

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 129**

51 Int. Cl.:

C07H 1/06 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2008 E 08733883 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2281826**

54 Título: **Reactivos, agentes caotrópicos, kits y métodos para aislar ácidos nucleicos basados en materiales de celulosa magnéticos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.06.2016

73 Titular/es:

**RBC BIOSCIENCE CORP. (100.0%)
12F, No. 716 Chung Cheng road Chung Ho City
Taipei
Taiwan 235, CN**

72 Inventor/es:

**JIANG, PEI-SHIN;
SU, YU-TING;
WU, KUN-CHAN;
CHO, HUI-JU;
KUO, WEN-HSUN;
LIN, YUH-JIUAN;
LI, YI-LING y
KUAN, CHENG-CHUN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 574 129 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

Reactivos, agentes caotrópicos, kits y métodos para aislar ácidos nucleicos basados en materiales de celulosa magnéticos

5 Antecedentes de la invención

1. Campo técnico

10 La presente divulgación se refiere a un método de aislamiento. Más en particular, la presente divulgación se refiere a un método para aislar un ácido nucleico que comprende un agente caotrópico.

2. Descripción del estado de la técnica

15 Convencionalmente, un ácido nucleico se aísla a partir de una muestra que contiene ácidos nucleicos y se purifica desnaturizando las proteínas y otras sustancias de la muestra mediante el uso de un disolvente orgánico tal como fenol y cloroformo, y efectuando después una centrifugación de modo que las sustancias y las proteínas desnaturizadas se separan del ácido nucleico. Sin embargo, puesto que tanto el fenol como el cloroformo son sustancias altamente corrosivas, altamente volátiles, y altamente tóxicas, la operación mencionada debe efectuarse con mucho cuidado; de otro modo, es muy probable que la persona que los manipula sufra alguna lesión. Además, el proceso de purificación de este método convencional consume mucho tiempo y, por tanto, plantea dificultades en cuanto a su uso comercial. Actualmente, los métodos de aislamiento de ácidos nucleicos usados en aplicaciones comerciales se basan la mayoría de ellos en la técnica patentada de aislamiento con partículas (patente de Estados Unidos US 5.234.809) desarrollada por Willem R. Boom et al. y cedida a Akzo Nobel N.V. En la patente de Estados Unidos anteriormente mencionada, conocida también como "Patente de Boom", se aísla un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos en una muestra mediante un agente caotrópico. El ácido nucleico aislado se une a partículas de sílice y después se eluye de las mismas mediante un tampón de lavado de modo que se recupera el ácido nucleico. No obstante, la tendencia en el desarrollo de técnicas de aislamiento de ácidos nucleicos tras la "patente de Boom" es hacia el uso de partículas magnéticas, que son más eficaces en la separación de un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos, tal y como se divulga en la patente de Estados Unidos US 6.855.499, o hacia una mejora adicional de la composición de agentes caotrópicos.

Por ejemplo, la patente de Estados Unidos US 5.990.302 divulga un método para aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos mediante un agente caotrópico que contiene una sal de guanidina y un vehículo que se une al ácido nucleico. Sin embargo, no se puede conseguir un aislamiento eficaz a menos que se controle adecuadamente la proporción de la sal de guanidina con respecto a los disolventes usados. Asimismo, puesto que la fabricación de la sal de guanidina se complica y requiere una línea de producción separada, el agente caotrópico que contiene una sal de guanidina puede ser difícil de preparar en la práctica.

40 El documento WO 2005/058933 divulga reactivos, métodos y kits para la desnaturización de proteínas.

Por tanto, el desarrollo de un agente caotrópico que presente un aislamiento eficaz de un ácido nucleico, una operación segura, un uso conveniente, y una fácil fabricación, así como de un kit de reactivos que contenga tal agente caotrópico, sigue siendo un problema sin resolver.

Sumario de la invención

Este objeto se resuelve mediante un método para aislar un ácido nucleico ADN de acuerdo con la reivindicación 1.

50 Para superar los inconvenientes del estado de la técnica mencionados anteriormente, la presente divulgación proporciona un método que usa un agente caotrópico para su uso junto con un vehículo en fase sólida para aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos. Cuando se añade el vehículo en fase sólida con el agente caotrópico y se mezcla con una muestra que contiene el ácido nucleico, el agente caotrópico proporciona el aislamiento del ácido nucleico de las sustancias que no son ácidos nucleicos de la muestra y promueve la unión y la adsorción del ácido nucleico al vehículo en fase sólida. El agente caotrópico se caracteriza por que el vehículo en fase sólida usado con el agente caotrópico comprende celulosa magnética. Y el agente caotrópico comprende una sustancia alcohólica y una solución sustrato. La solución sustrato ajusta la sal metálica y la sustancia alcohólica a concentraciones apropiadas y, por tanto, promueve la unión del ácido nucleico al material de celulosa magnético. La sustancia alcohólica puede ser etanol, isopropanol, o una combinación arbitraria de etanol e isopropanol.

60 La presente divulgación proporciona también un reactivo para su uso junto con un vehículo en fase sólida para aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos. Cuando se añade el vehículo en fase sólida con el reactivo y se mezcla con una muestra que contiene el ácido nucleico, el reactivo proporciona el aislamiento del ácido nucleico de las sustancias que no son ácidos nucleicos de la muestra y promueve la unión y la adsorción del ácido nucleico al vehículo en fase sólida. El reactivo se caracteriza por que el vehículo en fase sólida usado con el reactivo comprende celulosa magnética. Y el reactivo comprende una sal metálica y un agente caotrópico. El agente

caotrópico comprende una sustancia alcohólica y una solución sustrato. La solución sustrato ajusta la sal metálica y la sustancia alcohólica a concentraciones apropiadas y, por tanto, promueve la unión del ácido nucleico al material de celulosa magnético. La sal metálica puede ser la sal formada con cationes univalentes. Son preferentes la sal de litio, la sal de sodio o la sal de potasio. El alcohol puede ser etanol, isopropanol, o una combinación arbitraria de etanol e isopropanol.

La presente divulgación proporciona también un kit de reactivos para aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos. El kit de reactivos comprende un reactivo, un vehículo en fase sólida para su uso con el reactivo, un tampón de lavado y un tampón de elución. El kit de reactivos se caracteriza por que el vehículo en fase sólida comprende celulosa magnética. Y el reactivo comprende una sal metálica y un agente caotrópico. El agente caotrópico comprende una sustancia alcohólica y una solución sustrato. La solución sustrato ajusta la sal metálica y la sustancia alcohólica a concentraciones apropiadas y, por tanto, promueve la unión del ácido nucleico al material de celulosa magnético. La sal metálica puede ser la sal formada con cationes univalentes. Son preferentes la sal de litio, la sal de sodio o la sal de potasio. El alcohol puede ser etanol, isopropanol, o una combinación arbitraria de etanol e isopropanol.

La presente divulgación proporciona también un agente caotrópico para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético. Cuando se añade el material de celulosa magnético con el agente caotrópico y se mezcla con una muestra que contiene el ácido nucleico, el agente caotrópico proporciona el aislamiento del ácido nucleico de las sustancias que no son ácidos nucleicos de la muestra. El agente caotrópico se caracteriza por que el agente caotrópico comprende una sustancia alcohólica y una solución sustrato. La solución sustrato ajusta la sal metálica y la sustancia alcohólica a concentraciones apropiadas y, por tanto, promueve la unión del ácido nucleico al material de celulosa magnético. La sal metálica puede ser la sal formada con cationes univalentes. Son preferentes la sal de litio, la sal de sodio o la sal de potasio. El alcohol puede ser etanol, isopropanol, o una combinación arbitraria de etanol e isopropanol.

La presente divulgación proporciona también un reactivo para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético. Cuando se añade el material de celulosa magnético con el reactivo y se mezcla con una muestra que contiene el ácido nucleico, el reactivo proporciona el aislamiento del ácido nucleico de las sustancias que no son ácidos nucleicos de la muestra. El reactivo se caracteriza por que el reactivo comprende una sal metálica y un agente caotrópico. El agente caotrópico comprende una sustancia alcohólica y una solución sustrato. La solución sustrato ajusta la sal metálica y la sustancia alcohólica a concentraciones apropiadas y, por tanto, promueve la unión del ácido nucleico al material de celulosa magnético. La sal metálica puede ser la sal formada con cationes univalentes. Son preferentes la sal de litio, la sal de sodio o la sal de potasio. El alcohol puede ser etanol, isopropanol, o una combinación arbitraria de etanol e isopropanol.

La presente divulgación proporciona también un kit de reactivos para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético. El kit de reactivos se caracteriza por que el kit de reactivos comprende un reactivo, el material de celulosa magnético, un tampón de lavado y un tampón de elución. El reactivo comprende una sal metálica y un agente caotrópico. El agente caotrópico comprende una sustancia alcohólica y una solución sustrato. La solución sustrato ajusta la sal metálica y la sustancia alcohólica a concentraciones apropiadas y, por tanto, promueve la unión del ácido nucleico al material de celulosa magnético. La sal metálica puede ser la sal formada con cationes univalentes. Son preferentes la sal de litio, la sal de sodio o la sal de potasio. El alcohol puede ser etanol, isopropanol, o una combinación arbitraria de etanol e isopropanol.

La presente divulgación proporciona también un método para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético. El método comprende las etapas de: proporcionar una muestra que contiene el ácido nucleico, y preparar un reactivo y el material de celulosa magnético para su uso con el reactivo. El método se caracteriza por que comprende adicionalmente añadir el reactivo a la muestra que contiene el ácido nucleico y mezclarlos. El reactivo comprende una sal metálica y un agente caotrópico. El agente caotrópico comprende una sustancia alcohólica y una solución sustrato. La solución sustrato ajusta la sal metálica y la sustancia alcohólica a concentraciones apropiadas y, por tanto, promueve la unión del ácido nucleico al material de celulosa magnético. La sal metálica puede ser la sal formada con cationes univalentes. Son preferentes la sal de litio, la sal de sodio o la sal de potasio. El alcohol puede ser etanol, isopropanol, o una combinación arbitraria de etanol e isopropanol.

La presente divulgación proporciona también un método para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético. El método comprende las etapas de: proporcionar una muestra que contiene el ácido nucleico, y preparar un reactivo, el material de celulosa magnético para su uso con el reactivo, un tampón de lavado, y un tampón de elución. El método se caracteriza por que comprende adicionalmente las etapas de: añadir el reactivo a la muestra que contiene el ácido nucleico y mezclarlos. El reactivo comprende una sal metálica, una sustancia alcohólica, y una solución sustrato. La solución sustrato ajusta la sal metálica y la sustancia alcohólica a concentraciones apropiadas y, por tanto, promueve la unión del ácido nucleico al material de celulosa magnético. La sal metálica puede ser de cationes univalentes. Son preferentes la sal de litio, la sal de sodio o la sal de potasio. El alcohol puede ser etanol, isopropanol, o una combinación arbitraria de etanol e isopropanol. El método comprende adicionalmente las etapas de lavar el material de celulosa magnético con el tampón de lavado para eliminar las

sustancias que no son ácidos nucleicos de la muestra, y aislar el ácido nucleico del material de celulosa magnético al que se ha unido el ácido nucleico con el tampón de elución.

5 La presente divulgación proporciona también un método para unir un ácido nucleico a un material de celulosa magnético. El método comprende las etapas de: proporcionar una muestra que contiene el ácido nucleico, y preparar un reactivo y el material de celulosa magnético para su uso con el reactivo. El método se caracteriza por que comprende adicionalmente: añadir el reactivo a la muestra que contiene el ácido nucleico y mezclarlos. El reactivo comprende una sal metálica, una sustancia alcohólica, y una solución sustrato. La solución sustrato ajusta la sal metálica y la sustancia alcohólica a concentraciones apropiadas y, por tanto, promueve la unión del ácido nucleico al material de celulosa magnético. La sal metálica puede ser la sal formada con cationes univalentes. Son preferentes la sal de litio, la sal de sodio o la sal de potasio. El alcohol puede ser etanol, isopropanol, o una combinación arbitraria de etanol e isopropanol.

15 La presente divulgación proporciona también un método para unir un ácido nucleico a un material de celulosa magnético. El método comprende las etapas de: proporcionar una muestra que contiene el ácido nucleico, y preparar un reactivo y el material de celulosa magnético para su uso con el reactivo. El método se caracteriza por que comprende adicionalmente: añadir el reactivo a la muestra que contiene el ácido nucleico y mezclarlos. El reactivo comprende una sal metálica, una sustancia alcohólica, y una solución sustrato. La solución sustrato ajusta la sal metálica y la sustancia alcohólica a concentraciones apropiadas y, por tanto, promueve la unión del ácido nucleico al material de celulosa magnético. La sal metálica puede ser la sal formada con cationes univalentes. Son preferentes la sal de litio, la sal de sodio o la sal de potasio. El alcohol puede ser etanol, isopropanol, o una combinación arbitraria de etanol e isopropanol.

25 La presente divulgación proporciona también un método para aislar un ácido nucleico. El método comprende las etapas de: proporcionar una muestra que contiene el ácido nucleico, y preparar un tampón de lavado y un tampón de elución. El método se caracteriza por que comprende adicionalmente:

- (a) proporcionar un vehículo en fase sólida, y el vehículo en fase sólida comprende celulosa magnética;
- 30 (b) proporcionar un reactivo, y el reactivo comprende una sal metálica, una sustancia alcohólica y una solución sustrato, la solución sustrato ajustando la sal metálica y la sustancia alcohólica a concentraciones apropiadas y, por tanto, promoviendo la unión del ácido nucleico de la muestra al vehículo en fase sólida, teniendo la sal metálica un catión univalente, seleccionándose la sustancia alcohólica del grupo que consiste en etanol, isopropanol y una combinación arbitraria de etanol e isopropanol; y
- 35 (c) mezclar el reactivo con el vehículo en fase sólida y la muestra que contiene el ácido nucleico, lavar el vehículo en fase sólida con el tampón de lavado para eliminar las sustancias que no son ácidos nucleicos de la muestra, y aislar el ácido nucleico del vehículo en fase sólida al que se ha unido el ácido nucleico, con el tampón de elución.

40 La presente divulgación proporciona también un método para purificar un ADN cromosómico, que comprende las etapas de: proporcionar una muestra que contiene el ADN cromosómico, y preparar un tampón de lavado y un tampón de elución, estando caracterizado el método por que comprende además:

- (a) proporcionar un vehículo en fase sólida, en el que el vehículo en fase comprende celulosa magnética;
- 45 (b) proporcionar un reactivo, en el que el reactivo comprende una sal metálica, una sustancia alcohólica y una solución sustrato, la solución sustrato ajustando la sal metálica y la sustancia alcohólica a concentraciones apropiadas y, por tanto, promoviendo la unión del ADN cromosómico de la muestra al vehículo en fase sólida, teniendo la sal metálica un catión univalente, seleccionándose la sustancia alcohólica del grupo que consiste en etanol, isopropanol y una combinación arbitraria de etanol e isopropanol; y
- 50 (c) mezclar el reactivo con el vehículo en fase sólida y la muestra que contiene el ADN cromosómico, lavar el vehículo en fase sólida con el tampón de lavado para eliminar las sustancias que no son ácidos nucleicos de la muestra, y aislar el ADN cromosómico del vehículo en fase sólida al que se ha unido el ADN cromosómico, con el tampón de elución.

55 Por tanto, el objeto principal es proporcionar un agente caotrópico que presente un aislamiento eficaz de un ácido nucleico para su uso junto con un vehículo en fase sólida para aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos.

Otro objeto es proporcionar un agente caotrópico que presente una operación segura y un uso conveniente para su uso junto con un vehículo en fase sólida para aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos.

60 Otro objeto adicional es proporcionar un agente caotrópico que presente una fácil fabricación para su uso junto con un vehículo en fase sólida para aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos.

65 Por tanto, el objeto principal es proporcionar un reactivo que presente un aislamiento eficaz de un ácido nucleico para su uso junto con un vehículo en fase sólida para aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos.

- Otro objeto adicional es proporcionar un reactivo que presente una operación segura y un uso conveniente para su uso junto con un vehículo en fase sólida para aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos.
- 5 Otro objeto adicional es proporcionar un reactivo que presente una fácil fabricación para su uso junto con un vehículo en fase sólida para aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos.
- Por tanto, el objeto principal es proporcionar un kit de reactivos que presente un aislamiento eficaz de un ácido nucleico.
- 10 Otro objeto es proporcionar un kit de reactivos que presente una operación segura y un uso conveniente.
- Otro objeto adicional es proporcionar un kit de reactivos que presente una fácil fabricación.
- 15 Por tanto, el objeto principal es proporcionar un agente caotrópico que presente un aislamiento eficaz de un ácido nucleico para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético.
- Otro objeto es proporcionar un agente caotrópico que presente una operación segura y un uso conveniente para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético.
- 20 Otro objeto adicional es proporcionar un agente caotrópico que presente una fácil fabricación para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético.
- Por tanto, el objeto principal es proporcionar un reactivo que presente un aislamiento eficaz de un ácido nucleico para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético.
- 25 Otro objeto es proporcionar un reactivo que presente una operación segura y un uso conveniente para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético.
- Otro objeto adicional es proporcionar un reactivo que presente una fácil fabricación para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético.
- 30 Por tanto, el objeto principal es proporcionar un kit de reactivos que presente un aislamiento eficaz de un ácido nucleico para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético.
- 35 Otro objeto es proporcionar un kit de reactivos que presente una operación segura y un uso conveniente para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético.
- Otro objeto adicional es proporcionar un kit de reactivos que presente una fácil fabricación para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético.
- 40 Por tanto, el objeto principal es proporcionar un método que presente un aislamiento eficaz de un ácido nucleico para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético.
- Otro objeto es proporcionar un método que presente una operación segura y un uso conveniente para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético.
- 45 Otro objeto adicional es proporcionar un método que presente una fácil fabricación para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético.
- 50 Por tanto, el objeto principal es proporcionar un método que presente un aislamiento eficaz de un ácido nucleico para unir un ácido nucleico a un material de celulosa magnético.
- Otro objeto es proporcionar un método que presente una operación segura y un uso conveniente para unir un ácido nucleico a un material de celulosa magnético.
- 55 Otro objeto adicional es proporcionar un método que presente una fácil fabricación para unir un ácido nucleico a un material de celulosa magnético.
- Por tanto, el objeto principal es proporcionar un método que presente un aislamiento eficaz de un ácido nucleico para aislar un ácido nucleico.
- 60 Otro objeto es proporcionar un método que presente una operación segura y un uso conveniente para aislar un ácido nucleico.
- 65 Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método que presente una fácil fabricación para aislar un ácido nucleico.

Por tanto, el objeto principal es proporcionar un método que presente un aislamiento eficaz de un ácido nucleico para purificar un ADN cromosómico.

5 Otro objeto es proporcionar un método que presente una operación segura y un uso conveniente para purificar un ADN cromosómico.

Otro objeto adicional es proporcionar un método que presente una fácil fabricación para purificar un ADN cromosómico.

10 Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona un agente caotrópico, un reactivo, un kit de reactivos, un agente caotrópico para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético, un reactivo para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético, un kit de reactivos para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético, un método para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético, un método para unir un ácido nucleico a un material de celulosa magnético, y un método para purificar un ADN cromosómico, tal y como se describe en adelante en el presente documento con referencia a algunas realizaciones ilustrativas. Puesto que los principios y esquemas básicos de la etapa de unión vehículo/ácido nucleico, la etapa de aislamiento del ácido nucleico, la etapa de lavado, y el programa de elución de la presente invención son bien conocidos por el experto en la materia, en el presente documento se omite una descripción detallada de tales principios y esquemas.

Realización 1

25 La Realización 1 es un agente caotrópico que se debe usar junto con un vehículo en fase sólida a fin de aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos, de modo que se aísle un ADN plasmídico, un ADN genómico, un ADNc, o sustancias de ADN similares a partir de un lisado celular, en el que el lisado celular puede provenir de una solución de cultivo que contiene células o bacterias, una muestra de tejido, una muestra de sangre completa, etcétera.

30 El vehículo en fase sólida para su uso con el agente caotrópico es papel de celulosa magnético o esferas de celulosa magnéticas elaborados con celulosa magnética. El método para elaborar el papel de celulosa magnético o las esferas de celulosa magnéticas se basa en el método propuesto por M. Pourfarzaneh et al. ("The Use of Magnetizable Particles in Solid Phase Immunoassay", M. Pourfarzaneh, R. S. Kamel, J. Landon, y C. C. Dawes, *Methods of Biochemical Analysis*. Volumen 28, Páginas 267-295).

35 El agente caotrópico incluye una sustancia alcohólica y una solución sustrato. La sustancia alcohólica puede ser etanol, isopropanol, y una combinación arbitraria de etanol e isopropanol. La solución sustrato contiene una sal de litio, una sal de sodio, o una sal de potasio que tiene una concentración de 0,05 M a 2,0 M. Además, la solución sustrato tiene un valor de pH que varía aproximadamente de 5,0 a 7,5. Se puede conseguir un buen efecto de aislamiento cuando la concentración de la sustancia alcohólica está entre aproximadamente un 10 % y un 80 % en volumen.

40 Para aislar un ADN de sustancias que no son ácidos nucleicos de una muestra, el agente caotrópico y el vehículo en fase sólida (es decir, el papel de celulosa magnético o las esferas de celulosa magnéticas elaborados con celulosa magnética) se añaden a la muestra de modo que la muestra se mezcla con el vehículo en fase sólida. Puesto que la solución sustrato ajusta la concentración de la sustancia alcohólica a un nivel apropiado, el agente caotrópico rompe los enlaces de hidrógeno, las interacciones de Van der Waals, o los efectos hidrófobos entre el ácido nucleico y el entorno en el que se localiza el ácido nucleico, aislando de este modo el ADN de las sustancias que no son ácidos nucleicos de la muestra y permitiendo que el ADN de la muestra se una y sea adsorbido sobre el papel de celulosa magnético o las esferas de celulosa magnéticas. Los resultados detallados del experimento se presentan más adelante en el Ejemplo Comparativo 1 y el Ejemplo Comparativo 2.

Realización 2

55 La Realización 2 es un reactivo que, cuando se usa en el aislamiento de ácidos nucleicos, puede aislar eficazmente un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos y que da como resultado la adsorción del ácido nucleico sobre el vehículo en fase sólida. El reactivo incluye una sal de litio, una sal de sodio, o una sal de potasio de una concentración predeterminada y un agente caotrópico, en el que la sal de litio, la sal de sodio, o la sal de potasio tiene una concentración que varía de 0,05 M a 2,0 M.

60 El reactivo se puede usar junto con un vehículo en fase sólida a fin de aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos, de modo que aísla un ADN plasmídico, un ADN genómico, un ADNc o sustancias de ADN similares a partir de un lisado celular, en el que el lisado celular puede provenir de una solución de cultivo que contiene células o bacterias, una muestra de tejido, una muestra de sangre completa, etcétera.

65

El vehículo en fase sólida para su uso con el reactivo es papel de celulosa magnético o esferas de celulosa magnética elaborados con celulosa magnética mediante el método descrito en la Realización 1.

El agente caotrópico incluye una sustancia alcohólica y una solución sustrato. La sustancia alcohólica puede ser etanol, isopropanol, y una combinación arbitraria de etanol e isopropanol. Además, la solución sustrato tiene un valor de pH que varía aproximadamente de 5,0 a 7,5. La solución sustrato contiene una sal de litio, una sal de sodio, o una sal de potasio que tiene una concentración de 0,05 M a 2,0 M. Se puede conseguir un buen efecto de aislamiento cuando la concentración de la sustancia alcohólica está entre aproximadamente un 10 % y un 80 % en volumen.

Para aislar un ADN de sustancias que no son ácidos nucleicos de una muestra, el agente caotrópico y el vehículo en fase sólida (es decir, el papel de celulosa magnético o las esferas de celulosa magnéticas elaborados con celulosa magnética) se añaden a la muestra de modo que la muestra se mezcla con el vehículo en fase sólida. Puesto que la solución sustrato ajusta la concentración de la sustancia alcohólica a un nivel apropiado, el agente caotrópico rompe los enlaces de hidrógeno, las interacciones de Van der Waals, o los efectos hidrófobos entre el ácido nucleico y el entorno en el que se localiza el ácido nucleico, aislando de este modo el ADN de las sustancias que no son ácidos nucleicos de la muestra y permitiendo que el ADN de la muestra se una y sea adsorbido sobre el papel de celulosa magnético o las esferas de celulosa magnéticas. Los resultados detallados del experimento se presentan más adelante en el Ejemplo Comparativo 1 y el Ejemplo Comparativo 2.

Realización 3

La Realización 3 es un kit de reactivos para aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos y recuperar de este modo el ácido nucleico. Por ejemplo, el kit de reactivos es adecuado para aislar un ADN plasmídico, un ADN genómico, un ADNc o sustancias de ADN similares a partir de un lisado celular de modo que se recuperan las sustancias de ADN.

El kit de reactivos incluye un reactivo, un vehículo en fase sólida para su uso con el reactivo, un tampón de lavado y un tampón de elución. El kit de reactivos se caracteriza por que el vehículo en fase sólida para su uso con el reactivo es papel de celulosa magnético o esferas de celulosa magnéticas elaboradas con celulosa magnética. Además, el reactivo del kit de reactivos incluye una sal metálica que tiene un catión univalente (por ejemplo, una sal de litio, una sal de sodio, o una sal de potasio) y un agente caotrópico. El agente caotrópico incluye una sustancia alcohólica y una solución sustrato. La sustancia alcohólica puede ser etanol, isopropanol, y una combinación arbitraria de etanol e isopropanol. La concentración de la sal de litio, la sal de sodio, o la sal de potasio, así como las concentraciones y los valores de pH de la sustancia alcohólica y de la solución sustrato, son los mismos que los de la Realización 2 y, por tanto, no se repiten en esta. Los dos párrafos siguientes describen sólo las características únicas de la presente realización.

Para usar el kit de reactivos, el reactivo, que contiene la sal metálica con un catión univalente y el agente caotrópico, se añade a la muestra, junto con el vehículo en fase sólida, que está en forma de papel de celulosa magnético o de esferas de celulosa magnéticas, de modo que la muestra se mezcla con el vehículo en fase sólida. La solución sustrato ajusta la concentración de la sustancia alcohólica a un nivel apropiado, permitiendo que el agente caotrópico rompa los enlaces de hidrógeno, las interacciones de Van der Waals, o los efectos hidrófobos entre el ácido nucleico y el entorno en el que se localiza el ácido nucleico, aislando de este modo el ADN de las sustancias que no son ácidos nucleicos de la muestra. Como resultado, el ADN de la muestra se une y es adsorbido sobre el papel de celulosa magnético o las esferas de celulosa magnéticas para formar un complejo.

El complejo formado por el ADN y el papel de celulosa magnético o las esferas de celulosa magnéticas se lava con el tampón de lavado para eliminar las impurezas unidas al complejo. Una vez completado el lavado, el ADN es separado del papel de celulosa magnético o las esferas de celulosa magnéticas por el tampón de elución y se eluye en el tampón de elución. De este modo, se recupera el ADN de la muestra. Los resultados detallados del experimento se presentan más adelante en el Ejemplo Comparativo 1 y el Ejemplo Comparativo 2.

Realización 4

La Realización 4 es un agente caotrópico para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético, de modo que aísla un ADN plasmídico, un ADN genómico, un ADNc o sustancias de ADN similares a partir de un lisado celular, en el que el lisado celular puede provenir de una solución de cultivo que contiene células o bacterias, una muestra de tejido, una muestra de sangre completa, etcétera. El agente caotrópico incluye una sustancia alcohólica y una solución sustrato. La sustancia alcohólica puede ser etanol, isopropanol, y una combinación arbitraria de etanol e isopropanol. La solución sustrato contiene una sal de litio, una sal de sodio, o una sal de potasio que tiene una concentración de 0,05 M a 2,0 M. Además, la solución sustrato tiene un valor de pH que varía aproximadamente de 5,0 a 7,5. Se puede conseguir un buen efecto de aislamiento cuando la concentración de la sustancia alcohólica está entre aproximadamente un 10 % y un 80 % en volumen.

Para aislar un ADN de sustancias que no son ácidos nucleicos de una muestra, el agente caotrópico y el vehículo en fase sólida (es decir, el papel de celulosa magnético o las esferas de celulosa magnéticas elaborados con celulosa magnética) se añaden a la muestra de modo que la muestra se mezcla con el vehículo en fase sólida. Puesto que la solución sustrato ajusta la concentración de la sustancia alcohólica a un nivel apropiado, el agente caotrópico rompe los enlaces de hidrógeno, las interacciones de Van der Waals, o los efectos hidrófobos entre el ácido nucleico y el entorno en el que se localiza el ácido nucleico, aislando de este modo el ADN de las sustancias que no son ácidos nucleicos de la muestra y permitiendo que el ADN de la muestra se una y sea adsorbido sobre el papel de celulosa magnético o las esferas de celulosa magnéticas. Los resultados detallados del experimento se presentan más adelante en el Ejemplo Comparativo 1 y el Ejemplo Comparativo 2.

Realización 5

La Realización 5 es un reactivo para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético. Cuando se usa en el aislamiento de ácidos nucleicos, el reactivo puede aislar eficazmente un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos y provocar la adsorción del ácido nucleico sobre el material de celulosa magnético. El reactivo incluye una sal metálica que tiene un catión univalente (por ejemplo, una sal de litio, una sal de sodio, o una sal de potasio) y un agente caotrópico, en el que la sal de litio, la sal de sodio, o la sal de potasio tiene una concentración que varía de 0,05 M a 2,0 M.

El reactivo es para aislar un ADN plasmídico, un ADN genómico, un ADNc o sustancias de ADN similares a partir de un lisado celular, en el que el lisado celular puede provenir de una solución de cultivo que contiene células o bacterias, una muestra de tejido, una muestra de sangre completa, etcétera.

El agente caotrópico mencionado anteriormente incluye una sustancia alcohólica y una solución sustrato. La solución sustrato contiene una sal de litio, una sal de sodio o una sal de potasio. Se puede conseguir un buen efecto de aislamiento cuando la concentración de la sustancia alcohólica está entre aproximadamente un 10 % y un 80 % en volumen. La composición de la sustancia alcohólica y el valor de pH de la solución sustrato son los mismos que en la Realización 2 y, por tanto, no se repiten en esta.

Para aislar un ADN de sustancias que no son ácidos nucleicos de una muestra, el agente caotrópico y el vehículo en fase sólida (es decir, el papel de celulosa magnético o las esferas de celulosa magnéticas elaborados con celulosa magnética) se añaden a la muestra de modo que la muestra se mezcla con el vehículo en fase sólida. Puesto que la solución sustrato ajusta la concentración de la sustancia alcohólica a un nivel apropiado, el agente caotrópico rompe los enlaces de hidrógeno, las interacciones de Van der Waals, o los efectos hidrófobos entre el ácido nucleico y el entorno en el que se localiza el ácido nucleico, aislando de este modo el ADN de las sustancias que no son ácidos nucleicos de la muestra y permitiendo que el ADN de la muestra se una y sea adsorbido sobre el papel de celulosa magnético o las esferas de celulosa magnéticas. Los resultados detallados del experimento se presentan más adelante en el Ejemplo Comparativo 1 y el Ejemplo Comparativo 2.

Realización 6

La Realización 6 es un kit de reactivos para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético. El kit de reactivos se diseña para aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos y, de este modo, recuperar el ácido nucleico.

El kit de reactivos se caracteriza por que incluye un reactivo, un material de celulosa magnético, un tampón de lavado, y un tampón de elución. El reactivo del kit de reactivos incluye una sal metálica que tiene un catión univalente (por ejemplo, una sal de litio, una sal de sodio, o una sal de potasio) y un agente caotrópico. El agente caotrópico incluye una sustancia alcohólica y una solución sustrato, en el que la sustancia alcohólica se selecciona del grupo que consiste en etanol, isopropanol, y una combinación arbitraria de etanol e isopropanol. La concentración de la sal metálica, así como las concentraciones y los valores de pH de la sustancia alcohólica y de la solución sustrato, son los mismos que los de la Realización 2 y, por tanto, no se repiten en esta. A continuación se describen las características únicas de la presente realización.

Para usar el kit de reactivos, el reactivo, que contiene la sal metálica con un catión univalente y el agente caotrópico, se añade a una muestra, junto con el vehículo en fase sólida, que está en forma de papel de celulosa magnético o de esferas de celulosa magnéticas, de modo que la muestra se mezcla con el vehículo en fase sólida. La solución sustrato ajusta la concentración de la sustancia alcohólica a un nivel apropiado, permitiendo que el agente caotrópico del reactivo rompa los enlaces de hidrógeno, las interacciones de Van der Waals, o los efectos hidrófobos entre el ácido nucleico y el entorno en el que se localiza el ácido nucleico, aislando de este modo el ADN de las sustancias que no son ácidos nucleicos de la muestra. Como resultado, el ADN de la muestra se une y es adsorbido sobre el papel de celulosa magnético o las esferas de celulosa magnéticas para formar un complejo.

Ejemplo Comparativo 1

Se efectuaron ensayos para evaluar la eficacia de las realizaciones anteriores (es decir, el agente caotrópico; el reactivo y el kit de reactivos que contiene el agente caotrópico; el agente caotrópico para su uso con un material de celulosa magnético, etc.) en cuanto a aislar un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos y promover la unión del ácido nucleico al material de celulosa magnético. Más específicamente, se usó una cantidad fija de ácido nucleico como muestra de partida. A la muestra de partida se añadieron diferentes sales metálicas y una sustancia alcohólica cuyo volumen total y concentraciones eran fijos y un material de celulosa magnético. El contenido de ácidos nucleicos de la muestra se midió en cada etapa del ensayo para determinar el efecto de unión y la tasa de recuperación final. A continuación se da una descripción detallada de las etapas:

1. Se preparan 200 µl de ADN de placenta humana de 50 mg/ml (Sigma D7011).
2. Al ADN de placenta humana de la Etapa 1, se añaden 500 µl de agente caotrópico o reactivo y 20 µl de esferas de celulosa Cortex (Megacell®), en el que el agente caotrópico o el reactivo contienen un 72 % de etanol (EtOH) y una sal metálica 0,05 M, variando la sal metálica de un ensayo a otro. Se mezcla por completo y se deja que la mezcla repose a temperatura ambiente durante 10 min.
3. Se retira el sobrenadante tras la precipitación de las esferas unidas al ADN, y se mide la absorbancia del sobrenadante a 260 nm (es decir, D.O. 260). El valor de absorbancia se convierte en concentración de ADN y, por tanto, en contenido de ADN. El contenido de ADN se compara con el contenido de ADN de partida para determinar el efecto de aislamiento. (Efecto de aislamiento = 1 - Efecto de unión)
4. Se lava con 500 µl de un 70 % de isopropanol como tampón de lavado. Después se separa el ADN de las esferas mediante enjuagado con 20 µl de agua. Se mide el contenido de ADN recuperado, y se compara con el contenido de ADN de partida para determinar la tasa de recuperación.

Como se muestra en la Tabla 1, en las realizaciones anteriores se usaron cloruro de litio (LiCl), acetato de sodio (NaOAc) y cloruro de sodio (NaCl) 0,05 M como solución de sal metálica para operar en combinación con un 72 % de etanol. En el grupo de control (es decir, el Grupo 1-4, el experimento blanco), sin embargo, las concentraciones de la sustancia alcohólica y de la sal metálica eran del 0 % y de 0 M, respectivamente.

Tabla 1

Grupo	Sustancia alcohólica	Sal metálica	Efecto de unión (%)	Tasa de recuperación (%)
1-1	72 % EtOH	LiCl 0,05 M	81	22
1-2	72 % EtOH	NaOAc 0,05 M	94	76
1-3	72 % EtOH	NaCl 0,05 M	86	57
1-4	0 % EtOH	sal 0 M	N/D*	N/D*
*: No disponible				

A partir de los resultados de la Tabla 1, se puede observar que el efecto de unión es mayor del 90 % para todas las combinaciones entre el 72 % de etanol y las diferentes sales metálicas 0,05 M. En particular, la combinación de un 72 % de etanol y NaOAc 0,05 M produce el efecto óptimo.

Ejemplo Comparativo 2

Con respecto a la Tabla 2, en la que se usó una muestra de sangre completa de un volumen fijo, se usó como solución de sal metálica acetato de sodio o acetato de potasio (KOAc) 0,05 M, 0,1 M, 0,5 M, 1,0 M, y 2 M en las anteriores realizaciones para operar junto con una sustancia alcohólica cuya concentración varía de un 10 % a un 72 % en peso (Grupos 2-1 a 2-8). Por otro lado, el Grupo 2-9 es el grupo de control (es decir, el experimento blanco), en el que las concentraciones de la sustancia alcohólica y del acetato de potasio son 0 % y 0 M, respectivamente.

Más específicamente, se trataron muestras de sangre entera del mismo volumen con un tampón de lisis para obtener lisados celulares. Las soluciones de sal metálica con las diferentes concentraciones mencionadas anteriormente y los agentes caotrópicos con diferentes concentraciones en peso se añadieron a los lisados celulares junto con un material de celulosa magnético y se mezclaron por completo con los lisados celulares. La mezcla se lavó con un 70 % de isopropanol como tampón de lavado y después se eluyó con Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, como tapón de elución, recuperando de este modo el ADN de la muestra. A continuación se midió la concentración de ADN de la muestra en cada grupo en unidades de ng/µl. Asimismo, se midieron las relaciones de absorbancia del producto de ADN recuperado en cada grupo entre 260 nm y 280 nm (es decir, la relación D.O. 260/280) y entre 260 nm y 230 nm (es decir, la relación D.O. 260/230) para determinar la pureza del ADN recuperado en cada grupo.

Tabla 2

Grupo	Sustancia alcohólica	Sal metálica (sal de Li, sal de Na, o sal de K)	Concentración producto ADN (ng/μl)	Relación D.O. 260/280	Relación D.O. 260/230
2-1	50 % isopropanol	KOAc 0,5 M	22,12	1,52	0,21
2-2	50 % isopropanol	KOAc 1 M	28,99	1,67	0,24
2-3	72 % isopropanol	NaOAc 0,05 M	60,92	1,64	0,41
2-4	25 % isopropanol	KOAc 1 M	32,23	1,5	0,21
2-5	25 % isopropanol	KOAc 2 M	27,12	1,61	0,24
2-6	10 % isopropanol	NaOAc 0,1 M, pH 5,0	34,06	1,52	0,17
2-7	50 % isopropanol	KOAc 0,05 M	19,49	1,91	0,07
2-8	25 % isopropanol	KOAc 0,05 M	24,63	1,9	0,24
2-9	0 % isopropanol	KOAc 0 M	0	N/D*	N/D*

*: No disponible

Se puede saber a partir de los resultados de la Tabla 2 que, para todas las combinaciones entre el 10 % y el 72 % de sustancia alcohólica y las sales metálicas 0,05 M a 2 M, los productos de ADN finales son de elevada pureza, con un bajo contenido de proteínas (relación D.O. 260/280 > 1,5) así como con un bajo contenido de ARN (relación D.O. 260/230 < 0,5) en los productos. Asimismo, mientras que este ejemplo comparativo sólo muestra los resultados del experimento que corresponden a las diferentes sales metálicas usadas en combinación con de un 10 % a un 72 % de sustancia alcohólica, otros experimentos han demostrado que se consiguieron un buen efecto de aislamiento y una elevada pureza del producto de ADN cuando la concentración de la sustancia alcohólica se elevó hasta el 80 %; adicionalmente, los agentes caotrópicos o reactivos con valores de pH que variaban entre 5,0 y 7,5 se demostró que eran igualmente capaces de promover el aislamiento de un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos y de promover la unión del ácido nucleico al material de celulosa magnético.

Por tanto, el agente caotrópico, el reactivo que incluye un agente caotrópico y una sal metálica, el kit de reactivos que incluye un agente caotrópico, el agente caotrópico para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético, el reactivo para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético, y el kit de reactivos para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético tal y como se describen en el presente documento, operan eficazmente con un vehículo en fase sólida que contiene un material de celulosa magnético para producir buenos efectos de aislamiento y purificación.

Realización 7

La Realización 7 es un método para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético. El método incluye proporcionar una muestra que contiene ácidos nucleicos y preparar un reactivo y un material de celulosa magnético para su uso con el reactivo. El reactivo incluye una sal metálica y un agente caotrópico, en el que el agente caotrópico incluye una sustancia alcohólica y una solución sustrato. La concentración de la sal metálica, así como las concentraciones y los valores de pH de la sustancia alcohólica y de la solución sustrato, son los mismos que los de la Realización 2 y, por tanto, no se repiten en esta. Los dos párrafos siguientes describen sólo las características únicas de la presente realización.

En primer lugar, se proporciona una muestra que contiene un ácido nucleico, tal como un lisado celular, en la que el lisado celular se puede obtener a partir de una solución de cultivo que contiene células o bacterias, una muestra de tejido, una muestra de sangre completa, etc. Asimismo, se preparan un reactivo y un material de celulosa magnético para su uso con el reactivo. El reactivo incluye una sal de litio, una sal de sodio, o una sal de potasio que tiene una concentración predeterminada y un agente caotrópico, en el que el agente caotrópico incluye una sustancia alcohólica y una solución sustrato. El reactivo y el material de celulosa magnético se añaden y se mezclan con la muestra que contiene el ácido nucleico de modo que la muestra se mezcla con el material de celulosa magnético. Puesto que la solución sustrato ajusta la concentración de la sustancia alcohólica a un nivel apropiado, el agente caotrópico del reactivo rompe los enlaces de hidrógeno, las interacciones de Van der Waals, o los efectos hidrófobos entre el ácido nucleico y el entorno en el que se localiza el ácido nucleico, aislando de este modo el ADN de la muestra de las sustancias que no son ácidos nucleicos. El ADN de la muestra se une y es adsorbido sobre el material de celulosa magnético para formar un complejo.

El método puede incluir adicionalmente proporcionar un tampón de lavado para separar mediante lavado las sustancias que no son ácidos nucleicos adsorbidas sobre el complejo formado por el ADN y el material de celulosa magnético. El método incluye también proporcionar un tampón de elución el cual, una vez completado el proceso de lavado mencionado previamente, separa el ADN mediante lavado del material de celulosa magnético de modo que

el ADN se eluye en el tampón de elución y está listo para ser recuperado. Los resultados detallados del experimento se dan en el Ejemplo Comparativo 3 que sigue a continuación.

Ejemplo Comparativo 3

5

Las etapas efectuadas son tal como sigue:

(a) Se añaden 200 µl de tampón de lisis y 20 µl de Proteinasa K de 10 mg/ml en 200 µl de una muestra de sangre completa. Se mezcla bien para producir un lisado celular.

10 (b) Se añaden 500 µl de reactivo al lisado celular, en el que el reactivo incluye de un 10 % a un 72 % de isopropanol, acetato de sodio o acetato de potasio 0,05 M a 2,0 M, y un vehículo en fase sólida que contiene el material de celulosa magnético, y en el que el reactivo tiene un valor de pH menor o igual a 6,0. Como resultado, el ADN cromosómico de la muestra se une al vehículo en fase sólida.

15 (c) Se separan mediante lavado las sustancias que no son ácidos nucleicos, las cuales no se unen al vehículo en fase sólida, con 1 ml de tampón de lavado. El tampón de lavado contiene o bien un 70 % de isopropanol o bien un 20 % de PEG6000 y acetato de potasio 2 M.

(d) Se aísla el ADN cromosómico del vehículo en fase sólida, con 100 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, como tampón de elución.

20 Después, se mide la concentración de ADN de la muestra en cada grupo en unidades de ng/µl. Asimismo, se miden las relaciones de absorbancia del producto de ADN recuperado en cada grupo entre 260 nm y 280 nm (es decir, la relación D.O. 260/280) y entre 260 nm y 230 nm (es decir, la relación D.O. 260/230) para determinar la pureza del ADN recuperado en cada grupo.

25

Tabla 3

Grupo	Sustancia alcohólica	Sal metálica (sal de Li, sal de Na, o sal de K)	Concentración producto ADN (ng/µl)	Relación D.O. 260/280	Relación D.O. 260/230
3-1	50 % isopropanol	KOAc 0,5 M	11,31	2,93	0,17
3-2	50 % isopropanol	KOAc 1 M	13,31	1,72	0,19
3-3	72 % isopropanol	NaOAc 0,05 M	28,56	1,53	0,22
3-4	25 % isopropanol	KOAc 1 M	9,42	1,58	0,12
3-5	25 % isopropanol	KOAc 2 M	9,76	1,77	0,17
3-6	10 % isopropanol	NaOAc 0,1 M, pH 5,0	5,75	0,96	0,06
3-7	72 % isopropanol	NaOAc 0,05 M	68,19	1,71	0,42
3-8	50 % isopropanol	KOAc 0,05 M	19,49	1,91	0,07
3-9	25 % isopropanol	KOAc 0,05 M	24,63	1,9	0,24
3-10	0 % isopropanol	KOAc 0 M	0	N/D*	N/D*

*: No disponible

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 3, se obtuvieron al menos 5 ng/µl de ADN cromosómico con el 10 % al 72 % de sustancia alcohólica y las sales metálicas 0,05 M a 2 M. Asimismo, los productos de ADN son de elevada pureza, en términos generales, el ADN cromosómico obtenido tiene un bajo contenido de proteínas (relación D.O. 260/280 > 1,5) así como un bajo contenido de ARN (relación D.O. 260/230 < 0,5). Además, mientras que este ejemplo comparativo sólo muestra los resultados del experimento que corresponden a las diferentes sales metálicas usadas en combinación con de un 10 % a un 72 % de sustancia alcohólica, otros experimentos han demostrado que se consiguieron un buen efecto de aislamiento y una elevada pureza del producto de ADN cuando la concentración de la sustancia alcohólica se elevó hasta el 80 %; adicionalmente, los agentes caotrópicos o reactivos con valores de pH que variaban entre 5,0 y 7,5 se demostró que eran igualmente capaces de promover el aislamiento de un ácido nucleico de sustancias que no son ácidos nucleicos y de promover la unión del ácido nucleico al material de celulosa magnético.

40 Por tanto el método para aislar un ácido nucleico mediante el uso de un material de celulosa magnético, el método para unir un ácido nucleico a un material de celulosa magnético, el método para aislar un ácido nucleico, y el método para purificar un ADN cromosómico, y tal y como se describen en el presente documento operan eficazmente con un vehículo en fase sólida que contiene un material de celulosa magnético para producir buenos efectos de aislamiento y purificación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar un ADN de una muestra promoviendo la unión del ADN contenido en la muestra con un material de celulosa magnético, estando caracterizado el método por tener las etapas de:

5 (1) proporcionar un material de celulosa magnético y un reactivo que comprende:
una solución caotrópica de un sal metálica univalente seleccionada del grupo que consiste en cloruro de litio, acetato de sodio y cloruro de sodio, y un alcohol seleccionado del grupo que consiste en etanol, isopropanol y una mezcla
10 seleccionada arbitrariamente de etanol e isopropanol, en la que la sal metálica univalente tiene una concentración que varía aproximadamente de 0,05 M a 2,0 M, y el alcohol tiene una concentración que varía aproximadamente del 10 % al 80 % en volumen, y el valor de pH de la solución caotrópica varía aproximadamente entre 5,0 y 7,5;

15 (2) añadir el reactivo y el material de celulosa magnético a la muestra que contiene el ADN y una pluralidad de sustancias que no son ácidos nucleicos; y mezclar el reactivo, el material de celulosa magnético y la muestra, permitiendo que la solución caotrópica de dicho reactivo rompa los enlaces de hidrógeno, las interacciones de Van der Waals, o los efectos hidrófobos entre el ADN y el entorno en el que se localiza el ácido nucleico de la muestra, de modo que el material de celulosa magnético se una y transporte al ADN; y
20 (3) eluir el ADN del material de celulosa magnético.

2. El método para aislar un ADN de una muestra de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra es un lisado celular.

25 3. El método para aislar un ADN de una muestra de acuerdo con la reivindicación 1, estando caracterizado el método por tener adicionalmente una etapa de proporcionar un tampón de lavado para separar mediante lavado las sustancias que no son ácidos nucleicos.

30 4. El método para aislar un ADN de una muestra de acuerdo con la reivindicación 3, usando el método un kit de reactivos que comprende un tampón de lavado, un tampón de elución, y una solución caotrópica de un reactivo que comprende:

35 una solución caotrópica de un sal metálica univalente seleccionada del grupo que consiste en cloruro de litio, acetato de sodio y cloruro de sodio, y un alcohol seleccionado del grupo que consiste en etanol, isopropanol y una mezcla seleccionada arbitrariamente de etanol e isopropanol; en la que la sal metálica univalente tiene una concentración que varía aproximadamente de 0,05 M a 2,0 M; el alcohol tiene una concentración que varía aproximadamente del 10 % al 80 % en volumen; y el valor de pH de la solución caotrópica varía aproximadamente entre 5,0 y 7,5.