

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 569**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2006 PCT/EP2006/001274**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2006 WO06084753**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2006 E 06706886 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 1851313**

54 Título: **Procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos en el que los ácidos nucleicos se inmovilizan a alta temperatura sobre una matriz**

30 Prioridad:

11.02.2005 EP 05002932

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

13.06.2017

73 Titular/es:

**QIAGEN GMBH (100.0%)
QIAGEN STRASSE 1
40724 HILDEN, DE**

72 Inventor/es:

**SPRENGER-HAUSSELS, MARKUS;
SCHULTE, GABI;
DEUTSCHMANN, THOMAS y
FELKER, SIBYLLE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 616 569 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

Procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos en el que los ácidos nucleicos se inmovilizan a alta temperatura sobre una matriz

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para el aislamiento de ácidos nucleicos.

5 El aislamiento de ácidos nucleicos tales como ADN o ARN de células vegetales, animales o humanas, así como de cultivos celulares o cultivos de virus, tiene lugar, por lo general, según un modelo base uniforme: en primer lugar, los materiales de partida que contienen ácidos nucleicos se descomponen - de manera parcial bajo utilización de enzimas degradadoras de proteínas. Entonces, en pasos siguientes pueden ser separados constituyentes individuales bajo utilización de los más diversos métodos.

10 La separación de la parte proteica que se presenta inevitablemente en cada lisado celular representa, en este caso, un paso particularmente importante. La separación puede tener lugar, por ejemplo, mediante puesta en contacto de la mezcla de proteínas/ácidos nucleicos con fenol y/o mezclas de cloroformo/alcohol isoamílico. La parte proteica, sin embargo, también puede ser precipitada, mediante adición de sales desnaturizantes - tales como, por ejemplo, hidrocloreuro de guanidinio, isotiocianato de guanidinio - de la fase acuosa. Junto a ello, las proteínas pueden ser descompuestas y, a continuación, eliminadas mediante la adición de proteasas. Por último, mediante la adición
15 opcional de DNasa o RNasa, se puede separar el ácido nucleico no deseado y mantener la fracción de ácido nucleico deseada en cada caso. Para la protección de los ácidos nucleicos ante una degradación enzimática no intencionada, durante el proceso de aislamiento, debe trabajarse, no obstante, bajo condiciones estériles y libres de nucleasa. La separación de los ácidos nucleicos puede, junto a ello, también tener lugar por la vía de la
20 centrifugación.

El documento EP1479769 da a conocer un procedimiento mediante el cual el ADN y ARN pueden ser aislados separados uno de otro. El enlace tiene lugar en presencia de un compuesto caotrópico, pero en ausencia de un alcohol. El documento WO98/31840 da a conocer un procedimiento en el cual ácidos nucleicos, en presencia de un compuesto caotrópico, son unidos a partículas de sílice magnéticas. La unión tiene lugar igualmente en ausencia de un alcohol. Smith et al, 1995 (Biotechniques, Vol. 18, Nº. 6 p 970 - 975), da a conocer un procedimiento para el
25 aislamiento de ADN a partir de muestras no complejas, mediante la unión a leche en vaso en presencia de yoduro de sodio. El documento WO95/01359 da a conocer un procedimiento para la purificación y separación de mezclas de ácidos nucleicos en presencia de altas concentraciones en sal y/o altas concentraciones en alcohol. El documento US 6.562.568 da a conocer un procedimiento de varias etapas para el aislamiento de ácidos nucleicos de una muestra biológica mediante la unión a partículas de vidrio magnéticas y enseña que muchos o, dado el caso, incluso todos los pasos pueden ser realizados esencialmente a la misma temperatura. Esta temperatura está en el intervalo de la temperatura ambiente hasta 70°C. El documento WO01/71732 da a conocer partículas de sílice magnéticas porosas y procedimiento para la fabricación de éstas. Además, da a conocer el uso de estas partículas magnéticas para el aislamiento de ácidos nucleicos en presencia de agentes caotrópicos y/o alcohol.

35 La mayoría de los procedimientos conocidos por el estado de la técnica se basan en uno de los dos siguientes principios de separación:

Los "procedimientos clásicos" se basan en un proceso de una sola etapa, en el cual tras la adición de un tampón, el cual en la mayoría de los casos contiene una sal de guanidinio, y tras adición de un agente de extracción orgánico - por lo general cloroformo o fenol - se realiza una extracción. Las sustancias acompañantes indeseadas se desechan
40 entonces con la fase orgánica. Los ácidos nucleicos que permanecen en la fase acuosa pueden a continuación ser separados y aislados mediante una separación por fases.

La fundamental desventaja de este procedimiento estriba en que junto con la utilización de sustancias venenosas y perjudiciales para la salud - tal como isotiocianato de guanidino, fenol o cloroformo - permanecen en la disolución de ácido nucleico acuosa sustancias solubles en agua como impurezas, las cuales deben ser separadas en otros
45 pasos de purificación que requieren mucho tiempo. Esta problemática dificulta la aplicación de estos procedimientos para el aislamiento de ácidos nucleicos, por ejemplo de plantas, dado que éstas contienen la mayoría de las veces grandes cantidades en polisacáridos y sustancias solubles en agua similares.

A la vista de estas desventajas, se ha impuesto, por lo tanto, en el estado de la técnica un proceso alternativo, el cual se basa en la adsorción selectiva de ácidos nucleicos en soportes sólidos, generalmente minerales tales como dióxido de silicio. En este caso, en un procedimiento de varias etapas se añade al lisado de células o de virus diferentes disoluciones tampón (tampón de lisis, de unión, de lavado y de elución) ,una detrás de otra; en la última
50 etapa se eluye del soporte el ácido nucleico purificado.

En el mundo científico, entretanto, se ha investigado el principio físico-químico de la unión de ácidos nucleicos a soportes minerales en presencia de sales caotrópicas. Se ha postulado que la unión de los ácidos nucleicos a las superficies de los soportes minerales se basa en una destrucción de las estructuras del medio acuoso más
55 relevantes, mediante las cuales los ácidos nucleicos se adsorben a la superficie de materiales minerales, en particular de partículas de vidrio o bien de sílice.

Desventajoso en los procedimientos arriba descritos es, en particular, que con el uso de muestras, las cuales están enriquecidas con una porción especialmente alta de sustancias secundarias nocivas, para la alta pureza pretendida deben ser aceptadas pérdidas de rendimiento considerables.

5 La misión de la presente invención consiste, por lo tanto, en poner a disposición un procedimiento para el aislamiento de ARN o bien ADN, el cual no presente las desventajas arriba descritas y conocidas por el estado de la técnica y poner a disposición ácidos nucleicos en un alto rendimiento y pureza.

Este problema se resuelve mediante los procedimientos de acuerdo con la invención de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 13.

10 De manera inesperada se descubrió que se puede lograr una mejora de la unión de ácidos nucleicos a partículas de sílice magnéticas en ausencia de agentes caotrópicos y alcohol de acuerdo con las reivindicaciones, si la disolución que contiene ácido nucleico se calienta antes o durante la unión. Esta mejora repercute, en particular, tanto en la unión de ARN y ADN virales como de ARN sintético e, igualmente, en otras especies de ácido nucleico.

15 Por materiales biológicos se entienden materiales de base en partículas o molecular. A ellos pertenecen, en particular, virus, fagos y células tales como, p. ej., bacterias, pero también células humanas, animales (por ejemplo leucocitos) o vegetales. En particular, el procedimiento de acuerdo con la invención es adecuado, sin embargo, preferiblemente para el aislamiento de ácidos nucleicos tales como ADN o ARN de materiales de muestra de origen humano o animal – tal como por ejemplo muestras clínicas, tal como sangre, plasma, suero, líquido de enjuague bucal, orina, líquido cerebral, esputo, excremento, punciones, frotis de epitelio, biopsias y otras muestras de tejido o médula de hueso.

20 La muestra también puede proceder del campo de la analítica del medio ambiente, analítica de los alimentos o de la investigación molecular-biológica, p. ej., de cultivos de bacterias, cultivos de virus, lisados de fagos, filtros de aire o de agua.

25 Con el procedimiento de acuerdo con la invención se puede aislar material biológico nativo o modificado. Por material biológico nativo se entiende un material, cuya estructura no se modificó de manera irreversible, en comparación con los materiales biológicos que aparecen de forma natural. Esto, sin embargo, no descarta la modificación de otros constituyentes de la muestra. Si, por ejemplo, deben aislarse células, entonces ciertamente el medio que rodea las células puede estar modificado, pero no las células como tales. Si deben ser aislados ácidos nucleicos, también éstos deben estar modificados en la forma nativa, es decir, no cortados o modificados mediante acoplamiento de grupos reactivos. Por lo tanto, la expresión material biológico nativo comprende, en particular, 30 ácidos nucleicos biotinilados. Ejemplos de materiales biológicos nativos representan, entre otros, ADN virales, ARN virales o ácidos nucleicos celulares de materiales de muestra humanos o animales.

35 Materiales biológicos modificados comprenden materiales, los cuales no aparecen en la naturaleza, p. ej., ácidos nucleicos, los cuales están modificados mediante fijación de grupos reactivos, detectables, estabilizantes o aptos para la inmovilización, p. ej., ácidos nucleicos biotinilados; junto a ellos, se han de mencionar ADN y ARN sintéticos pero también, por ejemplo, ARN blindado ("armored RNA").

40 En determinados casos, la muestra puede ser utilizada sin tratamiento previo en el procedimiento de acuerdo con la invención. En muchos casos, la muestra, sin embargo, debería ser descompuesta mediante un método adecuado y liberado el material biológico contenido en la muestra. Procedimientos para la descomposición de muestras son conocidos para el experto en la materia y pueden ser de naturaleza química, enzimática o física. También es posible una combinación de estos procedimientos.

45 En este caso, se pueden manifestar como más ventajosos diversos métodos para diferentes materiales biológicos, pero, por otro lado, en principio, es adecuado cada uno de los métodos expuesto a continuación: lisis con ayuda de detergentes iónicos y no ionógenos tales como, p. ej., SDS, LiDS o sarcosil en tampones adecuados, la utilización de sales caotrópicas tales como, por ejemplo, hidrocloreto de guanidinio (GHCl), tiocianato de guanidinio (GTC), yoduro sódico, perclorato sódico, etc.; el desgarrado mecánico tal como, p. ej., por medio de una prensa French, ultrasonidos, molienda con esferas de vidrio, aluminio o en nitrógeno líquido, lisis enzimática, por ejemplo con lisozima, proteinasas, pronasas o celulasas u otras enzimas para la lisis adquiribles en el comercio; lisis de la célula por medio de bacteriófagos o infección vírica; liofilización; choque osmótico; tratamiento por microondas; tratamiento térmico, p. ej., calentando o hirviendo o congelando, p. ej., en hielo seco o nitrógeno líquido y descongelación, lisis 50 alcalina.

Como ya se ha mencionado arriba, todos los procedimientos anteriores representan técnicas estándares para la lisis, las cuales son suficientemente conocidas por el estado de la técnica y puede ser aplicadas en cada uno de los procedimientos, o combinaciones de estos.

55 Así, es particularmente efectiva una combinación de caotrópicos y detergentes para la lisis de células bacterianas. Un agente a modo de ejemplo, adecuado para la lisis, contiene, por lo tanto, un caotrópico tal como, p. ej., GTC o GHCl y un detergente tal como, p. ej., SDS o sarcosil. Estos agentes para la lisis se pueden presentar en disolución acuosa o en una disolución tampón, es decir, como el denominado tampón de lisis. Como tampón se puede utilizar cualquier

tampón adecuado tal como, por ejemplo, tampón Tris, bicina, tricina o fosfato. Alternativamente a ello, el agente de lisis también puede ser añadido por separado. Concentraciones y cantidades adecuadas de los agentes de lisis varían en función del sistema respectivo, de la naturaleza de las células, etc. y pueden ser determinadas por el experto en la materia, pudiendo ser utilizadas, por ejemplo, concentraciones en el intervalo de 2 M a 7 M de caótropro tal como, p. ej., GTC, GHCl, NaI o perclorato de sodio, agentes alcalinos 0,1 M a 1 M tales como, p. ej., NaOH, y detergentes al 0,1 a 50% en peso (peso/volumen). Un ejemplo de un tampón de lisis de este tipo contiene, por tanto, un disolución acuosa de GTC 4 M y sarcosil al 1% (peso/volumen).

Para diferentes sistemas de lisis pueden ser adecuadas diferentes condiciones de incubación, las cuales son conocidas por el estado de la técnica. Para un tampón de lisis que contiene detergentes y/o caótropros, por ejemplo, la incubación puede tener lugar a temperatura ambiente o a temperatura elevada, por ejemplo en un intervalo de 37 a 65° C.

De la misma manera también se puede variar el tiempo de incubación, desde unos pocos minutos hasta 24 horas, por ejemplo 5 minutos hasta 2 horas. En el caso del tampón de lisis de GTC/sarcosil y células bacterianas, por ejemplo, se ha acreditado una incubación a 65° C durante 10 a 20 minutos, la cual, sin embargo, también puede ser variada cuando sea necesario. Para la lisis enzimática, por ejemplo por medio de proteinasa K, etc., pueden ser necesarios tiempos de tratamiento más largos, por ejemplo a lo largo de un espacio de tiempo de 12 horas.

Preferiblemente, la lisis tiene lugar en presencia de sales caotrópicas, oscilando la concentración de estas sales entre 2 y 8 mol/l, preferiblemente de 4 a 6 mol/l. En el caso de sales caotrópicas se trata, p. ej., de yoduro de sodio, perclorato de sodio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio o hidrocloreuro de guanidinio. La unión, sin embargo, no está limitada a estos compuestos. El enlace tiene lugar en presencia de un alcohol. Se utilizan alcoholes de cadena corta, ramificados o no ramificados, seleccionados de etanol, propanol e isopropanol. En este caso, la concentración de los alcoholes se mueve en el intervalo de 1 a 100% (volumen/volumen), preferiblemente de 2 a 80%, más preferiblemente de 5 a 70%, aún más preferiblemente de 10 a 60% y lo más preferiblemente de 15 a 50%. De manera sorprendente, se demuestra que el calentamiento de la disolución que contiene el ácido nucleico en ausencia de reactivos caotrópicos y alcohol, ejerce una influencia similar, tanto sobre la unión de ARN y ADN virales como sobre los ARN sintéticos y otras especies de ácidos nucleicos.

Para el aislamiento de los ácidos nucleicos, la muestra se pone en contacto con el material de soporte, es decir las partículas arriba mencionadas, y se incuba durante un tiempo suficiente para la unión. Para ácidos nucleicos, pueden ser apropiados tiempos de incubación entre 10 segundos y 30 minutos. De manera práctica, se han mostrado como ventajosos tiempos de incubación en un intervalo de 11 +/- 10 minutos.

Para el aislamiento de ácidos nucleicos se utilizan preferiblemente partículas magnéticas silanizadas, las cuales tienen forma de perla o de esfera y presentan un tamaño de partícula en el intervalo de 5 a 25 µm, de manera preferida 6 a 15 µm y de manera particularmente preferida de 6 a 10 µm, así como con una distribución según el tamaño muy estrecha. Partículas de sílice magnéticas, las cuales de manera ventajosa pueden ser utilizadas en el procedimiento de acuerdo con la invención, se describen, p. ej., en la solicitud de patente internacional WO 01/71732 página 6, línea 29 a página 8 línea 8, a la cual por la presente se hace referencia a su contenido completo. De acuerdo con la invención, la unión tiene lugar, en este caso, en un intervalo de temperaturas de 50 a 65° C y, de manera muy particularmente preferida, a 56° C.

Efectos similares sobre la unión de ácidos nucleicos los muestran, entre otros, sustancias desnaturalizantes tales como, por ejemplo, dimetilsulfóxido.

Tras la incubación tiene lugar la separación del material biológico, preferiblemente de los ácidos nucleicos del líquido de muestra. Esto, en general, se logra mediante la separación de los ácidos nucleicos unidos de acuerdo con la invención a las partículas – en el caso de utilizar partículas de sílice magnéticas - con ayuda de un campo magnético. Por ejemplo, las partículas magnéticas pueden ser atraídas a la pared del recipiente, en el cual tuvo lugar la incubación. A continuación, puede ser separado el líquido con las sustancias constitutivas de la muestra, las cuales no se unieron a las partículas magnéticas.

Esta separación depende del tipo de recipiente en el cual ha tenido lugar la incubación. Etapas de procedimiento adecuadas para la supresión del líquido son, p. ej., pipeteado o succión del líquido.

En caso deseado, las partículas cargadas - magnéticas - pueden ser limpiadas una o varias veces con una disolución de lavado. La disolución de lavado se elige de manera que, a ser posible, no tenga lugar - o bien, no en una medida digna de mención - un desprendimiento del material biológico, p. ej., de los ácidos nucleicos, de la superficie de las partículas, sin embargo, impurezas todavía existentes son separadas por lavado lo mejor posible. Esta etapa de lavado tiene lugar preferiblemente mediante incubación de la disolución de lavado con las partículas cargadas, efectuando, preferiblemente, una resuspensión de las partículas, p. ej., mediante agitación o aplicación de un campo magnético que no es idéntico al primer campo magnético. La disolución de lavado con impurezas se suprime, preferiblemente, igual que el líquido del lisado que permanece tras la unión de los ácidos nucleicos.

Como disolución de lavado se puede utilizar cualquier tampón de lavado convencional o cualquier otro medio adecuado. En general, se prefieren tampones con fuerza iónica baja a moderada tal como, p. ej., Tris-HCl 10 mM

- 5 con un pH de 8, 0 – NaCl 10 mM. Además, también se pueden utilizar tampones de lavado, los cuales presentan elevadas concentraciones en sales – tales como, p. ej., hidrocloreuro de guanidinio 3 M. Igualmente, se pueden utilizar otros medios estándares para la realización de la etapa de lavado, por ejemplo medios alcohólicos tales como, p.ej., disoluciones de alcanos de cadena corta con uno a cinco átomos de carbono, preferiblemente, disoluciones de etanol en agua y de manera particularmente preferida, etanol acuoso al 70 por ciento.
- La utilización de partículas magnéticas posibilita una realización sencilla de las etapas de lavado mediante la agregación magnética de las partículas, separación del medio que une ácidos nucleicos, supresión del medio de lavado y adición de medio de lavado nuevo tan a menudo como le parezca necesario al experto en la técnica.
- 10 Tras el procedimiento del aislamiento de ácidos nucleicos y, en su caso, de cada una de las etapas de lavado deseada, el soporte que porta el ácido nucleico puede ser transferido, p. ej., resuspendido o sumergido, en cualquier medio adecuado, p. ej., agua o un tampón con fuerza iónica baja.
- A continuación de la última etapa de lavado, se puede realizar una breve etapa de secado de las partículas magnéticas al vacío o (dejando) evaporar el líquido.
- 15 Es evidente que las etapas del lavado y del secado descritas anteriormente no sólo pueden ser llevadas a cabo durante el lavado y/o el aislamiento de ácidos nucleicos, sino también son adecuadas para el lavado y/o el aislamiento de los otros materiales biológicos anteriormente nombrados.
- 20 En función del soporte y del tipo de un subsiguiente tratamiento, puede ser deseable disolver el ácido nucleico del soporte o no disolver éste del soporte. En el caso de un soporte particularmente sólido tal como las partículas magnéticas arriba mencionadas, éste puede, en muchos casos, ser utilizado directamente tal como, p. ej., en la PCR u otros métodos de amplificación sin tener que eluir los ácidos nucleicos del soporte. Además, tampoco es necesaria una elución para muchos procedimientos de detección o procedimientos de identificación de ADN, ya que, aunque el ADN, casualmente, está en contacto con la superficie de las bolitas y puede estar unido con una multitud de puntos mediante uniones por puente de hidrógeno o enlaces iónicos u otra fuerzas, está a disposición una longitud de ADN suficiente para la hibridación con oligonucleótidos y para la multiplicación.
- 25 Para el caso de que en el material biológico se trate de ácidos nucleicos nativos, se puede separar el ácido nucleico por medio de un tampón de elución con contenido bajo en sales de las partículas de acuerdo con la invención. Tampones de este tipo son conocidos por el estado de la técnica [Analytical Biochemistry 175,196-201 (1988)]. Como tampón de elución con bajo contenido en sales se utilizan, en particular, tampones con un contenido en sales de menos de 0,1 mol/l. De manera particularmente preferida, el tampón de elución contiene Tris-HCl.
- 30 También es particularmente adecuada para la elución agua desmineralizada.
- En caso deseado, también es posible separar el ARN del ADN, lo cual se puede lograr mediante la destrucción del ARN antes de la etapa de la separación de ADN, por ejemplo mediante adición de RNasa o álcalis tal como, p. ej., NaOH.
- 35 Mediante combinación del aislamiento de células de acuerdo con la invención arriba descrito con el aislamiento de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, igualmente descrito, mediante la unión en su forma nativa a materiales de soporte magnéticos, en forma de partícula, a la temperatura de enlace elevada de acuerdo con la invención, resulta un procedimiento particularmente ventajoso para el aislamiento de ácidos nucleicos de muestras que contienen células. Las ventajas de esta forma de realización no sólo consisten en su simplicidad y alta sensibilidad, así como su sencilla capacidad de automatización sino, particularmente, en su alto rendimiento
- 40 mediante la unión de acuerdo con la invención de los ácidos nucleicos a las superficies de sílice a temperaturas elevadas.
- Los materiales biológicos aislados a consecuencia del procedimiento de acuerdo con la invención pueden ahora continuar siendo utilizados de manera arbitraria. Por ejemplo, se pueden utilizar como sustrato para diferentes reacciones enzimáticas. En el caso de los ácidos nucleicos se mencionan como ejemplos la secuenciación, el
- 45 marcaje radiactivo o no radiactivo, la amplificación de una o varias secuencias contenidas en ellos, la transcripción, la hibridación con ácidos nucleicos con sondas marcadas, la traslación o la ligación. Una ventaja del procedimiento de acuerdo con la invención es que la separación del material biológico, en particular de los ácidos nucleicos del líquido, no es sólo muy sencilla, sino también se puede llevar a cabo con altas ganancias y alto rendimiento.
- 50 La Figura 1 muestra valores medios de los valores Ct de ARN del VHC según (RT)-PCR en tiempo real en función de la temperatura de enlace. Una descripción adicional de la figura se encuentra en el Ejemplo 1.
- La Figura 2 muestra los valores medios de los valores Ct de ARN del VHC (Fig. 2 a)) ADN del VHB (Fig. 2b)) y VIH blindado ("armored-HIV") (Fig. 2 c)) según (RT)-PCR en tiempo real en función de la temperatura de enlace. Una descripción adicional de la figura se encuentra en el Ejemplo 2.

Ejemplo 1

Extracción de ARN viral y de ADN viral (llevada a cabo con el kit MagAttract Virus Mini M 48 (QIAGEN, Hilden, Alemania)).

5 400 µl de plasma, suero o CSF (líquido) se combinan y mezclan con ayuda de un tampón de lisis adquirible comercialmente, p. ej., 435 µl de Tampón de Lisis AL de QIAGEN, que contiene 3 µg de ARN de soporte y una proteasa, p. ej., 80 µl de proteasa liofilizada de QIAGEN, resuspendida en Tampón de Resuspensión de Proteasa de QIAGEN. La mezcla se incuba durante un espacio de tiempo de 15 minutos a una temperatura de 56 °C.

10 Después se mezclan las partículas de sílice magnéticas - p. ej. 30 µl MagAttract Suspension B (QIAGEN, Hilden, Alemania) - y 525 µl de isopropanol. Tiene lugar una incubación durante 5 minutos a 8 °C, 18 °C, 26 °C, 36 °C, 46 °C, 56 °C, 65 °C o 75 °C (véase abajo), durante la cual se unen los ácidos nucleicos a las partículas de sílice magnéticas. Tras la separación de las partículas, se retira la fase líquida y las partículas se lavan con un tampón de lavado, p. ej. con 500 µl de Tampón de Lavado AW 1 de QIAGEN reconstituido con etanol. Tras la separación de las partículas se retira la fase líquida y se lavan de nuevo las partículas - p. ej. con 500 µl de Tampón de Lavado AW 2 de QIAGEN reconstituido con etanol. Se repite el último proceso de lavado. Después se lavan las partículas con 500 µl de etanol. Tras la separación de las partículas se retira la fase etanólica y las partículas se secan a temperatura ambiente. A continuación, se eluye el ácido nucleico con un tampón de elución obtenible comercialmente - p. ej., con 100 µl de Tampón de Elución QIAGEN AVE -, las partículas de sílice magnéticas se retiran y el material eluido se calienta durante un espacio de tiempo de 5 minutos a un temperatura de 75 °C.

20 De acuerdo con la metodología arriba descrita se mezcló plasma humano negativo con VHC (ARN viral). 12 réplicas de las muestras se calentaron respectivamente a 8 °C, 18 °C, 26 °C, 36 °C, 46 °C, 56 °C, 65 °C o bien 75 °C antes de la unión. Los materiales eluidos obtenidos se sometieron en cada caso a una (RT)-PCR en tiempo real específica para el VHC. De los valores medios de los valores Ct en función de la temperatura de enlace representados en la Fig. 1, es evidente que con la realización del procedimiento de acuerdo con la invención en el caso de la unión en un intervalo de temperaturas 36 °C a 75 °C, la misión que sirve de base para la invención se resuelve de manera impresionante.

Ejemplo 2

En otro experimento se mezcló, de acuerdo con la metodología descrita en el ejemplo anterior, plasma humano negativo con VHC (un virus de ARN de una cadena) y VHB (un virus de ADN de doble cadena), así como VIH blindado ("armored-HIV") (un ARN sintético, el cual fue empaquetado en una envoltura de proteína).

30 En cada caso se procesaron 6 repeticiones de ensayo (operaciones) con en cada caso 6 réplicas de las muestras, por un lado, con el protocolo estándar MagAttract Virus Mini M 48 de QIAGEN (protocolo como en el Ejemplo 1, unión de ácido nucleico, pero a 8 °C), así como un protocolo MagAttract Virus Mini M 48 modificado, en el cual el lisado se calentó hasta 56 °C antes de la unión. Los materiales eluidos obtenidos se sometieron en cada caso a una (RT)-PCR en tiempo real específica para el VHC, VHB y VIH. De los valores medios de los valores Ct en función de la temperatura de enlace representados en la Fig. 2a) a c), es evidente que en el caso de la realización del procedimiento de acuerdo con la invención, la unión del ácido nucleico a temperatura elevada, aumenta significativamente el rendimiento.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos, que comprende las siguientes etapas de procedimiento
- a) lizado de una muestra biológica que contiene células y/o virus y/o fagos,
- 5 b) inmovilización del o de los ácidos nucleicos liberados en una matriz sobre una base de uno o varios compuestos de silicio-oxígeno en presencia de un alcohol ramificado o no ramificado elegido de isopropanol y etanol y un compuesto caotrópico y, en su caso, lavado del o de los ácidos nucleicos inmovilizados sobre la matriz,
- c) separación del ácido nucleico unido de manera en sí conocida,
- 10 tratándose en el caso de la matriz de partículas magnéticas con una superficie de sílice y teniendo lugar la inmovilización del o de los ácidos nucleicos en un intervalo de temperaturas de 50 a 65 °C.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la inmovilización tiene lugar a una temperatura de 56 °C.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto caotrópico se representa mediante una sal de sodio o de guanidinio caotrópica.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la sal de sodio o de guanidinio caotrópica es yoduro de sodio, perclorato de sodio, tiocianato de guanidinio, iso-tiocianato de guanidinio o hidrocloreto de guanidinio, o representa una mezcla de dos o más de las sales mencionadas.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el alcohol se representa mediante mezclas de los alcoholes nombrados.
- 20 6. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 5, en el que el alcohol se presenta en forma de una disolución acuosa en una concentración de 1 a 100% (volumen/volumen), preferiblemente 2 a 80%, más preferiblemente de 5 a 70%, aún más preferiblemente de 10 a 60% y lo más preferiblemente de 15 a 50%.
7. Procedimiento para la inmovilización de ácidos nucleicos en una matriz, en la cual se trata de partículas magnéticas con una superficie de sílice, en presencia de un alcohol ramificado o no ramificado, elegido de isopropanol, propanol y etanol y un compuesto caotrópico, en el que la inmovilización del o de los ácidos nucleicos tiene lugar en un intervalo de temperaturas de 50 a 65 °C.
- 25 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el alcohol se presenta en disolución acuosa.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el alcohol se representa mediante mezclas de los alcoholes mencionados.
- 30 10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la inmovilización tiene lugar en presencia de una disolución acuosa de etanol, propanol y/o isopropanol en una concentración en un intervalo de 1 a 100% (volumen/volumen), preferiblemente de 2 a 80%, más preferiblemente de 5 a 70%, aún más preferiblemente de 10 a 60% y lo más preferiblemente de 15 a 50% a una temperatura de 56 °C.
- 35 11. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el compuesto caotrópico se representa mediante una sal de sodio o de guanidinio caotrópica.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la sal de sodio o de guanidinio caotrópica es yoduro de sodio, perclorato de sodio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio o hidrocloreto de guanidinio o representa una mezcla de dos o más de de las sales mencionadas.
13. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la inmovilización tiene lugar a una temperatura de 56 °C.

40

Fig. 1

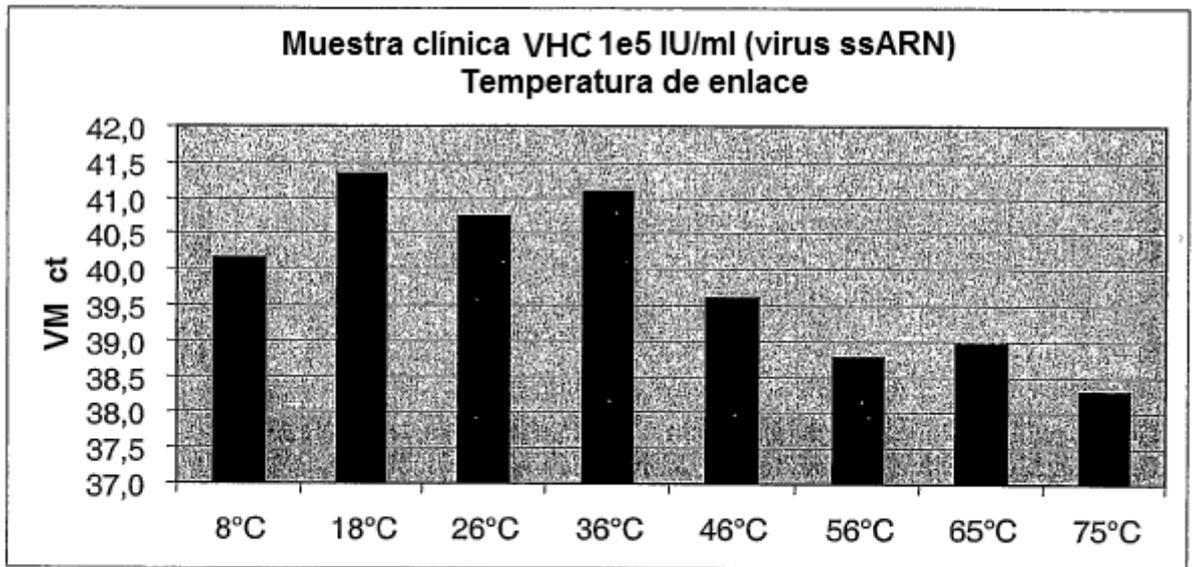


Fig. 2

Fig. 2 a)

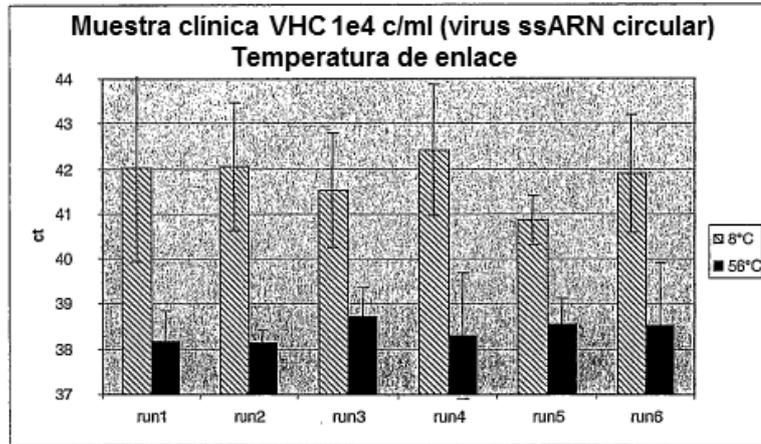


Fig. 2 b)

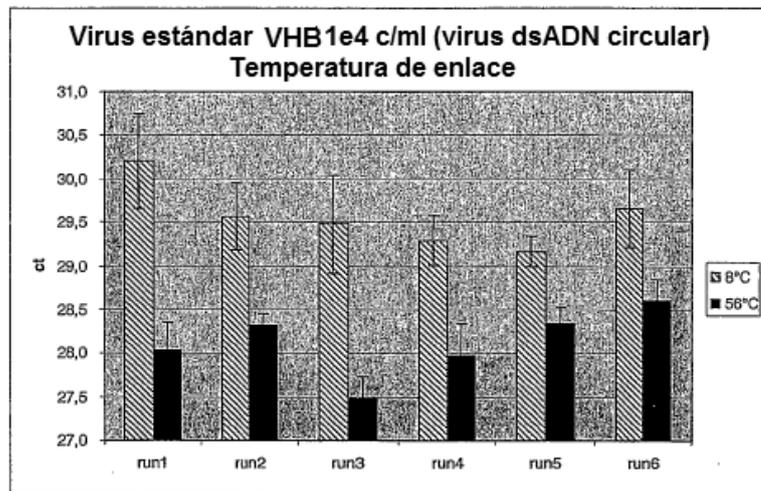


Fig. 2 c)

