A | Arenavirus | Virus | ARN | Ser humano |
| 20 | Encefalitis viral | Encefalitis equina venezolana | B | Alfavirus | Virus | ARN | Ser humano |
| | Encefalitis viral | Encefalitis equina del Este | B | Alfavirus | Virus | ARN | Ser humano |
| | Encefalitis viral | Encefalitis equina del Oeste | B | Alfavirus | Virus | ARN | Ser humano |
| | Botulismo | Toxina de Clostridium botulinum | A | Toxina | Toxina | Proteína | Ser humano |
| | Toxinas | Ricinus communis | B | Toxina | Toxina | Proteína | Ser humano |
| 25 | Toxinas | Staph. aureus | B | Enterotoxina B | Toxina | Proteína | Ser humano |
| | Toxinas | Toxina de Clostridium perferinges | B | Toxina épsilon | Toxina | Proteína | Ser humano |

[0056] Como se observa arriba, en la práctica de esta invención, la extracción de ácido nucleico desde una muestra comprenderá como se ha apuntado arriba poner en contacto la muestra con una solución que comprende un agente caotrópico, un detergente y un amortiguador. En un aspecto, puede utilizarse un proceso agitador de perlas en el que la muestra de suelo se pone en contacto con perlas y vibración. Puede introducirse vibración por cualquier medio conveniente, como mediante sonicación o un aparato de vortex usando un adaptador de vortex (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA), por ejemplo. Sin embargo, como se ha mencionado arriba, la extracción incluirá poner en contacto la muestra de suelo y/o ácido nucleico con un detergente, ejemplos de los cuales incluyen, sin carácter limitativo, dodecil-sulfato sódico, sarkosyl, lauril sarcosinato de sodio, bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB, también conocido como hexadeciltrimetil-amonio-bromuro), ácido cólico, ácido desoxicólico y ácido 4-amino-7-benzamidotaurocólico (BATC, también conocido como 2-[ácido 3a,12a-dihidroxi-7-(4-aminobenzamido)-5b-(colanoil-24-amino)-etanosulfónico]) polietilenglicol terc-octilfenil eter (Triton® X-100), (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol (Triton® X-114).

[0057] Existen numerosos métodos en la técnica para exponer un ácido nucleico a aislamiento, incluyendo abrir el organismo u organela que contiene el ácido nucleico en muestras ambientales y biológicas y puede emplearse en la puesta en práctica de la invención. Se introduce un proceso de desintegración para disociar la muestra ambiental o biológica y alterar los organismos y componentes para facilitar la liberación de ácido nucleico, aumentando así el ácido nucleico obtenido. Este proceso no elimina el ácido nucleico que contamina el material, sino que en su lugar aumenta la concentración del material inhibidor en el medio. El proceso de alteración aumenta la liberación de sustancias húmicas en el caso de muestras ambientales como suelos, mientras que en plantas, este método aumenta la cantidad de restos celulares junto con la liberación de ácido nucleico. Los procesos de alteración usados en los métodos de la invención incluyen sonicación, extrusión a través de una abertura de tamaño limitado y homogeneización usando agitado mecánico, a menudo con medio de molienda añadido para mejorar la homogeneización de la muestra y alteración del organismo. La extracción de ácido nucleico es mejorada mediante la puesta en contacto de la muestra de suelo y/o ácido nucleico con un detergente, ejemplos adecuados del cual se han aportado previamente arriba. Este proceso también fomenta la solubilidad de sustancias húmicas en suelos y aumenta así la cantidad de sustancias húmicas que se coextraen junto con los ácidos nucleicos.

[0058] En algunos modos de realización, puede utilizarse un detergente caliente y un procedimiento de lisis en vortex.

[0059] El término "floculante" según su uso aquí hace referencia a una sustancia que precipita uno o más componentes de la solución. En un aspecto, los términos "floculante" y "reactivo precipitante" hacen referencia a un material que se combinará con un material suspendido y/o disuelto de manera pasiva o reactiva de forma que la masa combinada de los dos en una solución alcanzará un punto crítico por el cual el material combinado "precipitará", es decir, será incapaz de permanecer suspendido y "caerá" de la solución. El floculante se selecciona de manera que no precipite una cantidad sustancial de un ácido nucleico de la solución, sino que precipite una cantidad sustancial de una o más sustancias que inhiban la PCR o hibridación de un oligonucleótido al ácido nucleico, p.ej., una sustancia húmica como ácido húmico (la fracción de sustancias húmicas que no es soluble en agua en condiciones ácidas (pH < 2) pero que es soluble a valores de pH superiores). Las sustancias húmicas dominan los ambientes naturales como polímeros con una amplia distribución de peso molecular y alta heterogeneidad química. La disociación de grupos funcionales de ácido húmico (HA) resulta en una carga neta negativa de macromoléculas en un amplio intervalo de pH, y determina la alta afinidad de sustancias húmicas hacia la formación de complejos, así como la alta estabilidad de coloides húmicos en ecosistemas naturales.

[0060] Esta invención incorpora la comprensión de que la etapa en la que se añade un floculante puede ser crítica. Las sustancias húmicas que son omnipresentes en entornos acuáticos y terrestres desempeñan un papel importante en la reducción del metal actuando como lanzaderas de electrones. Se cree que las fracciones de quinina en sustancias húmicas actúan como aceptadores de electrones. Es a través de estos mecanismos como el ácido húmico reacciona con grupos seleccionados de sales inorgánicas de hierro y aluminio y provoca el proceso de floculación o complejo metal-húmico. De este modo, en un aspecto, los métodos de la invención cronometran la introducción del agente floculante en una etapa en el protocolo donde la mayoría de los detergentes, proteínas y sólidos suspendidos, que son en su mayoría iónicos en la naturaleza se eliminan completamente o se reducen a un porcentaje insignificante. Esto crea la etapa para la eliminación de sustancias húmicas a través de floculación, que se encuentran de manera predominante en estado disuelto y se cree que son un componente esencial en el medio de la muestra aparte del ácido nucleico. Las sustancias húmicas están disponibles para floculación selectiva para dejar el ácido nucleico en solución.

[0061] En un método de la invención, se separa un detergente del ácido nucleico poniendo en contacto el ácido nucleico y detergente con un precipitante específico del detergente (el acetato de amonio precipita el detergente dodecil-sulfato sódico) y separando el detergente precipitado por centrifugación.

[0062] En un aspecto, una cantidad sustancial del floculante se separa del ácido nucleico; esto puede hacerse por cualquier procedimiento conveniente. Por ejemplo, la separación puede llevarse a cabo poniendo en contacto el floculante y ácido nucleico con un soporte sólido en condiciones en las que el ácido nucleico se une de manera selectiva al soporte sólido. En un aspecto, el soporte sólido comprende o consta de sílice, y el ácido nucleico se adhiere al sílice en presencia de una sustancia caotrópica (p.ej., cloruro de guanidinio) y se eluye a partir del sílice mediante la eliminación del caotropo y la adición de agua. El término "cantidad sustancial" según su uso aquí (p.ej., con respecto a la separación de un detergente, un floculante y/o una sustancia inhibidora de la PCR de un ácido nucleico), en modos de realización alternativos, hace referencia a la sustancia separada que está presente en una solución que contiene el ácido nucleico tras la separación en una cantidad no detectable, o en una cantidad inferior a aproximadamente 60%, inferior a aproximadamente 50%, inferior a aproximadamente 40%, inferior a aproximadamente 30%, inferior a aproximadamente 20%, inferior a aproximadamente 10%, inferior a aproximadamente 5%, inferior a aproximadamente 1%, inferior a aproximadamente 0,1%, inferior a aproximadamente 0,01%, inferior a aproximadamente 0,001%, inferior a aproximadamente 0,0001%, inferior a aproximadamente 0,00001% en peso de la sustancia separada con

respecto al peso del ácido nucleico.

[0063] El ácido nucleico aislado por un método de la invención puede utilizarse en un procedimiento posterior, que puede llevarse a cabo después de haber aislado el ácido nucleico (p.ej., una vez que el ácido nucleico se ha separado del floculante) y en un aspecto puede llevarse a cabo durante el procedimiento de aislamiento del ácido nucleico. Por ejemplo, tras el aislamiento de un ácido nucleico de uno o más organismos en la muestra de suelo, puede ponerse en contacto un oligonucleótido con el ácido nucleico. El oligonucleótido puede diseñarse para hibridar con una secuencia concreta de nucleótido potencialmente presente en el ácido nucleico. Las secuencias de nucleótidos para numerosos organismos en muestras de suelo están disponibles públicamente, p.ej., NIH GenBank, y se utilizan métodos estándares para designar y generar oligonucleótidos para generar oligonucleótidos que hibriden específicamente con un ácido nucleico de un organismo concreto, p.ej., como se describe en Current Protocols In Molecular Biology (Ausubel, F.M., et al., eds. 2000) y Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2ª ed. (1989). Los oligonucleótidos pueden utilizarse en diferentes tipos de procedimientos y análisis, incluyendo un procedimiento de amplificación (descrito en adelante). En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento en el que se unen múltiples oligonucleótidos a una etiqueta detectable y se ponen en contacto con el ácido nucleico; la combinación de oligonucleótidos que hibrida con el ácido nucleico es una marca para el tipo o tipos de organismos presentes en la muestra.

[0064] En un aspecto, el ácido nucleico aislado o una parte del mismo es amplificado, cuando puede llevarse a cabo amplificación usando un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transcripción inversa, replicación por círculo rodante y reacción en cadena de la ligasa. Mediante el uso de los kits y procedimientos aquí descritos, el ácido nucleico aislado puede encontrarse sustancialmente libre de un sustancia que inhiba un procedimiento de PCR (p.ej., el ácido nucleico aislado puede encontrarse sustancialmente libre de un sustancia húmica). Se conocen los procedimientos de PCR (p.ej., véase las patentes estadounidenses nº 4.683.202; 4.683.195; 4.965.188; y 5.656.493) y generalmente, los procesos de PCR se llevan a cabo en ciclos, donde cada ciclo incluye desnaturalización térmica, en la que se disocian los ácidos nucleicos híbridos; enfriamiento, en el que los oligonucleótidos cebadores hibridan; y extensión de los oligonucleótidos mediante una polimerasa (a saber, polimerasa Taq). Un ejemplo de un proceso cíclico de PCR que puede usarse en la práctica de la invención comprende tratar la muestra a 95°C durante 5 minutos; repetir cuarenta y cinco ciclos de 95°C durante 1 minuto, 59°C durante 1 minuto, 10 segundos y 72°C durante 1 minuto 30 segundos; y después tratar la muestra a 72°C durante 5 minutos. Múltiples ciclos se llevan a cabo frecuentemente usando un termociclador disponible en el mercado. Los productos de amplificación de PCR puede almacenarse durante un tiempo a una temperatura más baja (p.ej., a 4°C) y pueden congelarse (p.ej., a -20°C) antes del análisis.

[0065] Los productos de amplificación y ADN aislado de muestras ambientales y biológicas por los métodos de la invención pueden detectarse de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, los productos de amplificación por PCR en una muestra pueden resolverse y detectarse mediante electroforesis en gel (p.ej., geles capilares o placa compuestos de poliacilamida o aragorosa), donde las bandas correspondientes a los productos de amplificación pueden resolverse por tamaño y visualizarse mediante tinción de emisión de luz que se intercala con productos de ácido nucleico en el gel (p.ej., bromuro de etidio). En un modo de realización, los productos de amplificación de PCR pueden cuantificarse determinando las intensidades de señal de las bandas en un gel (p.ej., escaneando el gel con un densitómetro disponible en el mercado). En otro modo de realización, los productos de amplificación pueden cuantificarse mediante técnicas de hibridación (p.ej., llevando a cabo (RT)-PCR en tiempo real usando productos TAQMAN® y LUX® disponibles en el mercado). En el último modo de realización, puede utilizarse un oligonucleótido con doble etiqueta complementario a un producto de PCR en el procedimiento de cuantificación, donde una o ambas etiquetas pueden ser una molécula fluorescente (p.ej., un tinte de carboxifluoresceína (FAM™ o FAM-X™) en el extremo 5' del oligonucleótido y un tinte carboxitetrametilrodamina (TAMRA™) en el extremo 3' del oligonucleótido (p.ej., estos y otros tintes fluorescentes se encuentran disponibles en el mercado, p.ej., SYNTHAGEN, LLC, Houston, Texas). Los límites inferiores del proceso de detección de PCR pueden determinarse mediante dilución en serie de una muestra y determinando la menor cantidad detectable de ácido nucleico del organismo en la muestra de suelo.

[0066] En algunos modos de realización, un ácido nucleico aislado es ARN, y en un aspecto, el ARN es transcrito de manera inversa, de manera que se genera ADN complementario (ADNc). Los métodos y productos para la transcripción inversa de ARN son conocidos (p.ej., SUPERSRIPT™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen, San Diego, CA). El ADNc en un aspecto puede cuantificarse, como usando un método descrito arriba, y en un aspecto el ADNc se cuantifica después de que el ADNc producido por el procedimiento de transcripción inversa haya sido amplificado.

[0067] En un aspecto, el ácido nucleico aislado es puesto en contacto con una enzima de restricción. En tales modos de realización, las digestiones de restricción comparativas pueden evaluarse para determinar si una marca de patrón de digestión de restricción para un organismo u organismos concretos está presente en la muestra de suelo. En otros modos de realización, el ácido nucleico aislado es analizado mediante espectrometría de masas. Los procedimientos de espectrometría de masas son conocidos (p.ej., patentes

estadounidenses n° 5.547.835, 5.605.798, 5.691.141, 5.849.542, 5.869.242, 5.928.906, 6.043.031 y 6.194.144) y pueden llevarse a cabo tras la amplificación de una región del ácido nucleico aislado, y pueden utilizarse para detectar variantes polimórficas en el ácido nucleico aislado. En algunos modos de realización, el ácido nucleico aislado es inmovilizado a una superficie sólida. Los ejemplos de superficies sólidas incluyen, sin carácter limitativo, una placa o portaobjetos de vidrio, una oblea o chip de silicio, un pocillo de una placa de microtitulación (p.ej., placa de 96 pocillos o 384 pocillos) y una superficie de plástico de un recipiente adecuado para cultivar células.

[0068] La invención puede utilizar kits como se ha observado arriba para aislar un ácido nucleico a partir de una muestra, p.ej., una muestra ambiental o biológica, que comprende un floculante e instrucciones que describen un método para su uso según cualquiera de los métodos de la invención para aislar el ácido nucleico de la muestra de suelo. Dicho kit comprende un detergente, que se utiliza en un proceso para extraer ácidos nucleicos del suelo. En algunos modos de realización, dicho kit comprende métodos y composiciones homogeneizantes, que incluyen perlas (p.ej., perlas de vidrio o perlas de granate), y en un aspecto incluye un adaptador para conectar tubos que contienen la muestra a un aparato de vortex (p.ej., Vortex Adapter, Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA). Dicho kit puede incluir en un aspecto un soporte sólido útil para separar un floculante de un ácido nucleico, como un medio de sílice, donde el soporte sólido en un aspecto puede estar en un aparato adaptado para encajar en un tubo para su uso en la centrifugación. Dicho kit comprenderá una sustancia caotrópica (p.ej., cloruro de guanidinio), a menudo usado en un proceso para separar un floculante de un ácido nucleico. En un aspecto dicho kit comprende una solución útil para precipitar un detergente. En un aspecto, dicho kit comprende una o más soluciones útiles para llevar a cabo el método de uso incluido en las instrucciones. En un aspecto, dicho kit puede comprender uno o más recipientes de tubo útiles para llevar a cabo el método de uso. Cuando se incluyen recipientes de tubo en el kit, los recipientes pueden ser estériles. En algunos modos de realización, dicho kit incluye componentes útiles para el mayor procesamiento del ácido nucleico aislado. Por ejemplo, en un aspecto, dicho kit incluye uno o más componentes seleccionados del grupo compuesto por uno o más oligonucleótidos, nucleótidos libres y una polimerasa capaz de amplificar todo o parte de un ácido nucleico aislado. En un aspecto, el kit incluye uno o más oligonucleótidos que hibridan con un ácido nucleico bacteriano, p.ej., un *Bacillus anthracis*, u otro agente asociado con bioterrorismo que contiene ADN o ARN.

[0069] Como se ha indicado arriba, los métodos de la invención son aplicables a ácido nucleico extraído de muestras biológicas o ambientales usando un procedimiento diferente del de esta invención. De este modo, los métodos de la invención son útiles para purificar preparaciones de ácido nucleico contaminadas aisladas a partir de una muestra, p.ej., muestras ambientales o biológicas, como muestras de suelo (p.ej., separar sustancias del ácido nucleico que inhibe procedimientos posteriores). Dicho procedimiento de purificación de la invención puede ser útil para separar contaminantes de los ácidos nucleicos extraídos, como sustancias contaminantes que inhiben la PCR y/o hibridación de un oligonucleótido al ácido nucleico (p.ej., una sustancia húmica). Los procedimientos de purificación son aplicables a una variedad de preparaciones de ácido nucleico, incluyendo aquellos que no arrojan productos de amplificación detectables tras realizar la PCR, y aquellos que pueden colorearse (p.ej., preparaciones de ácido nucleico que son de amarillas a marrones en color). De este modo, en otras palabras, se proporciona aquí un método para purificar un ácido nucleico contaminado extraído de una muestra, p.ej., muestras ambientales o biológicas, como muestras de suelo que comprende llevar a cabo los pasos del (a) al (e) como se ha analizado arriba.

[0070] En dicho método, el ácido nucleico es puesto en contacto con un detergente. Una cantidad sustancial del detergente se separa del ácido nucleico mediante la puesta en contacto del detergente con una sustancia (acetato de amonio) que precipita selectivamente el detergente. El someter la mezcla a centrifugado sedimenta el detergente precipitado y deja el ácido nucleico en la fracción sobrenadante.

[0071] La invención proporciona técnicas dirigidas de ADN o ARN que permiten el análisis *in situ* de comunidades microbianas en suelos. Aunque los estudios basados en ADN proporcionan información de la estructura de la comunidad y relaciones filogenéticas entre los diversos grupos, el aislamiento de ARN total usando los métodos de la invención puede hacer posible el estudio de niveles de expresión de ARNm que proporcionan información valiosa sobre las actividades funcionales de genes microbianos específicos en las poblaciones microbianas en el suelo. Puesto que los métodos de la invención pueden hacer posible la identificación, aislamiento y/o amplificación de ácido nucleico celular total, el ácido nucleico mitocondrial, nuclear, del cloroplasto u otras organelas, incluyendo ADN y ARN, también pueden identificarse, aislarse y/o amplificarse usando los métodos de la invención. Para el estudio de la expresión de genes en el suelo, la invención proporciona un protocolo robusto para la extracción de ARN no degradado total. La invención proporciona un proceso de recuperación fiable para ARN mensajero (ARNm) de diferentes entornos naturales con heterogeneidad microbiana, variaciones en las condiciones experimentales, diferencias en las interacciones de moléculas de ADN y ARN con matrices de muestras ambientales, características de adsorción de fracciones de arcilla para ácidos nucleicos y la naturaleza lábil del ARN para nucleasas y procesos de oxidación-reducción que ocurren de manera natural en suelos y otros entornos naturales.

[0072] La invención proporciona una desviación distinta del método tradicional de adición del reactivo de

floculación y detergente antes de la lisis de la muestra para proporcionar un método por el cual las muestras de alto contenido orgánico producen ácido nucleico a partir de sustancias contaminantes.

5 **[0073]** El proceso descrito aquí no depende de, pero puede incluir, el uso de un componente para facilitar la alteración de las muestras y liberación de ácido nucleico antes de o al mismo tiempo que la adición de floculante a la muestra (p.ej., perlas homogeneizantes). Debe observarse que el uso de un agente de floculación con una muestra que no contiene sustancias contaminantes no afectará a la pureza del ácido nucleico o su uso en aplicaciones posteriores.

10 **[0074]** Un método de la invención puede emplear un kit para separar ácidos nucleicos bien extraídos directamente desde una muestra ambiental o biológica, o para ADN previamente purificado mediante métodos no floculantes de muestras que contienen sustancias contaminantes que inhiben la aplicación de ácido nucleico posterior. Los procedimientos de purificación de la invención son aplicables a una variedad de preparaciones de ácido nucleico, incluyendo aquellas que no arrojan productos de amplificación detectables tras llevar a cabo la PCR y aquellas cuyos índices de refracción indican composiciones desde claras a coloreadas (p.ej., preparaciones de ácido nucleico que son de amarillas a marrones de color). Los métodos de la invención son
15 adaptables a una amplia variedad de volumen de muestra, masa y tipo y obtención de ácido nucleico.

[0075] La invención se describirá en mayor medida en relación con los siguientes ejemplos; sin embargo, debe entenderse que la invención no se limita a tales ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Aislamiento de ADN de hasta 250 miligramos de muestra ambiental

20 **[0076]** El siguiente ejemplo describe un proceso de purificación de ejemplo de la invención. Se aisló ácido nucleico de diferentes tipos de suelo y se examinó usando el método aquí descrito. El kit y método se sometieron a ensayo en suelos, sedimentos, compost y estiércol representando una amplia gama de contenido de nitrógeno y carbono orgánico y distintas composiciones de arena/limo/arcilla. El mismo kit también se sometió
25 a ensayo y se descubrió que era eficaz en el aislamiento de ADN libre de contaminantes a partir de tejidos vegetales como hojas, raíces, tallos y materiales de siembra. Específicamente, para suelos, había nueve muestras que incluían vertedero de 0-3 pulgadas (0-7,6 cm) de profundidad; vertedero de 3-6 pulgadas (7,6-15,2 cm) de profundidad, compost en etapa avanzada, compost de café; sedimento marino; sedimento de lago; sedimento de barro, estiércol de caballo y suelo de superficie de mantillo. Se extrajo ADN de estas muestras usando el método aquí descrito y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa para determinar la
30 calidad de ADN identificando visualmente una banda de ADN discreta mayor de 23.000 peso molecular (23 kpb). La presencia de fragmentos de ADN más cortos es una indicación de rotura de ADN, o corte, durante el proceso. La utilidad del ADN purificado para aplicaciones posteriores, en parte determinada por si la muestra está sustancialmente libre de sustancias inhibitorias de PCR, se evaluó mediante amplificación por PCR usando cebadores de consenso específicos para una región de 520 pares de bases (pb) de ADN ribosomal 16S
35 eubacteriano.

[0077] El ejemplo mostrado abajo utiliza un procedimiento de homogeneización/extracción de proceso de lisis mecánica en vortex (Vortex Adapter, Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA) y es incorporado para ilustrar su uso. El procedimiento ha demostrado funcionar sin lisis mecánica con reducida obtención de ácido nucleico. El resultado es que el procedimiento descrito produce ADN de calidad de la PCR con mínima fragmentación en
40 aproximadamente 45 minutos. El ADN purificado se amplificó directamente por PCR en todas las muestras sometidas a ensayo. No fueron necesarias etapas de dilución, optimización por PCR u otra purificación de ADN para llevar a cabo PCR usando el ADN aislado del suelo.

Procedimiento para aislar ADN a partir de 0,25 gramos de muestra ambiental

[0078]

- 45
1. Añadir 0,25 gramos de muestra a un tubo de perlas de suelo que contiene 750 microlitros (µl) de solución de perlas.
 2. Agitar en vortex las muestras y añadir 60 µl de Cl.
 3. Colocar los tubos en un adaptador de vortex (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, California) y agitar en vortex los tubos al nivel más alto durante 10 minutos.
 - 50 4. Centrifugar el tubo a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
 5. Añadir 250 µl de C2 y agitar en vortex para mezclar. Incubar la muestra a 4°C durante 10 minutos y después centrifugar el tubo a 10.000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
 - 55 6. Añadir 200 µl de C3 e incubar la muestra a 4°C durante 10 minutos.

7. Centrifugar el tubo a 10.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
8. Añadir 1200 µl de C4 y mezclar por inversión.
- 5 9. Cargar las muestras en la columna de centrifugación. Centrifugar la columna a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente.
- 10 10. Añadir 500 µl de solución C5 a la columna de centrifugación y centrifugar a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente.
11. Decantar el flujo y recentrifugar el filtro a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente.
12. Transferir la cesta de centrifugado a un nuevo tubo y eluir ADN con 100 µl de solución C6 mediante centrifugación a 10.000 x g a temperatura ambiente.

Resultados

[0079] Véase Figura 1: El ADN purificado por el método descrito aquí fue caracterizado mediante electroforesis en gel de agarosa. Figura 1: ADN genómico total aislado a partir de 0,25 gramos de tipos de suelo representativos. Se analizó el ADN mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% en TAE, fue teñido con etidio y fotografiado. Se obtuvieron muestras de vertederos (p.ej., de 0-3 pulgadas (0-7,6 cm) de profundidad, vía 1), vertedero (3-6 pulgadas (7,6-15,2 cm) de profundidad, vía 2); compost en etapa avanzada (vía 3); compost de café (vía 4); sedimento marino (vía 5), sedimento de lago (vía 6), sedimento de barro (vía 7), estiércol de caballo (vía 8), suelo de superficie de mantillo (vía 9). M= marcador de tamaño molecular de ADN.

[0080] Mediante el uso del procedimiento descrito arriba, se aisló ADN genómico de todas las muestras de suelo sometidas a ensayo. La amplificación por PCR del ADN genómico aislado de la Figura 2 usando cebadores para el ADN eubacteriano indicó que se produjeron productos de PCR a partir de cada muestra de suelo, indicando que el procedimiento de aislamiento nucleico descrito aquí había purificado con éxito el ADN genómico eubacteriano. La Figura 2 ilustra una electroforesis en gel de agarosa que muestra el ADN genómico total amplificado por PCR aislado en la Figura 1, donde el ADN genómico eubacteriano purificado se amplificó por PCR usando cebadores para ADN eubacteriano. M= marcador de tamaño molecular de ADN.

[0081] Se aisló ADN de los tipos de suelo usados en la Figura 1, usando el kit ULTRACLEAN™ Soil DNA Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA) La Figura 3 muestra amplificación por PCR del ADN genómico utilizando cebadores para ADN eubacteriano. M= marcador de tamaño molecular de ADN. Obsérvese que el ADN aislado con el ULTRACELAN™ Soil DNA Kit contenía contaminantes eliminados usando la invención que evitaban la amplificación por PCR en 4 de cada 9 muestras sometidas a ensayo.

Reactivos

[0082]

| | | |
|----|----------------|---|
| 35 | Tubo de perlas | Tubo de perlas con perlas de granate y 750 µl de NaPO ₄ 181 mM, isotiocianato de guanidinio 121 mM |
| | C1 | NaCl 150 mM, SDS 4%, Tris 0,5M |
| | C2 | Acetato de amonio 133 mM |
| | C3 | Sulfato de amonio y aluminio dodecahidratado 120 mM |
| 40 | C4 | GuHCL 5M, Tris 30 mM, isopropanol 9% |
| | C5 | Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EtOH 50% |
| | C6 | Tris 10 mM |

[0083] Los reactivos y método para purificar ácido nucleico de muestras biológicas y ambientales tendrá aplicaciones más amplias si el proceso es escalable en la cantidad de muestra procesada y la capacidad de usarlo con éxito en aplicaciones posteriores. El Ejemplo 2 aporta pruebas de la escalabilidad de la invención.

Ejemplo 2: Purificación de ADN extraído de hasta 10 gramos de suelo

[0084] El siguiente ejemplo describe un proceso de purificación de ejemplo de la invención.

- 50 1. Añadir hasta 10 gramos de muestra a un tubo de perlas de suelo que contiene 15 ml de solución de perlas.
2. Agitar en vortex las muestras brevemente y añadir 1,2 ml de C1.
3. Colocar los tubos en un adaptador de vortex (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, California) y agitar en vortex los tubos al nivel más alto durante 10 minutos.
- 55 4. Centrifugar el tubo a 2.500 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
5. Añadir 5 ml de C2 y agitar en vortex para mezclar. Incubar la muestra a 4°C durante 10 minutos y

después centrifugar el tubo a 2.500 x g durante 4 minutos a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

6. Añadir 4 ml de C3, invertir para mezclar e incubar a 4°C durante 10 minutos.

7. Centrifugar el tubo a 2.500 x g durante 4 minutos a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

8. Añadir 30 ml de C4 a cada tubo y mezclar mediante inversión.

9. Cargar las muestras en la columna de centrifugación. Centrifugar a 2.500 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. Repetir los pasos 8 y 9 dos veces.

10. Añadir 10 ml de solución C5 a la columna y centrifugar a 2.500 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

11. Transferir la cesta de centrifugado a un nuevo tubo y eluir el ácido nucleico con 5 ml de solución C6 mediante centrifugación a 2.500 x g a temperatura ambiente.

[0085] Véanse las Figuras 4, 5 y 6, que indican que el proceso descrito aquí es capaz de aislar ADN de diferentes tipos de muestras ambientales (Figura 4) y es capaz de purificar ADN de organismos del suelo endógenos en un proceso escalable. Es importante que el Ejemplo proporciona pruebas de que el proceso aísla ADN libre de sustancias inhibitoras de PCR (Figuras 5 y 6).

[0086] Figura 4: Se aisló el ADN genómico total a partir de hasta 10 gramos de 8 muestras diferentes de suelo usando los métodos descritos aquí. El ADN se analizó en gel de agarosa 1% en TAE y se tiñó con etidio. M = ADN marcador. Se identifican a continuación los tipos de suelo.

[0087] Figura 5: El ADN genómico total aislado en la Figura 3 usando los métodos descritos aquí se amplificó por PCR usando cebadores para *Bacillus* spp. Se analizó el ADN amplificado en agarosa 0,8% en TAE y se tiñó con etidio. N= control negativo sin patrón. P= patrón de control positivo. Se identifican a continuación los tipos de suelo y cantidad.

[0088] Figura 6: El ADN genómico total aislado de las muestras de suelo identificado en la Figura 3 usando los métodos descritos aquí se amplificó por PCR usando cebadores para *Streptomyces* spp. Se analizó el ADN en agarosa 1% en TAE y se tiñó con etidio. N= control negativo sin patrón. P= patrón de control positivo. Se identifican a continuación los tipos de suelo y cantidad.

| Vía de la muestra | Tipo | Cantidad procesada (gramos) |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| 1 | Campo de maíz de Iowa | 10 |
| 2 | Campo de fresas de California | 10 |
| 3 | Sedimento de laguna de Cardiff | 10 |
| 4 | Sedimento de laguna de Carlsbad | 10 |
| 5 | Compost casero | 5 |
| 6 | Compost de la ciudad de San Diego | 5 |
| 7 | Mezcla comercial para sembrar | 2,5 |
| 8 | Turba comercial | 2,5 |

Ejemplo 3: Procedimiento para eliminar contaminantes de ácido nucleico

[0089] El siguiente proceso de purificación de ejemplo de la invención produce ácido nucleico que puede usarse en procesos posteriores de ácido nucleico previamente purificado que tiene sustancias contaminantes que han evitado el uso del ácido nucleico en una aplicación posterior (p.ej., PCR). Se aisló el ácido nucleico usando el ULTRACLEAN MEGASOIL DNA ISOLATION KIT y se procesó usando el procedimiento y reactivos indicados a continuación y se analizó (Figura 7). Se sometió a ensayo el ácido nucleico en PCR (Figura 8).

[0090] Se purificó ácido nucleico de 3 muestras ambientales diferentes (identificado mediante 8 ml). Se analizó el ácido nucleico mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% en TAE, y fue teñido con etidio para la detección. Se identifican a continuación los tipos de suelo. Se concentró el ADN a un volumen de 1 ml usando precipitación

con isopropanol y se presenta en las vías marcadas 1*. El ácido nucleico en 1* se procesó con el protocolo de eliminación de contaminación y los reactivos descritos aquí y se analizó en las vías marcadas 1^ . El ácido nucleico en la Figura 7 parece equivalente para cada conjunto de muestra tras la precipitación con isopropanol y eliminación de contaminantes.

5 **[0091]** La Figura 7 muestra el uso del ácido nucleico en la Figura 6 en un procedimiento de PCR. Para cada muestra, las vías marcadas 8 ml y 1* muestran inhibición de PCR y el ácido nucleico de entrada no es capaz de producir un producto de amplificación. Las vías marcadas 1^, que han sido procesadas con el proceso de eliminación de contaminante descrito aquí, muestran la eliminación con éxito del contaminante y producto de amplificación por PCR.

- 10 1. Añadir hasta 1000 µl de muestra de ADN a un tubo limpio.
 2. Añadir 460 µl de solución de perlas por 150 µl de ADN. Invertir para mezclar.
 3. Añadir 140 µl de C1 e invertir para mezclar.
 4. Añadir 560 µl de C2 e invertir para mezclar. Incubar la muestra a 4°C durante 5 minutos y centrifugar la muestra a 10.000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
 15 5. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
 6. Añadir 460 µl de C4 e invertir para mezclar. Incubar la muestra a 4°C durante 10 minutos.
 7. Centrifugar la muestra a 10.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
 8. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
 9. Añadir 2750 µl de C5 y agitar en vortex para mezclar.
 20 10. Cargar la muestra en una columna de centrifugación y centrifugar a 2.500 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
 11. Añadir 2000 µl de C6 a la columna y centrifugar a 2.500 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente.
 12. Decantar el flujo y centrifugar la columna a 2.500 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 25 13. Transferir la cesta de centrifugado a un nuevo tubo y añadir 1000 µl de solución C7 para eluir el ADN. Centrifugar a 2.500 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Reactivos del kit

[0092]

| | | |
|----|--------------------|---|
| 30 | Solución de perlas | NaPO ₄ 181 mM, GITC 121 mM |
| | C1 | NaCl 150 mM, SDS 4%, Tris 0,5M |
| | C2 | Acetato de amonio 133 mM |
| | C3 | Sulfato de amonio y aluminio dodecahidratado 120 mM |
| | C4 | GuHCL 5M, Tris 30 mM isopropanol 9% |
| 35 | C5 | Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EtOH 50% |
| | C6 | Tris 10 mM |

40 **[0093]** En la Figura 8, el ácido nucleico de la Figura 7 se usó en una reacción de PCR. Las vías marcadas (-) y (+) son reacciones de control negativo y positivo. El ADN amplificado por PCR se analizó mediante electroforesis en agarosa 0,8% en TAE seguido de tinción con bromuro de etidio. En la Figura 8: * Antes de purificación, ^ Después de purificación y eliminación de sustancias contaminantes usando métodos aquí descritos.

Tipo de suelo y cantidad procesada

[0094]

- 45 Tipo de suelo 1. Compost (18-21" (45,7 - 53,3 cm) profundidad) (5g)
 Tipo de suelo 2. Compost casero (5g)
 Tipo de suelo 3. Compost -SD (5g)

[0095] El ARN aislado de 8 tipos de suelo diferentes, como se muestra en la Tabla 2, abajo, y aplicado en un gel 1% TAE 1x durante 45 minutos a 100v., véase Figura 9.

50

Tabla 2. Lista de muestras de suelo usadas para aislar ARN

| Vía de la muestra | Tipo | Cantidad procesada (gramos) |
|-------------------|---|-----------------------------|
| 1 | Suelo de césped | 2 |
| 2 | Campo de fresas de California | 2 |
| 3 | Suelo de la rizosfera | 2 |
| 4 | Sedimento de laguna de Cardiff | 2 |
| 5 | Suelo modificado RCP | 2 |
| 6 | Compost de la ciudad de San Diego | 1 |
| 7 | Campo de maíz de Iowa | 2 |
| 8 | Suelo del este del condado de San Diego (arenoso) | 2 |

Ejemplo 4: Aislamiento de ARN de hasta 2,0 gramos de muestra ambiental

[0096] El siguiente ejemplo describe un proceso de purificación de ejemplo de la invención. Se aisló ARN de diversos tipos de suelo diferentes y se examinó usando un método y descrito aquí. El kit y método se sometieron a ensayo en suelos, sedimentos, compost y estiércol representando una amplia gama de contenido de nitrógeno y carbono orgánico y distintas composiciones de arena/limo/arcilla. Específicamente, había ocho muestras, que incluían un suelo de césped fuertemente fertilizado, suelo de campos de fresas cultivados en el sur de California, un sedimento alimentado por agua del mar, un suelo modificado comercialmente, compost urbano, suelo de un campo de maíz en Iowa, suelo de la región rizosfera de una planta y un suelo arenoso del este del condado de San Diego. Se extrajo ARN de estas muestras usando el método aquí descrito y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa para determinar la calidad de ARN identificando visualmente una banda 23S discreta y una banda 16S. La utilidad del ARN digerido y purificado para aplicaciones posteriores, en parte determinada por si la muestra está sustancialmente libre de sustancias inhibitoras de la PCR, se evaluó mediante amplificación por RT-PCR usando cebadores de consenso específicos para una región de 600 pares de bases (pb) de bacterias pertenecientes al grupo *Bacilli* y una región de 1,2 kb pares de bases de grupo *Streptomyces*.

[0097] El ejemplo mostrado abajo utiliza un procedimiento de homogeneización/extracción de proceso de lisis mecánica en vortex y es incorporado para ilustrar su uso. El resultado es que el procedimiento descrito produce ARN de calidad de RT-PCR que está intacto a partir de todos los suelos sometidos a ensayo en este estudio, en aproximadamente 2,5 horas. El ARN purificado, tras la digestión con enzima ADNasa y posterior purificación, se amplificó directamente por RT-PCR en todas las muestras sometidas a ensayo. No fueron necesarias etapas de dilución, optimización por RT-PCR u otra purificación de ARN para llevar a cabo RT-PCR usando el ARN aislado del suelo.

Procedimiento para aislar ARN a partir de 2,0 gramos de muestra ambiental

[0098]

1. Añadir 2 gramos de muestra a un tubo de perlas de suelo que contiene 1,5 de perlas de carburo de sílice.
2. Añadir 2,5 ml de Solución SR1, agitar en vortex para mezclar y después añadir 250 µl de Solución SR2, agitar en vortex para mezclar.
3. Añadir 800 µl de Solución SR3 y agitar en vortex para mezclar.
4. Colocar los tubos en un adaptador de vortex (Mo Bio Laboratories, California) y agitar en vortex los tubos al nivel más alto durante 5 minutos.
5. Añadir 3,5 ml de SR 4 (Fenol:Cloroformo:Isoamylalcohol [50:49:1]) {pH 4,5 a 8,0} y continuar batiendo las perlas de los tubos durante 10 minutos.
6. Centrifugar el tubo a 2500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y transferir la fase acuosa a un tubo nuevo de 15 ml.
7. Añadir 1,5 ml de Solución SR5 y agitar en vortex para mezclar. Incubar la muestra a 4°C durante 10 minutos y después centrifugar el tubo a 2500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

8. Añadir 5 ml de Solución SR6 (100% isopropanol) e incubar la muestra a -20°C durante 30 minutos.
9. Centrifugar el tubo a 2500 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante y secar al aire los gránulos durante 5 minutos a temperatura ambiente.
10. Resuspender el gránulo en 1 ml de Solución SR7 y cargarlo en una columna de captura de ARN preequilibrada (preequilibrada con 2 ml de SR7. Descartar el flujo.
11. Lavar las columnas con 1 ml de SR7 y descartar el flujo.
12. Eluir las columnas con 1 ml de Solución SR8.
13. Transferir el SR8 eluido a un tubo de 2 ml y añadir un equivalente de 100% isopropanol. Incubar la muestra a -20°C durante 10 minutos seguido de centrifugado de los tubos a 16.000 x g durante 15 minutos.
14. Descartar el flujo y secar al aire el gránulo.
15. Resuspender el gránulo en 100 µl de Solución SR9.

Resultados

[0099] Véase Figura 9. El ARN purificado por el método descrito aquí fue caracterizado mediante electroforesis en gel de agarosa. Mediante el uso del procedimiento descrito arriba, se aisló ARN de todas las muestras de suelo sometidas a ensayo. La amplificación por RT-PCR del ARN aislado de la Figura 9 usando dos conjuntos de cebadores diferentes (uno para el grupo *Bacilli* y el otro para el grupo *Streptomyces*) indicó que se produjeron productos de RT-PCR a partir de cada muestra de suelo, indicando que el procedimiento de aislamiento de ARN descrito aquí había purificado con éxito ARN.

Reactivos

[0100]

| | | |
|----|-----------------------------------|---|
| 25 | Tubo de perlas | Tubos de perlas con 1,5 g de carburo de sílice en un tubo con tapa roscada de 15 ml. |
| | PowerSoil™ ARN Solución de perlas | NaPO ₄ 181 mM, tiocianato de guanidinio 121 mM |
| | SR1 | NaCl 150 mM, SDS 4%, Tris 0,5M |
| | SR2 | sulfato de amonio y aluminio dodecahidratado 120 mM |
| 30 | SR3 | NaCl 5M en sal anhidra del ácido cítrico 22 mM, citrato trisódico 29 mM, deshidratar, pH 5,0 - 5,2 Fenol:Cloroformo:Isoamil alcohol (50:49:1) |
| | SR4 | 100% Isopropanol |
| | SR5 | NaCl 500 mM en ácido 2-(N-morfolino)propano-sulfónico (MOPS) 50 mM con isopropanol 15%, pH 7.0 |
| 35 | SR6 | NaCl 750 mM en MOPS 50 mM con isopropanol 15%, pH 7,0 |
| | SR7 | agua tratada con DEPC |

[0101] Como se ilustra en la Figura 10, el ARN total aislado fue digerido con ADNasa libre de ARNasa y después purificado mediante extracción con fenol:cloroformo seguido por precipitación con isopropanol. El ARN libre de ADN se usó sin diluir en una reacción RT-PCR con un conjunto cebador específico para un fragmento de 1200 pb de microorganismos pertenecientes al grupo *Streptomyces*. M - marcador, N- control negativo, P- control positivo y muestras de la 1 a la 8 como se presentan en la Tabla 2.

[0102] Como se ilustra en la Figura 11, el ARN total aislado fue digerido con ADNasa libre de ARNasa y después purificado mediante extracción con fenol:cloroformo seguido por precipitación con isopropanol. El ARN libre de ADN se usó sin diluir (1 µl/50 µl) en una reacción de RT-PCR con un conjunto cebador específico para un fragmento de 1200 pb de microorganismos pertenecientes al grupo *Streptomyces*. M - marcador, N- control negativo, P- control positivo y muestras de la 1 a la 8 como se presentan en la Tabla 2.

REIVINDICACIONES

1. Un método para eliminar un contaminante o inhibidor de una muestra que comprende ácido nucleico, donde el contaminante o inhibidor inhibe la amplificación o hibridación del ácido nucleico en la muestra, o inhibe una reacción enzimática que utiliza el ácido nucleico en la muestra, comprendiendo el método los pasos de:
- 5 (a) procesar la muestra para romper, desnaturalizar o alterar la muestra, donde el procesamiento comprende poner en contacto la muestra con una solución que comprende un agente caotrópico, un detergente y un amortiguador;
- (b) poner en contacto la muestra con un primer floculante para formar un precipitado floculante, donde el primer floculante es acetato de amonio;
- 10 (c) aislar el ácido nucleico y contaminantes e inhibidores restantes del primer precipitado floculante en un sobrenadante;
- (d) poner en contacto el sobrenadante que contiene ácido nucleico con un segundo floculante para formar un segundo precipitado floculante, donde el segundo floculante es sulfato de amonio y aluminio o sulfato de amonio y aluminio dodecahidratado; y
- 15 (e) aislar el ácido nucleico del segundo precipitado floculante en un sobrenadante.
2. El método de la reivindicación 1, donde el contaminante o inhibidor se selecciona entre el grupo compuesto por un polifenol, un polisacárido, una sustancia húmica, un ácido húmico, una humina y un fenólico de plantas.
3. El método de la reivindicación 1, donde la muestra comprende una muestra ambiental o biológica, y opcionalmente la muestra ambiental o biológica comprende una muestra derivada de un animal, restos animales, un alimento, un microorganismo, una planta o sus componentes, suelo, sedimento, roca, arrecife, lodo, compost, materia biológica en descomposición, una biopsia, una muestra histológica, una muestra de semen, una muestra de saliva o sangre, cualquier muestra de fluido corporal, una muestra de pelo, una muestra de piel, una muestra fecal, restos arqueológicos, una turbera, compost, aceite, agua, agua terrestre o agua subterránea, agua industrial y atmosférica, polvo, polvo urbano, mezclas comerciales para sembrar o mejoradores del suelo, respiraderos del fondo marino, o aire.
- 20 25
4. El método de la reivindicación 1, donde el ácido nucleico comprende un ARN o ADN o una combinación de los mismos.
5. El método de la reivindicación 1, donde el detergente se selecciona entre el grupo compuesto por dodecil-sulfato sódico (SDS), sarkosyl, lauril sarcosinato de sodio, bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB), ácido cólico, ácido desoxicólico, benzamidotaurocolato (BATC), octilfenol polietoxilato, monolaurato de sorbitán polioxietilenado, terc-octilfenoxi poli(oxietileno)etanol, 1,4-piperazinabis-(ácido etanosulfónico), ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico, polietilenglicol terc-octilfenil éter (Triton[®]X-100), (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol (Triton[®]X-114) y una combinación de los mismos.
- 30 35
6. El método de la reivindicación 1, que comprende además; (f) purificar o aislar el ácido nucleico y/o (g) detectar el ácido nucleico, donde la detección resulta en la determinación de que el ácido nucleico es de un organismo que produce una espora o una toxina.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la toxina es una toxina bacteriana.
8. El método de la reivindicación 1, comprendiendo además: (f) purificar o aislar el ácido nucleico; y/o (g) detectar el ácido nucleico, donde la detección resulta en la determinación de que el ácido nucleico es de un organismo que produce un agente biopeligroso.
- 40
9. El método de la reivindicación 8, donde el agente biopeligroso es una toxina bacteriana.
10. El método de la reivindicación 1, que comprende además purificar o aislar el ácido nucleico tras el paso (e).
11. El método de la reivindicación 1, donde la muestra es una muestra no procesada, conservada, recién aislada, bruta o no refinada.
- 45
12. El método de la reivindicación 1, donde la puesta en contacto en el paso (b) comprende la mezcla o agitación en vortex.
13. El método de la reivindicación 1, donde el aislamiento en el paso (c) comprende centrifugar el floculante y la muestra obtenidos en el paso (b) y recolectar un sobrenadante que comprende ácido nucleico.
- 50
14. El método de la reivindicación 1, que comprende además tras el paso (e), detectar o caracterizar el ácido

nucleico, donde el ácido nucleico es un ácido nucleico purificado, aislado, amplificado o hibridado.

- 5 **15.** El método de la reivindicación 1, donde la muestra empleada en el paso (a) comprende un ácido nucleico extraído de una muestra biológica o ambiental donde el ácido nucleico aislado no arroja un producto de amplificación detectable en una reacción de amplificación, y opcionalmente la reacción de amplificación es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y que comprende además los pasos de: (f) purificar y/o amplificar el ácido nucleico.
- 16.** El método de la reivindicación 15, donde la puesta en contacto en el paso (b) comprende la mezcla o agitación en vortex.
- 10 **17.** El método de la reivindicación 15, donde el aislamiento en el paso (c) comprende centrifugar el floculante y la muestra obtenidos en el paso (b) y recolectar un sobrenadante que comprende ácido nucleico.
- 18.** El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se emplea un kit que comprende: (a) un agente caotrópico; (b) acetato de amonio; (c) sulfato de amonio y aluminio o sulfato de amonio y aluminio dodecahidratado; (d) una o más soluciones o amortiguadores; opcionalmente (e) uno o más recipientes de tubo útiles para llevar a cabo el método; y (f) instrucciones que describen un método para su uso según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 17.
- 15 **19.** El método de acuerdo con la reivindicación 18, donde el kit comprende además un detergente, donde opcionalmente el detergente se selecciona entre el grupo compuesto por dodecil-sulfato sódico (SDS), sarkosyl, lauril sarcosinato de sodio, bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB), ácido cítrico, ácido desoxicólico, benzamidotaurocolato (BATC), octilfenol polietoxilato, monolaurato de sorbitán polioxietilenado, terc-octilfenoxi poli(oxietileno)etanol, polietilenglicol terc-octilfenil éter (Triton[®]X-100), (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-poli-etilenglicol (Triton[®]X-114) y una combinación de los mismos.
- 20 **20.** El método de acuerdo con la reivindicación 18, donde el kit comprende además un material homogeneizante.
- 21.** El método de acuerdo con la reivindicación 20, donde el material homogeneizante comprende una perla.
- 25 **22.** El método de acuerdo con la reivindicación 18, donde el kit comprende además uno o más oligonucleótidos o nucleótidos libres.
- 23.** El método de acuerdo con la reivindicación 22, donde el kit comprende uno o más oligonucleótidos que hibridan específicamente con un ácido nucleico de un microorganismo, animal, planta, insecto, levadura, virus, fago, nematodo, bacteria u hongo.
- 30 **24.** El método de la reivindicación 23, donde el uno o más oligonucleótidos del kit hibridan específicamente con un ácido nucleico de:
- (a) un *Bacillus* spp., un *Clostridium* spp., un *Sporolactobacillus* spp., un *Sporocarcina* spp., un *Filibacter* spp., un *Caryophanum* spp., un *Desulfotomaculum* spp., un *Corynebacterium* spp., un *Micrococcus* spp., un *Mycobacterium* spp., un *Nocardia* spp., un *Peptococcus* spp., un *Peptostreptococcus* spp.; o
- 35 (b) un ácido nucleico de una bacteria Gram negativa seleccionada entre la familia compuesta por *Acetobacteriaceae*, *Alcaligenaceae*, *Bacteroidaceae*, *Chromatiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Legionellaceae*, *Neisseriaceae*, *Nitrobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Rhizobiaceae*, *Rickettsiaceae* y *Spirochaetaceae*; o
- 40 (c) un ácido nucleico de *B. anthracis*, *A. globiformis*, *B. subtilis*, *C. renale*, *C. difficile*, *M. luteus*, o *R. erythropolis*; o
- (d) un ácido nucleico de variola, varicela, reovirus, retrovirus, VIH, VIH-1, VIH-2, fiebre hemorrágica viral, Ebola, Marburg, Machupo, Lassa, Variola mayor o encefalitis viral.
- 45 **25.** El método de la reivindicación 22, donde el kit comprende uno o más oligonucleótidos y nucleótidos libres suficientes para llevar a cabo una reacción de PCR, una replicación por círculo rodante, una reacción en cadena de la ligasa o una reacción de transcripción inversa.
- 26.** El método de acuerdo con la reivindicación 18, donde el kit comprende además al menos una enzima.
- 27.** El método de acuerdo con la reivindicación 26, en el que el kit incluye una polimerasa.

Figura 1

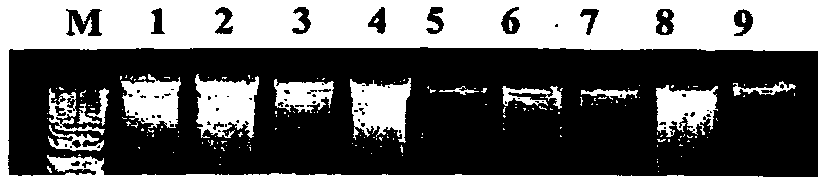


Figura 2

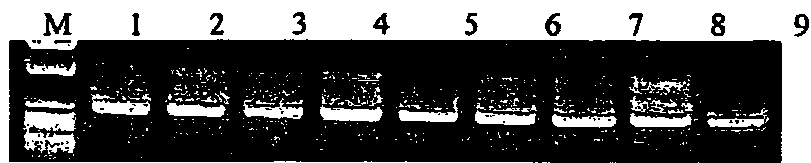


Figura 3

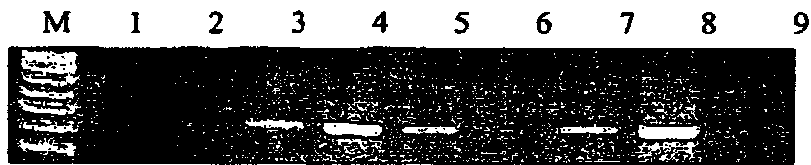


Figura 4

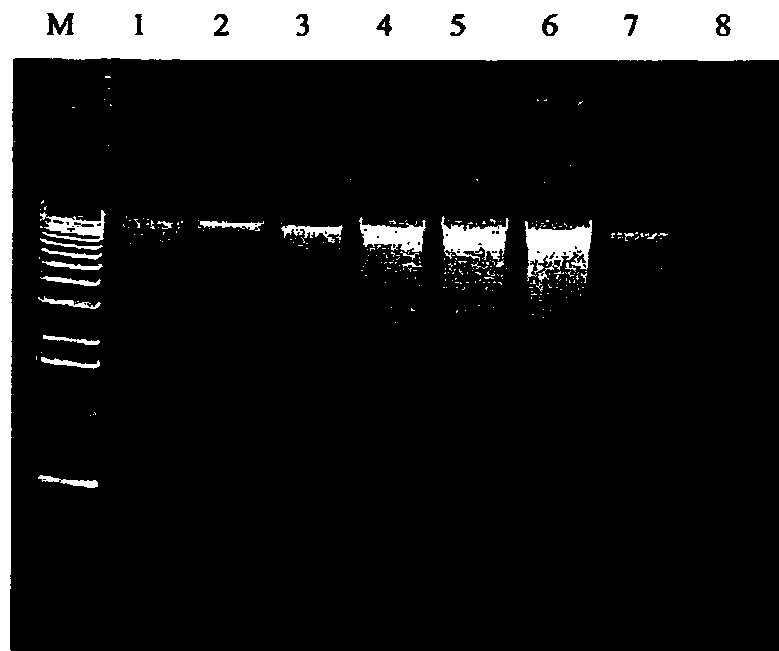


Figura 5

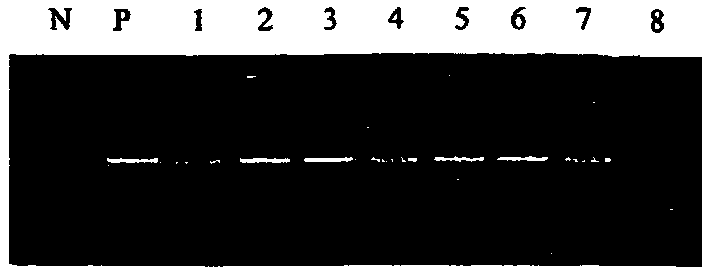


Figura 6

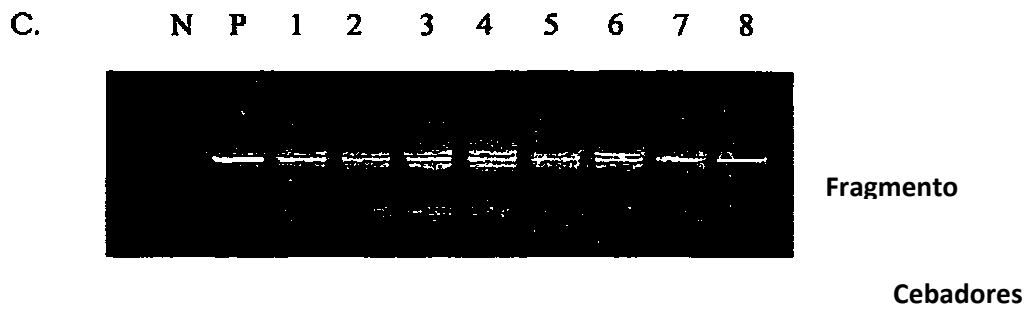
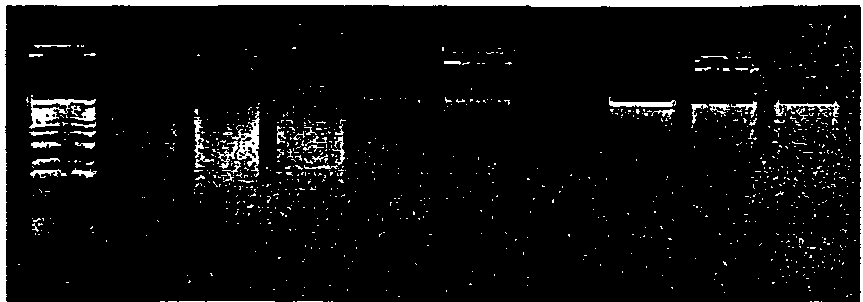


Figura 7

| | | Tipo de suelo 1 | | | Tipo de suelo 2 | | | Tipo de suelo 3 | | |
|-----------------|------------|-----------------|---|---|-----------------|---|---|-----------------|---|---|
| Volumen cargado | (μ l) | 15 | 5 | 5 | 15 | 5 | 5 | 15 | 5 | 5 |



| | | Tipo de suelo 1 | | Tipo de suelo 2 | | Tipo de suelo 3 | | | | | |
|----------------|------|---------------------------|------|-----------------|----|-----------------|----|---------------------------|------|----|----|
| Volumen eluido | (ml) | M | 8 ml | 1* | 1^ | 8 ml | 1* | 1^ | 8 ml | 1* | 1^ |
| | | * Antes de purificación / | | | | | | ^ Después de purificación | | | |

Figura 8

| | | Controles | | Tipo de suelo 4 | | Tipo de suelo 5 | | Tipo de suelo 6 | | | | |
|----------------|------|-----------|---|-----------------|------|-----------------|---|-----------------|------|---|------|------|
| Volumen eluido | (ml) | - | + | 8 | 1.0* | 1.0^ | 8 | 1.0* | 1.0^ | 8 | 1.0* | 1.0^ |

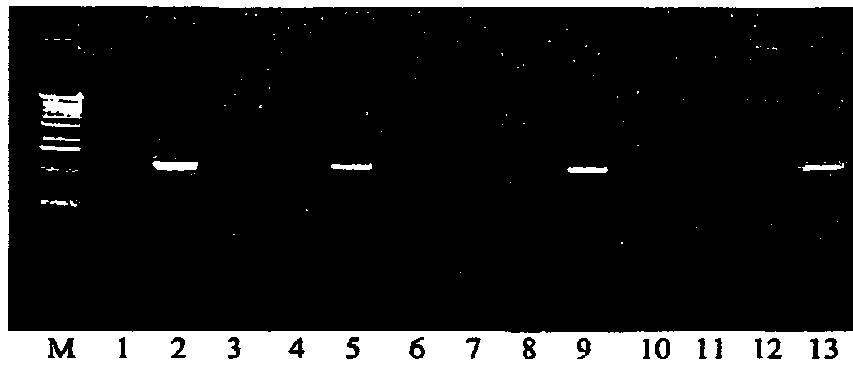


Figura 9

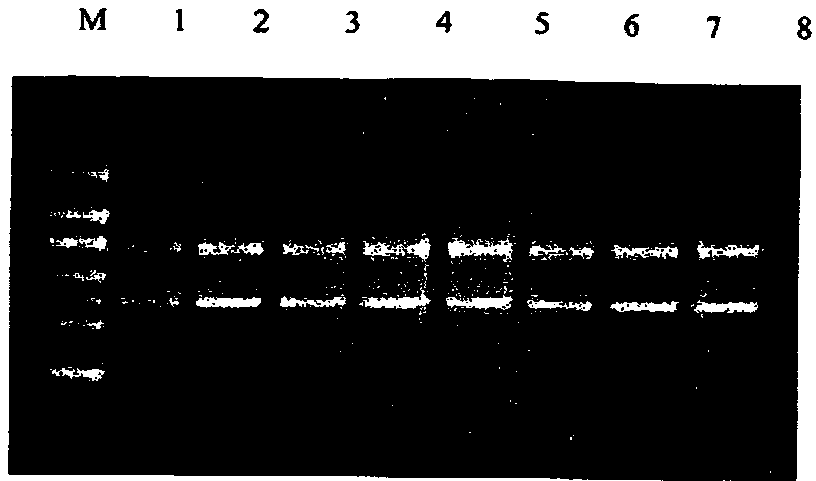


Figura 10

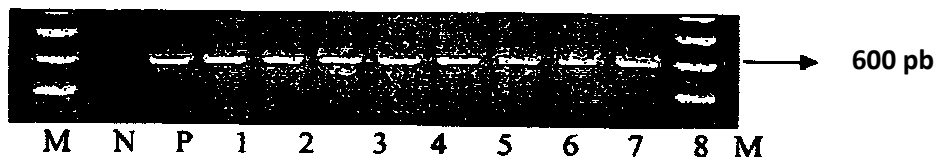


Figura 11

