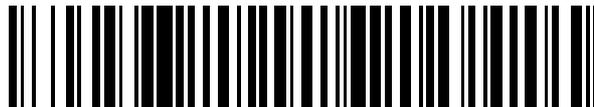


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 292**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2012 PCT/EP2012/065574**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2013 WO13021027**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2012 E 12745855 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2742132**

54 Título: **Matriz y método para purificar y/o aislar ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

09.08.2011 GB 201113698

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

06.07.2017

73 Titular/es:

**WIRTZ, RALPH MARKUS (100.0%)
Rolandstraße 82
50677 Köln, DE**

72 Inventor/es:

WIRTZ, RALPH MARKUS

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 622 292 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

Matriz y método para purificar y/o aislar ácidos nucleicos

5 La presente invención se relaciona con una matriz y un método para purificar y/o aislar ácidos nucleicos.

Introducción

10 La purificación y el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas es una tecnología clave en diagnóstico molecular, epidemiología, analítica de alimentos, investigación forense y ciencia biológica. Uno de los enfoques más populares implica la unión de ácidos nucleicos a superficies de sílice en presencia de agentes caotrópicos. Los principios de este enfoque son, por ejemplo, descritos por Boom *et al* (1990), *J Clin Microbiol*. marzo de 1990; 28(3): 495-503. Los kits que utilizan esta tecnología son por ejemplo comercializados por BioMerieux, Qiagen o Promega.

15 Los ácidos nucleicos disueltos en una muestra líquida tienen la capacidad de unir sílice, es decir, SiO₂ amorfa en presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas ("tampón de unión"). Estas últimas desnaturalizan biomoléculas alterando la capa de hidratación que las rodea. Esto permite iones cargados positivamente (por ejemplo, iones de sodio provistos de tampón de unión) para formar un puente salino entre la sílice cargada negativamente y el esqueleto del ADN cargado negativamente. En una etapa siguiente, un tampón de fuerza iónica baja ("tampón bajo en sal") se utiliza para alterar estas uniones mediante la solubilización de los ácidos nucleicos a efectos de eluir los ácidos nucleicos.

Sumario de la invención

25 Antes de describir la invención con detalle, queda entendido que esta invención no se limita a los componentes particulares de los dispositivos descritos o las etapas del proceso de los métodos descritos como tales dispositivos y métodos pueden variar. También se entiende que la terminología utilizada en la presente memoria se realiza con fines de describir únicamente realizaciones particulares, y no tiene por objeto ser limitante. Cabe señalar que, como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en singular y/o en plural salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Además, debe entenderse que, en el caso de que se den intervalos de parámetros que están delimitados por valores numéricos, se considera que los intervalos incluyan estos valores de limitación.

30 Las reivindicaciones dependientes están relacionadas con las realizaciones preferentes. Queda por entender que los intervalos de valores delimitados por valores numéricos deben entenderse que incluyen dichos valores de delimitación.

40 De acuerdo con la invención, se proporciona un material matricial adecuado para su uso en la purificación y/o aislamiento de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica, cuya matriz comprende una superficie que comprende al menos un elemento seleccionado entre el grupo que consiste en germanio, estaño y/o plomo; o al menos una de sus sales.

45 El germanio (Ge), el estaño (Sn) y el plomo (Pb) pertenecen al grupo de carbono de la tabla periódica, también denominado grupo 14 de acuerdo con el nuevo sistema UIQPA. En comparación con los elementos restantes del grupo de carbono, es decir, carbono (C) y silicio (Si), los tres elementos anteriores tienen en común una densidad y una masa atómica elevadas, además de una buena conductividad eléctrica, que los separa del silicio y del carbono. El germanio (Ge), el estaño (Sn) y el plomo (Pb) forman así un subgrupo con el grupo 14. Las siguientes tablas muestran claramente esto:

50

elemento	masa atómica	densidad (kg/m ³)	conductividad eléctrica (S/m)
Carbono	12,011	2.250-3.510	1×10^4 - 3×10^6
Silicio	28,086	2.330	$2,52 \times 10^{-4}$
Germanio	72,59	5.323	1,45
Estaño	118,71	7.310	$9,17 \times 10^6$
Plomo	207,2	11.340	$4,81 \times 10^6$

Además, el germanio, el estaño y el plomo tienen un diámetro iónico mayor que el silicio. Todas estas características técnicas contribuyen a las diferencias significativas en la reacción de unión del silicio, por una parte, y el germanio, el estaño y el plomo, por otra parte, con el esqueleto del ácido nucleico.

55

En una realización preferente, dicha matriz comprende germanio o una sal de germanio, preferentemente óxido de germanio.

El germanio es un elemento químico con el símbolo Ge y número atómico 32. El dióxido de germanio (GeO₂),

también llamado óxido de germanio (en contraste con monóxido de germanio, que es GeO) o "*germania*", es un compuesto inorgánico, un óxido de germanio. Su fórmula química es GeO₂. Otros nombres incluyen ácido germánico, G-15, y ACC10380. Se forma como una capa de pasivación en germanio puro en contacto con el oxígeno atmosférico. Las formas de dióxido de germanio son paralelas, en cierta medida, a las de dióxido de silicio.

5 GeO₂ hexagonal tiene la misma estructura que β-cuarzo (el germanio tiene un número de coordinación 4); GeO₂ tetragonal (el mineral argutita) tiene la estructura de stishovita similar a rutilo (el germanio tiene un número de coordinación 6); y GeO₂ amorfo (vítreo) es similar a la sílice fundida. El dióxido de germanio puede prepararse en formas tanto cristalinas como amorfas. Al igual que la sílice, puede ser proporcionado en forma de gel, que es una forma granular, vítrea, altamente porosa que, a pesar de su nombre, es un sólido que tiene una gran superficie interna con poros en el intervalo de nanómetros.

15 Debido a que el germanio tiene una electronegatividad mayor que el silicio (2,02 frente a 1,74), los procesos de deposición basados en líquidos, por ejemplo, de GeO₂ sobre superficies metálicas tienen una eficiencia mayor que con SiO₂. Además, debido a una mayor electronegatividad, la reacción de unión entre GeO₂ y ácidos nucleicos es más fuerte, ya que los dominios de GeO₂ tienen una mayor polaridad.

20 Generalmente, el material matricial puede consistir enteramente de óxido de germanio. Sin embargo, en una realización preferente, solo la superficie del material comprende óxido de germanio, mientras que las áreas centrales del material comprenden otros materiales. Tal realización puede utilizarse para añadir, a la capacidad de unión de ácidos nucleicos de óxido de germanio, otras características técnicas que pueden ser útiles en el presente contexto. Además, esto brinda la posibilidad de utilizar materiales más baratos que el germanio, o sus derivados, en las áreas centrales.

25 En una realización preferente de la presente invención, se prevé que dicho material matricial está provisto de al menos una forma seleccionada entre el grupo que consiste en

- recubrimiento del recipiente de reacción
- 30 • partículas
- polvo
- fibras
- 35 • membrana

40 En caso de que el material matricial sea una membrana, tal membrana puede, por ejemplo, ser utilizada en una columna de centrifugación, por ejemplo, en la purificación de ácidos nucleicos basada en columnas. En caso de que el material matricial esté en forma de partículas, estas últimas pueden ser utilizadas en sistemas de purificación de ácidos nucleicos basados en partículas. En caso de que el material matricial esté en forma de un recubrimiento de recipiente de reacción, los ácidos nucleicos se pueden unir a las paredes de un recipiente de reacción para fines de purificación. En caso de que el material matricial esté en forma de fibras, puede producirse un material similar a la lana que se puede utilizar en columnas para la purificación de ácidos nucleicos. En caso de que el material matricial esté en forma de polvo, se puede producir una suspensión de forma similar a un vidrio lechoso, que tiene un área de superficie mayor, y de este modo, pueden unir más ácidos nucleicos por unidad de volumen que otras matrices de sílice con formas regulares.

50 En otra realización preferente de la presente invención, se prevé que dichas partículas tengan al menos una característica seleccionada entre el grupo de

- forma esférica
- diámetro comprendido entre $\geq 0,01 \mu\text{m}$ y $\leq 100 \mu\text{m}$

55 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "forma esférica" no siempre se requiere que sea una esfera exacta o una esfera casi exacta puesto que el fin es compararla con dichas formas longitudinales (como en las fibras) o formas planas (como en las membranas). Dicho tipo de partículas también se llama "perlas", o nano- o microesferas.

60 Preferentemente, el diámetro medio de dichas partículas oscila en el intervalo comprendido entre $\geq 0,05 \mu\text{m}$ y $\leq 5 \mu\text{m}$, incluso más preferentemente en el intervalo de $\geq 0,1 \mu\text{m}$ y $\leq 1 \mu\text{m}$. Particularmente preferente, el diámetro medio está comprendido en el intervalo de $\geq 0,15 \mu\text{m}$ y $\leq 0,25 \mu\text{m}$.

65 En otra realización preferente de la presente invención, se prevé que dicho material es, al menos en parte, magnéticamente sensible.

La expresión “material magnéticamente sensible” se refiere a cualquier material magnético, paramagnético o magnetizable. El término también se refiere a la capacidad de un material para migrar en relación con la influencia de un campo magnético.

5 En tal realización, un imán se puede utilizar para recoger el material matricial, por ejemplo, las perlas, después de que hayan unido los ácidos nucleicos. En la presente realización, se facilitan las etapas de lavado o las etapas de elución, en particular cuando se utiliza un material de muestra fijado en formalina y embebido en parafina (FFEP) (véase a continuación).

10 Preferentemente, el material matricial comprende, o consiste en, al menos en parte, un material inorgánico. Resulta particularmente preferente que el material matricial comprenda un material magnético o paramagnético seleccionado entre el grupo que consiste en

- óxido de hierro
- polímeros magnéticos

15 Las partículas de óxido de hierro están por ejemplo disponibles comercialmente como tóner para fotocopiadoras. Estas partículas se producen bajo estándares muy altos y tienen, por consiguiente, una distribución de tamaño muy uniforme, son químicamente puras y tienen una alta pureza. Dicho tipo de partículas, aunque con un recubrimiento de sílice son, por ejemplo, comercializadas por Mobitec, Goettingen, AL. Alternativamente, dichas partículas de óxido de hierro consisten en Fe₃O₄ hidrófilo, que está por ejemplo disponible como BAYOXIDE E8706, E8707, E8709 y/o E8710.

25 En perlas de polímero magnéticas, la matriz de partículas consiste en látex, poliestireno o sílice con, por ejemplo, óxido de hierro de tamaño nanométrico homogéneamente incorporado. Tal tipo de perlas es por ejemplo comercializado como Dynabeads por Life Technologies.

30 En una realización particularmente preferente, se utilizan perlas magnéticamente sensibles con, por ejemplo, un núcleo de óxido de hierro y un recubrimiento de dióxido de germanio. De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para purificar y/o aislar ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica, método en el que se utiliza un material matricial de acuerdo con la invención.

35 En una realización preferente de dicho método, los ácidos nucleicos que se van a purificar y/o aislar se seleccionan entre el grupo que consiste en ADN o ARN. Resulta particularmente preferente que los ácidos nucleicos sean ADN genómico, ARNm, y/o microARN.

40 En una realización particularmente preferente de dicho método, la muestra biológica es al menos una seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- muestras de tejido frescas
- muestras de tejido congeladas
- muestras de tejido fijas
- muestras forenses o paleontológicas
- 45 • muestras obtenidas a partir de las heces, material biológico seco, momias, organismos taxidermizados
- muestras de alimentos, y/o
- muestras de plantas

50 Para las muestras de tejido fijas, al menos un fijador puede ser utilizado en una realización preferente que se selecciona entre el grupo que consiste en formalina tamponada neutra, formalina sin tamponar, glutaraldehído, etanol, acetona, metanol, metacarn, fijador de Carnoy, fijador AFA (formaldehído, etanol y ácido acético), Pen-Fix (fijador de formalina alcohólica), Glyo-Fix (fijador a base de glioxal), Hope (fijador disolvente orgánico mediado con tampón de ácido glutámico y Hepes), y/o Zinc formal-Fix (fijador de formaldehído que contiene zinc).

55 Un tipo preferente de muestras de tejido fijas son muestras de tejido fijadas en formalina y embebidas en parafina (FFEP). Habitualmente, en el diagnóstico de tumores, las muestras de tejido se extraen como biopsias de un paciente y se someten a procedimientos de diagnóstico. A tal fin, las muestras se fijan en formalina, se embeben en parafina y luego se examinan con métodos inmunohistoquímicos. El tratamiento con formalina conduce a la inactivación de las enzimas, como por ejemplo las enzimas que digieren ARN ubicuo (ARNsas). Por este motivo, el estado del ARNm del tejido (el llamado transcriptoma), permanece inalterado.

60 No obstante, el análisis molecular en muestras FFEP, particularmente por medio de la amplificación y la detección de ácidos nucleicos, es una manera difícil porque el proceso de fijación reticula proteínas y ácidos nucleicos. Además, el proceso para disolver los ácidos nucleicos a partir de tejido FFEP que se realiza normalmente de forma manual es muy propenso a errores. Otra cuestión es que en muestras FFEP, los ácidos nucleicos se suelen romper

en fragmentos muy pequeños, que, aunque son aún lo suficiente largos para ser analizados por PCR, plantean problemas cuando se aíslan con medios convencionales.

5 Dichas muestras pueden ser tratadas con éxito con una realización preferente de la invención, en la que se utilizan perlas magnéticamente sensibles con, por ejemplo, un núcleo de óxido de hierro y un recubrimiento de dióxido de germanio. Puesto que son magnéticas, dichas perlas pueden utilizarse en un entorno automático, eliminando así los errores causados por la disolución manual de los ácidos nucleicos a partir del tejido FFEP. Además, las perlas pueden unir también pequeños fragmentos de ácidos nucleicos.

10 Independientemente de la forma, se ha conservado la muestra, el tipo de muestra puede comprender secciones de tejidos, núcleos de micromatrices tisulares, muestras de aspirados con aguja, muestras de frotis cervical, muestras microdisseccionadas, y muestras obtenidas a partir de cultivos celulares.

15 En otra realización preferente de dicho método, los ácidos nucleicos se purifican y/o se aíslan en presencia de un agente caotrópico.

20 La expresión "agente caotrópico", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a sales de iones particulares que, cuando están presentes en una concentración suficientemente alta en una solución acuosa, provocan que las proteínas presentes en las mismas se desplieguen y que los ácidos nucleicos se desprendan de la estructura secundaria. Se cree que los iones caotrópicos tienen estos efectos porque alteran las redes de los enlaces de hidrógeno que existen en el agua líquida y por lo tanto hacen que las proteínas desnaturalizadas y los ácidos nucleicos sean termodinámicamente más estables que sus homólogos correctamente plegados o estructurados.

25 En aún otra realización preferente de dicho método, la purificación y/o el aislamiento comprende una etapa que consiste en centrar un material matricial magnéticamente sensible de acuerdo con la invención por medio de un campo magnético.

30 En la presente realización, son facilitadas las etapas de lavado después de la unión de los ácidos nucleicos, debido a que el material matricial con los ácidos nucleicos se puede inmovilizar temporalmente, evitando así que se enjuaguen y por consiguiente se pierdan.

35 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un kit de partes apropiadas para su uso en un método de acuerdo con la invención, dicho kit comprende un agente caotrópico y, opcionalmente, un material matricial de acuerdo con la invención.

Preferentemente, dicho kit comprende además un tampón de unión y un tampón bajo en sal.

40 Al igual que un tampón bajo en sal, se utilizan preferentemente tampón TE o agua. Tampón TE es una solución tamponada utilizada habitualmente en biología molecular, especialmente en procedimientos que implican ADN o ARN. "TE" se deriva de sus componentes Tris, un tampón de pH común, y EDTA, una molécula que quela cationes como Mg^{2+} . Una fórmula típica para la fabricación de 10:1 tampón TE es 10 mM de Tris, (pH 8,0 con HCl) y 1 mM de EDTA.

45 El tampón de unión comprende un agente caotrópico y un tampón, más, opcionalmente, un detergente y/o NaCl y/o KCl pueden añadirse en concentraciones altas. En el último caso, el tampón también se llama tampón alto en sal.

El kit o método de acuerdo con la invención comprende preferentemente al menos un agente caotrópico seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 50
- urea
 - tiourea
 - cloruro de guanidinio
 - clorhidrato de guanidinio
 - tiocianatos, como tiocianato de guanidinio

55

 - percloratos, como perclorato de litio o perclorato de sodio
 - tricloroacetatos, como tricloroacetato de sodio
 - yoduros, como yoduro de sodio
 - sales de bario

60 La urea se utiliza preferentemente en una concentración de 6-8 mol/l. La tiourea se utiliza preferentemente en una concentración de 2 mol/l. El cloruro de guanidinio se utiliza preferentemente en una concentración de 6 mol/l. El perclorato de litio se utiliza preferentemente en una concentración de 4,5 mol/l.

65 Preferentemente, dicho kit o método comprende además al menos un agente seleccionado entre el grupo que consiste en

- enzima degradante
- detergente
- alcohol

5 Las enzimas degradantes incluyen proteasas. Proteinasa K es una de estas, y en realidad funciona muy bien en estos tampones desnaturalizantes; cuanto más desnaturalizada esté la proteína, mejor funcionará la proteinasa K. Sin embargo, la lisozima no funciona en la desnaturalización y por lo tanto el tratamiento con lisozima se realiza antes de la adición de las sales de desnaturalización. Los detergentes ayudan con la solubilización y la lisis de proteínas. Preferentemente, Triton X 100 se utiliza como detergente. El alcohol se utiliza para potenciar e influir la unión de los ácidos nucleicos a la matriz, y para fines de lavado. Preferentemente, se utilizan etanol y/o isopropanol.

10 En una realización preferente, el kit de acuerdo con la invención comprende además un separador magnético. En la presente realización, son facilitadas las etapas de lavado después de la unión de los ácidos nucleicos, debido a que el material matricial con los ácidos nucleicos puede inmovilizarse temporalmente, evitando así que se enjuaguen y por consiguiente se pierdan. Dicho separador magnético puede estar realizado preferentemente en forma de una placa de microtitulación que puede acomodar un número de recipientes de microrreacción, como tubos de Eppendorf. Dicho separador puede consistir en una lámina, o un bloque, por ejemplo, de plexiglás, con una serie de pocillos (para las propias muestras, o para el alojamiento de los tubos de Eppendorf). En la sección inferior de la lámina, o bloque, se disponen uno o más imanes (imanes permanentes o electroimanes) que atraen a los materiales matriciales magnéticamente sensibles, por ejemplo, perlas de óxido de hierro recubiertas con GeO₂.

20 Alternativamente, dicho separador magnético puede consistir en una lámina individual, o bloque, que tiene el tamaño de una placa de microtitulación, en la que se disponen uno o más imanes que bloquean, se puede utilizar junto con una placa de microtitulación en una configuración de tipo sándwich. Un tamaño convencional de dicho separador magnético es de 12,8 cm x 8,6 cm x 2,8 cm para su uso con placas de microtitulación de 96 pocillos convencionales.

De acuerdo con aún otro aspecto de la invención, se proporciona el uso de un kit, método o matriz de acuerdo con la invención para al menos un fin seleccionado entre el grupo que consiste en

- 30
- investigación forense
 - diagnóstico molecular
 - procedimientos analíticos alimentarios, y/o
 - procedimientos analíticos vegetales

35 Figuras y experimentos

Detalles adicionales, distintivos, características y ventajas del objetivo de la invención se desvelan en las reivindicaciones secundarias, y la siguiente descripción de las figuras y ejemplos respectivos, los cuales, de una manera a modo de ejemplo, muestran realizaciones preferentes de la presente invención. Sin embargo, estos dibujos no deben entenderse en ningún caso como límite del alcance de la invención.

La Fig. 1 muestra una vista esquemática del método de acuerdo con la invención.

La Fig. 2 muestra un separador magnético que puede ser solicitado en el contexto de la presente invención.

La Fig. 3 demuestra el principio de unión entre las superficies recubiertas con GeO₂ y los ácidos nucleicos.

Ejemplos

50 1. Producción de un material matricial de acuerdo con la invención

Na₂GeO₃ se produce mediante la reacción de carbonato de sodio y dióxido de germanio cuando se funden de acuerdo con el siguiente esquema



Na₂GeO₃ anhidro contiene una cadena polimérica aniónica compuesta por un tetraedro {GeO₄} conectado por compartición de vértices, y no por un ión de GeO₃²⁻ diferente.

60 50 g de partículas de óxido de hierro que se utilizan para tóner se dan en 1.000 ml de una solución acuosa al 0,25 % de Na₂GeO₃. Después de agitar durante una hora, las partículas se separan, se lavan posteriormente con agua y etanol, y luego se secan. Alternativamente, una solución de Na₂GeO₃ al 20 % se puede utilizar.

65 Otras formas para crear material matricial recubierto con GeO₂ comprenden deposición de vapor químico potenciado con plasma y deposición de vapor químico.

2. Un kit de purificación de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención.

Un ejemplo no limitante de un kit de purificación de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención comprende al menos los siguientes artículos:

- 5 Tampón de unión (500 µl): 5 M de guanidinioisotiocianato, 10 mM de TrisHCl, Triton al 20 %, pH 8,8
Opcionalmente, se puede añadir NaCl y/o KCl en altas concentraciones
- Tampón de lavado: vol de etanol al 50 %, 20 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5
- Tampón bajo en sal (50 µl): 50 ul de tampón TE (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, pH 7,0)
- 10 Partículas recubiertas con GeO₂ 3 mg
(opcional):

3. Purificación de un ácido nucleico ESRI con un material matricial de acuerdo con la invención, y posterior amplificación

- 15 Se aisló ARN a partir de muestras cortadas de tejidos tumorales fijadas con formalinas y embebidas con parafina ("FFEP"). Los cortes FFEP se lisan y se tratan con proteinasa K durante 2 horas a 55 °C con agitación. Después de la adición de un tampón de unión (alto en sal + sales caotrópicas) y ácidos nucleicos de partículas magnéticas recubiertas con GEO₂ se unen a las partículas en un plazo de 15 minutos a temperatura ambiente. En un soporte magnético, el sobrenadante es sacado y las perlas se lavan varias veces con tampón de lavado. Después de la adición del tampón de elución (bajo en sal) y la incubación durante 10 min a 70 °C, el sobrenadante se saca de un soporte magnético sin tocar las perlas.
- 20

- 25 Después del tratamiento normal de ADNasa I durante 30 min a 37 °C y la inactivación de la ADNasa I, la solución se utiliza para la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). RT-PCR se ejecuta como análisis convencional cinético de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) TaqMan™ de una sola etapa en un sistema PCR ABI7900 (Applied Biosystems) para la evaluación de la expresión del ARNm.

- 30 Los datos brutos de la RT-PCR se normalizan a uno en un gen constitutivo de acuerdo con métodos convencionales.

Los experimentos muestran que la determinación de ESR1 por RT-PCR produce sistemáticamente mejores resultados que el análisis por inmunohistoquímica (IHQ).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Material matricial adecuado para su uso en la purificación y/o el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica, matriz que comprende una superficie de óxido de germanio, en donde dicho material es, al menos en parte, un material matricial magnéticamente sensible y comprende un material magnético o paramagnético seleccionado entre el grupo que consiste en óxido de hierro, y en donde dicho material se une de forma no covalente a dicho óxido de germanio.
- 10 2. Material matricial según la reivindicación 1, en donde dicho material matricial se proporciona en al menos una forma seleccionada entre el grupo que consiste en
- recubrimiento de recipiente de reacción
 - partículas
 - polvo
 - 15 • fibras o
 - membrana.
- 20 3. Material matricial según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas partículas tienen al menos una característica seleccionada entre el grupo de
- forma esférica o
 - diámetro comprendido entre $\geq 0,01 \mu\text{m}$ y $\leq 100 \mu\text{m}$.
- 25 4. Material matricial según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho material comprende, o consiste en, al menos en parte, un material inorgánico.
- 30 5. Material matricial según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho material matricial magnéticamente sensible comprende un material magnético o paramagnético seleccionado entre el grupo que consiste en:
- polímeros magnéticos u
 - oro.
- 35 6. Un método para purificar y/o aislar ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica, método en el que se utiliza un material matricial según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 40 7. El método según la reivindicación 6, en el que los ácidos nucleicos a purificar y/o aislar se seleccionan entre el grupo que consiste en
- ADN o
 - ARN.
- 45 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en el que la muestra biológica es al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en
- muestras de tejido frescas
 - muestras de tejido congeladas
 - muestras de tejido fijadas
 - muestras forenses o paleontológicas,
 - 50 • muestras obtenidas a partir de heces, material biológico seco, momias, organismos taxidermizados
 - muestras de alimentos o
 - muestras de plantas.
- 55 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que los ácidos nucleicos se purifican y/o se aíslan en presencia de un agente caotrópico.
- 60 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que la purificación y/o el aislamiento comprenden una etapa que consiste en concentrar un material matricial magnéticamente sensible por medio de un campo magnético.
- 65 11. Kit de partes adecuado para su uso en un método según cualquiera de las reivindicaciones 6-10, comprendiendo dicho kit un agente caotrópico y un material matricial según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, comprendiendo además preferentemente un tampón de unión y un tampón bajo en sal.
12. El kit o el método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que

a) el agente caotrópico es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en

- urea
- tiourea
- 5 • cloruro de guanidinio
- clorhidrato de guanidinio
- tiocianatos, como tiocianato de guanidinio
- percloratos, como perclorato de litio o perclorato de sodio
- 10 • tricloroacetatos, como tricloroacetato de sodio
- yoduros, como yoduro de sodio o
- sales de bario; y/o

b) que comprende además al menos un agente seleccionado entre el grupo que consiste en

- 15 • enzima degradante
- detergente o
- alcohol y/o

c) que comprende además un separador magnético.

20 13. El kit según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el kit es un kit de diagnóstico molecular, preferentemente un kit de diagnóstico tumoral.

25 14. El kit según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho material matricial se proporciona en al menos una forma seleccionada entre el grupo que consiste en recubrimiento de recipiente de reacción, polvo, fibras o membrana, preferentemente, en el que el material matricial está en forma de una columna de centrifugación, un sistema de purificación de ácidos nucleicos basado en partículas, un recubrimiento de recipiente de reacción, un material similar a la lana o una suspensión, preferentemente en donde las partículas son perlas, nano- o microesferas.

30 15. Uso de un kit, un método o una matriz según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para al menos un fin seleccionado entre el grupo que consiste en

- 35 • investigación forense
- diagnóstico molecular
- procedimientos analíticos alimentarios o
- procedimientos analíticos vegetales.

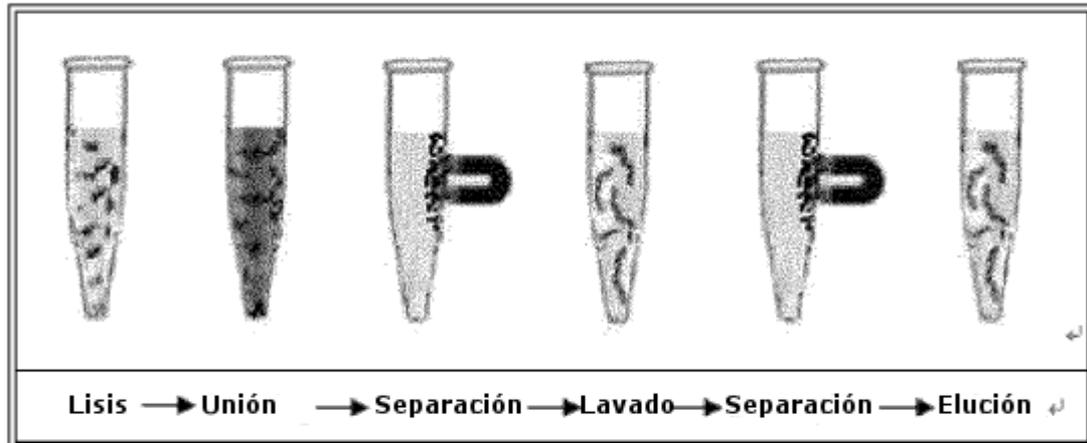


Fig. 1

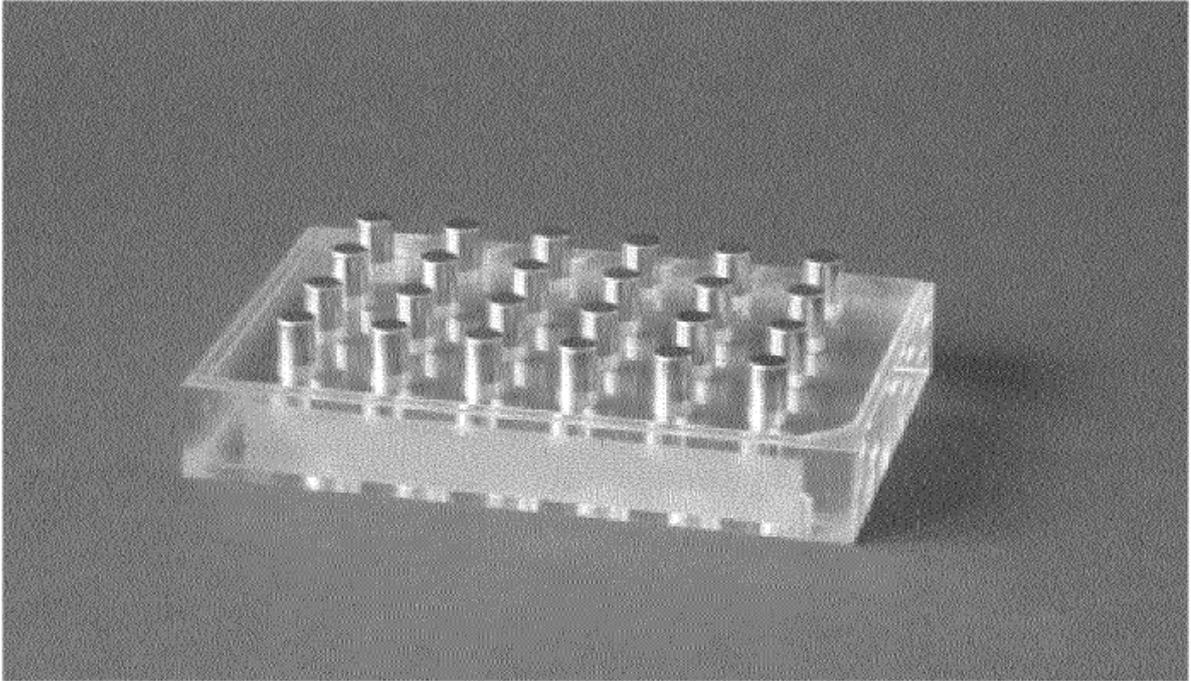
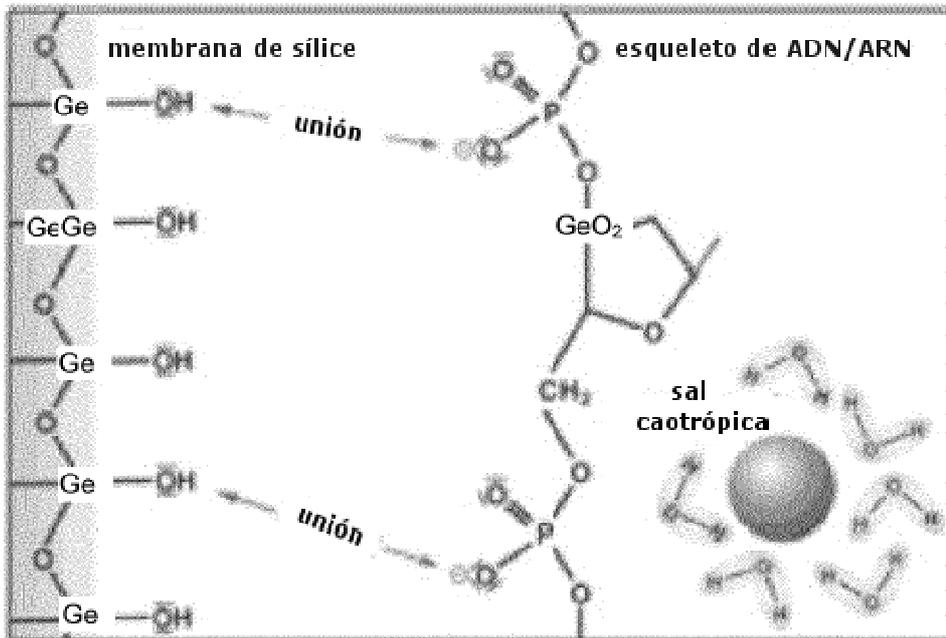
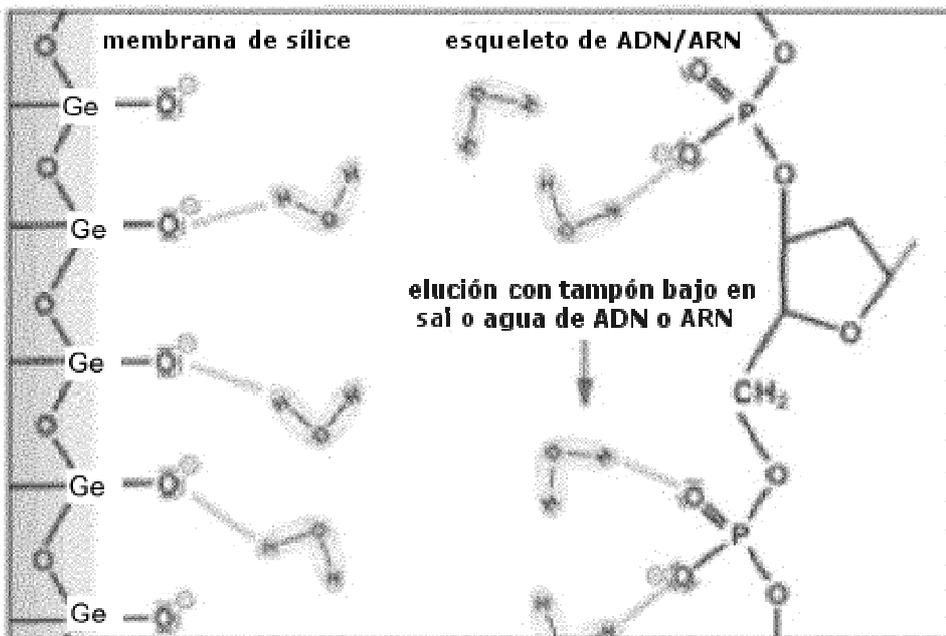


Fig. 2



Principio de unión



Principio de elución

Fig. 3