(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 535 809**

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2004** **E 04024138 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015** **EP 1524317**

(54) Título: **Métodos para aislar ácidos nucleicos**

(30) Prioridad:

13.10.2003 EP 03023039
28.07.2004 EP 04017856

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.05.2015

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es:

BERGMANN, FRANK, DR.;
KIRCHGESSER, MICHAEL, DR.;
WALTER, THOMAS, DR.;
WEINDEL, KURT, DR.;
ZIELENSKI, RALF y
SAROFIM, EMAD

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 535 809 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

Métodos para aislar ácidos nucleicos

La presente invención se refiere a la purificación de un ácido nucleico. Particularmente, la invención se refiere a métodos para adsorber un ácido nucleico presente en una solución de adsorción acuosa en un sustrato sólido.

Muchas sustancias biológicas, especialmente ácidos nucleicos, presentan retos especiales con respecto a su aislamiento de su ambiente natural. Por un lado, están presentes con frecuencia en concentraciones muy pequeñas y, por otro lado, se encuentran frecuentemente en presencia de muchas otras sustancias sólidas y disueltas por ejemplo después de la lisis de células. Esto los hace difícil de aislar o medir, en particular en ensayos bioespecíficos que permiten la detección de ácidos nucleicos específicos, o la detección de propiedades específicas de un ácido nucleico. Dichos ensayos bioespecíficos desempeñan un papel importante en el campo del diagnóstico y la bioanalítica en investigación y desarrollo. Son ejemplos para ensayos bioespecíficos los ensayos de hibridación, inmunoensayos y ensayos de receptor-ligando. Los ensayos de hibridación usan la formación de pares de bases específica para la detección molecular de analitos de ácido nucleico, por ejemplo ARN y ADN. Por lo tanto, las sondas oligonucleotídicas con una longitud de 18 a 20 nucleótidos pueden permitir el reconocimiento específico de una secuencia complementaria seleccionada por ejemplo en el genoma humano. Otro ensayo que implica la unión selectiva de dos cebadores oligonucleotídicos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita en el documento US 4.683.195. Este método permite la amplificación selectiva de una región de ácido nucleico específica hasta niveles detectables por una polimerasa termoestable en presencia de desoxinucleótidos trifosfatos en varios ciclos.

Como se ha descrito anteriormente, antes de poder analizar los ácidos nucleicos en uno de los ensayos anteriormente mencionados o usarse para otros procesos, tienen que aislarse o purificarse a partir de muestras biológicas que contienen mezclas complejas de diferentes componentes como por ejemplo componentes proteicos y no proteicos. Con frecuencia, para las primeras etapas, se usan procesos que permiten el enriquecimiento del componente de interés, es decir los ácidos nucleicos. Frecuentemente, estos están contenidos en una célula bacteriana, una célula fúngica, una partícula viral o la célula de un organismo más complejo, tal como una célula de sangre humana o una célula vegetal. Los ácidos nucleicos como componente de interés también pueden denominarse "componente diana".

Para liberar los contenidos de dichas células o partículas, se pueden tratar con enzimas o con productos químicos para disolver, degradar o desnaturalizar las paredes celulares y las membranas celulares de dichos organismos. Este proceso se denomina habitualmente lisis. La solución resultante que contiene dicho material lisado se denomina lisado. Un problema que se encuentra con frecuencia durante la lisis es que otras enzimas que degradan el componente diana, por ejemplo desoxirribonucleasas o ribonucleasas que degradan ácidos nucleicos, entran en contacto con el componente diana durante la lisis. Estas enzimas degradantes también pueden estar presentes fuera de las células o pueden haberse separado espacialmente en diferentes compartimentos celulares antes de la lisis y entrar ahora en contacto con el componente diana. Otros componentes liberados durante este proceso pueden ser por ejemplo endotoxinas que pertenecen a la familia de lipopolisacáridos que son tóxicos para células y pueden provocar problemas para productos que se pretende usar en terapia humana o animal.

En las siguientes etapas de la preparación de muestras que continúa en la etapa de lisis, los ácidos nucleicos se enriquecen adicionalmente. Los ácidos nucleicos se extraen normalmente de las mezclas de lisis complejas antes de usarse en un ensayo basado en sondas. Hay varios métodos para la extracción de ácidos nucleicos. Los métodos dependientes de secuencia o bioespecíficos incluyen, por ejemplo, cromatografía de afinidad o hibridación con sondas inmovilizadas. Los métodos independientes de secuencia o físico-químicos incluyen, por ejemplo, extracción de líquido-líquido con fenol-cloroformo, precipitación con etanol puro o isopropanol, extracción con papel de filtro, extracción con agentes formadores de micelas como cetil-trimetil-amonio-bromuro, unión con colorantes inmovilizados, de intercalación tales como derivados de acridina, adsorción en sustratos tales como gel de sílice o tierras diatomeas, adsorción en partículas de vidrio que pueden atraerse magnéticamente (MGP) o partículas de organo silano en condiciones caotrópicas. Se prefiere la unión directa de los ácidos nucleicos con un sustrato tal como un material con una superficie de sílice porque entre otras razones los ácidos nucleicos no tienen que modificarse e incluso pueden unirse a ácidos nucleicos nativos.

Es particularmente interesante para fines de extracción la adsorción de ácidos nucleicos en una superficie de vidrio aunque son posibles otras superficies.

Se han propuesto muchos procedimientos para aislar ácidos nucleicos de su ambiente natural en años recientes mediante el uso de su comportamiento de unión con sustratos tales como superficies de vidrio. Es habitual usar agentes caotrópicos tales como, por ejemplo, tiocianato de guanidina o detergentes aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos o no iónicos cuando se pretende liberar ácidos nucleicos. También es una ventaja usar proteasas que degradan rápidamente estas enzimas o proteínas no deseadas. Los ácidos nucleicos que se liberan, por ejemplo, después de lisis celular y/o lisis de orgánulos celulares tales como mitocondrias, plástidos, núcleos u otros orgánulos que contienen ácido nucleico, pueden purificarse por medio de la unión con un sustrato tal como un soporte mineral,

lavando dicho soporte mineral con los ácidos nucleicos unidos y liberando, es decir desorbiendo dichos ácidos nucleicos de dicho soporte mineral. Para una etapa de lavado el experto en la materia elige las condiciones en las que los ácidos nucleicos permanecen adsorbidos en el soporte mineral. Preferentemente, más del 40 %, más preferentemente más del 50 %, más preferentemente más del 70 %, más preferentemente más del 80 %, aún más preferentemente más del 90 %, aún más preferentemente más del 95 %, aún más preferentemente más del 99 % de los ácidos nucleicos permanecen adsorbidos en el soporte mineral. Para la etapa de desorción el experto en la materia elige las condiciones en las que los ácidos nucleicos se liberan del soporte mineral. Preferentemente, más del 40 %, más preferentemente más del 50 %, más preferentemente más del 70 %, más preferentemente más del 80 %, aún más preferentemente más del 90 %, aún más preferentemente más del 95 %, aún más preferentemente más del 99 % de los ácidos nucleicos se liberan del soporte mineral.

Se conoce en la técnica la adsorción de ácidos nucleicos con partículas de vidrio o partículas de sílice en presencia de sales caotrópicas (Vogelstein, B., y Gillespie, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 615-619) y proporciona la base de los procesos de purificación y separación cromatográficos para ácidos nucleicos. También se conocen en la técnica métodos para aislar y purificar ARN y ADN de lisados usando altas concentraciones de sales caotrópicas, por ejemplo, yoduro sódico, perclorato sódico y tiocianato de guanidina (Boom, R., *et al*., J. Clin. Microbiol. 28 (1990) 495-503; Yamada, O., et al., J. Virol. Methods 27 (1990) 203-209). La purificación de ADN plasmídico de bacterias en partículas de vidrio en presencia de perclorato sódico se describe en Marko, M.A., *et al*., Anal. Biochem. 121 (1982) 382-387. En el documento DE 37 24 442, se describe el aislamiento de ADN de fago M13 monocatenario en filtros de fibra de vidrio precipitando partículas de fago usando ácido acético y lisis de las partículas de fago con perclorato. Los ácidos nucleicos unidos a los filtros de fibra de vidrio se lavan y después se eluyen con un tampón de Tris/EDTA que contiene metanol. Se describe un procedimiento similar para purificar ADN de fagos lambda en Jakobi, R., *et al*., Anal. Biochem. 175 (1988) 196-201. El procedimiento implica la unión selectiva de ácidos nucleicos con superficies de vidrio en soluciones de sal caotrópica y separar los ácidos nucleicos de contaminantes tales como agarosa, proteínas o residuos celulares. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, las partículas pueden centrifugarse o se extraen fluidos a través de filtros de fibra de vidrio. Hay una etapa limitante, sin embargo, que evita que el procedimiento se use para procesar grandes cantidades de muestras.

El uso de partículas magnéticas para inmovilizar ácidos nucleicos después de la precipitación añadiendo sal y etanol es más ventajoso y se describe por ejemplo en: Alderton, R.P., *et al*., Anal. Biochem. 201 (1992) 166-169 y el documento WO 91/00212. En este procedimiento, los ácidos nucleicos se aglutinan junto con las partículas magnéticas. El aglutinado se separa del disolvente original aplicando un campo magnético y realizando una etapa de lavado. Después de una etapa de lavado, los ácidos nucleicos se disuelven en un tampón Tris. Este procedimiento tiene una desventaja, sin embargo, porque la precipitación no es selectiva para ácidos nucleicos. En su lugar, se aglutinan también una diversidad de sustancias sólidas y disueltas. Como resultado, este procedimiento no puede usarse para retirar cantidades significativas de ningún inhibidor de reacciones enzimáticas específicas que puedan estar presentes. También está disponible en el mercado vidrio poroso, magnético, que contiene partículas magnéticas en una matriz de vidrio en particular, poroso, y está cubierto con una capa que contiene estreptavidina. Este producto puede usarse para aislar materiales biológicos, por ejemplo, proteínas o ácidos nucleicos, si se modifican en una etapa de preparación compleja de modo que se unan covalentemente con la biotina. Los adsorbentes particulares imantables han demostrado ser muy eficaces y adecuados para la preparación de muestras automática. Se usan para este fin pigmentos ferrimagnéticos y ferromagnéticos así como superparamagnéticos. Las MGP más preferidas son los descritos en el documento WO 01/37291.

También se aplica purificación de un ácido nucleico por medio de adsorción de la misma en un sustrato tal como un sustrato mineral en presencia de alta concentración de sales a otras mezclas complejas. Los expertos en la materia de la biología molecular conocen ejemplos de los mismos e incluyen mezclas de reacción después de, por ejemplo, síntesis *in vitro* de ácidos nucleicos tales como PCR, digestiones por enzimas de restricción, reacciones de ligamiento, etc. En Vogelstein, B., y Gillespie, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 615-619, por ejemplo, se propone un procedimiento para unir ácidos nucleicos de geles de agarosa en presencia de yoduro sódico con vidrio de pedernal molido. Otra aplicación para la purificación de un ácido nucleico por medio de la adsorción del mismo con un sustrato, tal como un sustrato mineral, en presencia de una alta concentración de sales, es la retirada de contaminantes pirógenos que pueden haberse copurificado con el ácido nucleico.

El mecanismo por el que los ácidos nucleicos se unen con el soporte mineral en presencia de agentes caotrópicos no está completamente claro. Se plantea la hipótesis de que la interacción entre los ácidos nucleicos y el disolvente se ve influida de modo que los ácidos nucleicos se adsorban en el soporte mineral y se desnaturalicen. En presencia de altas concentraciones de agentes caotrópicos la reacción es casi cuantitativa. Los ácidos nucleicos adsorbidos pueden eluirse aplicando al soporte mineral tampones de baja fuerza iónica.

El documento EP 0 658 164 describe un método para la purificación cromatográfica de ácidos nucleicos por medio de purificación cromatográfica. Se adsorben ácidos nucleicos en un sustrato, es decir un soporte mineral, a partir de una solución de adsorción acuosa con una alta concentración salina que contiene preferentemente un agente caotrópico. La solución de adsorción acuosa comprende 1 %-50 % de alcohol alifático con una longitud de cadena de C1-C5 y/o polietilenglicol y/o polímeros inorgánicos y/u orgánicos hidrófobos y/o ácido orgánico tal como ácido tricloroacético.

El documento EP 0 512 767 describe métodos para la purificación de ADN con soportes sólidos usando tampones de unión con compuestos orgánicos como acetonitrilo en ciertas concentraciones.

Los métodos para el aislamiento/purificación de ácidos nucleicos del estado de la técnica tienen ciertas desventajas. Dichas desventajas se refieren a por ejemplo pureza, selectividad, velocidad de recuperación, seguridad de laboratorio y conveniencia, así como a la velocidad del proceso de aislamiento/purificación.

Por ejemplo, en protocolos que usan una extracción con fenol/cloroformo, el fenol residual es con frecuencia un problema para ciertos procedimientos después del aislamiento, particularmente para reacciones enzimáticas tales como una digestión con una enzima de restricción, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o una reacción mediada por la ligasa. En general, las concentraciones elevadas de reactivos residuales del proceso de purificación/aislamiento pueden presentar un problema. Se desea por lo tanto mantener cantidades residuales de los reactivos usados durante el procedimiento de purificación tan bajas como sea posible en el ácido nucleico purificado. Otro problema potencial relacionado con la pureza es la extracción conjunta de ciertas sustancias de la matriz de adsorción (lixiviación). Se desea por lo tanto mantener cantidades residuales de compuestos liberados durante el procedimiento de purificación por lixiviación tan bajas como sea posible en el ácido nucleico purificado.

Otra desventaja de los protocolos del estado de la técnica que usan etanol o isopropanol en la solución de adsorción es la alta volatilidad e inflamabilidad de dichos alcoholes. Por un lado, estos alcoholes inflamables son peligros potenciales en la práctica de laboratorio. Además, dependiendo de las regulaciones nacionales, los alcoholes inflamables pueden presentar problemas logísticos con respecto al almacenamiento y transporte permisible. Además, los alcoholes volátiles son difíciles de dosificar con precisión debido a su presión de vapor. Se desea por lo tanto reemplazar alcoholes inflamables por sustancias que sean menos peligrosas y/o que presenten menos problemas logísticos.

Son kits ejemplares que están disponibles en el mercado para la preparación de muestras de ácidos nucleicos la línea de productos "High Pure" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). La solución de adsorción se transfiere a una columna de "High Pure" y se pasa a través de un vellón que contiene material de fibra de vidrio. Durante este proceso los ácidos nucleicos se adsorben en el material de vidrio. Cuando se usan las columnas del kit "High Pure" de Roche y un protocolo para aislamiento/purificación de ácidos nucleicos del suero haciendo uso del etanol en la solución de adsorción se ha observado que altas concentraciones de triglicéridos en suero conducen a un tiempo prolongado necesario para pasar la solución de adsorción a través del vellón de fibra de vidrio (véase también Ejemplo 6). Se desea por lo tanto identificar un sustituto para etanol que, teniendo en cuenta la preparación de muestras de suero con altas concentraciones de triglicéridos, reduce el tiempo necesario para pasar la solución de adsorción a través del vellón de fibra de vidrio.

El problema subyacente a la presente invención es por lo tanto proporcionar un método alternativo para la purificación de un ácido nucleico usando sustancias alternativas en la solución de adsorción acuosa, para facilitar la unión de un ácido nucleico con un sustrato tal como un soporte mineral.

Sorprendentemente, se ha descubierto que un ácido nucleico puede unirse con un sustrato si la solución de adsorción de alta fuerza iónica contiene un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I,

$$W \equiv Z \text{ (Fórmula I)}$$

en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno.

Por lo tanto, un método útil para la purificación de un ácido nucleico que comprende las etapas de: a) adsorber en un sustrato el ácido nucleico de una composición que contiene (i) un tampón acuoso, (ii) sales en una alta concentración y (iii) un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I,

$$W \equiv Z \text{ (Fórmula I)}$$

en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno, y (iv) el ácido nucleico; b) opcionalmente lavar con una solución de lavado el sustrato con el ácido nucleico adsorbido, seguido de c) poner en contacto el sustrato con el ácido nucleico adsorbido con una solución que contiene sales en una concentración menor en comparación con la composición de la etapa (a), desorbiendo de este modo el ácido nucleico del sustrato, y d) separar la solución con el ácido nucleico desorbido del sustrato, purificando de este modo el ácido nucleico, y opcionalmente (e) precipitar el ácido nucleico desorbido de la solución de la etapa (d) y aislar el ácido nucleico precipitado, purificando adicionalmente de este modo el ácido nucleico.

También es útil un método para adsorber un ácido nucleico en un sustrato, que comprende las etapas de (a) proporcionar el ácido nucleico en una solución acuosa que contiene sales en una alta concentración y un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende una grupo funcional de Fórmula I, en la que W es un átomo de

carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno; seguido de (b) añadir la solución acuosa de la etapa (a) al sustrato.

Es útil además un método para adsorber un ácido nucleico en un sustrato, que comprende las etapas de (a) proporcionar el ácido nucleico en una solución acuosa que contiene sales en una alta concentración; (b) proporcionar el sustrato en forma de material en polvo; (c) proporcionar un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I, en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno; seguido de dispersar el sustrato de la etapa (b) en el compuesto orgánico no ácido miscible en agua de la etapa (c) para formar una suspensión de dicho sustrato; y (e) mezclar la solución acuosa de la etapa (a) con la suspensión de la etapa (d).

Es útil además una suspensión que contiene un sustrato en forma de material en polvo disperso en un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I, en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno.

Es útil además el uso de un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I, en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno, para realizar los métodos de acuerdo con la invención descrita en el presente documento. También es útil el uso de un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I, en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno, para preparar una suspensión por medio de dispersión de un sustrato en dicho compuesto orgánico no ácido miscible en agua para formar una suspensión de dicho sustrato. Es útil además el uso de una suspensión mencionada anteriormente para realizar un método de acuerdo con la invención.

También son útiles kits de partes que contienen un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I, por lo que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno.

También se ha descubierto que los ácidos nucleicos pueden unirse a un sustrato si la solución de adsorción de alta fuerza iónica contiene un diéter cíclico miscible en agua.

Por lo tanto, es útil además un método para la purificación de un ácido nucleico, que comprende las etapas de: adsorber en un sustrato la forma de ácido nucleico de una composición que contiene (i) un tampón acuoso, (ii) sales en una alta concentración, (iii) un diéter cíclico miscible en agua, (iv) el ácido nucleico; b) opcionalmente lavar con una solución de lavado el sustrato con el ácido nucleico adsorbido; seguido de c) poner en contacto el sustrato con el ácido nucleico adsorbido con una solución que contiene sales en una concentración menor en comparación con la composición de la etapa (a), desorbiendo de este modo el ácido nucleico del sustrato; y (d) separar la solución con el ácido nucleico desorbido del sustrato, purificando de este modo el ácido nucleico, y opcionalmente (e) precipitar el ácido nucleico desorbido de la solución de la etapa (d) y aislar el ácido nucleico precipitado, purificando adicionalmente de este modo el ácido nucleico.

Es útil además un método para adsorber un ácido nucleico en un sustrato, que comprende las etapas de (a) proporcionar el ácido nucleico en una solución acuosa que contiene sales en una alta concentración y un diéter cíclico miscible en agua; y (b) añadir la solución acuosa de la etapa (a) al sustrato.

También es útil un método para adsorber un ácido nucleico en un sustrato, que comprende las etapas de (a) proporcionar el ácido nucleico en una solución acuosa que contiene sales en una alta concentración; (b) proporcionar el sustrato en forma de material en polvo; (c) proporcionar un diéter cíclico miscible en agua; (d) dispersar el sustrato de la etapa (b) en el diéter cíclico miscible en agua de la etapa (c) para formar una suspensión de dicho sustrato; y (e) mezclar la solución acuosa de la etapa (a) con la suspensión de la etapa (d).

Es útil además una suspensión que contiene un sustrato en forma de material en polvo dispersado en un diéter cíclico miscible en agua.

También es útil el uso de un diéter cíclico miscible en agua, para realizar los métodos de acuerdo con la invención descrita en el presente documento. Es útil además el uso de un diéter cíclico miscible en agua para preparar una suspensión por medio de dispersión de un sustrato en dicho compuesto orgánico no ácido miscible en agua para formar una suspensión de dicho sustrato. También es útil el uso de una suspensión descrita en el presente documento para realizar un método de acuerdo con la invención.

Son útiles además kits de partes que contienen un diéter cíclico miscible en agua.

También es útil un método para determinar la presencia de un ácido nucleico en una muestra biológica, que comprende las etapas de: (a) lisar la muestra biológica; (b) formar una composición que contiene (i) la muestra biológica lisada de la etapa (a), (ii) un tampón acuoso, (iii) sales en una alta concentración, (iv) un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I,

W ≡ Z (Fórmula I)

en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno; (c) poner en contacto la composición de la etapa (b) con un sustrato, adsorbiendo de este modo el ácido nucleico en el sustrato; (d) opcionalmente lavar con una solución de lavado el sustrato con el ácido nucleico adsorbido; seguido de (e) poner en contacto el sustrato con el ácido nucleico adsorbido con una solución que contiene sales en una concentración menor en comparación con la composición de la etapa (a), desorbiendo de este modo el ácido nucleico del sustrato; y (f) separar la solución con el ácido nucleico desorbido del sustrato; y (g) detectar en la solución de la etapa (f) la presencia del ácido nucleico, determinando de este modo la presencia del ácido nucleico. Preferentemente, el ácido nucleico se determina mediante la amplificación del ácido nucleico por medio de la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos, una sonda de detección específica, y una mezcla de amplificación, por lo que la amplificación se controla en tiempo real.

También es útil un método para determinar la presencia de un ácido nucleico en una muestra biológica, que comprende las etapas de: (a) lisar la muestra biológica; (b) formar una composición que contiene (i) la muestra biológica lisada de la etapa (a), (ii) un tampón acuoso, (iii) sales en una alta concentración, (iv) un diéter cíclico miscible en agua, en la que W es una átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno; (c) poner en contacto la composición de la etapa (b) con un sustrato, adsorbiendo de este modo el ácido nucleico con el sustrato; (d) opcionalmente lavar con una solución de lavado el sustrato con el ácido nucleico adsorbido; seguido de (e) poner en contacto el sustrato con el ácido nucleico adsorbido con una solución que contiene sales en una concentración menor en comparación con la composición de la etapa (a), desorbiendo de este modo el ácido nucleico del sustrato; y (f) separar la solución con el ácido nucleico desorbido del sustrato; y (g) detectar en la solución de la etapa (f) la presencia del ácido nucleico, determinando de este modo la presencia del ácido nucleico

En el presente documento se entiende que la expresión "un ácido nucleico" indica al menos un ácido nucleico. Además, la expresión "un ácido nucleico" también puede indicar una mezcla de ácidos nucleicos. La expresión "ácido nucleico" abarca ARN, ADN o ambos. El término "sustrato" indica una sustancia que es sustancialmente insoluble en una solución acuosa y en la que un ácido nucleico en una solución acuosa de alta fuerza iónica puede adsorberse cuando se añade la sustancia. Estos ejemplos son por lo tanto partículas minerales porosas o no porosas tales como sílice, vidrio, cuarzo, zeolitas o mezclas de los mismos. Además, el término "sustrato" abarca partículas que pueden atraerse magnéticamente recubiertas con sílice, vidrio, cuarzo o zeolitas. Además, se entiende que un sustrato en forma de "polvo" o material "en polvo" se refiere a material finamente dividido que, cuando se dispersa en una fase líquida tal como un compuesto orgánico líquido o una solución acuosa, produce una suspensión. Se entiende que el término "polvo" o material "en polvo" incluye comprimidos, en los que el material en polvo se ha agregado, pero aún produce una suspensión cuando se combina con el compuesto orgánico líquido o la solución acuosa. Además, se entiende que las expresiones "alta fuerza iónica" y "alta concentración" significan la fuerza iónica o concentración en una solución acuosa que resulta de sales disueltas en concentraciones iguales a o mayores de aproximadamente 1 M. Se prefieren sales presentes en la solución acuosa en concentraciones de 1 a 10 M. Se prefieren más sales caotrópicas en concentraciones de 1 a 8 M. Además, la expresión "miscible en agua" indica que a temperatura ambiente y presión atmosférica normal el compuesto orgánico no acuoso puede disolverse en agua a una relación igual a o mayor de 1 % (por ciento) en volumen, para formar una fase líquida homogénea. La expresión compuesto orgánico "no ácido" indica un compuesto orgánico que carece de una función carboxi.

En detalle, el procedimiento para unir un (al menos un) ácido nucleico (también denominado ácido nucleico diana) a un sustrato tal como, por ejemplo, partículas de vidrio puede describirse de la siguiente manera. Se realiza preferentemente en presencia de sales caotrópicas con una concentración de entre 1 y 8 mol/l, y preferentemente entre 2 y 6 mol/l. Las sales caotrópicas pueden ser yoduro sódico, perclorato sódico, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina o clorhidrato de guanidina. También son posibles otras sustancias tales como cloruro de litio, cloruro sódico, cloruro potásico, acetato sódico, urea y mezclas de los mismos.

El efecto de purificación resulta del comportamiento de ADN o ARN para unirse con material con una superficie de vidrio en estas condiciones es decir en presencia de ciertas concentraciones de un agente caotrópico y, preferentemente, un compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Para poner la muestra en contacto con el sustrato, es decir el material con una afinidad por ácidos nucleicos, la muestra se mezcla con el material y se incuba durante un período de tiempo suficiente para que se produzca la unión. Los expertos están habitualmente familiarizados con la duración de la etapa de incubación de procedimientos para realizar el tratamiento con partículas no magnéticas. Esta etapa puede optimizarse determinando la cantidad de material biológico inmovilizado en la superficie en diferentes puntos temporales. Los tiempos de incubación de entre 10 segundos y 30 minutos pueden ser apropiados para ácidos nucleicos. Después de la incubación, el componente diana unido (al menos uno), es decir el ácido nucleico o los ácidos nucleicos, se separa del líquido. Esto puede conseguirse en general por gravedad o en el caso conveniente de ácidos nucleicos unidos a partículas de vidrio magnéticas separando el material unido a estas partículas magnéticas aplicando un campo magnético. Por ejemplo, las partículas magnéticas pueden atraerse a la pared del vaso en el que se ha realizado la incubación. El líquido que contiene los contenidos de muestra que no se habían unido con las partículas magnéticas puede después retirarse. El procedimiento de

retirada usado depende del tipo de recipiente en el que se realice la incubación. Las etapas adecuadas incluyen retirar el líquido mediante pipeteo o aspiración.

Otro ejemplo es la unión del ácido nucleico en la solución de adsorción con un vellón de vidrio. Los kits comerciales proporcionan con frecuencia dicho vellón en el fondo de una columna. La solución de adsorción que contiene el ácido nucleico se transfiere a la columna y se pasa a través del vellón aplicando fuerza. El término "fuerza" incluye fuerza gravitacional y, preferentemente, fuerza centrífuga. Se prefiere en gran medida el procedimiento de "columna de centrifugación" en el que la disolución de adsorción se pasa a través del filtro debido a la aplicación de fuerza por medio de centrifugación. Otros modos de pasar la solución de adsorción a través del vellón incluyen la aplicación de presión o succión.

El material con el ADN o ARN unido puede después lavarse al menos una vez. Preferentemente, la solución de lavado contiene entre más de 1 y menos de 100 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua. También preferentemente, la solución de lavado contiene entre 1 y 100 por cien en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Más preferentemente, la solución de lavado es una mezcla de 1-50 % en volumen de un compuesto orgánico no ácido miscible en agua en agua. Otra solución de lavado muy preferida es una mezcla del 40-80 % en volumen de un compuesto orgánico no ácido miscible en agua con agua. Otra solución de lavado preferida en gran medida es una mezcla del 50-99 % en volumen de un compuesto orgánico no ácido miscible en agua con agua. Se prefiere aún más una solución de lavado que es una mezcla de aproximadamente el 70 % en volumen de un compuesto orgánico no ácido miscible en agua con agua. También se prefiere para lavar el compuesto orgánico no ácido miscible en agua, es decir también se entiende que el compuesto líquido puro como se obtiene de proveedores comerciales está abarcado por la expresión "solución de lavado".

Se usa una solución de lavado que no provoca que el (al menos un) ácido nucleico o los ácidos nucleicos diana se liberen de la superficie del material pero que retira por lavado los contaminantes no deseados tan exhaustivamente como sea posible. Esta etapa de lavado tiene lugar preferentemente incubando el material con el ácido nucleico o los ácidos nucleicos diana unidos con la solución de lavado. El material se resuspende preferentemente durante esta etapa. También preferentemente, en caso de que el material sea un vellón de vidrio o un empaquetado en una columna, la etapa de lavado tiene lugar aclarando la columna con la solución de lavado. Preferentemente, la solución de lavado se pasa a través de la columna aplicando presión, succión, fuerza centrífuga o fuerza gravitacional. Lo anterior se aplica igualmente cuando el compuesto orgánico no ácido miscible en agua se usa en forma pura.

La solución de lavado contaminada se retira preferentemente justo igual que en la etapa descrita anteriormente para unión del ácido nucleico con el material de substrato. Después de la última etapa de lavado, el material puede secarse brevemente en vacío, o puede permitirse que se evapore el fluido. También puede realizarse una etapa de pretratamiento usando acetona.

Posteriormente, las condiciones pueden invertirse, por ejemplo, se reduce la concentración del agente caotrópico o el compuesto orgánico no ácido miscible en agua para eluir el ADN o ARN unido con el material. Preferentemente, el proceso para separar el sustrato, por ejemplo, las partículas de vidrio magnéticas, del resto de la muestra se realiza sedimentando el material biológico inmovilizado, por ejemplo, por fuerza gravitatoria o mediante el uso de un imán, en el caso de partículas de vidrio magnéticas y la retirada del sobrenadante. Después, las partículas de vidrio magnéticas con el material biológico inmovilizado se resuspenden en una solución acuosa sin o con solamente una cantidad pequeña de agente caotrópico y/o un compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Como alternativa, la suspensión puede diluirse con una solución sin o con solamente una cantidad pequeña de agente caotrópico y/o un compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Se conocen tampones de esta naturaleza del documento DE 37 24 442 y Jakobi, R., *et al*., Anal. Biochem. 175 (1988) 196-201. Los tampones de elución con un bajo contenido en sal son en particular tampones con un contenido de menos de 0,2 mol/l. Preferentemente, el tampón de elución contiene la sustancia Tris para fines de tamponamiento. También preferentemente, el tampón de elución es agua desmineralizada. La solución que contiene ADN o ARN purificado puede usarse ahora para otras reacciones. Opcionalmente, el ácido nucleico o los ácidos nucleicos pueden precipitarse de la solución usando, por ejemplo, etanol o isopropanol. El precipitado también puede someterse a etapas de lavado adicionales. Se conocen bien por el experto en la materia métodos de este tipo y se describen en detalle en Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, CSHL Press, 2001.

Para las etapas de lavado en los métodos de la invención, se usan preferentemente líquidos que son adecuados para procesos en biología molecular, en particular procesos de purificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) que usan la unión de estas sustancias con partículas de vidrio en ciertas condiciones. Los líquidos preferidos comprenden un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I,

$$W \equiv Z \text{ (Fórmula I)}$$

en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno. Preferentemente, el grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en un grupo oxo, un grupo sulfoxo, un

grupo ciano y un grupo carbonilo de una función de carbamoilo o una amida pero que no pertenece a una función carboxi. Más preferentemente, el compuesto orgánico no ácido miscible en agua se selecciona del grupo que consiste en acetona, acetilacetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dietilcetona, metiletilcetona, metilpropilcetona, isobutilmetilcetona, gamma-butirolactona, gamma-valerolactona, propilencarbonato y N-metil-2-pirrolidona. También son útiles líquidos que comprenden como un compuesto orgánico no ácido miscible en agua un diéter cíclico. Preferentemente, el diéter cíclico es dioxano.

Las partículas de vidrio magnéticas usadas en la presente invención pueden proporcionarse en diferentes formulaciones. Es posible proporcionarlas en la forma de un comprimido, como un polvo o como una suspensión. Mucho más preferentemente, se suspenden partículas de vidrio magnéticas en el compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Preferentemente, estas suspensiones contienen entre 5 y 60 mg/ml de partículas de vidrio magnéticas (MGP). También preferentemente, el material que contiene sílice se suspende en soluciones tamponadas acuosas que pueden contener opcionalmente un agente caotrópico en una concentración de entre 2 y 8 mol/l, y preferentemente entre 4 y 6 mol/l. Las sales caotrópicas son yoduro sódico, perclorato sódico, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina o clorhidrato de guanidina. Otros compuestos conocidos por los expertos en la materia también son posibles. Un agente caotrópico de acuerdo con la presente invención es cualquier sustancia química que altere la estructura ordenada de agua líquida y tiene el efecto de que el ADN o ARN se une con las partículas de vidrio magnéticas si este agente está presente en la solución que contiene ADN o ARN. Es obvio para el experto en la materia producir soluciones tamponadas acuosas adecuadas. Pueden encontrarse sistemas de tampón que son adecuados para fines de biología molecular por ejemplo, en Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, CSHL Press, 2001. Son sustancias de tampón preferidas Tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS), fosfato, N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES), sales de los mismos u otras sustancias adecuadas. Adicionalmente pueden estar presentes sustancias que modifican la fuerza iónica de la solución como por ejemplo, NaCl, KCl o $CaCl_2$ o que son agentes de formación de complejos de cationes metálicos como por ejemplo ácido etilen-diamin-tetra-acético (EDTA) o las sales de los mismos. También pueden estar presentes otras sustancias biológicas conocidas por los expertos en la materia.

El método de acuerdo con la presente invención es adecuado para la purificación de ácidos nucleicos, es decir ARN o ADN, a partir de mezclas complejas con otras sustancias biológicas que las contienen. De este modo también pueden purificarse mezclas de diferentes ácidos nucleicos, incluso mezclas que contienen un ácido nucleico de interés en escasa abundancia. Por lo tanto, la presente invención también abarca la purificación de mezclas de ácidos nucleicos específicos en los que el ácido nucleico o los ácidos nucleicos diana pueden ser un componente menor con respecto a concentración (o pueden estar presentes en baja abundancia).

El procedimiento descrito puede usarse para aislar ácidos nucleicos nativos o modificados. Se entiende que los ácidos nucleicos nativos son ácidos nucleicos, cuya estructura no se cambió irreversiblemente en comparación con los ácidos nucleicos de origen natural. Esto no significa, sin embargo, que no puedan modificarse otros componentes de la muestra. Los ácidos nucleicos modificados incluyen ácidos nucleicos que no aparecen en la naturaleza, por ejemplo, ácidos nucleicos que se modifican uniéndolos con grupos que son reactivos, detectables o con capacidad de inmovilización. Un ejemplo de esto son ácidos nucleicos biotinilados.

Después de las etapas descritas anteriormente, los ácidos nucleicos aislados usando los métodos de acuerdo con la invención pueden usarse ahora adicionalmente según sea necesario. Por ejemplo, pueden usarse como un sustrato para diversas reacciones enzimáticas. Cuando están implicados los ácidos nucleicos, pueden usarse para secuenciación, marcaje radiactivo o no radiactivo, amplificación de una o más de las secuencias que contienen, transcripción, hibridación con ácidos nucleicos sonda marcados, traducción o ligamiento. Por lo tanto, la invención también abarca el método que comprende la etapa de liberar los ácidos nucleicos diana unidos del material con una afinidad con los mismos. Si se desea, el ácido nucleico o los ácidos nucleicos diana purificados de esta manera pueden separarse del material como se ha descrito anteriormente.

Por lo tanto, una realización de la invención es un método para la purificación de un ácido nucleico, que comprende las etapas de:

(a) adsorber en un sustrato mineral poroso o no poroso seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, fibras de vidrio, fibras de cuarzo, zeolitas y partículas que pueden atraerse magnéticamente recubiertas con vidrio la secuencia de ácido nucleico $W \equiv Z$ independientemente de una composición que contiene

(i) un tampón acuoso,

(ii) sales en una concentración igual a o mayor de 1 M,

(iii) un compuesto orgánico no ácido miscible en agua, que comprende un grupo funcional de Fórmula I,

$$W \equiv Z \text{ (Fórmula I)}$$

en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno,
en la que el grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en un grupo oxo, un grupo sulfoxo, un grupo ciano, y un grupo carbonilo de una función carbamoilo o una amida pero que no pertenece a una función carboxi, y el compuesto orgánico no ácido miscible en agua se selecciona del grupo que consiste en acetilacetona, dimetilsulfóxido, dietilcetona, metiletilcetona, metilpropilcetona, isobutilmetilcetona, gamma-butirolactona, gamma-valerolactona, propilencarbonato y N-metil-2-pirrolidona, y
por lo que la composición de la etapa (a) contiene de 1 a 50 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua, y el compuesto orgánico no ácido miscible en agua se disuelve para formar una fase líquida homogénea,
(iv) el ácido nucleico;

(b) opcionalmente lavar con una solución de lavado el sustrato con el ácido nucleico adsorbido; seguido de

(c) poner en contacto el sustrato con el ácido nucleico adsorbido con una solución que contiene sales en una concentración menor en comparación con la composición de la etapa (a), desorbiendo de este modo el ácido nucleico del sustrato; y

(d) separar la solución con el ácido nucleico desorbido del sustrato, purificando de este modo el ácido nucleico; y opcionalmente

(e) precipitar el ácido nucleico desorbido de la solución de la etapa (d) y aislar el ácido nucleico precipitado, purificando adicionalmente de este modo el ácido nucleico.

También se contempla que la composición de la etapa (a) se usa en procesos automáticos para la purificación de un (al menos un) ácido nucleico. Los dispositivos de procesamiento automáticos capaces de realizar los métodos de la invención, tales como robots con un dispositivo de pipeteo, con frecuencia tienen recipientes abiertos que contienen soluciones, por ejemplo soluciones madre. A este respecto es ventajoso que las fases líquidas de las soluciones contengan un disolvente que bajo presión atmosférica normal y a temperatura ambiente tengan una baja tendencia a evaporarse. Por lo tanto, muy preferentemente, el compuesto orgánico no ácido miscible en agua es dimetilsulfóxido. También muy preferentemente, el compuesto orgánico no ácido miscible en agua es N-metil-2-pirrolidona.

Preferentemente, la composición de la etapa (a) contiene del 2 al 35 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Aún más preferentemente, la composición de la etapa (a) contiene del 3 al 30 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Muy preferentemente, la composición de la etapa (a) contiene aproximadamente el 4 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Muy preferentemente, la composición de la etapa (a) contiene aproximadamente el 15 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Muy preferentemente, la composición de la etapa (a) contiene aproximadamente el 25 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua.

Preferentemente, las sales en la composición de la etapa (a) son sales caotrópicas en concentraciones de 1 a 8 M. Más preferentemente, dichas sales caotrópicas se seleccionan del grupo que consiste en perclorato sódico, clorhidrato de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina y yoduro sódico.

También preferentemente, las sales en la composición de la etapa (a) están en concentraciones de 1 a 10 M y dichas sales se seleccionan del grupo que consiste en cloruro de litio, cloruro sódico, cloruro potásico, acetato sódico, urea y mezclas de los mismos.

Preferentemente, la solución de lavado contiene el compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Más preferentemente, la solución de lavado contiene del 1 al 50 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Aún más preferentemente, la solución de lavado contiene del 2 al 35 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Aún más preferentemente, la solución de lavado contiene del 3 al 30 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Muy preferentemente, la solución de lavado contiene aproximadamente el 4 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Muy preferentemente, la solución de lavado contiene aproximadamente el 15 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua. Muy preferentemente, la solución de lavado contiene aproximadamente el 25 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua.

Preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral poroso o no poroso seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, fibras de vidrio, fibras de cuarzo y zeolitas. También preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral poroso o no poroso seleccionado del grupo que consiste en óxidos metálicos y/u óxidos mixtos metálicos, alúmina, titania, zirconia y materiales predominantemente consistentes en vidrio. También se prefiere que el sustrato mineral tenga un tamaño de partículas de 0,1 µm a 1000 µm. También se prefiere que los materiales de soporte minerales porosos, cuando se empleen, tengan un tamaño de poro de 2 a 1000 nm. Más preferentemente, los materiales de soporte porosos o no porosos, especialmente zeolitas, estén en forma de empaquetamientos sueltos. Aún más preferentemente, el sustrato mineral consiste en láminas de filtro en forma de

láminas de filtro de vidrio, cuarzo o cerámica, y/o una membrana que contiene gel de sílice y/o partículas o fibras de soportes minerales y tejidos de cuarzo o lana de vidrio. También se prefiere que el sustrato comprenda partículas que puedan atraerse magnéticamente. Más preferentemente, las partículas que pueden atraerse magnéticamente se recubren con un sustrato mineral seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, vidrio, cuarzo y zeolitas. Aún más preferentemente, el sustrato comprende partículas que pueden atraerse magnéticamente recubiertas con vidrio. El ácido nucleico o los ácidos nucleicos diana pueden detectarse y determinarse. Se prefiere el método de purificación anteriormente descrito, seguido de una etapa de determinación o detección o métodos de purificación seguidos de una etapa de amplificación y determinación o detección. El ácido nucleico o los ácidos nucleicos diana de interés pueden estar contenidos en una matriz de ácidos nucleicos no diana, y pueden ser incluso un componente menor en dicha mezcla de ácidos nucleicos específicos. Los expertos en la materia conocen métodos de detección de ADN adecuados y se describen en libros de texto convencionales como Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, CSHL Press, 2001; y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley and Sons, NY, 1987. También puede haber etapas de purificación adicionales antes de llevar a cabo la etapa de detección de ADN como por ejemplo una etapa de precipitación. Los métodos de detección pueden incluir pero sin limitación la unión o intercalación de colorantes específicos como bromuro de etidio que se intercala en el ADN bicatenario y cambia su fluorescencia a continuación. El ADN purificado también puede separarse por métodos electroforéticos, opcionalmente después de una digestión de restricción, y visualizarse posteriormente. También hay ensayos basados en sondas que aprovechan la hibridación de oligonucleótidos con secuencias específicas y detección posterior del híbrido. También es posible secuenciar el ADN después de etapas adicionales conocidas por los expertos en la materia. Otros métodos aplican una diversidad de secuencias de ADN a una microplaca de silicio con la que se unen sondas específicas y producen una señal cuando se unen secuencias complementarias.

La invención también abarca la mezcla de componentes proteicos y no proteicos que comprenden ácidos nucleicos en los que los ácidos nucleicos comprenden ADN o ARN o ambos.

La invención también abarca muestras biológicas, de las que se purifican ácidos nucleicos, que comprenden virus o células bacterianas, así como células aisladas de organismos multicelulares como por ejemplo células humanas y animales tales como leucocitos, y compuestos químicos inmunológicamente activos de alto y bajo peso molecular tales como haptenos, antígenos, anticuerpos y ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, líquido cerebral, esputo, heces, muestras de ensayo de biopsia, médula ósea, enjuagues bucales, suero sanguíneo, tejidos, orina o mezclas de los mismos. La presente invención también abarca muestras biológicas tales como un fluido del cuerpo humano o animal; preferentemente la muestra biológica es sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina. El plasma sanguíneo es preferentemente EDTA, heparina o plasma sanguíneo citratado. En una realización de la invención la muestra biológica comprende células bacterianas, células eucarióticas, virus o mezclas de los mismos. Una muestra biológica como se ha ejemplificado anteriormente, preferentemente en una forma procesada tal como un lisado, puede ser parte de la composición de la que se adsorbe el ácido nucleico (diana) con el sustrato.

También se prefiere que la mezcla de ácidos nucleicos y material proteico comprenda ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) o ambos, preferentemente el ADN o ARN o ambos derivan de un virus o un (al menos un) microorganismo. El virus puede ser virus de la hepatitis A (VHA), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus del papiloma humano (VPH) o parvovirus B19.

También se prefiere que un componente de ácido nucleico diana y los otros ácidos nucleicos se purifiquen esencialmente como se ha descrito anteriormente. Después el componente de ácido nucleico diana se manipula y detecta adicionalmente, es decir se amplifica con la reacción en cadena de la polimerasa que amplifica específicamente secuencias diana hasta cantidades detectables. Otras reacciones de amplificación posibles son la reacción en cadena de la ligasa (LCR, Wu, D.Y., y Wallace, R.B., Genomics 4 (1989) 560-569, y Barany, F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 189-193); Reacción en Cadena de la Polimerasa Ligasa (Barany, F., PCR Methods and Applic. 1 (1991) 5-16); Gap-LCR (Publicación de Patente PCT Nº WO90/01069); Reacción en Cadena de Reparación (Publicación de Patente Europea Nº EP 0 439 182 A2), 3SR (Kwoh, D.Y., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 1173-1177; Guatelli, J.C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 1874-1878; Publicación de Patente PCT Nº WO 92/08800), y NASBA (Patente de Estados Unidos Nº 5.130.238). Además, hay amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA), y amplificación Q-beta (para una revisión véase por ejemplo Whelen, A.C., y Persing, D.H., Annu. Rev. Microbiol. 50 (1996) 349-373; Abramson, R.D., y Myers, T.W., Curr. Opin. Biotechnol. 4 (1993) 41-47).

Se prefiere particularmente el método de detección TaqMan® desvelado en el documento WO 92/02638 y las Patentes de Estados Unidos correspondientes US 5.210.015; US 5.804.375; US 5.487.972. Este método aprovecha la actividad exonucleasa de una polimerasa para generar una señal. En detalle, el componente de ácido nucleico diana se detecta por un proceso que comprende poner en contacto la muestra con un oligonucleótido que contiene una secuencia complementaria de una región del componente de ácido nucleico diana y un oligonucleótido marcado que contiene una secuencia complementaria de una segunda región de la misma cadena de secuencia componente de ácido nucleico diana, pero que no incluye la secuencia de ácido nucleico definida por el primer oligonucleótido, para crear una mezcla de dobles cadenas durante las condiciones de hibridación, en el que las dobles cadenas

comprenden el ácido nucleico diana hibridado con el primer oligonucleótido y con el oligonucleótido marcado de modo que el extremo 3' del primer oligonucleótido está adyacente al extremo 5' del oligonucleótido marcado. Después esta mezcla se trata con una ácido nucleico polimerasa dependiente del molde que tiene una actividad nucleasa 5' a 3' en condiciones suficientes para permitir que la actividad nucleasa 5' a 3' de la polimerasa escinda el oligonucleótido marcado, hibridado, y libere fragmentos marcados. La señal generada por la hidrólisis del oligonucleótido marcado se detecta y/o se mide. La tecnología TaqMan® elimina la necesidad de que se forme y se haga detectable un complejo de reacción unido a fase sólida. En términos más generales, se desvela un procedimiento para la purificación de un componente de ácido nucleico diana seguido de una etapa de detección en el que la reacción de amplificación y/o detección es en una fase de solución homogénea.

Es útil una suspensión que contiene un sustrato en forma de un material en polvo dispersado en un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I,

$$W \equiv Z \text{ (Fórmula I)}$$

en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno. Preferentemente, el grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en un grupo oxo, un grupo sulfoxo, un grupo ciano y un grupo carbonilo de una función carbamoilo o una amida pero que no pertenecen a una función carboxi. Más preferentemente, el compuesto orgánico no ácido miscible en agua se selecciona del grupo que consiste en acetona, acetilacetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dietilcetona, metiletilcetona, metilpropilcetona, isobutilmetilcetona, gamma-butirolactona, gamma-valerolactona, propilencarbonato y N-metil-2-pirrolidona. También es útil que la suspensión descrita anteriormente se use en procesos automáticos para la purificación de un (al menos un) ácido nucleico. Los dispositivos de procesamiento automático capaces de realizar un método de la invención, tales como robots con un dispositivo de pipeteo, tienen con frecuencia recipientes abiertos que contienen soluciones, por ejemplo soluciones madre, y suspensiones tales como la suspensión mencionada anteriormente. A este respecto es ventajoso que las fases líquidas de las soluciones y/o suspensiones contengan un disolvente que bajo presión atmosférica normal y a temperatura ambiente tenga una baja tendencia a evaporarse. Por lo tanto, muy preferentemente, el compuesto orgánico no ácido miscible en agua es dimetilsulfóxido. También muy preferentemente, el compuesto orgánico no ácido miscible en agua es N-metil-2-pirrolidona.

Preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral en polvo poroso o no poroso seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, vidrio, cuarzo y zeolitas. También preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral en polvo poroso o no poroso seleccionado del grupo que consiste en óxidos metálicos y/u óxidos mixtos metálicos, alúmina, titania, zirconia y materiales predominantemente consistentes en vidrio. También se prefiere que el sustrato comprenda partículas que pueden atraerse magnéticamente. Más preferentemente, las partículas que pueden atraerse magnéticamente se recubren con un sustrato mineral seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, vidrio, cuarzo y zeolitas. Aún más preferentemente, el sustrato comprende partículas que pueden atraerse magnéticamente recubiertas con vidrio.

También es útil el uso de un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I,

$$W \equiv Z \text{ (Fórmula I)}$$

en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno, para realizar los métodos de acuerdo con la invención descritos en el presente documento.

Preferentemente, el grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en un grupo oxo, un grupo sulfoxo, un grupo ciano y un grupo carbonilo de una función carbamoilo o una amida pero que no pertenece a una función carboxi. Más preferentemente, el compuesto orgánico no ácido miscible en agua se selecciona del grupo que consiste en acetona, acetilacetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dietilcetona, metiletilcetona, metilpropilcetona, isobutilmetilcetona, gamma-butirolactona, gamma-valerolactona, propilencarbonato y N-metil-2-pirrolidona. También es útil que la suspensión descrita anteriormente se use en procesos automáticos para la purificación de un (al menos un) ácido nucleico. Los dispositivos de procesamiento automático capaces de realizar un método de la invención, tales como robots con un dispositivo de pipeteo, con frecuencia tienen recipientes abiertos que contienen soluciones, por ejemplo soluciones de reserva, y suspensiones tales como la suspensión mencionada anteriormente. A este respecto es ventajoso que las fases líquidas de las soluciones y/o suspensiones contengan un disolvente que bajo presión atmosférica normal y a temperatura ambiente tenga una baja tendencia a evaporarse. Por lo tanto, muy preferentemente, el compuesto orgánico no ácido miscible en agua es dimetilsulfóxido. También muy preferentemente, el compuesto orgánico no ácido miscible en agua es N-metil-2-pirrolidona.

También es útil el uso de un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I,

$$W \equiv Z \text{ (Fórmula I)}$$

en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno, para preparar una suspensión por medio de dispersión de un sustrato en dicho compuesto orgánico no ácido miscible en agua para formar una suspensión de dicho sustrato.

Preferentemente, el grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en un grupo oxo, un grupo sulfoxo, un grupo ciano y un grupo carbonilo de una función carbamoilo o una amida pero que no pertenece a un grupo carboxi. Más preferentemente, el compuesto orgánico no ácido miscible en agua se selecciona del grupo que consiste en acetona, acetilacetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dietilcetona, metiletilcetona, metilpropilcetona, isobutilmetilcetona, gamma-butirolactona, gamma-valerolactona, propilencarbonato, y N-metil-2-pirrolidona. También es útil que la suspensión descrita anteriormente se use en procesos automáticos para la purificación de un (al menos un) ácido nucleico. Los dispositivos de procesamiento automático capaces de realizar un método de la invención, tales como robots con un dispositivo de pipeteo, tienen con frecuencia recipientes abiertos que contienen soluciones, por ejemplo soluciones madre, y suspensiones tales como la suspensión mencionada anteriormente. A este respecto es ventajoso que las fases líquidas de las soluciones y/o suspensiones contengan un disolvente que bajo presión atmosférica normal y a temperatura ambiente tenga una baja tendencia a evaporarse. Por lo tanto, muy preferentemente, el compuesto orgánico no ácido miscible en agua es dimetilsulfóxido. También muy preferentemente, el compuesto orgánico no ácido miscible en agua es N-metil-2-pirrolidona.

Preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral poroso o no poroso en polvo seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, vidrio, cuarzo y zeolitas. También preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral poroso o no poroso en polvo seleccionado del grupo que consiste en óxidos metálicos y/u óxidos mixtos metálicos, alúmina, titania, zirconia y materiales predominantemente consistentes en vidrio. También se prefiere que el sustrato comprenda partículas que pueden atraerse magnéticamente. Más preferentemente, las partículas que pueden atraerse magnéticamente se recubren con un sustrato mineral seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, vidrio, cuarzo y zeolitas. Aún más preferentemente, el sustrato comprende partículas que pueden atraerse magnéticamente recubiertas con vidrio.

Es útil además el uso de una suspensión descrita anteriormente para realizar un método de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento.

También son útiles kits. Dichos kits conocidos en la técnica comprenden además utensilios de plástico que pueden usarse durante el procedimiento de preparación de muestras como por ejemplo placas de microtitulación en el formato de 96 o 384 pocillos o simplemente tubos de reacción ordinarios fabricados por ejemplo por Eppendorf, Hamburgo, Alemania, y todos los otros reactivos para llevar a cabo los métodos de acuerdo con la invención. Por lo tanto, el kit puede contener adicionalmente un material con una afinidad por ácidos nucleicos (y el (al menos un) componente de ácido nucleico diana), preferentemente el material con una afinidad por ácidos nucleicos (y el (al menos un) componente de ácido nucleico diana) comprende un material con una superficie de sílice. Preferentemente, el material con una superficie de sílice es un vidrio. Más preferentemente, el material con una afinidad por ácidos nucleicos es una composición que comprende partículas de vidrio magnéticas, es decir partículas que pueden atraerse magnéticamente recubiertas con vidrio. Otro material preferido con una afinidad por ácidos nucleicos es un intercambiador aniónico. El kit puede comprender además o adicionalmente un tampón de lisis que contiene por ejemplo agentes caotrópicos, detergentes o mezclas de los mismos que permiten la lisis de células. Estos componentes del kit descrito anteriormente pueden proporcionarse por separado en tubos o recipientes de almacenamiento. Dependiendo de la naturaleza de los componentes, estos pueden proporcionarse incluso en un único tubo o recipiente de almacenamiento. El kit puede comprender además o adicionalmente una solución de lavado que es adecuada para la etapa de lavado de las partículas de vidrio magnéticas cuando está unido a las mismas ADN o ARN. Esta solución de lavado puede contener un compuesto orgánico no ácido miscible en agua descrito en este documento y/o agentes caotrópicos en una solución tamponada o soluciones con un pH ácido sin un compuesto orgánico no ácido miscible en agua descrito en el presente documento y/o agentes caotrópicos como se han descrito anteriormente. Con frecuencia la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan como soluciones madre que se tienen que diluir antes de su uso. El kit puede comprender además o adicionalmente un eluyente o tampón de elución, es decir una solución o un tampón (por ejemplo Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) o agua pura para eluir el ADN o ARN unido a las partículas de vidrio magnéticas. Además, pueden estar presentes reactivos adicionales o soluciones tamponadas que pueden usarse para el proceso de purificación de un ácido nucleico, es decir ADN o ARN.

También es útil un kit de partes, que contiene (a) una solución madre concentrada de una sal de tampón y una sal caotrópica seleccionada del grupo que consiste en perclorato sódico, clorhidrato de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina y yoduro sódico; (b) un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I,

$$W \equiv Z \text{ (Fórmula I)}$$

en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno y el compuesto orgánico no ácido miscible en agua se selecciona del grupo que consiste en acetona, acetilacetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dietilcetona, metiletilcetona, metilpropilcetona, isobutilmetilcetona, gamma-butirolactona,

gamma-valerolactona, propilencarbonato y N-metil-2-pirrolidona; (c) soluciones de tampón; y (d) material cromatográfico y de filtración.
También es útil un kit de partes, que contiene (a) una solución madre concentrada de una sal de tampón y una sal seleccionada del grupo que consiste en cloruro de litio, cloruro sódico, cloruro potásico, acetato sódico, urea y mezclas de los mismos; (b) un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I,

$$W \equiv Z \text{ (Fórmula I)}$$

en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno y el compuesto orgánico no ácido miscible en agua se selecciona del grupo que consiste en acetona, acetilacetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dietilcetona, metiletilcetona, metilpropilcetona, isobutilmetilcetona, gamma-butirolactona, gamma-valerolactona, propilencarbonato y N-metil-2-pirrolidona; (c) soluciones de tampón; y (d) material cromatográfico y de filtración.

También es útil un kit de partes, que contiene (a) una solución madre concentrada de una sal de tampón y una sal caotrópica seleccionada del grupo que consiste en perclorato sódico, clorhidrato de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina y yoduro sódico; (b) una suspensión descrita anteriormente; (c) soluciones de tampón.

Es útil además un kit de partes, que contiene (a) una solución madre concentrada de una sal de tampón y una sal seleccionada del grupo que consiste en cloruro de litio, cloruro sódico, cloruro potásico, acetato sódico, urea, y mezclas de los mismos; (b) una suspensión descrita anteriormente; (c) soluciones de tampón.

Una realización preferida de la presente invención es usar los métodos de la presente invención en métodos automatizables como se describe, por ejemplo, en el documento WO 99/16781. Método automatizable significa que las etapas del método son adecuadas para llevar a cabo con un aparato o máquina capaz de actuar con poco o ningún control externo o influencia por un ser humano. Método automático significa que las etapas del método automatizable se llevan a cabo con un aparato o máquina capaz de actuar con poco o ningún control externo o influencia por un ser humano. Solamente las etapas de preparación para el método pueden tener que realizarse manualmente, por ejemplo los recipientes de almacenamiento tienen que llenarse y colocarse en su sitio, la elección de muestras tiene que realizarse por un ser humano y etapas adicionales conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo el funcionamiento del ordenador de control. El aparato o máquina puede por ejemplo añadir automáticamente líquidos, mezclar las muestras o llevar a cabo etapas de incubación a temperaturas específicas. Típicamente dicha máquina o aparato es un robot controlado por un ordenador que lleva a cabo un programa en el que se especifican las etapas y órdenes individuales. Son métodos automáticos preferidos los que se llevan a cabo en un formato de alto rendimiento lo que significa que los métodos y la máquina o aparato usados se optimizan para un alto rendimiento de muestras en un tiempo corto. En otra realización de la invención los métodos de acuerdo con la presente invención se usan en un proceso semiautomático que significa que algunas etapas de reacción pueden tener que realizarse manualmente. En una realización preferida de la invención, se toma una suspensión que contiene MGP (partículas de vidrio magnéticas) de un recipiente de almacenamiento y se añaden volúmenes parciales a diferentes recipientes de reacción. Los recipientes de reacción pueden ser tubos de reacción hechos de plásticos, con el tiempo en formato de placa de microtitulación que contienen 96 o 384 o más pocillos en los que puede llevarse a cabo una reacción. Sin embargo, estos recipientes pueden hacerse de otro material, por ejemplo de acero.

Resulta evidente para el experto en la materia que algunos de los compuestos orgánicos contemplados por la invención tienen capacidad de disolver ciertos materiales plásticos. Por lo tanto, cuando se determina la naturaleza de los recipientes de almacenamiento o reacción adecuados, el experto en la materia determinará en un número limitado de experimentos evidentes el material que se ajusta mejor para ejecutar los métodos de la invención o para producir kits.

Los kits descritos en el presente documento se usan para la purificación de ácidos nucleicos en investigación, bioanalítica o diagnóstico. En realizaciones preferidas de acuerdo con la invención los métodos de acuerdo con la invención se usan en un formato de alto rendimiento, es decir en un método automático que permite el análisis de un alto número de muestras diferentes en un tiempo muy corto.

También es útil un método para determinar la presencia de un ácido nucleico en una muestra biológica, que comprende las etapas de: (a) lisar la muestra biológica; (b) formar una composición que contiene (i) la muestra biológica lisada de la etapa (a), (ii) un tampón acuoso, (iii) sales en una alta concentración, (iv) un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I,

$$W \equiv Z \text{ (Fórmula I)}$$

en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno; (c) poner en contacto la composición de la etapa (b) con un sustrato, adsorbiendo de este modo el ácido nucleico en el

sustrato; (d) opcionalmente lavar con una solución de lavado el sustrato con el ácido nucleico adsorbido; seguido de (e) poner en contacto el sustrato con el ácido nucleico adsorbido con una solución que contiene sales en una concentración menor en comparación con la composición de la etapa (a), desorbiendo de este modo el ácido nucleico del sustrato; y (f) separar la solución con el ácido nucleico desorbido del sustrato; y (g) detectar en la solución de la etapa (f) la presencia del ácido nucleico, determinando de este modo la presencia del ácido nucleico. Preferentemente, el ácido nucleico se determina por amplificación del ácido nucleico por medio de la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos, una sonda de detección específica y una mezcla de amplificación, por lo que la amplificación se controla en tiempo real. También se prefiere determinar el ácido nucleico hibridando el ácido nucleico con una sonda de hibridación y detectar y/o cuantificar el híbrido. El experto en la materia es consciente del hecho de que no solamente un ácido nucleico puede actuar como una sonda de hibridación sino que también puede usarse un ácido nucleico que comprende uno o más análogos nucleosídicos. Además, se conocen en la técnica análogos de ácido nucleico tales como PNA que son capaces de formar híbridos detectables con ácidos nucleicos. Se entiende que el ácido nucleico para determinar es ADN o ARN. Se prefiere en gran medida el método anterior, por el que el ácido nucleico es ARN y la etapa (g) comprende (i) transcribir de forma inversa el ARN para formar un ADNc, (ii) amplificar posteriormente, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, el ADNc, (iii) detectar la presencia del ADNc determinando de este modo la presencia del ácido nucleico.

Los inventores también han descubierto que un diéter cíclico miscible en agua es un compuesto orgánico no ácido adecuado para realizar los métodos de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, también es útil un método para la purificación de un ácido nucleico, que comprende las etapas de: a) adsorber en un sustrato de ácido nucleico de una composición que contiene (i) un tampón acuoso, (ii) sales en una alta concentración, (iii) un diéter cíclico miscible en agua y (iv) el ácido nucleico; b) opcionalmente lavar con una solución de lavado el sustrato con el ácido nucleico adsorbido; seguido de c) poner en contacto el sustrato con el ácido nucleico adsorbido con una solución que contiene sales en una concentración menor en comparación con la composición de la etapa (a), desorbiendo de este modo el ácido nucleico del sustrato; y d) separar la solución con el ácido nucleico desorbido del sustrato, purificando de este modo el ácido nucleico; y opcionalmente (e) precipitar el ácido nucleico desorbido de la solución de la etapa (d) y aislar el ácido nucleico precipitado, purificando adicionalmente de este modo el ácido nucleico. Preferentemente, el diéter cíclico miscible en agua es dioxano.

Preferentemente, la composición de la etapa (a) contiene del 1 al 50 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Más preferentemente, la composición de la etapa (a) contiene del 2 al 35 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Aún más preferentemente, la composición de la etapa (a) contiene del 3 al 30 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Mucho más preferentemente, la composición de la etapa (a) contiene aproximadamente el 4 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Mucho más preferentemente, la composición de la etapa (a) contiene aproximadamente 15 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Mucho más preferentemente, la composición de la etapa (a) contiene aproximadamente 25 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua.

Preferentemente, las sales en la composición de la etapa (a) son sales caotrópicas en concentraciones de 1 a 8 M. Más preferentemente, dichas sales caotrópicas se seleccionan del grupo que consiste en perclorato sódico, clorhidrato de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina y yoduro sódico.

También preferentemente, las sales en la composición de la etapa (a) están en concentraciones de 1 a 10 M y dichas sales se seleccionan del grupo que consiste en cloruro de litio, cloruro sódico, cloruro potásico, acetato sódico, urea, y mezclas de los mismos.

Preferentemente, la solución de lavado contiene el diéter cíclico miscible en agua. Más preferentemente, la solución de lavado contiene del 1 al 50 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Aún más preferentemente, la solución de lavado contiene del 2 al 35 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Aún más preferentemente, la solución de lavado contiene del 3 al 30 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Mucho más preferentemente, la solución de lavado contiene aproximadamente un 4 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Mucho más preferentemente, la solución de lavado contiene aproximadamente el 15 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Mucho más preferentemente, la solución de lavado contiene aproximadamente el 25 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua.

Preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral poroso o no poroso seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, fibras de vidrio, fibras de cuarzo y zeolitas. También preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral poroso o no poroso seleccionado del grupo que consiste en óxidos metálicos y/u óxidos mixtos metálicos, alúmina, titania, zirconia y materiales predominantemente consistentes en vidrio. También se prefiere que el sustrato mineral tenga un tamaño de partícula de 0,1 µm a 1000 µm. También se prefiere que los materiales de soporte minerales porosos, cuando se empleen, tienen un tamaño de poro de 2 a 1000 nm. Más preferentemente, los materiales de soporte porosos o no porosos, especialmente zeolitas, están en forma de empaquetamientos sueltos. Aún más preferentemente, el sustrato mineral consiste en láminas de filtro en forma de vidrio, cuarzo o láminas de filtro de cerámica y/o una membrana que contiene gel de sílice y/o partículas o fibras de

soportes minerales y tejidos de cuarzo o lana de vidrio. También se prefiere que el sustrato comprenda partículas que pueden atraerse magnéticamente. Más preferentemente, las partículas que pueden atraerse magnéticamente se recubren con un sustrato mineral seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, vidrio, cuarzo y zeolitas. Aún más preferentemente, el sustrato comprende partículas que pueden atraerse magnéticamente recubiertas con vidrio.

Es útil además un método para adsorber un ácido nucleico en un sustrato, que comprende las etapas de (a) proporcionar el ácido nucleico en una solución acuosa que contiene sales en una alta concentración y un diéter cíclico miscible en agua; y (b) añadir la solución acuosa de la etapa (a) al sustrato. Preferentemente, el diéter cíclico miscible en agua es dioxano.

Preferentemente, la solución acuosa de la etapa (a) contiene del 1 al 50 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Más preferentemente, la solución acuosa de la etapa (a) contiene del 2 al 35 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Aún más preferentemente, la solución acuosa de la etapa (a) contiene del 3 al 30 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Mucho más preferentemente, la solución acuosa de la etapa (a) contiene aproximadamente el 4 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Mucho más preferentemente, la solución acuosa de la etapa (a) contiene aproximadamente el 15 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Mucho más preferentemente, la solución acuosa de la etapa (a) contiene aproximadamente el 25 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua.

Preferentemente, las sales en la solución acuosa de la etapa (a) son sales caotrópicas en concentraciones de 1 a 8 M. Más preferentemente, dichas sales caotrópicas se seleccionan del grupo que consiste en perclorato sódico, clorhidrato de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidinio y yoduro sódico.

También preferentemente, las sales en la solución acuosa de la etapa (a) están en concentraciones de 1 a 10 M y dichas sales se seleccionan del grupo que consiste en cloruro de litio, cloruro sódico, cloruro potásico, acetato sódico, urea, y mezclas de los mismos.

Preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral poroso o no poroso seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, fibras de vidrio, fibras de cuarzo y zeolitas. También preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral poroso o no poroso seleccionado del grupo que consiste en óxidos metálicos y/u óxidos mixtos metálicos, alúmina, titania, zirconia y materiales predominantemente consistentes en vidrio. También se prefiere que el sustrato mineral tenga un tamaño de partícula de 0,1 µm a 1000 µm. También se prefiere que los materiales de soporte mineral porosos, cuando se empleen, tengan un tamaño de poro de 2 a 1000 nm. Más preferentemente, los materiales de soporte porosos o no porosos, especialmente zeolitas, están en forma de empaquetamientos sueltos. Aún más preferentemente, el sustrato mineral consiste en láminas de filtro en forma de láminas de filtro de vidrio, cuarzo o cerámica y/o una membrana que contiene gel de sílice y/o partículas o fibras de soportes minerales y tejidos de cuarzo o lana de vidrio. También se prefiere que el sustrato comprenda partículas que pueden atraerse magnéticamente. Más preferentemente, las partículas que pueden atraerse magnéticamente se recubren con un sustrato mineral seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, vidrio, cuarzo y zeolitas. Aún más preferentemente, el sustrato comprende partículas que pueden atraerse magnéticamente recubiertas con vidrio.

También es útil un método para adsorber un ácido nucleico en un sustrato, que comprende las etapas de (a) proporcionar el ácido nucleico en una solución acuosa que contiene sales en una alta concentración; (b) proporcionar el sustrato en forma de material en polvo; (c) proporcionar un diéter cíclico miscible en agua; (d) dispersar el sustrato de la etapa (b) en el diéter cíclico miscible en agua de la etapa (c) para formar una suspensión de dicho sustrato; y (e) mezclar la solución acuosa de la etapa (a) con la suspensión de la etapa (d). Preferentemente, el diéter cíclico miscible en agua es dioxano.

Preferentemente, la composición de la etapa (e) contiene del 1 al 50 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Más preferentemente, la composición de la etapa (e) contiene del 2 al 35 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Aún más preferentemente, la composición de la etapa (e) contiene del 3 al 30 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Aún más preferentemente, la composición de la etapa (e) contiene aproximadamente el 4 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Aún más preferentemente, la composición de la etapa (e) contiene aproximadamente el 15 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua. Aún más preferentemente, la composición de la etapa (e) contiene aproximadamente el 25 por ciento en volumen del diéter cíclico miscible en agua.

Preferentemente, las sales de la composición de la etapa (e) son sales caotrópicas en concentraciones de 1 a 8 M. Más preferentemente, dichas sales caotrópicas se seleccionan del grupo que consiste en perclorato sódico, clorhidrato de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidinio y yoduro sódico.

También preferentemente, las sales en la composición de la etapa (e) están en concentraciones de 1 a 10 M y dichas sales se seleccionan del grupo que consiste en cloruro de litio, cloruro sódico, cloruro potásico, acetato sódico, urea, y mezclas de los mismos.

Preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral poroso o no poroso en polvo seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, vidrio, cuarzo y zeolitas. También preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral poroso o no poroso en polvo seleccionado del grupo que consiste en óxidos metálicos y/u óxidos mixtos metálicos, alúmina, titania, zirconia y materiales predominantemente consistentes en vidrio. También se prefiere que el sustrato comprenda partículas que pueden atraerse magnéticamente. Más preferentemente, las partículas que pueden atraerse magnéticamente se recubren con un sustrato mineral seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, vidrio, cuarzo y zeolitas. Aún más preferentemente, el sustrato comprende partículas que pueden atraerse magnéticamente recubiertas con vidrio.

Es útil además una suspensión que contiene un sustrato en forma de material en polvo dispersado en un diéter cíclico miscible en agua. Preferentemente, el diéter cíclico miscible en agua es dioxano.

Preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral poroso o no poroso en polvo seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, vidrio, cuarzo y zeolitas. También preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral poroso o no poroso en polvo seleccionado del grupo que consiste en óxidos metálicos y/u óxidos mixtos metálicos, alúmina, titania, zirconia y materiales predominantemente consistentes en vidrio. También se prefiere que el sustrato comprenda partículas que pueden atraerse magnéticamente. Más preferentemente, las partículas que pueden atraerse magnéticamente se recubren con un sustrato mineral seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, vidrio, cuarzo y zeolitas. Aún más preferentemente, el sustrato comprende partículas que pueden atraerse magnéticamente recubiertas con vidrio.

Es útil además el uso de un diéter cíclico miscible en agua, para realizar los métodos de acuerdo con la invención descritos en el presente documento. Preferentemente, el diéter cíclico es dioxano.

También es útil el uso de un diéter cíclico miscible en agua, para preparar una suspensión por medio de dispersión de un sustrato en dicho diéter cíclico miscible en agua para formar una suspensión de dicho sustrato. Preferentemente, el diéter cíclico es dioxano.

Preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral poroso o no poroso en polvo seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, vidrio, cuarzo y zeolitas. También preferentemente, el sustrato comprende un sustrato mineral poroso o no poroso en polvo seleccionado del grupo que consiste en óxidos metálicos y/u óxidos mixtos metálicos, alúmina, titania, zirconia y materiales predominantemente consistentes en vidrio. También se prefiere que el sustrato comprenda partículas que pueden atraerse magnéticamente. Más preferentemente, las partículas que pueden atraerse magnéticamente se recubren con un sustrato mineral seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, vidrio, cuarzo y zeolitas. Aún más preferentemente, el sustrato comprende partículas que pueden atraerse magnéticamente recubiertas con vidrio.

Es útil además el uso de una suspensión en dioxano descrito anteriormente para realizar un método de acuerdo con la invención como se ha descrito en el presente documento.

También es útil un kit de partes, que contiene (a) una solución madre concentrada de una sal de tampón y una sal caotrópica seleccionada del grupo que consiste en perclorato sódico, clorhidrato de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidinio y yoduro sódico; (b) dioxano; (c) soluciones de tampón; y (d) material cromatográfico y de filtración.

Es útil además un kit de partes, que contiene (a) una solución madre concentrada de una sal de tampón y una sal seleccionada del grupo que consiste en cloruro de litio, cloruro sódico, cloruro potásico, acetato sódico, urea y mezclas de los mismos; (b) dioxano; (c) soluciones de tampón; y (d) material cromatográfico y de filtración.

También es útil un kit de partes, que contiene (a) una solución madre concentrada de una sal de tampón y una sal caotrópica seleccionada del grupo que consiste en perclorato sódico, clorhidrato de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidinio y yoduro sódico; (b) una suspensión en dioxano descrita anteriormente; (c) soluciones de tampón.

Es útil además un kit de partes, que contiene (a) una solución madre concentrada de una sal de tampón y una sal seleccionada del grupo que consiste en cloruro de litio, cloruro sódico, cloruro potásico, acetato sódico, urea y mezclas de los mismos; (b) una suspensión en dioxano descrita anteriormente; (c) soluciones de tampón.

Los siguientes ejemplos, referencias y figuras se proporcionan para ayudar al entendimiento de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1a. Se aisló ARN de 10^6 células HeLa en repeticiones óctuples usando el protocolo y kit respectivos del Sistema MagNA Pure (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Para estos aislamientos, las MGP (partículas de vidrio magnéticas) se resuspendieron en agua o en N-

metil-2-pirrolidona (NMP). Los eluatos con ARN purificado se analizaron después en un gel de agarosa. Las bandas en los carriles 1 - 8, es decir preparaciones de ARN usando MGP resuspendidas en agua, son muy débiles y apenas pueden reproducirse. M indica un marcador de tamaño. Los carriles 9 - 16 muestran bandas de ARN de preparaciones usando MGP resuspendidas en NMP.

Figura 1b. Se aisló ARN de 10^6 células HeLa en repeticiones cuádruples usando el protocolo y kit respectivos del Sistema MagNA Pure (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nº de catálogo 3186229). Para estos aislamientos, los MGP (partículas de vidrio magnéticas) se resuspendieron en alcohol isopropílico (isopropanol) o en N-metil-2-pirrolidona (NMP). Los eluatos con ARN purificado se analizaron después en un gel de agarosa.

Figura 2. Se aisló ADN a partir de 1 ml de sangre en repeticiones óctuples usando el protocolo y kit respectivos del Sistema MagNA Pure (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nº de catálogo 3186229). Para estos aislamientos, las MGP (partículas de vidrio magnéticas) se resuspendieron en isopropanol o en N-metil-2-pirrolidona o en agua. Los eluatos con ADN purificado se analizaron después en un gel de agarosa.

Figuras 3a, 3b. Señal de fluorescencia durante PCR TaqMan. El eje x indica el número de ciclos de PCR, el eje y la señal de fluorescencia como se mide por el detector en [mV]. Las curvas "R300" reflejan las señales obtenidas con 10.000 copias de ARN diana de control positivo en agua purificada. Las curvas de "R30" reflejan las señales obtenidas con 1.000 copias de ARN diana de control positivo en agua purificada. Se proporcionan curvas adicionales para "NMP" (1-metil-2-pirrolidona), "PC" (propilencarbonato), "yBL" (gamma-butirolactona) y "sin BC" (sin la adición de un acondicionador de unión).

Ejemplo 1

Aislamiento de ADN usando fibra de vidrio

Se incubaron 1.000 µl de sangre completa de un donante sano con 100 µl de solución de proteinasa K (Roche Id. Nº 745723; 90 mg disueltos en 4,5 ml de agua) y 1.200 µl de tampón de unión caotrópico (Guanidinio-HCl 6 M, Tris HCl 10 mM Triton X100 20 % pH 4,4) a 70 °C durante 10 minutos.

Después de añadir 500 µl de (a) isopropanol, (b) acetonitrilo, (c) dimetilsulfóxido o (d) metiletilcetona, el lisado se transfirió a un tubo de filtro de fibra de vidrio (tubo de filtro tomado del kit de Macherey y Nagel Cat. Nº 740 954.20). Después de centrifugar durante 3 minutos a 1.900 x g el flujo continuo se descartó y el tubo de filtro se colocó en un tubo de recogida. Se pipetearon 2.000 µl de un tampón de retirada de inhibidor iónico alto (Guanidinio-HCl 5 M, Tris 20 mM etanol 60 % pH 6,6) en el filtro de fibra de vidrio y se centrifugó durante 1 minuto a 3.000 x g. Seguido de dos etapas de lavado con 2.000 µl de tampón de lavado (NaCl 20 mM, Tris HCl 2 mM, etanol al 80 %, pH 7,5) y centrifugación durante 5 minutos a 3.000 x g. El flujo continuo se descartó. Se usó un nuevo tubo de recogida. Se realizó la elución del ADN con 300 µl de tampón Tris caliente a 70 °C (10 mM, pH 8,5). Después de un tiempo de incubación de 5 minutos el tubo se centrifugó durante 5 minutos a 3.000 x g.

Análisis del ADN aislado

Los rendimientos de ADN se calcularon a partir de la medición de DO260nm usando un fotómetro convencional. La pureza se evaluó calculando la relación DO260/280 nm. Los resultados (n = 2) se representan en la Tabla 1.

Tabla 1

Aislamiento de ADN de 1.000 µl de sangre completa		
adsorción en el sustrato en presencia de	Rendimiento (medido por la determinación de DO a 260 nm)	Pureza (relación 260/280 nm)
(a) isopropanol	24,1 µg/ml de sangre	1,89
(b) acetonitrilo	22,2 µg/ml de sangre	1,88
(c) dimetilsufóxido	23,5 µg/ml de sangre	1,90
(d) metiletilcetona	33,5 µg/ml de sangre	1,81

Ejemplo 2

Aislamiento de ARN en el instrumento MagNA Pure LC

Se transfirieron directamente 10^6 células HeLa (en un volumen de 200 µl) al cartucho de muestras del instrumento MagNA Pure LC (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). El protocolo respectivo se eligió del software, los utensilios desechables de plástico y los reactivos del kit necesarios se cargaron en la estación de trabajo, y se inició el aislamiento de ARN automático. El instrumento MagNA Pure LC realizó después automáticamente todas las etapas de aislamiento y purificación como lisis celular con un tampón de unión/lisis especial, digestión enzimática de proteínas con proteinasa K, digestión enzimática de ADN con DNasa I, unión de ARN con partículas de vidrio magnéticas (MGP), varias etapas de lavado para retirar las sustancias e impurezas no unidas, elución del ARN puro en un tampón de elución especial y finalmente la transferencia del eluato a un cartucho de almacenamiento frío.

Cuando se fueran a analizar compuestos orgánicos no ácidos tales como N-metil-2-pirrolidona con respecto a su rendimiento en el procedimiento de aislamiento de ácido nucleico, se suspendieron MGP secas en un volumen adecuado del compuesto orgánico no ácido respectivo y se usó la suspensión en el instrumento MagNA Pure LC junto con todos los otros reactivos del kit MagNA Pure (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

En comparación con el agua, se descubrió que el rendimiento de ARN era mayor cuando la suspensión de las partículas de vidrio magnéticas se preparó usando N-metil-2-pirrolidona. En comparación con alcohol isopropílico, se descubrió que el rendimiento de ARN era igual o mayor cuando la suspensión de las partículas de vidrio magnéticas se preparaba usando N-metil-2-pirrolidona.

Tabla 2

Aislamiento de ARN de 10^6 células HeLa (véase también Figura 1a, Figura 1b)		
Suspensión de MGP en	Rendimiento (medido determinando la DO a 260 nm)	Pureza (relación 260/280 nm)
(i) agua dest.	1,97 µg/10^6 células	1,90
(ii) N-methyl-2- pirrolidona	15,90 µg/10^6 células	2,02
(iii) N-methyl-2- pirrolidona	14,53 µg/10^6 células	2,00
(iv) alcohol isopropílico l	14,31 µg/10^6 células	2,00

Los resultados también se muestran en las Figuras 1a (i, ii) y 1b (iii, iv).

Ejemplo 3

Aislamiento de ADN en el instrumento MagNA Pure LC

Se transfirió directamente sangre humana (1 ml) al cartucho de muestras del instrumento MagNA Pure LC (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). El protocolo respectivo se eligió del software, los utensilios desechables de plástico y reactivos de kit necesarios se cargaron en la estación de trabajo, y se inició el aislamiento de ADN automático. El instrumento MagNA Pure LC realizó después automáticamente todas las etapas de aislamiento y purificación como lisis celular con un tampón de unión/lisis especial, digestión enzimática de proteínas con proteinasa K, unión de ADN con partículas de vidrio magnéticas (MGP), varias etapas de lavado para retirar sustancias e impurezas no unidas, elución del ADN puro en un tampón de elución especial y finalmente la transferencia del eluato a un cartucho de almacenamiento frío.

Cuando se fueron a analizar compuestos orgánicos no ácidos tales como N-metil-2-pirrolidona con respecto a su rendimiento en el procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos, se suspendieron MGP secas en un volumen adecuado del compuesto orgánico no ácido respectivo y la suspensión se usó en el instrumento MagNA Pure LC junto con todos los otros reactivos del kit MagNA Pure (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Análisis del ADN aislado

La integridad del ADN aislado se comprobó en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio, junto con un marcador de peso molecular III (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Los rendimientos de ADN se calcularon a partir de la medición de DO260nm usando un fotómetro convencional. La pureza se evaluó calculando la relación DO260/280 nm. Para asegurar que el ADN aislado usando los protocolos Magna Pure y N-metil-2-pirrolidona u otros compuestos orgánicos no ácidos puedan amplificarse, se realizó PCR en un instrumento LightCycler para todas las muestras usando por ejemplo el Kit de detección de mutación de factor V LightCycler o el kit de cuantificación de ADN Her2neu LightCycler (ambos de Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). La amplificación fue exitosa en todos los casos.

Tabla 3

Aislamiento de ADN de 1.000 µl en sangre completa (véase también Figura 2)		
Suspensión de MGP en	Rendimiento (medido determinando la DO a 260 nm)	Pureza (relación 260/280 nm)
(i) alcohol isopropílico	25,3 µg/ml de sangre	1,70
(ii) N-methyl-2-pirrolidona	26,6 µg/ml de sangre	1,75
(iii) agua	7,3 µg/ml de sangre	1,69

El rendimiento de ADN con N-metil-2-pirrolidona fue igual que con alcohol isopropílico, el rendimiento con agua fue mucho menor. La Figura 2 ilustra estos resultados.

Ejemplo 4

Aislamiento de ARN de una muestra de suero

Lisis y acondicionamiento

Se mezcló un volumen de 200 µl de suero de un paciente sano con 20 µl de solución de proteinasa K (actividad enzimática 6.000 U/ml, sin actividad DNasa ni RNAsa) y se incubó durante 5 min a 37 °C. Posteriormente, se mezclaron 600 µl de tampón de lisis con la muestra tratada con proteinasa K para dar como resultado una solución de lisis. El tampón de lisis contenía los siguientes compuestos disueltos en agua:

Tabla 4

cantidad	unidad	sustancia	fabricante	número de producto
6,2	mol/l	Guanidinio-rodanida	Fluka	50981
0,04	mol/l	Tris HCl pH 7,5	Fluka	93372
10	g/l	Triton X100	Fluka	93426
0,02	mol/l	1,4-Ditio-DL-treit	Fluka	43816
15,6	mg/l	Poli-A	Amersham Biosciences	27-4110-01

Posteriormente, se añadieron 380 µl de un acondicionador de unión a la solución de lisis y se mezcló para dar como resultado una solución de adsorción. Se usaron como acondicionadores de unión Gamma-butirolactona (CAS 96-48-0) 100 %, propilencarbonato (CAS 108-32-7) 100 % o 1-metil-2-pirrolidona (CAS872-50-4) 100 %.

Adsorción en una fase sólida

Se transfirió una primera alícuota de 600 µl de la solución de lisis acondicionada a una columna de centrifugación disponible en el mercado con un vellón de vidrio como una fase sólida. Preferentemente, se usaron tubos de filtro de centrifugación High Pure del Kit de preparación de molde de PCR High Pure (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Nº de catálogo 1796828) como columnas de centrifugación. La columna de centrifugación con la primera alícuota de 600 µl se centrifugó a 4.300 x g durante 1 min. La segunda alícuota se transfirió después a la misma columna de centrifugación y la etapa de centrifugación se repitió en las mismas condiciones.

Lavado

La columna se lavó tres veces, cada vez usando 150 µl de tampón de lavado. El tampón de lavado contenía los siguientes compuestos disueltos en agua:

Tabla 5

cantidad	unidad	sustancia	fabricante	número de producto
600	g/l	Etanol/Isopropanol = 19:1	Fluka	2848
0,66	mmol/l	TrisHCl pH 7,5	Fluka	93372
10	mg/l	Poli A	Amersham Biosciences	27-4110-01

Para las dos primeras etapas de lavado la alícuota de tampón de lavado se transfirió a la columna de centrifugación y la columna se centrifugó a 4.300 x g durante 1 min. La tercera etapa de lavado se alteró porque la columna se centrifugó a 13.200 x g durante 3 min.

En lugar de retirar el tampón de lavado por medio de centrifugación (tercera etapa de lavado, véase anteriormente) la fase sólida se secó como alternativa a 65 °C durante 10 min.

Elución

Para esta etapa se usó tampón de elución que contenía el siguiente compuesto disuelto en agua:

Tabla 6

cantidad	unidad	sustancia	fabricante	número de producto
3,3	mmol/l	TrisHCl pH 7,5	Fluka	93372

Se transfirió un volumen de 150 µl de tampón de elución a la columna de centrifugación y la columna se centrifugó a 4.300 x g durante 1 min. El eluato se recogió para análisis posterior.

Ejemplo 5

Análisis de ARN

Se procesaron muestras de suero con adición de 10.000 copias de un ARN diana de control positivo (ARN de virus de la hepatitis C purificado) como se ha descrito en el Ejemplo 4. El contenido del ARN diana en el eluato se determinó por medio de PCR TaqMan usando un kit de detección de VHC Roche.

Para el cálculo de la tasa de recuperación (= cantidad encontrada después del proceso/cantidad antes del proceso) se procesaron patrones con el procedimiento de detección. Las Figuras 3a y 3b muestran la curva "R300", correspondiente a 10.000 copias (es decir tasa de recuperación del 300 %) y la curva "R30" correspondiente a 1.000 copias (es decir, tasa de recuperación del 30 %).

Las Figuras 3a y 3b ilustran el resultado de un experimento típico. Aunque un experimento de control sin acondicionador de unión ("sin BC") conduce a tasas de recuperación muy bajas (sin diana hallada), la adición de un acondicionador de unión ("NMP": N-metil-2-pirrolidona, "PC": propilencarbonato o "GBL": gamma-butirolactona) conduce a una tasa de recuperación de más del 50 % para el ARN de control.

Los procedimientos de preparación de muestras que dejan impurezas en el eluato pueden alterar la formación de señal durante el proceso de PCR TaqMan. Se controló por lo tanto la formación de señal para estimar la calidad/pureza de la preparación de ARN. El valor de la señal de fluorescencia después del último ciclo de PCR se tomó como una medida. Como referencia se usaron cantidades conocidas de ARN de control positivo limpio (el mismo que se añadió al suero) en agua pura. Las Figuras 3a y 3b ilustran el resultado de un experimento típico. Aunque la formación de señal de fluorescencia fue despreciable en las preparaciones sin acondicionador de unión (principalmente debido a la recuperación ausente), la adición de acondicionador de unión conduce a una formación de señal mejorada que es comparable a la formación de señal hallada con una diana pura.

Ejemplo 6

Tiempo de procesamiento de muestras

Se procesaron muestras recibidas de un hospital, teniendo las muestras valores potenciados de triglicéridos, de acuerdo con el siguiente protocolo:

Se incubó un volumen de 750 µl de suero durante 5 min con 75 µl de solución de proteinasa K (actividad enzimática 6.000 U/ml, sin actividad DNasa ni RNAsa) a 37 °C. A continuación, se añadió un volumen de 1.405 µl de tampón de lisis (de acuerdo con la Tabla 4) y se mezcló. Posteriormente, se añadieron 880 µl de gamma-butirolactona o, como alternativa, 880 µl de etanol al 96 % y se mezcló, dando como resultado dos tipos diferentes de solución de adsorción.

Cada solución de adsorción se procesó a una presión constante de +100 kPa mediante un dispositivo de columna que contenía un vellón de fibra de vidrio (usado de un kit "High Pure" de Roche) en un diámetro de 5 mm y un grosor de 1 mm. Se midió el tiempo de paso del volumen completo a través del dispositivo (también denominado "tiempo de unión"). Los resultados se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7

ID de la muestra	contenido de triglicéridos [mmol/litro]	Tiempo de unión usando gamma-butirolactona [segundos]	Tiempo de unión usando etanol [segundos]
3C	1,78*	97	91
1C	3,73**	92	128
9C	5,73**	92	103
2C	7,18**	94	148
* considerado normal, ** valor de triglicéridos elevado			

Lista de referencias

Abramson, R.D., y Myers, T.W., Curr. Opin. Biotechnol. 4 (1993) 41-47
Alderton, R.P., *et al*., Anal. Biochem. 201 (1992) 166-169
Ausubel *et al*., Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley y Sons, NY, 1987
Barany, F., PCR Methods and Applic. 1 (1991) 5-16
Barany, F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 189-193
Boom, R., *et al.,* J. Clin. Microbiol. 28 (1990) 495-503
Documento DE 37 24 442
Documento EP 0 439 182 A2
Documento EP 0 658 164
Guatelli, J.C., *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 1874-1878
Jakobi, R., *et al.,* Anal. Biochem. 175 (1988) 196-201
Kwoh, D.Y., *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 1173-1177
Marko, M.A., *et al*., Anal. Biochem. 121 (1982) 382-387
Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, CSHL Press, 2001
Documento US 4.683.195
Documento US 5.130.238
Documento US 5.210.015
Documento US 5.487.972
Documento US 5.804.375
Vogelstein, B., y Gillespie, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 615-619
Whelen, A.C., y Persing, D.H., Annu. Rev. Microbiol. 50 (1996
Documento WO 01/37291
Documento WO 90/01069
Documento WO 91/00212
Documento WO 92/02638
Documento WO 92/08800
Documento WO 99/16781
Wu, D.Y., y Wallace, R.B., Genomics 4 (1989) 560-569
Yamada, O., *et al*., J. Virol. Methods 27 (1990) 203-209

REIVINDICACIONES

1. Un método para la purificación de un ácido nucleico, que comprende las etapas de:

(a) adsorber en un sustrato mineral poroso o no poroso seleccionado del grupo que consiste en gel de sílice, fibras de vidrio, fibras de cuarzo, zeolitas y partículas con atracción magnética recubiertas con vidrio la secuencia de ácido nucleico independientemente de una composición que contiene

(i) un tampón acuoso,
(ii) sales en una concentración igual a o mayor de 1 M,
(iii) un compuesto orgánico no ácido miscible en agua que comprende un grupo funcional de Fórmula I,

$$W \equiv Z \text{ (Fórmula I)}$$

en la que W es un átomo de carbono o un átomo de azufre y Z es un átomo de oxígeno o un átomo de nitrógeno,
en el que el grupo funcional se selecciona del grupo que consiste en un grupo oxo, un grupo sulfoxo, un grupo ciano, y un grupo carbonilo de una función carbamoilo o una amida pero que no pertenece a una función carboxi, y
el compuesto orgánico no ácido miscible en agua se selecciona del grupo que consiste en acetilacetona, dimetilsulfóxido, dietilcetona, metiletilcetona, metilpropilcetona, isobutilmetilcetona, gamma-butirolactona, gamma-valerolactona, propilencarbonato y N-metil-2-pirrolidona y
en el que la composición de la etapa (a) contiene del 1 al 50 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua, y el compuesto orgánico no ácido miscible en agua se disuelve para formar una fase líquida homogénea, y
(iv) el ácido nucleico;

(b) opcionalmente lavar con una solución de lavado el sustrato con el ácido nucleico adsorbido; seguido de
(c) poner en contacto el sustrato con el ácido nucleico adsorbido con una solución que contiene sales en una concentración menor en comparación con la composición de la etapa (a), desorbiendo de este modo el ácido nucleico del sustrato; y
(d) separar la solución con el ácido nucleico desorbido del sustrato, purificando de este modo el ácido nucleico; y opcionalmente
(e) precipitar el ácido nucleico desorbido de la solución de la etapa (d) y aislar el ácido nucleico precipitado, purificando de este modo adicionalmente el ácido nucleico.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que
la composición de la etapa (a) contiene del 3 al 30 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua.

3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que
las sales en la composición de la etapa (a) son sales caotrópicas en concentraciones de 1 a 8 M y dichas sales caotrópicas se seleccionan del grupo que consiste en perclorato sódico, clorhidrato de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina y yoduro sódico.

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que las sales en la composición de la etapa (a) están en concentraciones de 1 a 10 M y dichas sales se seleccionan del grupo que consiste en cloruro de litio, cloruro sódico, cloruro potásico, acetato sódico, urea y mezclas de los mismos.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que
la solución de lavado de la etapa (b) contiene el compuesto orgánico no ácido miscible en agua.

6. El método de la reivindicación 5, caracterizado por que
la solución de lavado de la etapa (b) contiene entre 1 y 100 por ciento en volumen del compuesto orgánico no ácido miscible en agua.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el compuesto orgánico no ácido miscible en agua es gamma-butirolactona y el sustrato mineral consiste en fibras de vidrio.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el ácido nucleico es ARN y el compuesto orgánico no ácido miscible en agua es N-metil-2-pirrolidona.

Fig. 1a

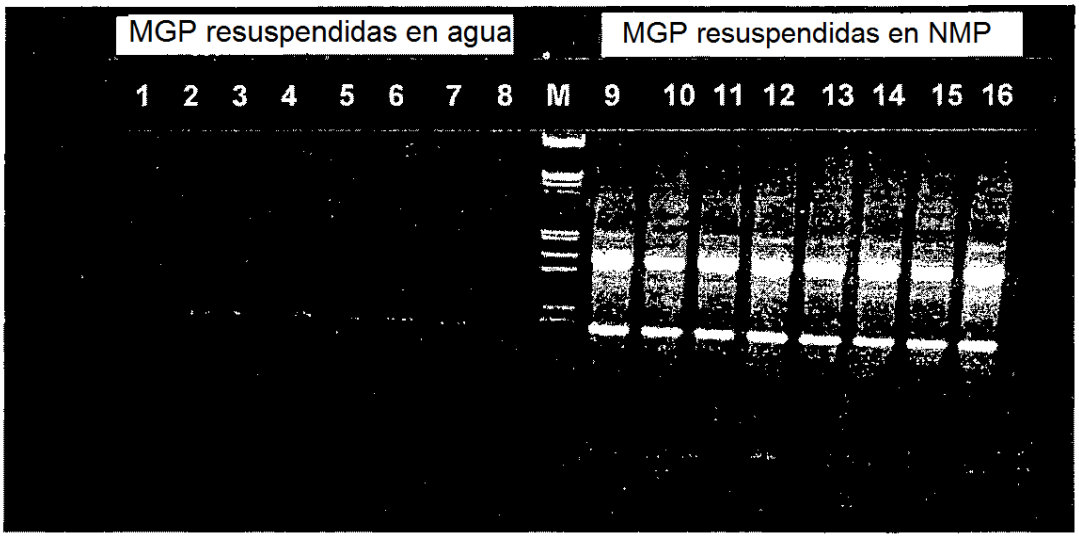

MGP resuspendidas en agua
MGP resuspendidas en NMP
1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13 14 15 16

Fig. 1b

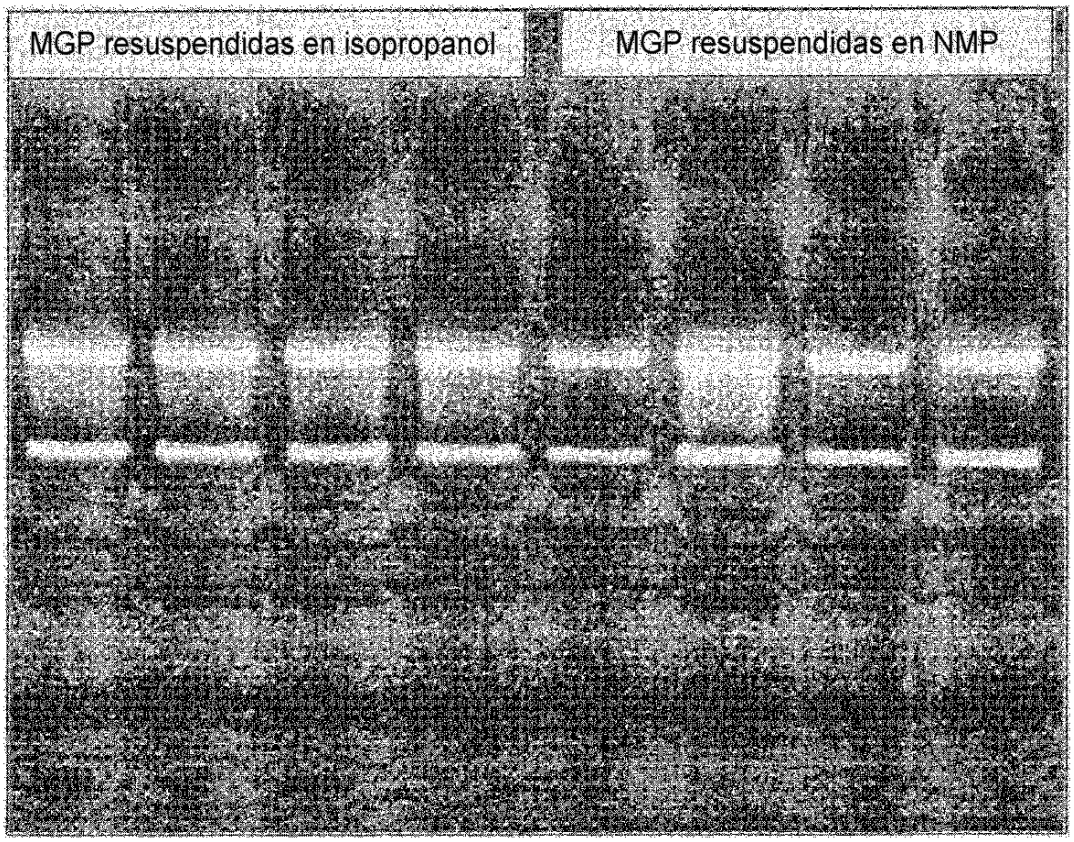

MGP resuspendidas en isopropanol
MGP resuspendidas en NMP

Fig. 2

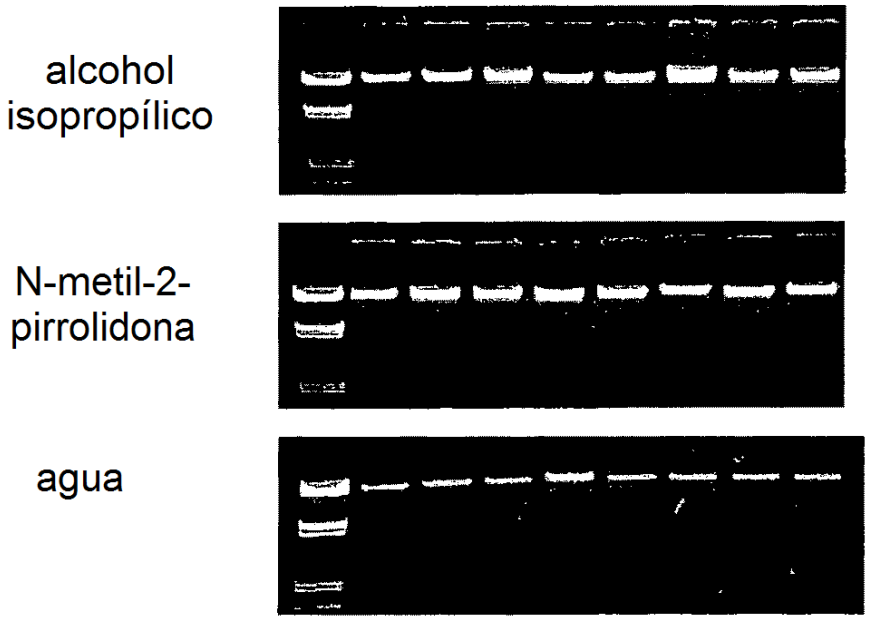


Fig. 3a

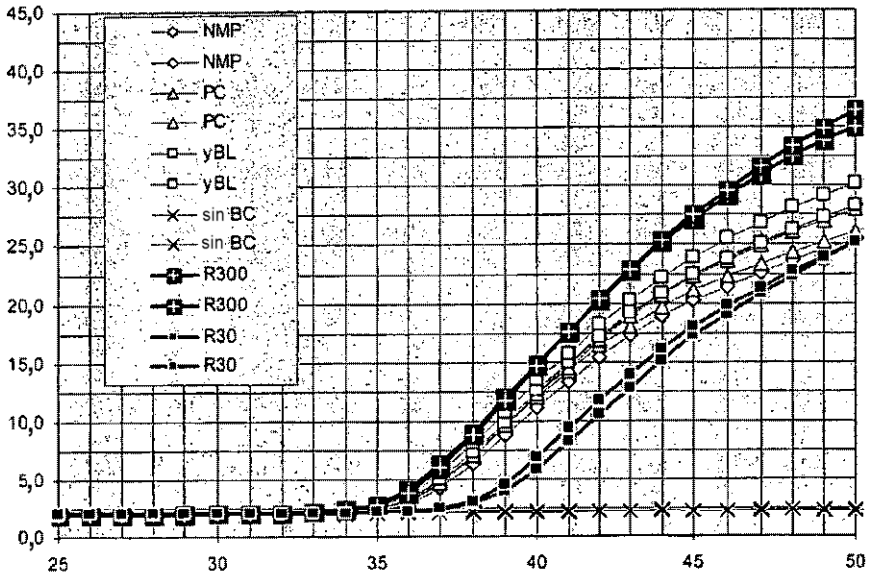
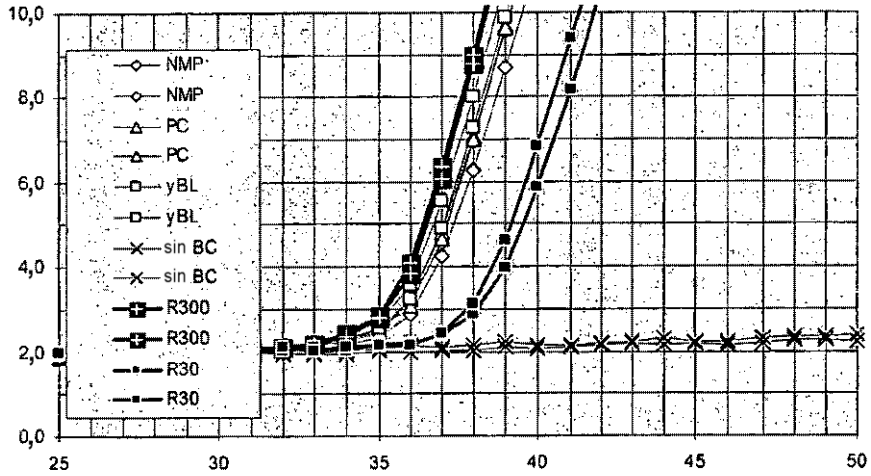

45,0
40,0
35,0
30,0
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
25
30
35
40
45
50
NMP
NMP
PC
PC
yBL
yBL
sin BC
sin BC
R300
R300
R30
R30

Fig. 3b


10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
25
30
35
40
45
50
NMP
NMP
PC
PC
yBL
yBL
sin BC
sin BC
R300
R300
R30
R30