

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 773**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2009 E 09753837 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2285957**

54 Título: **Reactivo de lisis, unión y/o lavado que se puede usar para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

30.05.2008 DE 102008026058

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

28.04.2015

73 Titular/es:

**QIAGEN GMBH (100.0%)
Qiagen Strasse 1
40724 Hilden, DE**

72 Inventor/es:

**FABIS, ROLAND;
HOMANN-WISCHINSKI, ANKE;
VOSS, THORSTEN y
HANSELLE, THOMAS**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

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

ES 2 534 773 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

Reactivo de lisis, unión y/o lavado que se puede usar para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un reactivo de lisis, unión y/o lavado así como a un procedimiento para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos. El reactivo de lisis, unión y/o lavado así como el procedimiento son particularmente adecuados para fines de aplicación en el diagnóstico molecular.

10

Antecedentes técnicos

En el estado de la técnica es conocida una pluralidad de procedimientos para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), de células, cultivos celulares o cultivos de virus.

15

En este caso, los procedimientos "clásicos" para el aislamiento de ácidos nucleicos, que se llevan a cabo muchas veces manualmente, se basan en un procedimiento monoetápico en el que, después de la adición de un tampón acuoso y un agente de extracción orgánico, se lleva a cabo una extracción. Los ácidos nucleicos permanecen en la fase acuosa y pueden aislarse después de la separación de la fase orgánica que contiene sustancias acompañantes indeseadas.

20

Estos procedimientos usan, por un lado, habitualmente agentes de extracción orgánicos perjudiciales para la salud, tales como cloroformo o fenol, por otro lado, las impurezas solubles en agua permanecen en la fase acuosa que contiene los ácidos nucleicos que se tienen que separar en otras etapas de purificación.

25

Por tanto, en el estado de la técnica ha adquirido importancia un procedimiento alternativo que se basa en la adsorción selectiva de ácidos nucleicos a soportes sólidos, la mayoría de las veces minerales, tales como dióxido de silicio. El principio de unión se basa en una unión reversible de los ácidos nucleicos bajo la influencia de las denominadas sales caotrópicas y/o alcohol a la superficie de dióxido de silicio. En un procedimiento multietápico se añaden a la muestra que contiene ácido nucleico distintas soluciones o mezclas, la mayoría de las veces soluciones o mezclas de lisis, unión, lavado y/o elución y en una etapa final del procedimiento se eluye el ácido nucleico purificado del soporte añadido como tarde en la etapa de unión.

30

El principio básico de ambos procedimientos se basa en que en una primera etapa se lisan las células, en particular las células vegetales, animales, humanas, bacterianas o de virus. Para esto, las células en primer lugar se incuban con un tampón de lisis que disgrega las células.

35

En el estado de la técnica son conocidos tampones y procedimientos para la lisis de materiales celulares de una muestra biológica. Los tampones de lisis conocidos contienen con frecuencia el tensioactivo monolaurato de polioxietilensorbitano (Tween® 20). Este tensioactivo se usa para, en el marco de la lisis celular, pasar las impurezas a un estado soluble o estabilizado para separar las mismas del ácido nucleico. (Véase, por ejemplo, el documento WO2006/023471 o DE10147439). Es desventajoso en los tampones de lisis que contienen monolaurato de polioxietilensorbitano (Tween® 20) que los mismos no son estables durante el almacenamiento. De este modo, por ejemplo, disminuye el valor del pH. En particular es desventajoso que durante el uso de estos tampones de lisis después del almacenamiento disminuye el rendimiento de los ácidos nucleicos aislados. Además, es desventajoso que los eluidos que contienen ácido nucleico están enturbiados, lo que señala la presencia de impurezas que pueden alterar el uso posterior de los ácidos nucleicos aislados.

40

45

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención era poner a disposición un agente que superase al menos una de las desventajas que se han mencionado anteriormente del estado de la técnica y que presentase, a este respecto, propiedades de lisis, unión y/o lavado en la medida de lo posible igual de buenas o mejores.

50

El objetivo se resuelve mediante un reactivo de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con la reivindicación 1 de la presente invención. Según esto se pone a disposición un reactivo de lisis, unión y/o lavado que comprende:

55

- al menos un compuesto caotrópico,
- al menos un compuesto de tampón seleccionado preferentemente del grupo que comprende tris(hidroxiometil)aminometano (TRIS), N-(tri(hidroxiometil)metil)glicina (tricina), N,N-bis(2-hidroxiometil)-glicina (BICIN), ácido N-(2-hidroxiometil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES), ácido piperazin-1,4-bis(2-etanosulfónico) (PIPES), ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (CHES), ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) y/o tampón fosfato y
- al menos un tensioactivo no iónico basado en polioxietileno que es un éter de alcohol graso de polioxietileno seleccionado del grupo cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno en el intervalo de $\geq 8\%$ (peso/volumen) a $\leq 30\%$ (peso/volumen) en relación con el volumen total del reactivo.

60

65

En el sentido de la presente invención, por la expresión “reactivo de lisis, unión y/o lavado” se entiende reactivos que son reactivos de lisis, reactivos de unión o reactivos de lavado al igual que también reactivos que pueden actuar como reactivo de lisis al igual que como reactivo de unión y de lavado. En particular, en el sentido de la presente invención por la expresión “reactivo de lisis, unión y/o lavado” se entiende también mezclas de reactivos de lisis,
5 reactivos de unión y/o reactivos de lavado de acuerdo con la invención.

En el sentido de la presente invención, por el término “reactivo” se entiende reactivo de lisis, unión y/o lavado.

En el sentido de la presente invención, por la expresión “compuesto caotrópico” se entiende compuestos que tienen un efecto desnaturalizante sobre proteínas y que en particular destruyen la estructura regular, basada en la formación de enlaces de puentes de hidrógeno, del agua líquida.
10

En el sentido de la presente invención, por la expresión “compuesto de tampón” se entiende compuestos que pueden poner a disposición un tamponamiento o una estabilización del valor del pH de una solución acuosa.
15

En el sentido de la presente invención, por la expresión “tampón fosfato” se entiende sales de fosfato tales como dihidrogenofosfatos, por ejemplo, dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4) o dihidrogenofosfato sódico (NaH_2PO_4) e hidrogenofosfatos, por ejemplo, hidrogenofosfato disódico dihidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) o hidrogenofosfato dipotásico. El uso de mezclas de las sales de fosfato también es posible. Otro tampón fosfato habitual es PBS (solución salina tamponada con fosfato), que contiene cloruro sódico, Na_2HPO_4 , cloruro potásico y KH_2PO_4 .
20

En el sentido de la presente invención, por la expresión “ácido nucleico” se entiende en particular, pero sin limitación, ácidos nucleicos naturales, preferentemente aislados, lineales, ramificados o circulares, tales como ARN, en particular ARNm, ARNip, miARN, ARNnp, ARNt, ARNnh o ribozimas, ADN, ADN plasmídico y similares, ácidos nucleicos sintéticos o modificados, transcritos *in vitro*, por ejemplo, oligonucleótidos, en particular cebadores, sondas o patrones que se pueden usar para la PCR, ácidos nucleicos marcados con digoxigenina, biotina o colorantes fluorescentes, ácidos nucleicos metilados o los denominados PNA (ácidos peptidonucleicos, “*peptide nucleic acids*”).
25

En el sentido de la presente invención, por el término “tensioactivo” se entiende sustancias con actividad interfacial y/o actividad superficial.
30

En el sentido de la presente invención, por la expresión “alcohol graso” se entiende alcoholes con una longitud de cadena con una cantidad de seis a 22 átomos de carbono, preferentemente de 8 a 20 átomos de carbono, con preferencia de 10 a 18 átomos de carbono, de forma particularmente preferente de 12 a 18 átomos de carbono. Se reivindican alcoholes con una cantidad de 16 o 18 átomos de carbono. Los alcoholes grasos ciertamente pueden estar mono- o poliinsaturados, sin embargo, preferentemente se trata de alcoholes grasos saturados.
35

En el sentido de la presente invención, “polioxietileno” se refiere a una unidad $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, representando n preferentemente un número entero de 2 a 150, más preferentemente de 4 a 120, aún más preferentemente de 8 a 80 y con la mayor preferencia un número entero seleccionado de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 o 150.
40
45

En el sentido de la presente invención, “polioxipropileno” se refiere a una unidad $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, siendo n preferentemente un número entero de 10 a 90, más preferentemente de 20 a 80, aún más preferentemente de 30 a 70 y con la mayor preferencia n es un número entero seleccionado de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89 o 90.
50

En el sentido de la presente invención, por la indicación “% en peso/volumen”, “% (peso/volumen)” o “% (p/v)” se ha de entender, por ejemplo, la indicación en gramos del tensioactivo por 100 ml de reactivo o composición.
55

Sorprendentemente, se ha encontrado que los reactivos de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con la invención presentan una estabilidad mejorada durante el almacenamiento. De este modo, los reactivos de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con la invención pueden presentar, por ejemplo, durante un almacenamiento a temperatura ambiente de tres, preferentemente seis meses, más preferentemente al menos ocho meses, un valor de pH estable. En particular, los reactivos de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con la invención pueden presentar incluso durante un almacenamiento a temperaturas elevadas, por ejemplo, a 50 °C durante varias semanas, preferentemente durante varios meses, un valor de pH estable.
60

Esto ha resultado ventajoso para reactivos de lisis, unión y/o lavado, ya que se supone que la inestabilidad del valor del pH está relacionada con la aparición de impurezas en el eluido obtenido después del aislamiento que contiene
65

los ácidos nucleicos.

De acuerdo con la invención se emplean tensioactivos no iónicos basados en polioxietileno, en concreto éteres de alcohol graso de polioxietileno seleccionados del grupo cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno.

Son éteres de alcohol graso de polioxietileno adecuados los alcoholes cetílicos, oleílicos o estearílicos polietoxilados correspondientes que se pueden usar en solitario o en una mezcla.

De acuerdo con una forma de realización preferente de la invención, el éter de alcohol graso de polioxietileno comprende un constituyente de polioxietileno que contiene de 2 a 150 unidades de (CH₂CH₂O).

El éter de alcohol graso de polioxietileno está seleccionado del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno.

Los éteres de alcohol graso de polioxietileno reivindicados han resultado ventajosos para una amplia variedad de aplicaciones dentro de la presente invención. En particular con reactivos de lisis, unión y/o lavado que comprenden compuestos de tampón seleccionados, preferentemente, del grupo que comprende tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), N-(tri(hidroximetil)metil)glicina (tricina), N,N-bis(2-hidroxietil)-glicina (BICIN), ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES), ácido piperazin-1,4-bis(2-etanosulfónico) (PIPES), ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (CHES), ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) y/o tampón fosfato se puede observar una estabilidad mejorada durante el almacenamiento.

Se ha podido constatar que aparecieron efectos ventajosos de los reactivos de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con la invención en particular con un contenido de tensioactivo no iónico basado en polioxietileno que es un éter de alcohol graso de polioxietileno seleccionado del grupo cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno en el intervalo de $\geq 8\%$ (peso/volumen) a $\leq 30\%$ (peso/volumen) en relación con el volumen total del reactivo de lisis, unión y/o lavado.

En el caso de que usen mezclas de tensioactivos, en el caso de las indicaciones de la concentración se trata preferentemente del contenido total de tensioactivo, por ejemplo, en el intervalo de en total $\geq 8\%$ (peso/volumen) a $\leq 30\%$ (peso/volumen) en relación con el volumen total del reactivo.

Esto ha resultado ventajoso en particular para los reactivos de lisis dentro de la presente invención.

Los éteres de alcohol graso de polioxietileno son alcoholes cetílicos, oleílicos o estearílicos etoxilados seleccionados del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno.

Los éteres de alcohol graso de polioxietileno preferentes están seleccionados del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno (2), cetiléter de polioxietileno (10), cetiléter de polioxietileno (20), esteariléter de polioxietileno (2), esteariléter de polioxietileno (10), esteariléter de polioxietileno (20), oleiléter de polioxietileno (2), oleiléter de polioxietileno (10), oleiléter de polioxietileno (20) y/o esteariléter de polioxietileno (100). En este caso, los números indican la cantidad promedio de las unidades de óxido de etileno.

Son adecuados de acuerdo con la invención en particular éteres de alcohol graso de polioxietileno correspondientes que se comercializan con la denominación comercial Brij®, por ejemplo, por la empresa ICI Surfactants.

Los ejemplos de éteres de alcohol cetílico, oleílico o estearílico de polioxietileno adecuados están seleccionados, preferentemente, del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno (2) (Brij® 52), cetiléter de polioxietileno (10) (Brij® 56), cetiléter de polioxietileno (20) (Brij® 58), esteariléter de polioxietileno (2) (Brij® 72), esteariléter de polioxietileno (10) (Brij® 76), esteariléter de polioxietileno (20) (Brij® 78), oleiléter de polioxietileno (2) (Brij® 92), oleiléter de polioxietileno (10) (Brij® 97), oleiléter de polioxietileno (20) (Brij® 98) y/o esteariléter de polioxietileno (100) (Brij® 700).

Los éteres de alcohol cetílico, oleílico o estearílico de polioxietileno adecuados se pueden usar también en forma de polvo, por ejemplo, esteariléter de polioxietileno (21) en polvo (Brij® 721P).

Otra ventaja del reactivo de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con la invención se puede poner a disposición debido a que los reactivos de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con la invención con un uso para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos incluso después de un almacenamiento de varias semanas o varios meses del reactivo de lisis, unión y/o lavado a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas, por ejemplo, de hasta 50 °C, muestran un rendimiento bueno sin modificar de los ácidos nucleicos aislados, mientras que los tampones del estado de la técnica, en particular tampones que contienen Tween®-20, muestran menores rendimientos de ácidos nucleicos después del almacenamiento.

En particular es ventajoso que con el uso de reactivos de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con la invención incluso después de almacenamiento durante varias semanas o varios meses, un eluido que contiene los ácidos nucleicos no está enturbado o solo ligeramente. Por lo tanto, una ventaja es que pueden no estar contenidas impurezas, o al menos claramente menos impurezas, en el eluido, por lo que el uso posterior del eluido que contiene los ácidos nucleicos es sustancialmente más ventajoso debido a que se pueden omitir etapas de purificación adicionales que requieren tiempo y que reducen el rendimiento de los ácidos nucleicos.

Con menor preferencia están comprendidos éteres de alcohol laurílico del polioxietileno, por ejemplo, lauriléter de polioxietileno (4) (Brij® 30) o lauriléter de polioxietileno (23) (Brij® 35) en los reactivos de lisis, unión y/o lavado. En una forma de realización preferente, por tanto, los reactivos de lisis, unión y/o lavado no contienen ninguna de estas sustancias.

El éter de alcohol graso de polioxietileno está seleccionado del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno.

Se prefieren éteres de alcohol cetílico, oleílico o estearílico de polioxietileno seleccionados del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno (10) (Brij® 56), cetiléter de polioxietileno (20) (Brij® 58), esteariléter de polioxietileno (20) (Brij® 78) y/u oleiléter de polioxietileno (20) (Brij® 98).

Se prefieren en particular éteres de alcohol cetílico u oleílico de polioxietileno, preferentemente seleccionados del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno (10) (Brij® 56), cetiléter de polioxietileno (20) (Brij® 58) y/u oleiléter de polioxietileno (20) (Brij® 98).

Los reactivos de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con la invención particulares que comprenden éteres de alcohol graso de polioxietileno, en particular éteres de alcohol cetílico u oleílico de polioxietileno, se caracterizan en comparación por un rendimiento particularmente bueno de ácidos nucleicos aislados, en particular ADN de virus. En particular, se ha podido constatar sorprendentemente que un aislamiento del ADN del virus de la hepatitis B (VHB) en comparación con tampones de lisis que contienen Tween® 20 ha podido dar lugar, tanto con el uso de un reactivo de lisis y/o unión recién preparado que contiene éter de alcohol cetílico de polioxietileno como con el uso después de varias semanas, en particular varios meses de almacenamiento a 50 °C, un rendimiento claramente mayor de ADN de virus. Esto puede proporcionar en particular una ventaja especial del reactivo de lisis y/o unión de acuerdo con la invención, ya que el virus de la hepatitis B (VHB) se considera un virus difícil de lisar. El reactivo de lisis de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para el aislamiento de ADN de virus.

Además son adecuados alcoholes cetílicos, estearílicos u oleílicos polietoxilados que están disponibles, por ejemplo, con las denominaciones INCI Ceteth, Steareth u Oleth.

Están disponibles ejemplos de otros alcoholes cetílicos, estearílicos u oleílicos etoxilados adecuados con denominaciones seleccionadas del grupo que comprende Ceteth-2, Ceteth-20, Steareth-2, Steareth-10, Steareth-20, Oleth-2, Oleth-10 y/u Oleth-20.

De acuerdo con una forma de realización preferente de la invención, el reactivo de lisis, unión y/o lavado comprende tensoactivo no iónico en el intervalo de $\geq 9\%$ (peso/volumen) a $\leq 30\%$ (peso/volumen), preferentemente en el intervalo de $\geq 10\%$ (peso/volumen) a $\leq 30\%$ (peso/volumen), preferentemente en el intervalo de $\geq 15\%$ (peso/volumen) a $\leq 20\%$ (peso/volumen) en relación con el volumen total del reactivo.

De acuerdo con una forma de realización preferente de la invención, el compuesto caotrópico es una sal de sodio o guanidinio seleccionada, preferentemente, del grupo que comprende ioduro sódico, perclorato sódico, clorhidrato de guanidinio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio y/o una mezcla de dos o varias sales de los mismos. Preferentemente, el compuesto caotrópico es una sal de guanidinio seleccionada, preferentemente, del grupo que comprende clorhidrato de guanidinio, tiocianato de guanidinio y/o isotiocianato de guanidinio.

En particular ha resultado adecuada una combinación de los compuestos caotrópicos que se han mencionado anteriormente y de los tensoactivos no iónicos basados en polioxietileno contenidos de acuerdo con la invención para la lisis de células de virus y el aislamiento de ácidos nucleicos de células de virus.

Las concentraciones y las cantidades adecuadas de los compuestos caotrópicos pueden variar dependiendo del tipo de las muestras o los parámetros de la lisis, siendo en general adecuadas concentraciones de compuesto caotrópico en el intervalo de $\geq 0,1\text{ M}$ a $\leq 10\text{ M}$, en relación con el volumen total del reactivo. Preferentemente, la concentración del compuesto caotrópico del reactivo de lisis, unión y/o lavado se encuentra en el intervalo de $\geq 0,5\text{ M}$ a $\leq 8\text{ M}$, preferentemente en el intervalo de $\geq 0,9\text{ M}$ a $\leq 6\text{ M}$.

Preferentemente, la concentración del compuesto caotrópico del reactivo de lisis se encuentra en el intervalo de $\geq 3\text{ M}$ a $\leq 7\text{ M}$, de forma particularmente preferente en el intervalo de $\geq 4\text{ M}$ a $\leq 6\text{ M}$. Preferentemente, la concentración del compuesto caotrópico del reactivo de unión se encuentra en el intervalo de $\geq 0,5\text{ M}$ a $\leq 7\text{ M}$, de forma

particularmente preferente en el intervalo de ≥ 1 M a ≤ 6 M. Preferentemente, la concentración del compuesto caotrópico del reactivo de lavado se encuentra en el intervalo de $\geq 0,5$ M a $\leq 3,5$ M, de forma particularmente preferente en el intervalo de $\geq 0,9$ M a ≤ 3 M.

5 De acuerdo con otra forma de realización preferente, el reactivo de lisis, unión y/o lavado comprende al menos un compuesto de tampón seleccionado del grupo que comprende tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), ácido N-(2-hidroxi-etil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) y/o tampón fosfato.

10 De acuerdo con una forma de realización particularmente preferente, el reactivo de lisis, unión y/o lavado comprende al menos un compuesto de tampón seleccionado del grupo que comprende tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y/o ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES).

El reactivo de lisis, unión y/o lavado preferentemente es una solución acuosa.

15 De acuerdo con otra forma de realización preferente, el reactivo de lisis, unión y/o lavado presenta un valor de pH en el intervalo de ≥ 4 a ≤ 12 , en particular en el intervalo de ≥ 6 a ≤ 11 , preferentemente en el intervalo de ≥ 7 a ≤ 10 , de forma particularmente preferente en el intervalo de ≥ 8 a ≤ 9 .

20 En formas de realización preferentes, el reactivo de lisis, unión y/o lavado, en particular el reactivo de lisis, puede presentar además enzimas, por ejemplo, enzimas líticas, en particular, por ejemplo, proteinasa K, proteasa (por ejemplo, proteasa QIAGEN), zimolasa, liticasa, cromopeptidasa, lisostafina, lisozima y, en función de la aplicación, nucleasas, por ejemplo, DNasa y/o RNasa.

25 Los reactivos de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con la invención pueden ser reactivos de lisis, reactivos de unión o reactivos de lavado o mezclas de reactivos de lisis, reactivos de unión y/o reactivos de lavado de acuerdo con la invención.

30 Una inmovilización de ácidos nucleicos en una matriz a base de uno o varios compuestos de óxido de silicio en presencia de un compuesto caotrópico se realiza, preferentemente, en presencia de un alcohol ramificado o no ramificado. Por tanto, al menos el reactivo de unión comprende preferentemente un alcohol ramificado o no ramificado.

35 Se pueden usar preferentemente alcoholes ramificados o no ramificados de cadena corta con uno a cinco átomos de carbono. De acuerdo con una forma de realización preferente de la invención, el alcohol ramificado o no ramificado es un alcohol con uno a cinco átomos de carbono seleccionado preferentemente del grupo que comprende metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, butanol o pentanol ramificado o no ramificado y/o mezclas de los mismos.

40 Siempre que no se describa de otro modo, las definiciones "alcohol ramificado o no ramificado" en particular propanol, butanol y pentanol comprenden todas las formas isoméricas concebibles de los respectivos restos. De este modo, por ejemplo, el propanol ramificado o no ramificado comprende n-propanol e iso-propanol, el butanol ramificado o no ramificado comprende iso-butanol, sec-butanol y terc-butanol y el pentanol ramificado o no ramificado comprende, por ejemplo, n-pentanol e iso-pentanol. Preferentemente se usan alcoholes seleccionados del grupo que comprende metanol, etanol, isopropanol y/o sus mezclas, de forma particularmente preferente se usan alcoholes seleccionados del grupo que comprende etanol, isopropanol y/o sus mezclas.

45 De acuerdo con una forma de realización preferente de la invención, el reactivo de unión comprende alcohol ramificado o no ramificado en el intervalo de ≥ 20 % en volumen a ≤ 80 % en volumen, preferentemente en el intervalo de ≥ 40 % en volumen a ≤ 70 % en volumen, preferentemente en el intervalo de ≥ 50 % en volumen a ≤ 60 % en volumen en relación con el volumen total del reactivo de unión.

50 En el caso de las indicaciones de los contenidos en volumen y/o peso es evidente para el experto que los contenidos en volumen y/o peso de los componentes individuales están seleccionados de tal manera que el volumen total o el peso total de los componentes no supera el 100 % en volumen o el 100 % en peso.

55 Además, la presente invención se refiere al uso de un reactivo de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con la invención para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos.

60 Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos de una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos que comprende las siguientes etapas del procedimiento:

a) lisis de la muestra biológica,

65 b) inmovilización del ácido o los ácidos nucleicos liberados en una matriz a base de uno o varios compuestos de óxido de silicio en presencia de un compuesto caotrópico y/o un alcohol ramificado o no ramificado,

c) opcionalmente lavado del ácido o los ácidos nucleicos inmovilizados sobre la matriz,
 d) opcionalmente separación del ácido nucleico unido,
 llevándose a cabo la lisis y/o inmovilización en presencia de una composición de lisis y/o unión que comprende:

- al menos un compuesto caotrópico y
- al menos un tensioactivo no iónico basado en polioxietileno que es un éter de alcohol graso de polioxietileno seleccionado del grupo cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno en el intervalo de $\geq 0,1$ % (peso/volumen) a ≤ 30 % (peso/volumen) en relación con el volumen total de la composición.

En el sentido de la presente invención, por el término “composición” se entiende una composición de lisis y/o unión.

En formas de realización preferentes del procedimiento se usa para lisar la muestra un reactivo de lisis de acuerdo con la invención. El reactivo de lisis se pone en contacto con la muestra biológica que se debe lisar. Se pueden añadir una o varias enzimas independientemente entre sí, en función de la aplicación, en distintos momentos. La muestra puede estar presente en forma líquida, por ejemplo, en el caso de muestras clínicas líquidas. Las muestras clínicas que contienen constituyentes sólidos, tales como muestras de heces o muestras de frotis, habitualmente antes del análisis posterior se suspenden en soluciones acuosas adecuadas. Los cultivos celulares se separan la mayoría de las veces antes de la lisis del medio de cultivo, sin embargo, la mayoría de las veces se evita un secado completo de la muestra. En el caso de muestras completamente secas, por ejemplo, liofilizados, la muestra se reconstituye antes del procesamiento posterior en soluciones acuosas, por ejemplo, liofilizados de patrones de virus.

Por tanto, las muestras que se deben lisar habitualmente contienen una parte de líquido. Este líquido contenido en la muestra se pone en contacto con el reactivo de lisis. En este sentido, habitualmente, en un procedimiento para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos de una muestra está presente una composición de lisis que contiene el reactivo de lisis así como otro líquido de la muestra o soluciones ya añadidas a la muestra.

En el sentido de la presente invención, la expresión “composición de lisis y/o unión” se refiere a un reactivo de lisis y/o unión que se usa en un procedimiento para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos de una muestra y que puede contener líquido adicional aparte del reactivo de lisis, unión y/o lavado. La composición de lisis y/o unión puede comprender preferentemente reactivo de lisis y/o unión de acuerdo con la invención.

De acuerdo con otra forma de realización preferente del procedimiento se lleva a cabo la inmovilización del ácido nucleico liberado en una matriz a base de uno o varios compuestos de óxido de silicio en presencia de una composición de unión de acuerdo con la invención.

Preferentemente se pone en contacto el reactivo de lisis y/o unión de acuerdo con la invención con la muestra lisada. La composición de lisis u otra solución en la que se ha llevado a cabo el lisado se puede retirar antes de la puesta en contacto con el reactivo de unión. Preferentemente no se retira la composición de lisis. Preferentemente se pone en contacto un reactivo de unión con una muestra que comprende composición de lisis.

De acuerdo con una forma de realización particularmente preferente del procedimiento se lleva a cabo el lisado en presencia de una composición de lisis y la inmovilización en presencia de una composición de unión. Correspondientemente se lleva a cabo la inmovilización preferentemente en presencia de una mezcla de una composición de lisis y unión.

Opcionalmente, el reactivo de lisis puede servir también al mismo tiempo de reactivo de unión. Además, opcionalmente, el reactivo de unión puede servir también de reactivo de lisis. También opcionalmente, el reactivo de unión puede servir de reactivo de lavado.

La composición de lisis y/o unión comprende al menos un compuesto caotrópico y al menos un tensioactivo no iónico basado en polioxietileno que es un éter de alcohol graso de polioxietileno seleccionado del grupo cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno en el intervalo de $\geq 0,1$ % (peso/volumen) a ≤ 30 % (peso/volumen) en relación con el volumen total de la composición. En el caso de que se usen mezclas de tensioactivos, en el caso de las indicaciones de la concentración se trata preferentemente del contenido total de tensioactivo, por ejemplo, en el intervalo de en total $\geq 0,1$ % (peso/volumen) a ≤ 30 % (peso/volumen) en relación con el volumen total de la composición.

Un procedimiento de este tipo ofrece para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos de una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos, por ejemplo, la ventaja de que con el uso de una composición de lisis y/o unión que comprende al menos un compuesto caotrópico y al menos un tensioactivo no iónico basado en polioxietileno que es un éter de alcohol graso de polioxietileno seleccionado del grupo cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno en el intervalo de $\geq 0,1$ % (peso/volumen) a ≤ 30 % (peso/volumen) en relación con el volumen total de la composición incluso después de un almacenamiento durante varias semanas o varios meses a temperatura ambiente o a temperaturas aumentadas, por ejemplo, 50 °C, un eluido que contiene los ácidos nucleicos no está enturbado o solo ligeramente. Por lo tanto, ventajosamente pueden no estar contenidas impurezas, o al menos claramente menos impurezas, en el eluido. Por ello, el uso posterior del eluido que contiene los ácidos nucleicos es sustancialmente más ventajoso debido a que se pueden omitir etapas de purificación adicionales que requieren tiempo y que reducen el rendimiento de los ácidos nucleicos.

Además, un procedimiento de este tipo para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos de una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos ofrece, por ejemplo, la ventaja de que se posibilita un rendimiento particularmente bueno de ácidos nucleicos aislados, en particular ADN de virus, por ejemplo, el ADN del virus de la hepatitis B (VHB).

5 Por una "muestra biológica" se puede entender un material a base de partículas o moléculas, en particular virus, fagos y células, tales como células bacterianas, células de levadura o mohos o células humanas, animales o vegetales. En particular, el procedimiento es adecuado para el aislamiento de ácidos nucleicos tales como ADN o ARN de materiales de muestra de origen humano o animal, por ejemplo, muestras clínicas tales como sangre, 10 plasma, suero, líquido de lavado de la cavidad oral, faringe y cavidad nasal, lavados broncoalveolares, orina, líquido cefalorraquídeo, esputo, saliva, heces, punciones, frotis, tales como por ejemplo frotis nasales, frotis de la mejilla, frotis cervicales, frotis vaginales, frotis uretrales, frotis faríngeos, frotis perineales y frotis rectales, heces, punciones, frotis epiteliales, biopsias y otras muestras tisulares o de médula ósea así como los cultivos de estos materiales de muestra en medios de cultivo adecuados.

15 La muestra puede proceder también del ámbito de la analítica medioambiental, de la analítica de los alimentos o de la investigación de biología molecular, por ejemplo, de cultivos bacterianos, cultivos de levadura u hongos, cultivos de virus, lisados de fagos o productos de procedimientos de amplificación, por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

20 El procedimiento de acuerdo con la invención es preferentemente adecuado para el aislamiento y/o para la purificación de ADN genómico, ADN mitocondrial, ADN plasmídico, de ADN de virus y ARN de virus y para el aislamiento y la purificación de ARN intracelular de sangre completa, por ejemplo, para la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (Reverse Transcription –Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), así como para el 25 aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos libremente circulantes contenidos en materiales de muestra celulares. El procedimiento de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para el aislamiento y/o la purificación de ADN de virus.

30 En la etapa a) del procedimiento se realiza un lisado de la muestra biológica. Básicamente son adecuados los métodos indicados a continuación seleccionados del grupo que comprende lisis con tensioactivos iónicos y no ionogénicos, por ejemplo, dodecilsulfato sódico (SDS), dodecilsulfato de litio (LiDS) o lauroilsarcosinato sódico (sarcosil) en reactivos o tampones adecuados, el uso de sales caotrópicas, ruptura mecánica por ejemplo mediante ultrasonidos, una "prensa francesa", molienda con partículas tales como bolas de vidrio, bolas de cerámica o 35 partículas de metal o en nitrógeno líquido, mediante ciclos reiterados de enfriamiento y congelación o cocción, lisis enzimática, lisis mediante liofilización, lisis mediante choque osmótico, tratamiento con microondas y/o temperatura y/o combinaciones de los mismos para la lisis de la muestra biológica. Preferentemente se realiza la lisis en presencia de sales caotrópicas.

40 Preferentemente se realiza un lisado de la muestra biológica en presencia de una composición de lisis que comprende al menos un compuesto caotrópico y al menos un tensioactivo no iónico basado en polioxietileno que es un éter de alcohol graso de polioxietileno seleccionado del grupo cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno en el intervalo de $\geq 0,1$ % (peso/volumen) a ≤ 30 % (peso/volumen) en relación con el volumen total de la composición de lisis.

45 En particular, una combinación de compuestos caotrópicos y un tensioactivo no iónico basado en polioxietileno correspondiente es particularmente eficaz para la lisis de células de virus.

50 La composición de lisis y/o unión comprende al menos un compuesto caotrópico y al menos un tensioactivo no iónico basado en polioxietileno que es un éter de alcohol graso de polioxietileno seleccionado del grupo cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno.

En este caso, para los tensioactivos no iónicos basados en polioxietileno se hace referencia en su totalidad a la anterior descripción.

55 Son ejemplos de alcoholes grasos etoxilados adecuados alcoholes cetílicos, oleílicos o estearílicos etoxilados que se pueden usar en solitario o en una mezcla. Los éteres de alcohol graso de polioxietileno son alcoholes cetílicos, oleílicos o estearílicos etoxilados seleccionados del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno.

60 Los éteres de alcohol graso de polioxietileno preferentes están seleccionados del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno (2), cetiléter de polioxietileno (10), cetiléter de polioxietileno (20), esteariléter de polioxietileno (2), esteariléter de polioxietileno (10), esteariléter de polioxietileno (20), oleiléter de polioxietileno (2), oleiléter de polioxietileno (10), oleiléter de polioxietileno (20) y/o esteariléter de polioxietileno (100). En este caso, los números indican la cantidad promedio de las unidades de óxido de etileno.

65

Los ejemplos de éteres de alcohol cetílico, oleílico o estearílico de polioxietileno adecuados están seleccionados, preferentemente, del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno (2) (Brij® 52), cetiléter de polioxietileno (10) (Brij® 56), cetiléter de polioxietileno (20) (Brij® 58), esteariléter de polioxietileno (2) (Brij® 72), esteariléter de polioxietileno (10) (Brij® 76), esteariléter de polioxietileno (20) (Brij® 78), oleiléter de polioxietileno (2) (Brij® 92), oleiléter de polioxietileno (10) (Brij® 97), oleiléter de polioxietileno (20) (Brij® 98) y/o esteariléter de polioxietileno (100) (Brij® 700).

De acuerdo con una forma de realización preferente de la invención, el éter de alcohol graso de polioxietileno comprende un constituyente de polioxietileno que contiene de 2 a 150 unidades de (CH₂CH₂O).

El éter de alcohol graso de polioxietileno está seleccionado del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno. En esta forma de realización están comprendidos con menor preferencia éteres de alcohol laurílico del polioxietileno, por ejemplo, lauriléter de polioxietileno (4) (Brij® 30) o lauriléter de polioxietileno (23) (Brij® 35) en la composición lisis y/o unión. Preferentemente, por tanto, la composición de lisis y/o unión no contiene ninguna de estas sustancias.

Se prefieren éteres de alcohol cetílico, oleílico o estearílico de polioxietileno seleccionados, preferentemente, del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno (10) (Brij® 56), cetiléter de polioxietileno (20) (Brij® 58), esteariléter de polioxietileno (20) (Brij® 78) y/u oleiléter de polioxietileno (20) (Brij® 98). Se prefieren en particular éteres de alcohol cetílico u oleílico de polioxietileno seleccionados, preferentemente, del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno (10) (Brij® 56), cetiléter de polioxietileno (20) (Brij® 58) y/u oleiléter de polioxietileno (20) (Brij® 98).

Además son adecuados alcoholes cetílicos, estearílicos u oleílicos polietoxilados que están disponibles, por ejemplo, con las denominaciones INCI Ceteth, Steareth u Oleth.

De acuerdo con una forma de realización preferente del procedimiento, la composición de lisis y/o unión comprende tensioactivo no iónico en el intervalo de $\geq 0,2$ % (peso/volumen) a ≤ 30 % (peso/volumen), preferentemente en el intervalo de ≥ 3 % (peso/volumen) a ≤ 10 % (peso/volumen), preferentemente en el intervalo de $\geq 3,2$ % (peso/volumen) a ≤ 8 % (peso/volumen) en relación con el volumen total de la composición.

Esto ha resultado adecuado en particular para composiciones de lisis y para mezclas de composiciones de lisis y unión.

De acuerdo con una forma de realización preferente del procedimiento, el compuesto caotrópico de la composición de lisis y/o unión es una sal de sodio o guanidinio seleccionada, preferentemente, del grupo que comprende ioduro sódico, perclorato sódico, clorhidrato de guanidinio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio y/o una mezcla de dos o varias sales de los mismos. Preferentemente, el compuesto caotrópico es una sal de guanidinio seleccionada, preferentemente, del grupo que comprende clorhidrato de guanidinio, tiocianato de guanidinio y/o isotiocianato de guanidinio.

En particular ha resultado adecuada una combinación de los compuestos caotrópicos que se han mencionado anteriormente y los tensioactivos no iónicos basados en polioxietileno contenidos de acuerdo con la invención para la lisis de células de virus y el aislamiento de ácidos nucleicos de células de virus.

Han resultado adecuadas concentraciones del compuesto caotrópico de la composición de lisis y/o unión en el intervalo de $\geq 0,1$ M a ≤ 10 M. Preferentemente, la concentración del compuesto caotrópico se encuentra en el intervalo de ≥ 1 M a ≤ 8 M, preferentemente en el intervalo de ≥ 3 M a ≤ 7 M, de forma particularmente preferente en el intervalo de ≥ 4 M a ≤ 6 M.

De acuerdo con una forma de realización preferente del procedimiento, la composición de lisis y/o unión comprende al menos un compuesto de tampón seleccionado del grupo que comprende tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), N-(tri(hidroximetil)metil)glicina (tricina), N,N-bis(2-hidroxietyl)-glicina (BICIN), ácido N-(2-hidroxietyl)piperazin-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES), ácido piperazin-1,4-bis(2-etanosulfónico) (PIPES), ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (CHES), ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) y/o tampón fosfato.

De acuerdo con otra forma de realización preferente del procedimiento, la composición de lisis y/o unión comprende al menos un compuesto de tampón seleccionado del grupo que comprende tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), ácido N-(2-hidroxietyl)piperazin-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES) y/o tampón fosfato. De acuerdo con otra forma de realización aún más preferente del procedimiento, la composición de lisis y/o unión comprende al menos un compuesto de tampón seleccionado del grupo que comprende tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y/o ácido N-(2-hidroxietyl)piperazin-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES).

El lisado de la muestra biológica se puede realizar a temperatura ambiente, por ejemplo, a de 15 °C a 25 °C, o a temperatura elevada, por ejemplo, a temperaturas en el intervalo de ≥ 37 °C a ≤ 75 °C.

En formas de realización preferentes, la composición de lisis puede presentar además enzimas, por ejemplo, proteinasa K, proteasa (por ejemplo, proteasa QIAGEN), zimolasa, liticasa, acromopeptidasa, lisostafina, lisozima y, en función de la aplicación, nucleasas, por ejemplo, DNasa y/o RNasa.

- 5 La inmovilización del ácido o los ácidos nucleicos liberados en una matriz a base de uno o varios compuestos de óxido de silicio se realiza en presencia de un compuesto caotrópico y/o un alcohol ramificado o no ramificado.

Preferentemente, la composición de unión comprende un alcohol ramificado o no ramificado. De acuerdo con una forma de realización preferente, el alcohol ramificado o no ramificado es un alcohol con uno a cinco átomos de carbono seleccionado, preferentemente, del grupo que comprende metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, n-butanol, iso-butanol, sec-butanol, terc-butanol, n-pentanol, iso-pentanol y/o mezclas de los mismos.

De acuerdo con una forma de realización preferente, la composición de unión comprende alcohol ramificado o no ramificado en el intervalo de $\geq 1\%$ en volumen a $\leq 80\%$ en volumen, preferentemente en el intervalo de $\geq 5\%$ en volumen a $\leq 70\%$ en volumen, preferentemente en el intervalo de $\geq 10\%$ en volumen a $\leq 60\%$ en volumen, más preferentemente en el intervalo de $\geq 15\%$ en volumen a $\leq 50\%$ en volumen en relación con el volumen total de la composición de unión.

De acuerdo con una forma de realización preferente de la invención, una mezcla de la composición de unión comprende el reactivo de lisis y opcionalmente uno o varios aditivos adicionales, preferentemente alcohol ramificado o no ramificado en el intervalo de $\geq 1\%$ en volumen a $\leq 80\%$ en volumen, preferentemente en el intervalo de $\geq 5\%$ en volumen a $\leq 70\%$ en volumen, preferentemente en el intervalo de $\geq 15\%$ en volumen a $\leq 50\%$ en volumen en relación con el volumen total de la mezcla.

25 Para el aislamiento de los ácidos nucleicos, la muestra se pone en contacto con una matriz a base de uno o varios compuestos de óxido de silicio, tales como dióxido de silicio (sílice), silicato, vidrio y/o gel de sílice y se incuba durante un tiempo suficiente para la unión. La matriz puede estar presente en las configuraciones habituales conocidas por el estado de la técnica tales como, por ejemplo, en forma de partículas, como membrana o filtro. Para una separación más sencilla, las partículas preferentemente presentan propiedades magnéticas. Para ácidos nucleicos pueden ser apropiados tiempos de incubación entre 10 segundos y 30 minutos. Han resultado ventajosos tiempos de incubación en un intervalo de 1 minuto a 20 minutos, en particular de aproximadamente 10 minutos.

30 Para el aislamiento de ácidos nucleicos se usan preferentemente partículas magnéticas que presentan una envoltura de gel de sílice. Para el aislamiento de los ácidos nucleicos se usan preferentemente partículas magnéticas que presentan una envoltura de gel de sílice y que presentan un tamaño de partícula medio en el intervalo de $\geq 1\ \mu\text{m}$ a $\leq 25\ \mu\text{m}$, preferentemente en el intervalo de $\geq 5\ \mu\text{m}$ a $\leq 15\ \mu\text{m}$ y, de forma particularmente preferente, en el intervalo de $\geq 6\ \mu\text{m}$ a $\leq 10\ \mu\text{m}$, preferentemente con una distribución de tamaño estrecha. Para el aislamiento de ácidos nucleicos se usan además preferentemente partículas magnéticas que presentan una envoltura de gel de sílice y que presentan un tamaño de partícula medio en el intervalo de $\geq 1\ \mu\text{m}$ a $\leq 5\ \mu\text{m}$, preferentemente con una distribución de tamaño estrecha.

En otra forma de realización preferente, las partículas magnéticas o magnéticamente atraíbles son partículas que presentan un núcleo magnético basado en óxido de hierro, seleccionado preferentemente del grupo que comprende magnetita (Fe_3O_4), magemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y/o ferritas.

45 Las partículas de sílice magnéticas que se pueden usar ventajosamente están descritas, por ejemplo, en la solicitud internacional de patente WO 01/71732, a la que se hace referencia en su totalidad por la presente.

En una forma de realización preferente se puede usar una matriz a base de uno o varios compuestos de óxido de silicio en forma de partículas magnéticas o magnéticamente atraíbles con una superficie de sílice.

Preferentemente se realiza la unión a temperaturas en el intervalo de $\geq 15\ ^\circ\text{C}$ a $\leq 75\ ^\circ\text{C}$, preferentemente en el intervalo de $\geq 20\ ^\circ\text{C}$ a $\leq 70\ ^\circ\text{C}$, de forma particularmente preferente en el intervalo de $\geq 46\ ^\circ\text{C}$ a $\leq 65\ ^\circ\text{C}$, mucho más preferentemente de $\geq 50\ ^\circ\text{C}$ a $\leq 60\ ^\circ\text{C}$. La unión se puede realizar también a temperatura ambiente, por ejemplo, a $\geq 15\ ^\circ\text{C}$ a $\leq 28\ ^\circ\text{C}$.

Después de la incubación se separan los ácidos nucleicos unidos a la matriz a base de uno o varios compuestos de óxido de silicio de la composición de lisis y/o unión. Con el uso de partículas de sílice magnéticas, esto se puede conseguir con ayuda de un campo magnético. Por ejemplo, las partículas magnéticas se pueden atraer hacia la pared del recipiente en el que ha tenido lugar la incubación, recogerse en puntas de pipeta adecuadas mediante aplicación de un campo magnético o inmovilizarse en varillas magnéticas protegidas por envolturas de plástico. Son etapas de procedimiento adecuadas para la retirada de la composición de lisis y/o unión, por ejemplo, el pipeteado o aspiración del líquido o la elevación de las partículas magnéticas en puntas de pipeta o en varillas magnéticas o el descenso de la preparación de lisis y/o unión, permaneciendo las partículas magnéticas separadas a la misma altura.

- Opcionalmente, el ácido o los ácidos nucleicos inmovilizados sobre la matriz se pueden lavar antes de la separación. La etapa de lavado tiene lugar preferentemente mediante incubación de una solución de lavado con las partículas cargadas, realizándose preferentemente una resuspensión de las partículas, por ejemplo, mediante agitación o aplicación de un campo magnético. La solución de lavado contaminada se retira preferentemente al igual que la composición de lisis y/o unión que permanece después de la unión, en particular una mezcla de composición de lisis y/o unión.
- Como reactivo de lavado se puede usar un tampón de lavado convencional o cualquier otro medio adecuado. En general se prefieren reactivos de lavado con una fuerza iónica de baja a moderada, por ejemplo, una solución de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) 10 mM. Además se pueden usar tampones de lavado que presentan mayores concentraciones de sales, por ejemplo, una solución de clorhidrato de guanidinio 4-6 M. Los reactivos de lavado de acuerdo con la invención que se han descrito anteriormente representan también reactivos de lavado adecuados.
- Además se pueden usar reactivos de lavado que contienen alcohol, por ejemplo, soluciones acuosas de alcoholes con uno a cinco átomos de carbono, preferentemente soluciones acuosas de etanol, en particular soluciones acuosas de etanol al 50-100 por ciento.
- Preferentemente, el ácido o los ácidos nucleicos inmovilizados sobre la matriz se lavan varias veces, por ejemplo de 2 a 4 veces, preferentemente con distintos reactivos de lavado. En formas de realización preferentes se realiza el lavado en primer lugar con reactivos de lavado con una fuerza iónica de baja a moderada y a continuación con una solución acuosa de etanol al 70-100 por ciento.
- En particular un uso de partículas magnéticas posibilita una realización sencilla de etapas de separación y/o lavado mediante la agregación magnética de las partículas.
- Después de la última etapa de lavado o una etapa de enjuagado con agua ("water rinse") se puede efectuar una etapa de secado de las partículas preferentemente magnéticas, por ejemplo, al vacío o mediante evaporación o dejando evaporar el líquido.
- De acuerdo con la etapa d) del procedimiento, los ácidos nucleicos unidos se pueden separar de la matriz. La separación de los ácidos nucleicos se denomina también elución.
- También puede ser preferente usar los ácidos nucleicos unidos a la matriz, en particular a partículas magnéticas, sin separación, por ejemplo, para PCR u otros métodos de amplificación, procedimientos de detección de ADN o procedimientos de identificación de ADN.
- El ácido nucleico unido se puede separar mediante un reactivo de elución con un reducido contenido de sal de las partículas. Como reactivo de elución con un reducido contenido de sal se pueden usar en particular reactivos con un contenido de sal de menos de 0,1 mol/l. De forma particularmente preferente, el reactivo de elución contiene el compuesto de tampón tris(hidroximetil)aminometano (Tris). Además, es particularmente adecuada para la elución agua desmineralizada, opcionalmente con uno o varios aditivos, por ejemplo, complejantes tales como etilendiamina-tetraacetato (EDTA), azida y/o compuestos de tampón, por ejemplo, tris(hidroximetil)aminometano (Tris).
- En particular mediante el uso de la composición de lisis y/o unión resulta un procedimiento particularmente ventajoso para el aislamiento de ácidos nucleicos de muestras biológicas, en particular para el aislamiento de ADN de virus.
- Resultan ventajas en particular a partir de los buenos rendimientos que se pueden obtener después incluso de almacenamiento de los reactivos de lisis y/o unión.
- La presente invención se refiere además a un kit para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos de una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos que comprende un reactivo de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con la invención.
- En formas de realización preferentes, el kit puede contener además una matriz a base de uno o varios compuestos de óxido de silicio, en particular una matriz a base de uno o varios compuestos de óxido de silicio en forma de partículas magnéticas o magnéticamente atraíbles con una superficie de sílice. Las partículas de sílice magnéticas contenidas preferentemente están descritas, por ejemplo, en la solicitud internacional de patente WO 01/71732 a la que se hace referencia en su totalidad por la presente.
- En otra forma de realización preferente, el kit puede contener además reactivos de lavado y/o elución adecuados, en particular un reactivo de lavado de acuerdo con la invención.
- En otra forma de realización preferente, el kit en lugar de partículas de sílice magnéticas puede contener otros materiales de soporte silanizados, preferentemente columnas de centrifuga con membranas de sílice.

La presente invención se refiere además al uso de tensioactivos no iónicos basados en polioxietileno, en concreto éteres de alcohol graso de polioxietileno seleccionados del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno para la solubilización de lípidos de una muestra biológica.

5 Por el término "lípidos" en el sentido de la presente invención se ha de entender sustancias naturales insolubles en agua o al menos en su mayor parte insolubles en agua. El término "lípidos" comprende en el sentido de la presente invención ácidos grasos, el grupo de los triglicéridos que comprende grasas y aceites, ceras, fosfolípidos, esfingolípidos, liposacáridos y el grupo de los isoprenoides que comprende esteroides y carotinoides. En particular, por el término "lípidos" se ha de entender constituyentes lipídicos o componentes estructurales de las membranas
10 celulares de organismos tales como fosfolípidos y esfingolípidos.

Se prefiere un uso de tensioactivos no iónicos basados en polioxietileno, en concreto éter de alcohol graso de polioxietileno seleccionado del grupo cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno para la solubilización de lípidos de una muestra biológica en procedimientos para el aislamiento y/o la
15 purificación de ácidos nucleicos de una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos.

En este caso, para los tensioactivos no iónicos basados en polioxietileno se hace referencia en su totalidad a la anterior descripción.

20 Se prefiere en particular un uso de éteres de alcohol graso de polioxietileno seleccionados del grupo que comprende cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno para la solubilización de lípidos de una muestra biológica en procedimientos para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos de una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos.

25 Se prefiere en especial un uso de los tensioactivos no iónicos basados en polioxietileno, en concreto éteres de alcohol graso de polioxietileno seleccionados del grupo cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno para la solubilización de lípidos de una muestra biológica en procedimientos para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos mediante el uso de una matriz a base de uno o varios compuestos de óxido de silicio preferentemente en forma de partículas magnéticas o magnéticamente atraíbles con una
30 superficie de sílice.

De forma ventajosa se ha podido constatar que con un uso de estos tensioactivos no iónicos basados en polioxietileno en procedimientos para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos mediante el uso de una matriz a base de uno o varios compuestos de óxido de silicio, preferentemente en forma de partículas magnéticas o magnéticamente atraíbles con una superficie de sílice, no estaban contenidas impurezas o al menos claramente
35 menos impurezas en el eluido.

Además, la invención se refiere al uso de tensioactivos no iónicos basados en polioxietileno, en concreto éteres de alcohol graso de polioxietileno seleccionados del grupo cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u
40 oleiléter de polioxietileno para la preparación de reactivos de unión, lisis y/o lavado estables en almacenamiento.

En este caso, para los tensioactivos no iónicos basados en polioxietileno se hace referencia en su totalidad a la anterior descripción.

45 A este respecto, por "estables en almacenamiento" se ha de entender preferentemente que las propiedades pertinentes para la respectiva aplicación del reactivo de lisis, unión o lavado con almacenamiento en un periodo de tiempo de tres meses, preferentemente de 6 meses, más preferentemente de al menos 8 meses no cambian de tal manera que por ello se altere sustancialmente la aplicación. En una forma de realización preferente se muestra la estabilidad en almacenamiento a temperatura ambiente, más preferentemente incluso a una temperatura de
50 almacenamiento elevada de, por ejemplo, 50 °C.

Como una de las propiedades pertinentes de los reactivos para la aplicación ha resultado el valor de pH. El mismo, por tanto, durante el almacenamiento de los reactivos preferentemente no cambia de forma sustancial, preferentemente el valor del pH durante el almacenamiento de los reactivos disminuye menos de 1.
55

Resultan otras particularidades, características y ventajas del objeto de la invención a partir de las reivindicaciones dependientes así como de la siguiente descripción de las figuras y ejemplos correspondientes en los que están representados de forma ilustrativa ejemplos de realización de la presente invención.

60 La Figura 1a, 1b muestra el cambio del valor del pH del reactivo de lisis B de acuerdo con la invención, representado como barras no rellenas, y del reactivo de lisis A que contiene Tween 20®, representado como barras rellenas, durante 33 semanas de almacenamiento a 25 °C (Figura 1a) y 50 °C (Figura 1b).

65 La Figura 2 muestra los valores medios de los valores de CT después de PCR en tiempo real específica para VHB del ADN de VHB después de la realización de preparaciones de ADN viral con el reactivo de lisis B de acuerdo con la invención y el reactivo de lisis A que contiene Tween® 20.

La Figura 3 muestra los valores medios de los valores de CT después de PCR en tiempo real específica para VHB de ADN de VHB después de la realización de preparaciones de ADN viral con el reactivo de lisis B de acuerdo con la invención y el reactivo de lisis A que contiene Tween® 20 después de 10 semanas de almacenamiento a 50 °C. En este caso, un reactivo de lisis A que se había almacenado durante aproximadamente 4 semanas a temperatura ambiente sirvió de referencia. Se usaron respectivamente 6 µl y 24 µl del eluido para la PCR en tiempo real, representándose los resultados para 6 µl del eluido como barras no rellenas y representándose los de 24 µl del eluido como barras rellenas.

10 La invención se explica a continuación también mediante ejemplos. Se entiende que los mismos se han de considerar como meramente ilustrativos y no han de representar ninguna limitación de la presente invención.

Ejemplo 1: Examen de la estabilidad

15 Un reactivo de lisis A que contenía el 20 % (p/v) de Tween® 20 (empresa Fluka), isotiocianato de guanidinio y tris(hidroximetil)aminometano y reactivo de lisis B, en el que se substituyó el Tween® 20 por el 20 % (p/v) de Brij® 58 (empresa Sigma) se prepararon de forma fresca en agua bidestilada y se almacenaron respectivamente en recipientes cerrados durante 33 semanas a 25 °C y 50 °C.

20 En este caso se determinó en el momento del almacenamiento así como a intervalos semanales respectivamente el valor de pH de las soluciones con ayuda de un pH-metro (empresa Metrohm) a temperaturas en el intervalo de 20 °C a 28 °C.

25 Mediante el diagrama de barras representado en la Figura 1a se puede ver que el valor de pH del reactivo de lisis A durante 33 semanas de almacenamiento a 25 °C disminuyó ligeramente de aproximadamente pH 7,8 a pH 7,2, mientras que el valor del pH durante 33 semanas de almacenamiento a 50 °C disminuyó de aproximadamente pH 7,8 a aproximadamente pH 5,9, tal como está representado en la Figura 1b. Frente a esto, el valor de pH del reactivo de lisis B durante las 33 semanas de almacenamiento a 25 °C y 50 °C permaneció estable en aproximadamente pH 8.

Ejemplo 2: Extracción de ADN viral

35 Se mezcló plasma humano negativo, es decir, sin virus VHB, con 10⁴ sgU/ml de virus de la hepatitis B (VHB). De respectivamente 1000 µl de la muestra de plasma se extrajo el ADN viral mediante el uso de la plataforma de automatización disponible en el mercado QIASymphony® (empresa Qiagen) mediante el protocolo automatizado para la purificación de ácido nucleico viral de muestras de plasma.

40 De acuerdo con el protocolo usado, la muestra se puso en contacto con los volúmenes definidos en el protocolo de reactivo B que contiene isotiocianato de guanidinio, tris(hidroximetil)aminometano y el 20 % (p/v) de Brij® 58 (empresa Sigma) y proteinasa K y solución AVE que contenía ARN transportador. Se realizó una incubación a 65 °C para la lisis de la muestra. A continuación se añadió a la preparación de muestra el volumen definido en el protocolo de reactivo de unión C que contenía isotiocianato de guanidinio, tris(hidroximetil)aminometano y el 9 % (p/v) de Brij® 58 (empresa Sigma) así como isopropanol. Después de otra incubación durante 3 minutos se añadió suspensión MagAttract que contenía las partículas magnéticas de óxido de silicio y se mezcló como está previsto en el protocolo. Durante este tiempo se unen los ácidos nucleicos a las partículas de óxido de silicio. A continuación se separaron las partículas magnéticas de óxido de silicio y se retiró la fase líquida. A las partículas de óxido de silicio a continuación se añadió el volumen definido en el protocolo de solución de lavado que contenía tiocianato de guanidinio y etanol y se suspendieron las partículas en la solución de lavado. Se realizó una nueva retirada del sobrenadante así como la adición del volumen definido en el protocolo de solución de lavado que contenía Tris, NaCl y etanol y una segunda etapa de lavado. Después de la separación y retirada de la fase líquida, las partículas se lavaron con el volumen definido en el protocolo de etanol acuoso al 80 %. Después de la separación de las partículas se retiró el sobrenadante y se realizó un secado al aire de las partículas durante 8 minutos. Para eluir el ADN se añadieron los volúmenes definidos en el protocolo de solución de elución E y se suspendieron en su interior las partículas durante 3 minutos. A continuación se retiraron las partículas y se obtuvo el eluido.

55 De acuerdo con este protocolo, de una muestra de plasma de 1000 µl adicional se extrajo ADN viral, usándose como modificación reactivo de lisis A que contenía el 20 % (p/v) de Tween® 20 (empresa Fluka) y reactivo de unión D que contenía el 9 % (p/v) de Tween® 20 (empresa Fluka).

60 Los eluidos obtenidos se sometieron respectivamente a una PCR en tiempo real (RT) específica para VHB, usándose respectivamente 24 µl de eluido. De los valores medios representados en la Figura 2 de los valores de CT (Threshold Cycle, "ciclo de valor umbral"), que describen el ciclo en el que la fluorescencia comienza a aumentar logarítmicamente, se puede reconocer que la extracción mediante el uso del reactivo de lisis B de acuerdo con la invención y el reactivo de unión C obtuvo un mayor rendimiento.

65

Ejemplo 3: Extracción de ADN viral después de almacenamiento del reactivo de lisis

5 Los reactivos de lisis B que contenían isotiocianato de guanidinio, tris(hidroximetil)aminometano y el 20 % (p/v) de Brij® 58 (empresa Sigma) y A, en el que el Brij® 58 estaba sustituido por el 20 % (p/v) de Tween® 20 (empresa Fluka), se almacenaron respectivamente en recipientes cerrados durante 10 semanas a 50 °C.

10 A continuación, mediante el uso de la plataforma de automatización disponible en el mercado QIASymphony® (empresa Qiagen) mediante el protocolo automatizado para la purificación de ácido nucleico viral de muestras de plasma se extrajo el ácido nucleico viral.

15 De acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 2 se extrajo de respectivamente 1000 µl de la muestra de plasma el ADN viral mediante el uso de la plataforma de automatización disponible en el mercado QIASymphony® (empresa Qiagen), usándose para diferentes preparaciones reactivo de lisis B almacenado respectivamente durante 10 semanas a 50 °C que contenía isotiocianato de guanidinio, tris(hidroximetil)aminometano y el 20 % (p/v) de Brij® 58 (empresa Sigma) y reactivo de lisis A, en el que el Brij® 58 estaba sustituido por el 20 % (p/v) de Tween® 20 (empresa Fluka). Como referencia sirvió un reactivo de lisis A que se almacenó a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 semanas.

20 Se constató que los eluidos que se obtuvieron mediante el uso del reactivo de lisis A almacenado a 50 °C estaban intensamente enturbiados, mientras que los eluidos que se obtuvieron mediante el uso del reactivo de lisis B eran claros.

25 De los eluidos obtenidos, respectivamente 6 µl y 24 µl se sometieron a una PCR en tiempo real (RT) específica para VHB. A partir de los valores medios representados en la Figura 3 de los valores de CT se puede observar que la extracción mediante el uso del reactivo de lisis B de acuerdo con la invención y el reactivo de unión C obtuvo un mayor rendimiento.

REIVINDICACIONES

1. Reactivo de lisis, unión y/o lavado que comprende:
- 5 - al menos un compuesto caotrópico,
 - al menos un compuesto de tampón seleccionado preferentemente del grupo que comprende tris(hidroximetil)aminometano, N-(tri(hidroximetil)metil)glicina, N,N-bis(2-hidroxietil)-glicina, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico, ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico), ácido piperazin-1,4-bis(2-etanosulfónico), ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico, ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico y/o tampón fosfato y
- 10 - al menos un tensioactivo no iónico basado en polioxietileno que es un éter de alcohol graso de polioxietileno seleccionado del grupo cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno en el intervalo de $\geq 8\%$ en peso/volumen a $\leq 30\%$ en peso/volumen en relación con el volumen total del reactivo.
- 15 2. Reactivo de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el éter de alcohol graso de polioxietileno comprende un constituyente de polioxietileno que contiene de 2 a 150 unidades de $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$.
- 20 3. Reactivo de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que el éter de alcohol graso de polioxietileno es un cetiléter de polioxietileno.
4. Reactivo de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el reactivo de lisis, unión y/o lavado comprende tensioactivo no iónico en el intervalo de $\geq 9\%$ en peso/volumen a $\leq 30\%$ en peso/volumen, preferentemente en el intervalo de $\geq 10\%$ en peso/volumen a $\leq 30\%$ en peso/volumen, con preferencia en el intervalo de $\geq 15\%$ en peso/volumen a $\leq 20\%$ en peso/volumen en relación con el volumen total del reactivo.
- 25 5. Reactivo de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el compuesto caotrópico es una sal de sodio o guanidinio seleccionada, preferentemente, del grupo que comprende ioduro sódico, perclorato sódico, clorhidrato de guanidinio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio y/o una mezcla de dos o varias sales de los mismos.
- 30 6. Reactivo de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el reactivo de unión comprende un alanol ramificado o no ramificado, preferentemente un alcohol ramificado o no ramificado con uno a cinco átomos de carbono seleccionado preferentemente del grupo que comprende metanol, etanol, isopropanol, n-propanol, n-butanol, butanol o pentanol ramificado o no ramificado y/o mezclas de los mismos.
- 35 7. Uso de un reactivo de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos.
- 40 8. Procedimiento para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos de una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos que comprende las siguientes etapas del procedimiento:
- a) lisis de la muestra biológica,
- 45 b) inmovilización del ácido o los ácidos nucleicos liberados en una matriz a base de uno o varios compuestos de óxido de silicio en presencia de un compuesto caotrópico y/o un alanol ramificado o no ramificado,
- c) opcionalmente lavado del ácido o los ácidos nucleicos inmovilizados sobre la matriz,
- d) opcionalmente separación del ácido nucleico unido,
- llevándose a cabo la lisis y/o inmovilización en presencia de una composición de lisis y/o unión que comprende:
- 50 - al menos un compuesto caotrópico
 - al menos un compuesto de tampón y
 - al menos un tensioactivo no iónico basado en polioxietileno que es un éter de alcohol graso de polioxietileno seleccionado del grupo cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno en el intervalo de $\geq 0,1\%$ en peso/volumen a $\leq 30\%$ en peso/volumen en relación con el volumen total de la
- 55 composición.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que el éter de alcohol graso de polioxietileno comprende un constituyente de polioxietileno que contiene de 2 a 150 unidades de $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$.
- 60 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, caracterizado por que el éter de alcohol graso de polioxietileno es un cetiléter de polioxietileno.
11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la composición de lisis y/o unión comprende tensioactivo no iónico en el intervalo de $\geq 0,2\%$ en peso/volumen a $\leq 30\%$ en peso/volumen, preferentemente en el intervalo de $\geq 3\%$ en peso/volumen a $\leq 10\%$ en peso/volumen, con
- 65

preferencia en el intervalo de $\geq 3,2$ % en peso/volumen a ≤ 8 % en peso/volumen en relación con el volumen total de la composición.

5 12. Kit para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos de una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos que comprende un reactivo de lisis, unión y/o lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6.

10 13. Uso de tensioactivos no iónicos basados en polioxietileno, en concreto éter de alcohol graso de polioxietileno seleccionado del grupo cetiléter de polioxietileno, esteariléter de polioxietileno y/u oleiléter de polioxietileno para la preparación de reactivos de unión, lisis y/o lavado estables en almacenamiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 6.

14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, siendo el éter de alcohol graso de polioxietileno un cetiléter de polioxietileno.

Fig. 1a

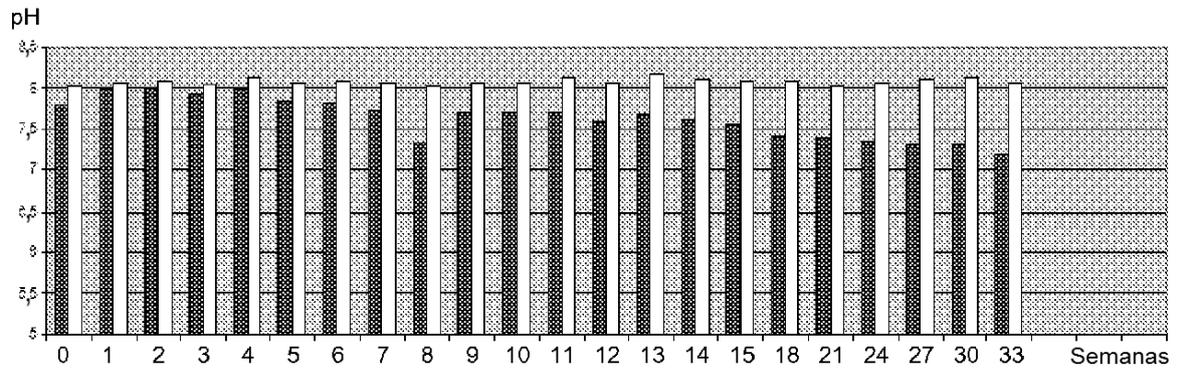


Fig. 1b

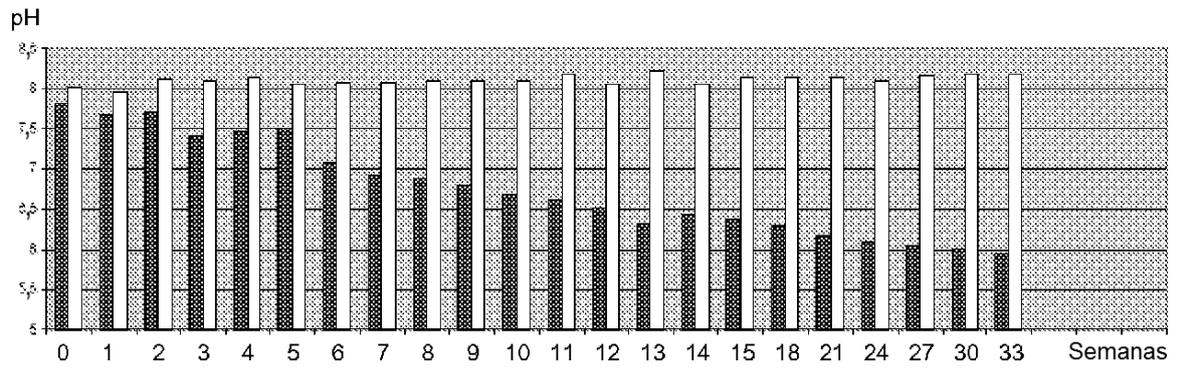


Fig. 2

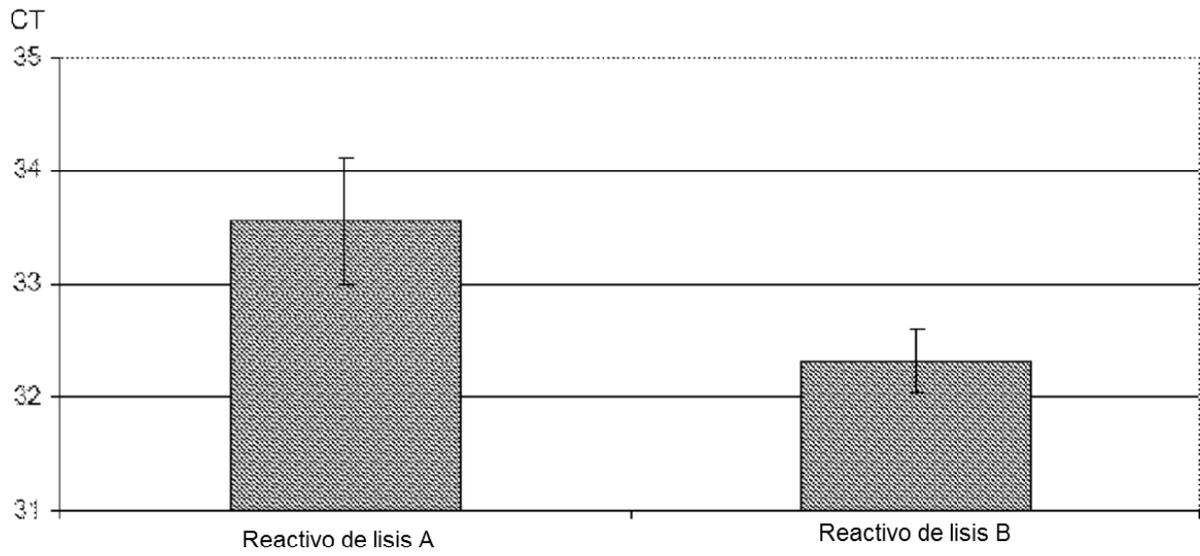


Fig. 3

