

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 335**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.01.2011 PCT/IB2011/050044**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11083429**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2011 E 11730170 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2521780**

54 Título: **Un método para aislar ácidos nucleicos y un kit del mismo**

30 Prioridad:

**07.01.2010 IN 50CH2010**

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

**01.02.2018**

73 Titular/es:

**BIGTEC PRIVATE LIMITED (100.0%)  
11nd Floor SID Entrepreneurship Building Indian  
Institute of Science Campus Bangalore  
Karnataka 560 012, IN**

72 Inventor/es:

**PULLELA, PHANI KUMAR;  
MANOJ, MULAKKAPURATH NARAYANAN;  
GANDHAVALLA, SANTHOSH KUMAR;  
PINTO, MITCHELL PREETHAM;  
NAIR, CHANDRASEKHAR BHASKARAN y  
SUBBARAO, PILLARISSETTI VENKATA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 652 335 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**

Un método para aislar ácidos nucleicos y un kit del mismo

**5 Campo técnico**

La presente divulgación se refiere al aislamiento y purificación de ácidos nucleicos. Más esencialmente, proporciona un método y un kit para aislar y purificar ácidos nucleicos usando algodón o sus derivados.

**10 Antecedentes y técnica anterior de la divulgación**

Los protocolos de extracción de ácidos nucleicos se pueden clasificar ampliamente en protocolos basados en sílice y no basados en sílice. Los protocolos existentes de sílice y no sílice no pueden tolerar un lavado con agua para eliminar los componentes que no son ácidos nucleicos y requieren un lavado acuoso con algún porcentaje de alcohol en él. La presencia de alcohol en la solución de ácido nucleico eluida inhibe la reacción en cadena de la polimerasa y, por lo tanto, típicamente ambos protocolos requieren un centrifugado de alta velocidad u otros métodos para eliminar el alcohol residual y la elución de ácidos nucleicos con un tampón acuoso a temperatura ambiente o a temperatura elevada. En algunos casos, ambos protocolos requieren una alta concentración de sal con polietilenglicol o un lavado con alcohol acuoso. El uso de altas concentraciones de sales y alcohol acuoso restringe la elución de ácidos nucleicos como la eliminación estricta de estos componentes antes de que se eluyan los ácidos nucleicos o el uso de centrifugas, etc. Por lo tanto, ninguno de los protocolos existentes basados en sílice o no basados en sílice puede usarse en el punto de atención (POC), ya que una centrifuga generará aerosoles. Algunos de los protocolos no basados en sílice indicados en la literatura son los siguientes: documento US 7,264,927, Este documento describe el uso de celulosa o papel de celulosa que implica el uso de polialquilenglicol y altas concentraciones de sal para unirse y, finalmente, eluir los ácidos nucleicos en un tampón o agua desionizada.

Documento US 6,084,091: Describe el método de usar harina de celulosa (como almidón de patata) para el aislamiento de ácidos nucleicos.

30 Documento US 5,804,684: Describe un método para usar papel de filtro para la extracción de ácido nucleico, en el que se aloja en un material como una punta de plástico con la ayuda de un papel de seda suave o una pieza de algodón como filtro o barrera para soportar el papel de filtro.

35 Todos los procesos anteriores utilizan columnas de sílice comercialmente disponibles para el aislamiento final de ácidos nucleicos o requieren tiempos de procesamiento de muestras más largos (más de 30 minutos) o implican el uso de altas concentraciones de sales durante el lavado de la matriz o el uso de centrifugas, etc. Ninguno de los métodos de extracción de ácido nucleico basados en celulosa lavan los ácidos nucleicos con un tampón acuoso al 100 % o agua y habitualmente contienen un porcentaje de alcoholes o compuestos que contienen poliol.

40 El documento WO2008/150187 A1 da a conocer un método de múltiples fines para extraer y purificar ARN, que incluye el diagnóstico para análisis de rutina mediante sonda de ADN (ARN), RT-PCR y otros métodos.

**Exposición de la divulgación**

45 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un método para el aislamiento de ácido nucleico de una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de: (a) añadir tampón de lisis a la muestra que contiene ácido nucleico para obtener una solución lisada o (b) añadir tampón de lisis en combinación con tampón de unión a la muestra para obtener una solución lisada, (c) añadir un tampón de unión a la solución de la etapa (a) para unir el ácido nucleico a una matriz o la unión directa de la solución de la etapa (b) a la matriz y (d) lavar y eluir el ácido nucleico unido a la matriz para aislar y purificar el ácido nucleico; y un kit para el aislamiento de ácido nucleico de una muestra, comprendiendo dicho kit una matriz y tampones.

La presente invención es como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

**55 Breve descripción de las figuras adjuntas**

60 Las características de la presente divulgación serán más evidentes a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas, tomadas en conjunto con las figuras adjuntas. Entendiendo que estas figuras representan solo varias realizaciones de acuerdo con la divulgación, por lo tanto, no deben considerarse limitantes de su alcance, ya que la divulgación se describirá con especificidad y detalles adicionales mediante el uso de las figuras adjuntas:

**Figura 1:** Algodón empaquetado en [a] jeringa [b] aguja de jeringa [c] moldes de plástico unidos a la jeringa [d] botella de plástico con tapón de rosca [e] tubo de ensayo de vidrio [f] vial de vidrio con tapón de rosca.

65 **Figura 2:** Algodón empaquetado en [a] cuentagotas de plástico desechable [b] pipeta de plástico Pasteur moldeada [c] pipeta de vidrio Pasteur [d] cuentagotas de plástico con cabezal de caucho [e] hisopo de algodón [f] pipeta de plástico moldeada.

**Figura 3:** Algodón empaquetado en [a] tubo Eppendorf [b] tubo de vidrio con tapón de rosca [c] punta de plástico moldeado de 1 ml [d] pipeta graduada de vidrio desechable con cabezal de goma [e] hisopo de viscosa [f] pipeta de vidrio con cabezal de plástico y goma.

**Figura 4:** Muestras de ADN purificadas mediante diferentes protocolos se amplificaron mediante PCR. Calle 1: Marcador de peso molecular, Calle 2: viscosa empaquetada en una punta de pipeta de 1 ml, Calle 3: hisopo de viscosa comercial, Calle 4: algodón empaquetado en una punta de pipeta de 1 ml, Calle 5: columna de sílice comercial, Calle 6: ADN purificado usando un hisopo de algodón comercial, Calle 7: ADN sin amplificar, Calle 8: blanco de agua.

**Figura 5:** Muestras de ADN purificadas mediante diferentes protocolos se amplificaron mediante PCR. Calle 1: algodón empaquetado en una punta de pipeta de 1 ml, Calle 2: blanco de agua, Calle 3: algodón empaquetado en una jeringa de 2 ml, Calle 4: columna de sílice comercial, Calle 5: Marcador de peso molecular:

**Figura 6:** Muestras de ADN purificadas mediante diferentes protocolos se amplificaron mediante PCR. Calle 1: Marcador de peso molecular, Calle 2: protocolo de sílice comercial, Calle 3: algodón empaquetado en una punta de pipeta de 1 ml, Calle 4: papel de filtro Whatman No 1 empaquetado en una punta de pipeta, Calle 5: Protocolo de la tarjeta de FTA.

**Figura 7:** Una muestra de ARN de 30 ct purificadas mediante diferentes protocolos se amplificó mediante RT-PCR. Calle 1: Marcador de peso molecular, Calle 2: Algodón quirúrgico, Calle 3: Algodón esterilizado en autoclave, Calle 4: algodón lavado con hidróxido de sodio Calle 5: Algodón lavado con ácido clorhídrico, Calle 6: Algodón absorbente, Calle 7: columna de sílice Qiagen, Calle 8: Tarjeta FTA Figura 8: Un componente del cartucho cargado con algodón para extracción automática de ácido nucleico.

### Descripción detallada de la divulgación

En la descripción detallada siguiente se hace referencia a las figuras adjuntas, que forman parte de la misma. Las realizaciones ilustrativas descritas en la descripción detallada, figuras y reivindicaciones no pretenden ser limitantes. Se pueden usar otras realizaciones y se pueden implementar otros cambios sin desviarse del espíritu o alcance de la materia objeto: presentada en el presente documento. Se entenderá fácilmente que los aspectos de la presente divulgación, como generalmente se describen en el presente documento y se ilustran en las figuras, se pueden combinar en una amplia variedad, todo lo cual se contempla explícitamente y forma parte de la presente divulgación.

La presente divulgación se refiere a un método para el aislamiento de ácido nucleico de una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (a) añadir tampón de lisis a la muestra que contiene ácido nucleico para obtener una solución lisada; o
- (b) añadir tampón de lisis en combinación con tampón de unión a la muestra para obtener una solución lisada;
- (c) añadir un tampón de unión a la solución de la etapa (a) para unir el ácido nucleico a una matriz o la unión directa de la solución de la etapa (b) a la matriz y
- (d) lavar y eluir el ácido nucleico unido a la matriz para aislar y purificar el ácido nucleico.

En una realización de la presente divulgación, el ácido nucleico se selecciona de un grupo que comprende ADN, ARN y PNA.

En otra realización de la presente divulgación, la muestra es una muestra biológica o no biológica.

En otra realización más de la presente divulgación, la muestra biológica se selecciona de un grupo que comprende extractos de sangre, esputo, suero, saliva o tejido, y la muestra no biológica se selecciona de un grupo que comprende PNA químicamente sintetizado.

En otra realización más de la presente divulgación, el tampón de lisis se selecciona de un grupo que comprende tiocianato de guanidina, hidrocloreuro de guanidina, EDTA, Tris, detergente, poliol, sal monovalente que contiene catión del grupo IA o sal divalente que contiene catión del grupo IIA y enzima digestiva de proteínas opcionalmente junto con urea o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización más de la presente divulgación, el EDTA tiene una concentración que varía de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 300 mM, preferentemente aproximadamente 100 mM.

En otra realización más de la presente divulgación, el tiocianato de guanidina o el hidrocloreuro de guanidina tiene una concentración que varía de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 7 M.

En otra realización más de la presente divulgación, la urea tiene una concentración que varía de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 7 M.

En otra realización más de la presente divulgación, el Tris tiene una concentración que varía de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 100 mM, preferentemente aproximadamente 20 mM.

En otra realización más de la presente divulgación, el poliol tiene una concentración que varía de aproximadamente

0,01 % a aproximadamente el 30 % (v/v).

5 En otra realización más de la presente divulgación, el detergente se selecciona de un grupo que comprende laurilsulfato de sodio, dodecilsulfato de sodio, Triton X-100, Tween 20 y NP-40 o cualquier combinación de los mismos y en el que la enzima de digestión de proteínas es proteinasa K.

En otra realización más de la presente divulgación, el tampón de unión es agua opcionalmente junto con polioles o no polioles.

10 En otra realización más de la presente divulgación, el poliol comprende compuestos de poliol solubles en agua seleccionados de un grupo que consiste en polietilenglicol, glicerol, polipropilenglicol, etilenglicol y propilenglicol;

15 En otra realización más de la presente divulgación, el no poliol comprende alcoholes que consisten en metanol, etanol, propanol o cualquier líquido soluble en agua con un grupo funcional de ácido, amina, alcohol, fenol, amida o éster como uno de los grupos funcionales; o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización más de la presente divulgación, el lavado y elución se llevan a cabo utilizando tampón de lavado y tampón de elución, respectivamente.

20 En otra realización más de la presente divulgación, el lavado comprende un primer lavado con un tampón de lavado que comprende de aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % (v/v), preferentemente de aproximadamente 30 % a aproximadamente 70 % (v/v) y, óptimamente, aproximadamente 50 % (v/v) de alcohol acuoso seguido de lavados múltiples con un tampón de lavado que comprende 100 % de agua.

25 En otra realización más de la presente divulgación, el alcohol acuoso se selecciona de un grupo que comprende etanol, metanol, n-propanol, 2-propanol, glicerol, PEG, PPG, etilenglicol y propilenglicol.

30 En otra realización más de la presente divulgación, el agua se selecciona de un grupo que comprende agua desionizada, agua libre de DNasa, agua libre de RNasa, agua MilliQ, agua filtrada, agua corriente y agua subterránea o cualquier combinación de las mismas.

35 En otra realización más de la presente divulgación, dicho tampón de lavado puede comprender, opcionalmente, sales seleccionadas de un grupo que comprende  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ , NaCl y KCl, o tampones seleccionados de un grupo que comprende bicina, tricina, Tris, HEPES, CHAPS, fosfato, acetato, MES, piridina, piperazina, Bis-tris, PIPES, ACES, BES, TES, borato, TAPS, CHES, CAPS, etanolamina y piperidina, que tienen un pH que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 12.

40 En otra realización más de la presente divulgación, el tampón de elución comprende agua caliente que tiene una temperatura que varía de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 99 °C junto con tampón o sal, que tiene un pH que varía de aproximadamente 8 a aproximadamente 11.

45 En otra realización más de la presente divulgación, el agua se selecciona de un grupo que comprende agua desionizada, agua libre de DNasa, agua libre de RNasa, agua MilliQ, agua filtrada, agua corriente y agua subterránea o cualquier combinación de las mismas.

50 En otra realización más de la presente divulgación, el tampón se selecciona de un grupo que comprende bicina, tricina, Tris, HEPES, CHAPS, fosfato, acetato, MES, piridina, piperazina, Bis-tris, PIPES, ACES, BES, TES borato, TAPS, CHES, CAPS, etanolamina y piperidina o cualquier combinación de las mismas que tenga un pH que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 o que tenga un pKa que varía de aproximadamente 7 a aproximadamente 10.

55 En otra realización más de la presente divulgación, la sal se selecciona de un grupo que comprende  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ , NaCl y KCl o cualquier combinación de los mismos en la concentración que varía de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 100 mM, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM.

En otra realización más de la presente divulgación, la matriz se selecciona de un grupo que comprende algodón, derivados de algodón y polímeros sintéticos que tienen mezclas de algodón o cualquier combinación de los mismos.

60 En otra realización más de la presente divulgación, el algodón se selecciona de un grupo que comprende algodón natural, algodón quirúrgico, algodón de grado clínico, algodón comercial, algodón hilado, algodón lavado con agua, algodón lavado con ácido o base, algodón esterilizado en autoclave, algodón tratado con tampón que tiene pH que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 14, algodón tratado con solución salina, algodón tratado con disolvente orgánico, algodón prensado y algodón procesado.

65 La presente divulgación se refiere adicionalmente a un kit para el aislamiento de ácido nucleico de una muestra, comprendiendo dicho kit una matriz y tampones.

En una realización de la presente divulgación, la matriz se selecciona de un grupo que comprende algodón, derivados de algodón y polímeros sintéticos que tienen mezclas de algodón o cualquier combinación de los mismos.

5 En otra realización de la presente divulgación, el algodón se selecciona de un grupo que comprende algodón natural, algodón quirúrgico, algodón de grado clínico, algodón comercial, algodón hilado, algodón lavado con agua, algodón lavado con ácido o base, algodón esterilizado en autoclave, algodón tratado con tampón que tiene pH que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 14, algodón tratado con solución salina, algodón tratado con disolvente orgánico, algodón prensado y algodón procesado.

10 En otra realización más de la presente divulgación, el tampón se selecciona de un grupo que comprende el tampón de lisis, tampón de unión, tampón de lavado y tampón de elución como se ha descrito anteriormente.

En otra realización más de la presente divulgación, la muestra comprende muestras biológicas o no biológicas.

15 En otra realización más de la presente divulgación, la muestra biológica se selecciona de un grupo que comprende extractos de sangre, esputo, suero, saliva o tejido, y la muestra no biológica se selecciona de un grupo que comprende PNA químicamente sintetizado.

20 La presente divulgación se refiere a un método para construir un sistema de extracción de ácido nucleico usando algodón. El algodón se aloja de manera que todas las soluciones mencionadas en la extracción de ácido nucleico interaccionen con el algodón.

En otra realización, las especificaciones para varios materiales usados en la presente divulgación se proporcionan a continuación:

25 Algodón, derivados del algodón, materiales que comprenden algodón y materiales similares al algodón: El algodón esponjoso se obtiene como una cápsula alrededor de la semilla de algodón de la planta de algodón. Para la extracción de ácidos nucleicos, el algodón es el material preferido como matriz. Las formas de algodón pueden ser algodón natural, algodón quirúrgico, algodón de grado clínico, algodón comercial, algodón hilado, algodón lavado con agua, algodón lavado con ácido o base, algodón esterilizado en autoclave, algodón tratado con tampón (pH 1-14), algodón tratado con solución salina, algodón tratado con disolvente orgánico, algodón prensado, algodón procesado, etc. son adecuadas. Cualquier tela de algodón o diferentes formas de algodón o polímeros sintéticos con una mezcla de algodón o materiales que contienen algodón podrían usarse para la extracción de ácidos nucleicos. Los materiales como lana, seda, cachemira, etc., que tienen fibras similares al algodón también se consideran parte de esta divulgación. El algodón producido mediante agricultura orgánica o el uso de insecticidas y pesticidas también se considera parte de esta divulgación. El algodón producido en diferentes geografías será ligeramente diferente en cuanto a la composición, estructura, color y calidad, y se considera que el algodón cultivado en todas las regiones del mundo es parte de esta divulgación. Cualquier producto con un origen de algodón o un material, que utiliza algodón en su fabricación se considera parte de esta divulgación y podría utilizarse para la extracción de ácido nucleico.

30

35

40

Tampón de lisis: El tampón de lisis contiene una concentración alta de EDTA para permitir la unión de ácidos nucleicos al algodón y también para la manipulación de diferentes tipos de muestras (extractos de sangre, esputo, suero, saliva, tejido, etc.). La variación de las sales constituyentes es posible y el uso de EDTA se da como ejemplo y no debe considerarse como límite de la divulgación. Típicamente, cualquier molécula cargada negativamente a una concentración elevada podría repeler los ácidos nucleicos en solución y mejorar la unión al algodón. El tampón de lisis comprende tiocianato de guanidina o hidrocloreuro de guanidina, EDTA, Tris, un detergente y, opcionalmente, con urea, un poliol, una sal monovalente que contiene un catión del grupo IA y/o una sal divalente que contiene un catión del grupo IIA y proteinasa K o cualquier enzima digestiva de proteínas. El tiocianato de guanidina o hidrocloreuro de guanidina puede estar en cualquier lugar entre 0,1 a 7 M en concentración. El tiocianato de guanidina puede reemplazarse con hidrocloreuro de guanidina o urea en algunas aplicaciones y su concentración también puede variar de 0,1 a 7 M. La urea se utiliza para desnaturalizar las proteínas y complementará la función de las sales de guanidina y podría variar entre 0 y 7 M. Típicamente, la mayoría de la literatura informó que los protocolos de lisis para sangre contenían EDTA en el intervalo de 1-20 mM. Nuestro tampón de lisis podría contener cantidades significativamente diferentes de EDTA, preferentemente en el intervalo de 10-300 mM, más preferentemente en un intervalo de aproximadamente 100 mM. La concentración de EDTA puede manipularse para otros ácidos nucleicos, como ARN y PNA, pero, en general, se encontró que una mayor concentración de EDTA ayuda a mejorar los tiempos de ciclo (Ct) y las intensidades de señal en la PCR y la RT-PCR. La concentración significativamente diferente de EDTA ayuda a detener el hierro presente en la hemoglobina (para la sangre), previene cualquier actividad de DNasa y RNasa, y crea una atmósfera altamente negativa en la que el ácido nucleico se puede unir al algodón. El aspecto importante de esto es que, esta realización es el primer ejemplo en el que la unión del ADN a una matriz se realiza en condiciones básicas. De forma importante, el pH de unión de la solución tiene un efecto significativo sobre la unión del ADN/ARN al algodón y, por lo tanto, se usa un pH de aproximadamente 8-10 para la unión,

45

50

55

60

65

El cloruro de magnesio se usa típicamente en concentraciones más altas para desactivar la actividad de la RNasa y,

por lo tanto, en el protocolo de lisis del ADN, está ausente o se usa mínimamente (a 20 mM). De nuevo, el uso de EDTA también desactiva la RNasa y el uso de  $MgCl_2$  no necesita ser esencial y es opcional para cualquier aplicación de ácido nucleico. Tris es la elección del tampón para la lisis y se encontró que se puede usar de 0-100 mM y, típicamente, aproximadamente 20 mM es el óptimo. Debe señalarse que, en el tampón de lisis de la invención, el papel de Tris es ayudar en la lisis y puede ser reemplazado por cualquier tampón adecuado. El uso de poliol en el tampón de unión es mejorar la solubilidad de las proteínas escindidas y desnaturalizadas. El porcentaje de poliol en el tampón de unión podría ser 0-30 % (v/v). En algunas aplicaciones, no se agrega un tampón de unión distinto y, después de la lisis, los ácidos nucleicos se unieron directamente a la matriz. Todos estos tampones se prepararon típicamente en agua desionizada y, para aplicaciones de ARN, el agua se puede tratar opcionalmente con DEPC y esterilizar en autoclave. La lisis con proteinasa K puede realizarse antes de la adición del tampón de lisis descrito anteriormente para sangre, esputo, saliva, semen, etc. y, opcionalmente, puede realizarse con tampón de lisis. Se encontró que el tratamiento con proteinasa K era eficaz en el tampón de lisis mencionado y, por lo tanto, este tratamiento puede estar por delante de la adición de tampón de lisis o podría serlo junto con tampón de lisis para cualquier tipo de muestra líquida que contenga ácidos nucleicos. El detergente usado en el tampón de lisis podría seleccionarse del grupo que comprende SLS (laurilsulfato sódico), SDS, Triton X-100. Tween 20 o cualquier otro detergente iónico no iónico de uso común conocido en el estado de la técnica.

Tampón de unión: Se descubrió que el tampón de unión, que se añadió después de la lisis para iniciar la unión de ácidos nucleicos con algodón, era muy flexible en términos de composición y pH. El tampón de unión es tan flexible que, la simple adición de agua es suficiente para diluir la concentración de sales en el tampón de lisis y se observó una buena unión de los ácidos nucleicos al algodón. Se puede colocar algodón para que interaccione durante la lisis o después de la adición de tampón de unión para extraer ácidos nucleicos de la muestra dada. A efectos prácticos, la composición de tampón de unión puede tener cualquier pH entre 4 y 12, preferentemente en el intervalo de 7-10. Para muestras complejas como sangre, esputo o saliva, el tampón de unión puede tener un cierto porcentaje de compuestos de poliol solubles en agua, tales como PEG, glicerol, PPG, etilenglicol, propilenglicol, etc. El peso molecular de PEG y PPG podría oscilar entre 200-200.000 y para todos los propósitos prácticos será de 1000 a 20.000. El porcentaje de compuestos de poliol en la solución de unión puede ser de hasta 50 % (v/v), pero para todas las aplicaciones prácticas, será de 1-30 % (v/v). Los compuestos de poliol son para asegurar la miscibilidad completa de los componentes lisados y si la lisis de la proteinasa K está completa, el porcentaje de poliol puede disminuir al 1 %. Los tampones conocidos en el estado de la técnica incluyen bicina, tricina, Tris, HEPES, CHAPS, fosfato, acetato, MES, piridina, piperazina, Bis-tris, PIPES, ACES, BES, TES, borato, TAPS, CHES, CAPS, etanolamina, piperidina etc., en el intervalo de pH de 5-12, preferentemente en el intervalo de 7-10 pueden usarse para preparar tampón de unión y la presencia de tampón no es obligatoria, pero dependiendo del tipo de muestra, el volumen de la muestra, la temperatura, la composición del tampón de lisis, puede usarse. Si se usan sales tampón, su concentración puede variar de 1-200 mM, preferentemente 1-100 mM y, lo más preferentemente, 5- 50 mM. La concentración descrita anteriormente es la concentración de la solución de unión y, después de la adición al tampón de lisis, la concentración cambiará dependiendo de la composición del tampón de lisis. Asimismo, el pH definido anteriormente es para el pH del tampón de unión cuando se hizo y después de la adición al tampón de lisis, el pH de la solución mixta (tampón de lisis + tampón de unión) podría cambiar. Aunque los alcoholes como el metanol, el etanol y el propanol no son polioles, también pueden usarse en la preparación del tampón de unión. En general, se puede usar cualquier líquido soluble en agua con un grupo funcional de ácido, amina, alcohol, fenol, amida, éster, etc. como uno de los grupos funcionales.

Tampón de lavado: Un tampón de lavado es una solución, que lava selectivamente los componentes que no son ácidos nucleicos del algodón. Si la muestra clínica es sangre, después de la unión, el algodón será de color marrón y para eliminar el color se encontró que un porcentaje de etanol en el tampón de lavado (llamado tampón de lavado 1) ayudaba. Particularmente, el primer lavado se realizó con un tampón o agua que contenía 1-99 % (v/v), preferentemente 30-70 % (v/v), más preferentemente 50 % (v/v) de etanol. Si es necesario, se pueden administrar múltiples lavados acuosos de etanol para eliminar componentes de ácidos no nucleicos y esto podría depender de la muestra. El metanol, n-propanol, 2-propanol, glicerol, PEG, PPG, etilenglicol, propilenglicol o cualquier otro alcohol soluble en agua pueden reemplazar el etanol en la solución de lavado. Se puede usar un tampón de lavado 2 en el que está presente un catión mono o divalente junto con el tampón de lavado 1 como su composición. También es posible que el tampón de lavado 1 y 2 pueda tener la misma composición y que comprenda agua, un alcohol y un catión mono o divalente. El número de veces que se lava el algodón con los tampones de lavado 1 y 2 puede ser 0-10 e, idealmente, estar en el intervalo de 1-3. Los lavados posteriores usualmente serán con agua desionizada y el número de lavados puede ser de uno a diez, preferentemente de 2 a 5 y, más preferentemente, de 3-5. El agua desionizada utilizada en la etapa de lavado puede reemplazarse por DNasa, agua libre de RNasa o agua MilliQ o agua filtrada o agua corriente o agua subterránea. Los inventores observaron que un lavado inicial con alcohol acuoso tiende a eliminar la mayoría de los componentes de ácido no nucleico y, luego, seguido de múltiples lavados con agua (100 % de agua) para eliminar el alcohol residual. Los lavados con agua garantizan que los ácidos nucleicos obtenidos estén preparados para PCR sin inhibidores de la PCR o con mínima cantidad de los mismos. Los tampones de lavado pueden contener, opcionalmente, tales como,  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ , NaCl,  $KCl$ , o tampones como bicina, tricina, Tris, HEPES, CHAPS, fosfato, acetato, MES, piridina, piperazina, Bis-tris, PIPES, ACES, BES, TES, borato, TAPS, CHES, CAPS, etanolamina, piperidina etc., en el intervalo de pH de 5-12. El tampón o la sal o una combinación de ellos podría estar en la concentración de 1-1000 mM, preferentemente en el intervalo de 20-200 mM y, más preferentemente, aproximadamente 100 mM.

Tampón de elución: Cualquier solución tampón acuosa caliente (45-99 °C) podría eluir los ácidos nucleicos del algodón. Se encontró que el pH de elución era crucial, pero, preferentemente, en el intervalo de 8-11 y la elución se debe realizar a una temperatura entre 45-99 °C para la recuperación completa de ácidos nucleicos. El agua desionizada utilizada en la formación del tampón en la etapa de elución puede reemplazarse por DNasa, agua libre de RNasa o agua MilliQ o agua filtrada o agua corriente o agua subterránea. Los tampones conocidos en el estado de la técnica incluyen bicina, tricina, Tris, HEPES, CHAPS, fosfato, acetato, MES, piridina, piperazina, Bis-tris, PIPES, ACES, BES, TES, borato, TAPS, CHES, CAPS, etanolamina, piperidina etc., en el intervalo de pH de 5-12 se pueden usar para la elución, aunque los más preferentes serán aquellos con un pKa en el intervalo de 7-10. Siempre que se use algodón para la elución de ácidos nucleicos unidos, el tampón de elución debe estar tibio y, por consideraciones prácticas, en el intervalo de 45-99 °C. Esto está en marcado contraste con la mayoría de los métodos descritos en la bibliografía, en los que la elución se realiza en condiciones cálidas usando agua desionizada, pero los ácidos nucleicos unidos al algodón no se pueden eluir completamente con agua caliente y la presencia de tampón o sal es crítica. La sal puede ser MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, KCl, etc. a la concentración de 0-100 mM, preferentemente en el intervalo de 5-50 mM. El tampón puede seleccionarse del grupo de tampones, a saber, bicina, tricina, Tris, HEPES, CHAPS, fosfato, acetato, MES, piridina, piperazina, Bis-tris, PIPES, ACES, BES, TES, borato, TAPS, CHES, CAPS, etanolamina, piperidina.

Recuperación de ácidos nucleicos: Con el sistema actual, la recuperación de ácidos nucleicos depende del tampón de lisis, el tampón de unión, los tampones de lavado y el tampón de elución y las combinaciones utilizadas. Dependiendo de la combinación, la recuperación de ácido nucleico podría ser comparable a cualquier sistema de extracción de ácido nucleico basado en sílice. También se observó que con muestras de títulos bajos, la eficacia del enfoque de la invención de extracción de ácidos nucleicos a base de algodón a veces es mejor que la sílice.

Cantidad de algodón: La cantidad de algodón depende del volumen de la muestra clínica y para las muestras en el intervalo de 1-300 µl, se encontró que 5-30 mg de algodón eran adecuados. Para volúmenes de muestras en el intervalo de mililitros, un 50 mg o más de algodón puede ser esencial. En general, 1 miligramo a 10 gramos de algodón es suficiente para extraer ácidos nucleicos de cualquier muestra clínica, ambiental o de campo.

Precio de cada ensayo: Como el algodón utilizado en este protocolo es algodón quirúrgico disponible comercialmente en cualquier farmacia o tienda minorista (puede ser esterilizado en autoclave o estar sometido a purificación), el precio de cada extracción de ácido nucleico es mínimo y uno de los más baratos notificados hasta la fecha en la literatura. De nuevo, considerando la eliminación de la presencia accidental de inhibidores de la PCR en fracciones eluidas de ácidos nucleicos, la simplicidad y la capacidad de adaptación al uso de POC, la facilidad de automatización, etc. hace que este enfoque sea superior y el coste por extracción es, probablemente, una ventaja adicional.

Seguridad de los componentes y eliminación de las soluciones: El sistema de extracción de ácidos nucleicos basado en algodón utiliza la mayoría de los tampones de origen acuoso con los cuales un experto en la técnica puede eliminar los desechos de manera segura y efectiva. El algodón puede empaquetarse en un cartucho y todas las soluciones de lisis, unión, y de lavado pueden quedar atrapadas en el cartucho para el uso de POC con lo que el trabajador de la salud o el analista no tiene que eliminar los desechos y el cartucho será autocontenido.

Usos de ácidos nucleicos extraídos: Los ácidos nucleicos extraídos usando el protocolo de algodón descrito en esta realización pueden prepararse fácilmente para su uso en una PCR o RT-PCR. Otras aplicaciones del protocolo de algodón descrito son para la recuperación de ácidos nucleicos de una muestra clínica para su archivo, almacenamiento, uso posterior en bioquímica y biología molecular, etc. Los ácidos nucleicos extraídos se pueden usar para cualquier aplicación bioquímica o de biología molecular, que un experto en la materia descubrirá de vez en cuando.

Uso de algodón en una forma adecuada para la extracción de ácido nucleico: Esta realización es para extraer ácidos nucleicos en "forma lista para PCR" usando algodón con un requisito de equipo mínimo, como centrífuga u otro equipo de hilado. El algodón puede empaquetarse en cualquier forma adecuada para la extracción de ácido nucleico dependiendo de la cantidad de la muestra, la naturaleza de la muestra y el origen de la muestra. Preferentemente, los ácidos nucleicos se obtuvieron en una solución o emulsión, que se procesará de acuerdo con los sistemas de lisis, unión, lavado y elución descritos. Por tanto, el empaquetamiento de algodón es una parte crucial de la extracción de ácido nucleico y cualquier naturaleza en la que el algodón pueda entrar en contacto con la solución que contiene ácidos nucleicos se considera parte de esta divulgación. Las figuras 1-3 ilustran algunas formas en que se puede empaquetar el algodón, pero no debe interpretarse como limitante de ninguna manera. En términos simples, el algodón se empaqueta de tal manera que la solución que contiene ácido nucleico entre en contacto con el algodón o el algodón entra en contacto con el líquido y se considera parte de esta divulgación.

En otra realización, el algodón puede empaquetarse en una punta de pipeta de plástico modificada de 1 ml, una punta de pipeta de plástico modificada de 2 ml, un tubo falcon de 15 ml, un tubo falcon de 50 ml, 1. un tubo eppendorf de 5 ml, un tubo eppendorf de 2 ml, un tubo de ensayo de vidrio de borosilicato de 5 ml, un vial de plástico con tapón de rosca de 4 ml, una pipeta Pasteur de plástico de 3 ml, una pipeta Pasteur de vidrio, una pipeta Pasteur de vidrio con un bulbo de caucho, una pipeta Pasteur de plástico con un bulbo de caucho, una pipeta de vidrio con

un molde de caucho y de plástico como bulbo, vial de vidrio de 2 ml con un tapón de plástico, una jeringa de plástico de 10 ml desechable y esterilizada en autoclave, un molde de plástico unido a una jeringa de 5 ml, una unidad desechable conectada a una jeringa de 50 ml, etc. El algodón también se puede hacer como un bastoncillo de algodón y el bastoncillo puede estar hecho manualmente o a máquina. El bastoncillo de algodón que se muestra en la Figura 3[e] hecho de viscosa y cualquier polímero mezclado con algodón (1 a 100 %) o algodón modificado química o físicamente (1 a 100 %) se considera parte de esta divulgación.

Uso de algodón para almacenar una muestra clínica: El algodón puede exponerse directamente a la muestra y, al ser absorbente, el algodón se estabilizará y almacenará la muestra en una forma segura. La forma segura se define como un medio en el cual el contenido de ácido nucleico de la muestra añadida no se degrada significativamente. La unión puede ser reversible, en la que los ácidos nucleicos pueden extraerse usando el protocolo de extracción de ácido nucleico descrito en esta realización. El algodón puede estar opcionalmente incluido con un estabilizante, lo que mejorará la estabilidad de la muestra y los constituyentes de la muestra. Opcionalmente, el algodón puede estar incluido con una enzima o un producto químico o el tampón de lisis notificado en este protocolo o tampón de lisis que contiene proteinasa K o proteinasa K junto con sales tampón estabilizantes. El algodón podría estar tratado con EDTA, tratado con azida sódica, tratado con base, tratado con ácido, tratado con tampón de lisis, tratado con miel, tratado con cualquier agente antibacteriano, tratado con cualquier agente antimicrobiano, tratado con cualquier compuesto antiviral o tratado con EDTA y azida sódica, antibacterianos, antimicrobianos, antivirales, anticoagulantes, estabilizantes de muestras clínicas conocidas en el estado de la técnica, miel o cualquier combinación de los mismos. El volumen de muestra añadido al algodón para almacenar puede ser cualquier volumen, pero para todos los propósitos prácticos puede ser de 1 µl a 20 ml y la cantidad de algodón utilizada puede ser cualquier cantidad y para todos los propósitos prácticos puede ser de 1 mg a 10 gramos. Cuando se recoge la muestra, puede realizarse en un algodón impregnado con tampón de lisis y también se considera parte de esta divulgación.

Método de uso del sistema empaquetado con algodón para la extracción de ácidos nucleicos: El algodón empaquetado en un dispositivo como se ilustra en la Figura 1-3 usando el protocolo de extracción de ácidos nucleicos notificado descrito en esta realización. El mecanismo por el cual se hizo que el algodón interaccionara con los sistemas de lisis, unión, lavado y elución descritos en esta realización puede ser calentamiento, sacudidas, agitación en vórtex, agitación, movimiento constante, pipeteo o cualquier otro medio por el cual se hace que un sólido y un líquido interaccionen. Esencialmente, el ácido nucleico que contiene líquido entrará en contacto con las fibras de algodón.

En otra realización, el presente método es uno de los protocolos de extracción de ácidos nucleicos más simples y más flexibles presentados en la literatura. Casi todos los métodos de la literatura requieren una centrífuga para centrifugar el contenido o un imán para mantener las partículas magnéticas en posición intacta o ambas, y el método informado en esta realización elimina por completo la necesidad de una centrífuga o un imán. Los protocolos de ácido nucleico existentes tienen un límite en el volumen de la muestra o requieren un procesamiento múltiple para mayores volúmenes de muestras. Este protocolo puede procesar prácticamente cualquier cantidad de muestra (para fines prácticos, de 1 µl a 20 ml) casi al mismo tiempo utilizando un sistema de extracción desechable único. El presente método produce ácidos nucleicos inmediatamente listos para su posterior caracterización y procesamiento posterior, tal como PCR, secuenciación o transferencia. La simplicidad de este sistema lo hace igualmente adecuado para el punto de atención (POC) o laboratorios establecidos, el primero de un tipo notificado en la literatura.

El protocolo de algodón descrito en esta realización tiene características destacadas, tal como la eliminación del uso de centrifugas, la mínima variación de un usuario a otro, eficacia comparable a los protocolos de sílice, facilidad de uso en comparación con cualquier protocolo de ácido nucleico existente, capacidad de procesar cualquier cantidad de muestra, recuperación adecuada de ácidos nucleicos, capacidad para seleccionar muestras de título bajo, la facilidad de automatización, adecuado tanto para entornos hospitalarios establecidos como para configuraciones de punto de atención y alta consistencia en la recuperación y calidad de ácidos nucleicos.

En otra realización, el método descrito en esta divulgación emplea materiales fibrosos, como algodón, para extraer ácidos nucleicos de prácticamente cualquier muestra clínica o analítica de origen biológico en una PCR o PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) o secuenciación o formato listo para transferencia. El procedimiento comprende la lisis, unión de ácidos nucleicos a algodón, lavado del algodón unido a ácido nucleico con soluciones acuosas y elución de ácidos nucleicos en un tampón con sal como KCl. Un tampón de lisis típico en protocolos de sílice o sin sílice contiene algunos iones tetrabásicos o dibásicos como EDTA (agentes quelantes), que se unen al hierro de la sangre. En este protocolo descrito, se añade una concentración alta de EDTA (10-300 mM) para crear un entorno en el que toda la selectividad de los ácidos nucleicos se une al algodón. Por lo general, el pH del tampón de lisis se ajusta a 6 para permitir la unión a una matriz (sílice o no sílicea), en la que la mayoría de las proteínas y otros componentes son neutros o positivos en lo que respecta a la carga, en los que el ácido nucleico todavía está cargado negativamente e interacciona con la matriz. En el sistema actual, la unión de pH debe ser básica (pH 8-11) y el exceso de EDTA con carga negativa (10-300 mM) actúa como un tampón y eleva el pH a aproximadamente 8. El de los inventores es el primer protocolo en el que los ácidos nucleicos se lisan y se pueden unir a una matriz a pH básico. El tampón de unión puede ser agua, cualquier tampón acuoso que tenga un pH en el intervalo de 3-11 o agua que contenga polietilenglicol (PEG, 1-30 %) o glicerol (1-30 %) o polipropilenglicol (PPG, 1-30 %) o etilenglicol

(1-50 %) o propilenglicol (1-50 %) o cualquier alcohol soluble en agua o cualquier combinación de los anteriores. El tampón de unión es para asegurar la dilución de las sales de tampón de lisis, potenciar la unión de los ácidos nucleicos en una atmósfera rica en EDTA y solubilizar las partículas lisadas. El protocolo notificado puede tolerar una amplia gama de tampones con diferente pH para la unión y esta también es la primera vez en la literatura que el pH o composición del tampón de unión es tan flexible. Los tiempos de procesamiento de la muestra más largos, el límite del volumen de la muestra y la imposibilidad de la cuantificación de los ácidos nucleicos son desventajas asociadas con las tarjetas FTA, que no están presentes con el protocolo de extracción de ácido nucleico descrito en esta realización usando algodón. Finalmente, todos los protocolos descritos en la literatura eluyen en un tampón acuoso o agua a temperatura ambiente u, ocasionalmente, a temperatura elevada, y nuestro lavado de ácido nucleico es con agua a temperatura ambiente y elución a temperatura elevada (50-99 °C). Usando el protocolo y la matriz definidos en esta realización, un agua desionizada caliente no eluirá todos los ácidos nucleicos unidos y la presencia de un tampón o sal o una combinación de ellos es una necesidad. Esto también contrasta fuertemente con el protocolo de extracción de ácido nucleico de la literatura, que puede eluir ácidos nucleicos unidos de la matriz en agua desionizada caliente (los protocolos tanto de sílice como no síliceos permiten la elución con agua caliente de ácidos nucleicos). El tampón de elución podría estar en cualquier punto entre pH 8-10, lo que indica que el pH de elución es flexible y se prefiere alguna concentración de sal como KCl para la elución eficiente de ácidos nucleicos unidos a partir de algodón.

En otra realización, en los métodos siguientes, se usaron algodón y otros materiales fibrosos a base de algodón en la extracción cuantitativa de ácidos nucleicos en condiciones especiales de lisis, unión, lavado y elución, que son únicas para la elución de los ácidos nucleicos del algodón. La presente divulgación, en un aspecto, proporciona un sistema rápido de aislamiento de ácidos nucleicos de cualquier origen ambiental, clínico, bacteriano, fúngico y animal usando algodón. Las muestras pueden ser lisados celulares, fluidos corporales, plantas, tejidos y células bacterianas y lisados celulares. El algodón y la viscosa son materiales fibrosos obtenidos de forma natural y artificial respectivamente, que se encontraron unidos a los ácidos nucleicos en condiciones dadas. El proceso de unión de ácido nucleico y retención selectiva de ácidos nucleicos sobre el algodón y la liberación de ácidos nucleicos en condiciones de elución específicas se ilustra mediante el ADN y el ARN.

En otra realización, en una extracción de ADN típica de una muestra clínica como sangre, la sangre se lisó con un tampón de lisis que comprende tiocianato de guanidina, EDTA, un tampón como Tris, un detergente como tritón X-100 y, opcionalmente, con urea, un poliol, una sal monovalente que contiene un catión del grupo IA y/o una sal divalente que contiene un catión del grupo IIA y enzimas que escinden la proteína como la proteinasa K. El tiocianato de guanidina puede estar en cualquier lugar entre 0,1 a 7M en concentración. El tiocianato de guanidina puede reemplazarse con hidrocloreto de guanidina o urea en alguna aplicación y su concentración también puede variar de 1 a 6 M. La urea se utiliza para desnaturalizar las proteínas y complementará la función de las sales de guanidina y podría variar entre 0 y 7 M. Típicamente, la mayoría de la literatura informó que los protocolos de lisis para sangre contenían EDTA en el intervalo de 20 mM. Nuestro tampón de lisis podría tolerar cantidades significativamente más altas de EDTA, en el intervalo de 10-300 mM, preferentemente aproximadamente en un intervalo de 100 mM para la unión eficiente del ácido nucleico al algodón. La concentración de EDTA puede manipularse para otros ácidos nucleicos, como ARN y PNA, pero, en general, se encontró que una mayor concentración de EDTA ayuda a mejorar los tiempos de ciclo (Ct) y las intensidades de señal en la PCR y la RT-PCR. La concentración significativamente más alta de EDTA ayuda a detener el hierro presente en la hemoglobina (para la sangre), previene cualquier actividad de DNasa y crea una atmósfera altamente negativa en la que el ácido nucleico se puede unir al algodón. El aspecto importante de esto es que, la adición de una concentración significativamente mayor de EDTA en el tampón hace que el pH del tampón sea básico y, en lo que a nuestro conocimiento se refiere, esta realización es el primer ejemplo en el que el ácido nucleico se une a una matriz en condiciones básicas. De forma importante, el pH de la unión de la solución debe ser básico para permitir la unión del ácido nucleico al algodón, ya que a pH muy ácido, existe la posibilidad de que el EDTA precipite fuera del tampón de lisis y, por lo tanto, se prefiere un pH superior a 8 para la unión. El cloruro de magnesio se usa típicamente en concentraciones más altas para desactivar la actividad de la RNasa y, por lo tanto, podría usarse en el protocolo de lisis de ácido nucleico. Tris es la elección del tampón para la lisis y se encontró que se puede usar de 0-100 mM y, típicamente, aproximadamente 20 mM es el óptimo. El uso de poliol en el tampón de lisis o de unión es para aumentar la actividad de la Proteínasa K y para mejorar la solubilidad de las proteínas escindidas. El porcentaje de poliol en el tampón de lisis podría ser 0-30 % (v/v). Todos estos tampones se prepararon en agua desionizada y, para aplicaciones de ARN, el agua se pudo tratar con DEPC y esterilizar en autoclave. La lisis con proteinasa K puede realizarse antes de la adición del tampón de lisis descrito anteriormente para sangre, esputo, saliva etc. y junto con tampón de lisis para orina, sudoración, etc. Se encontró que el tratamiento con proteinasa K era eficaz en el tampón de lisis mencionado y, por lo tanto, este tratamiento puede estar por delante de la adición de tampón de lisis o podría serlo junto con tampón de lisis para cualquier tipo de muestra clínica que contenga ácidos nucleicos.

En otra realización, se descubrió que el tampón de unión, que se añadió después de la lisis para iniciar la unión de ácidos nucleicos con algodón era muy flexible en términos de composición. El tampón de unión es tan flexible que, la simple adición de agua es suficiente para diluir la concentración de sales en el tampón de lisis y se observó una buena unión de los ácidos nucleicos al algodón. Se puede colocar algodón para que interactúe durante la lisis o después de la adición de tampón de unión. La composición del tampón de unión puede tener cualquier pH entre 5 y 12, preferentemente en el intervalo de 7-10. Para muestras complejas como sangre, esputo o saliva, el tampón de

unión puede tener un cierto porcentaje de compuestos de poliol, tales como PEG, glicerol, PPG, etilenglicol, propilenglicol, etc. Se descubrió que las soluciones de unión utilizadas tradicionalmente (para sistemas de ácido nucleico basados en sílice) como etanol o etanol acuoso disminuían la afinidad de unión de los ácidos nucleicos al algodón, es decir, se descubrió que la presencia de etanol durante la etapa de unión disminuye la eficacia de la unión de ácido nucleico al algodón.

En otra realización, un tampón de lavado es una solución, que lava selectivamente los componentes que no son ácidos nucleicos del algodón. Si la muestra clínica es sangre, después de la unión, el algodón será de color marrón y para eliminar el color se encontró que un porcentaje de etanol en el tampón de lavado (llamado tampón de lavado 1) ayudaba. Particularmente, el primer lavado se realizó con un tampón o agua que contenía 10-90 %, preferentemente 30-70 %, más preferentemente 50 % de etanol. El metanol, n-propanol, isopropanol, glicerol, PEG, PPG, etilenglicol, propilenglicol o cualquier otro alcohol soluble en agua pueden reemplazar el etanol en la solución de lavado. Se puede usar un tampón de lavado 2 en el que está presente un catión mono o divalente junto con el tampón de lavado 1 como su composición. También es posible que el tampón de lavado 1 y 2 pueda tener la misma composición y que comprenda agua, un alcohol y un catión mono o divalente. El número de veces que se lava el algodón con los tampones de lavado puede ser 0-10 e, idealmente, estar en el intervalo de 1-3. Los lavados posteriores usualmente serán con agua desionizada y el número de lavados puede ser de uno a diez, preferentemente de 2 a 5 y, más preferentemente, de 3-5. El agua desionizada utilizada en la etapa de lavado puede reemplazarse por DNasa, agua libre de RNasa o agua MilliQ o agua filtrada o agua corriente o agua subterránea.

En otra realización, la elución de ácidos nucleicos del algodón puede realizarse con cualquier tampón acuoso. La concentración de tampón debe estar entre 1 y 200 mM, preferentemente de 5-50 mM, más preferentemente, 30-70 mM en el tampón de elución. Los tampones conocidos en el estado de la técnica incluyen bicina, tricina, Tris, HEPES, CHAPS, fosfato, acetato, MES, piridina, piperazina, Bis-tris, PIPES, ACES, BES, TES, borato, TAPS, Etanolamina, CHES, CAPS, etanolamina, piperidina etc., en el intervalo de pH de 5-12, preferentemente en el intervalo de 7-10, más preferentemente en el intervalo de 8 -10, funcionarán para la elución de ácidos nucleicos del algodón en condiciones de calor. La elución de ácido nucleico del algodón debe realizarse a una temperatura elevada entre 50 y 100 °C, preferentemente a 70-95 °C, más preferentemente a aproximadamente 85 °C.

En otra realización, los ácidos nucleicos purificados pueden tener una pureza del 10-100 % y habitualmente estarán listos para PCR. La pureza de los ácidos nucleicos depende de la combinación óptima de tampones de lisis, unión, lavado y elución y la matriz para la purificación (derivados de algodón o algodón o materiales mezclados con algodón). Los inventores observaron que las tarjetas FTA o partículas unidas a celulosa o papeles de filtro celulósicos no son eficaces en estas combinaciones de tampones, lo que indica que el algodón es diferente de otras formas de celulosa con respecto a la interacción con ácidos nucleicos. En métodos relacionados, la presente divulgación proporciona un medio para aislar ácidos nucleicos de una muestra que contiene ácidos nucleicos usando derivados de algodón o algodón o materiales mezclados con algodón como la matriz sólida usando el siguiente protocolo general.

a) La muestra que contiene ácidos nucleicos se añadió al tampón de lisis. El tampón de lisis comprende tiocianato de guanidina, EDTA, Tris, un detergente y, opcionalmente, con urea, un poliol, una sal monovalente que contiene un catión del grupo IA y/o una sal divalente que contiene un catión del grupo IIA y proteinasa K. La muestra de ácido nucleico y el tampón de lisis se mezclaron y calentaron a 50-95 °C durante 1-20 minutos.

b) Se agrega un tampón de unión a la solución anterior y podría ser agua, un tampón con pH entre 4-11 o una solución que contiene un poliol. El volumen del tampón de unión podría ser 0. 1-10 veces el volumen del tampón de lisis.

c) Se hizo que la solución anterior interaccionara con el algodón, preferentemente a temperatura ambiente, durante de unos pocos segundos a algunos minutos.

d) A continuación, el algodón se lavó específicamente (primer lavado) con un tampón de lavado que comprende alcohol acuoso o agua sola.

e) El algodón anterior se lavó posteriormente con agua o un tampón hasta que el alcohol residual se eliminó del algodón.

f) Los ácidos nucleicos se eluyeron con un tampón que comprendía sal como KCl (sales que contienen catión del grupo IA o del grupo IIA) y/o tampón de tipo bicina, y los ácidos nucleicos eluidos están normalmente listos para su uso en PCR o RT-PCR.

La presente divulgación se elabora adicionalmente con la ayuda de la siguiente tabla, que proporciona una explicación comparativa entre el método utilizado en la presente divulgación y los utilizados en la técnica anterior. La tabla compara algunos de los aspectos importantes con respecto a los diversos métodos utilizados para la caracterización de los métodos utilizados para el aislamiento de ácidos nucleicos.

**Tabla 1:** Descripción comparativa de aspectos importantes implicados en el aislamiento de ácidos nucleicos.

N.º de M	Propiedad	Extracción de ácidos nucleicos usando algodón	Extracción de ácidos nucleicos basados en matriz de celulosa	Extracción de ácidos nucleicos usando columnas de sílice comercial	Extracción de ácidos nucleicos usando nanopartículas magnéticas recubiertas con sílice
1	pH del tampón de lisis por encima de 8	Sí	No	No	No
2	Protocolo único para ADN/ARN	Sí	Posible	Posible, pero normalmente se dan protocolos diferentes	Posible
3	Elución de ácidos nucleicos con agua/tampón a pH 7	No	Sí	Sí	Sí
4	100 % de lavado acuoso de ácidos nucleicos unidos a la matriz	Sí	Posible	No	No
5	Procesamiento automático de ácidos nucleicos	Sí	No descrito en la literatura	No descrito en la literatura	Existen prototipos en la literatura
6	Uso de centrífuga	No	Sí	Sí	En algunos protocolos
7	Generación de aerosol durante el protocolo	No	Sí	Sí	En algunos protocolos
8	Idoneidad para el punto de atención	Sí	No, Necesita un procesamiento adicional de la muestra en un laboratorio	No, requiere una centrífuga y genera aerosoles	No, Requiere instrumentos voluminosos
9	Extracción de ácido nucleico adecuada con RT-PCR	Sí	Sí	Sí	Sí
10	Capacidad para procesar diferentes muestras, como sangre, esputo, suero, saliva, tejidos etc. con mínimo preprocesamiento de muestras	Sí	No	No	No
11	Tiempo típico necesario para el aislamiento e ácidos nucleicos	8-12 min	20-30 min	15-20 min	15-20 min
12	Costes estándar implicados para el aislamiento de ácidos nucleicos (costes de los reactivos, matriz y otros componentes del kit)	Rs. 10-30	Rs. 50-100	Rs. 150-500	Rs. 100-500

La tecnología de la presente divulgación se elabora más detalladamente con la ayuda de los siguientes ejemplos. Sin embargo, no debe interpretarse que los ejemplos limitan el ámbito de la divulgación.

5

**Metodología general:** La solución que contiene ácido nucleico se puso en contacto con el algodón, preferentemente a temperatura ambiente, y los componentes no nucleicos se lavaron del algodón usando una serie de lavados que comprenden agua y alcohol acuoso. Los ácidos nucleicos de algodón se eluyeron usando un tampón acuoso que comprende una sal a temperatura elevada. Los ácidos nucleicos eluidos estarán listos para un procesamiento posterior o para la PCR. Los siguientes ejemplos se presentan con algodón empaquetado en una punta de pipeta de 1 ml que se utiliza habitualmente en los laboratorios de investigación. Pero como un experto en la materia puede darse cuenta de que el algodón se puede empaquetar en cualquier forma donde exista la posibilidad de que un líquido entre en contacto con él. Esencialmente, cualquier cosa con una entrada y una salida y entre el algodón puede empaquetarse se considera parte de esta divulgación.

15

**Ejemplo -1:** Extracción de ADN de la sangre

- Se añadieron 50 µl de sangre a 75 µl de tampón de lisis (30 µl de 10 mg/ml de proteinasa K, tiocianato de guanidina 5,6 M, EDTA 100 mM, Tris 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %). La solución resultante se calentó a 60 °C y se dejó a esa temperatura durante 3 minutos. Luego, la solución se calentó a 85 °C durante 2 minutos.
- Se añadieron 150 µl de tampón de unión (agua con 0,1 g/ml de PEG 6000) a la solución anterior.
- Se hizo un cuentagotas de plástico de 1 ml empaquetado con 8 mg de algodón (cuentagotas de algodón,

20

como se muestra en la Figura 2 [a]) interaccionara con la solución anterior.

d) A continuación, el cuentagotas de algodón se lavó con 2 ml de tampón de lavado 1 (etanol al 50 %) y tampón de lavado 2 (etanol al 50 % que contenía  $MgCl_2$  100 mM).

e) La punta de algodón se lavó con agua (3 x 1 ml).

5 f) Los ácidos nucleicos se eluyeron en 100 ul de tampón de elución (bicina 10 mM, KCl 10 mM, pH 9,8) a 95 °C.

**Ejemplo -2:** Extracción de ADN de la sangre

10 a) Se añadieron 100 µl de sangre a 150 µl de tampón de lisis (40 µl de 10 mg/ml de proteinasa K, tiocianato de guanidina 5,6 M, EDTA 100 mM, Tris 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %). La solución resultante se calentó a 60 °C y se dejó a esa temperatura durante 3 minutos. Luego, la solución se calentó a 85 °C durante 2 minutos.

b) Se añadieron 300 µl de tampón de unión (agua con 0,1 g/ml de PEG 6000) a la solución anterior.

c) Se hizo que una punta de pipeta moldeada de 1 ml empaquetada con 10 mg de algodón (punta de algodón, como se muestra en la Figura 3 [c]) interaccionara con la solución anterior.

15 d) A continuación, la punta de algodón se lavó con 1 ml de tampón de lavado 1 (etanol al 50 %) y 2 ml de tampón de lavado 2 (etanol al 50 % que contenía  $MgCl_2$  100 mM).

e) La punta de algodón se lavó con agua (3 x 1 ml).

f) Los ácidos nucleicos se eluyeron en 200 ul de tampón de elución (bicina 10 mM, KCl 10 mM, pH 9. 8) a 95 °C.

20 **Ejemplo -3:** Extracción de ADN de la sangre

a) Se añadieron 100 µl de sangre que contenía el parásito del paludismo (p. falciparum) a 150 µl de tampón de lisis (40 µl de 10 mg/ml de proteinasa K, tiocianato de guanidina 5,6 M, EDTA 100 mM, Tris 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %). La solución resultante se calentó a 60 °C y se dejó a esa temperatura durante 3 minutos. Luego, la solución se calentó a 85 °C durante 2 minutos.

25 b) Se añadieron 300 µl de tampón de unión (agua con 0,1 g/ml de PEG 6000) a la solución anterior.

c) Se hizo que una punta de pipeta moldeada de 1 ml empaquetada con 10 mg de algodón (punta de algodón, como se muestra en la Figura 3 [c]) interaccionara con la solución anterior.

30 d) A continuación, la punta de algodón se lavó con 1 ml de tampón de lavado 1 (etanol al 50 %)

e) La punta de algodón se lavó con 2 ml de tampón de lavado 2 (etanol al 50 % que contiene  $MgCl_2$  100 mM).

f) La punta de algodón se lavó con agua (3 x 1 ml).

g) Los ácidos nucleicos se eluyeron en 200 ul de tampón de elución (bicina 10 mM, KCl 10 mM, pH 9. 8) a 95 °C.

**Ejemplo -4:** Extracción de ARN de la sangre

35 a) Se añadieron 50 µl de sangre positiva a Chikungunya a 75 µl de tampón de lisis (30 µl de 10 mg/ml de proteinasa K, tiocianato de guanidina 5,6 M, EDTA 100 mM, Tris 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %). La solución resultante se calentó a 60 °C y se dejó a esa temperatura durante 3 minutos. Luego, la solución se calentó a 85 °C durante 2 minutos.

40 b) Se añadieron 150 µl de tampón de unión (agua con 0,1 g/ml de PEG 6000) a la solución anterior.

c) Se hizo que una punta de pipeta de 1 ml con 10 mg de algodón interaccionara con la solución anterior.

d) La punta de algodón se lavó específicamente con 1 ml de tampón de lavado 1 (etanol al 50 % que contiene  $MgCl_2$  50 mM).

e) La punta de algodón se lavó con agua (3 x 1 ml).

45 f) Los ácidos nucleicos se eluyeron en 200 ul de tampón de elución (bicina 10 mM, KCl 10 mM, pH 9. 8) a 95 °C.

**Ejemplo -5:** Extracción de ADN de la saliva

50 a) Se añadieron 50 µl de saliva a 100 µl de tampón de lisis (10 µl de 10 mg/ml de proteinasa K, tiocianato de guanidina 5,6 M, EDTA 200 mM, Tris 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %). La solución resultante se calentó a 60 °C y se dejó a esa temperatura durante 3 minutos. Luego, la solución se calentó a 85 °C durante 2 minutos.

b) Se añadieron 250 µl de tampón de unión (10 % de glicerol en agua) a la solución anterior.

c) Se hizo que una punta de pipeta moldeada de 1 ml empaquetada con algodón (punta de algodón, como se muestra en la Figura 3 [c]) interaccionara con la solución anterior.

55 d) La punta de algodón se lavó específicamente con 3 ml de tampón de lavado 1 (etanol al 50 % que contiene  $MgCl_2$  200 mM).

e) La punta de algodón se lavó con agua (3 x 1 ml) pipeteando el líquido tres veces durante cada lavado.

f) Los ácidos nucleicos se eluyeron en 250 ul de tampón de elución (bicina 10 mM, KCl 50 mM, pH 9. 8) a 95 °C.

60 **Ejemplo -6:** Extracción de ARN de la sangre

a) Se añadieron 100 µl de sangre positiva a Chikungunya a 150 µl de tampón de lisis (40 µl de 10 mg/ml de proteinasa K, tiocianato de guanidina 5,6 M, EDTA 100 mM, Tris 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %). La solución resultante se calentó a 60 °C y se dejó a esa temperatura durante 3 minutos. Luego, la solución se calentó a 85 °C durante 2 minutos.

65 b) Se añadieron 300 µl de tampón de unión (agua con 0,1 g/ml de PEG600) a la solución anterior. c) Se hizo que

una punta de pipeta moldeada de 1 ml empaquetada con 10 mg de algodón (punta de algodón, como se muestra en la Figura 3 [c]) interaccionara con la solución anterior.

d) A continuación, la punta de algodón se lavó específicamente con 1 ml de tampón de lavado 1 (etanol al 50 %) y 2 ml de tampón de lavado 2 (etanol al 50 % que contenía  $MgCl_2$  50 mM).

e) La punta de algodón se lavó con agua (2 x 1 ml).

f) Los ácidos nucleicos se eluyeron en 100  $\mu$ l de tampón de elución (bicina 10 mM, KCl 10 mM, pH 9.8) a 95 °C.

#### Ejemplo -7: Extracción de ARN de la sangre

a) Se añadieron 50  $\mu$ l de sangre positiva a Chikungunya a 75  $\mu$ l de tampón de lisis (40  $\mu$ l de 10 mg/ml de proteinasa K, tiocianato de guanidina 5,6 M, EDTA 80 mM, Tris 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %). La solución resultante se calentó a 55 °C y se dejó a esa temperatura durante 3 minutos. Luego, la solución se calentó a 70 °C durante 2 minutos.

b) Se añadieron 150  $\mu$ l de tampón de unión (agua con 0,1 g/ml de PEG 8000) a la solución anterior.

c) Se hizo un jeringa de 2,5 ml empaquetado con 10 mg de algodón (jeringa de algodón, como se muestra en la Figura 1 [a]) interaccionara con la solución anterior.

d) A continuación, la punta de algodón se lavó específicamente con 1 ml de tampón de lavado 1 (etanol al 50 %) y 2 ml de tampón de lavado 2 (etanol al 50 % que contenía  $MgCl_2$  50 mM).

e) La jeringa de algodón se lavó con agua (3 x 1 ml).

f) Los ácidos nucleicos se eluyeron en 100  $\mu$ l de tampón de elución (bicina 10 mM, KCl 10 mM, pH 9.8) a 95 °C.

#### Ejemplo -8: Extracción de ADN de esputo

a) Se añadieron 100  $\mu$ l de esputo a 150  $\mu$ l de tampón de lisis (40  $\mu$ l de 10 mg/ml de proteinasa K, tiocianato de guanidina 5,6 M, EDTA 100 mM, Tris 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %). La solución resultante se calentó a 60 °C y se dejó a esa temperatura durante 5 minutos. Luego, la solución se calentó a 75 °C durante 2 minutos.

b) Se añadieron 300  $\mu$ l de tampón de unión (agua con 0,1 g/ml de PEG 6000) a la solución anterior.

c) Se hizo que pipeta de fuelle de 5 ml empaquetada con 10 mg de algodón (fuelle de algodón, como se muestra en la Figura 2 [c]) interaccionara con la solución anterior.

d) A continuación, la punta de algodón se lavó específicamente con 1 ml de tampón de lavado 1 (etanol al 50 %) y tampón de lavado 2 (etanol al 50 % que contenía  $MgCl_2$  50 mM).

e) El fuelle de algodón se lavó con agua (3 x 1 ml).

f) Los ácidos nucleicos se eluyeron en 100  $\mu$ l de tampón de elución (tricina 10 mM, KCl 10 mM, pH 9.8) a 95 °C.

#### Ejemplo -9: Extracción de ADN de suero

a) Se añadieron 50  $\mu$ l de suero a 75  $\mu$ l de tampón de lisis (60  $\mu$ l de 10 mg/ml de proteinasa K, tiocianato de guanidina 5,6 M, EDTA 100 mM, Tris 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %). La solución resultante se calentó a 60 °C y se dejó a esa temperatura durante 3 minutos. Luego, la solución se calentó a 85 °C durante 2 minutos.

b) Se añadieron 150  $\mu$ l de tampón de unión (agua con 0,1 g/ml de PEG 6000) a la solución anterior.

c) Se hizo que una punta de pipeta moldeada de 1 ml empaquetada con 10 mg de algodón (punta de algodón, como se muestra en la Figura 3 [c]) interaccionara con el algodón.

d) A continuación, la punta de algodón se lavó específicamente con 1 ml de tampón de lavado 1 (etanol al 50 %) y 2 ml de tampón de lavado 2 (etanol al 50 % que contenía  $MgCl_2$  50 mM).

e) La punta de algodón se lavó con agua (3 x 1 ml).

f) Los ácidos nucleicos se eluyeron en 200  $\mu$ l de tampón de elución (bicina 10 mM, KCl 10 mM, pH 9.8) a 95 °C.

#### Ejemplo -10: Extracción de ARN de suero

a) Se añadieron 100  $\mu$ l de suero positiva a Chikungunya a 150  $\mu$ l de tampón de lisis (40  $\mu$ l de 10 mg/ml de proteinasa K, tiocianato de guanidina 5,6 M, EDTA 100 mM, Tris 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %). La solución resultante se calentó a 60 °C y se dejó a esa temperatura durante 3 minutos. Luego, la solución se calentó a 85 °C durante 2 minutos.

b) Se añadieron 300  $\mu$ l de tampón de unión (agua con 0,1 g/ml de PEG 6000) a la solución anterior.

c) Se hizo que una punta de pipeta moldeada de 1 ml empaquetada con 10 mg de algodón (punta de algodón, como se muestra en la Figura 3 [c]) interaccionara con el algodón.

d) A continuación, la punta de algodón se lavó específicamente con 3 ml de tampón de lavado 3 (etanol al 50 % que contiene  $MgCl_2$  50 mM).

e) La punta de algodón se lavó con agua (3 x 1 ml).

f) Los ácidos nucleicos se eluyeron en 200  $\mu$ l de tampón de elución (bicina 10 mM, KCl 10 mM, pH 9.8) a 95 °C.

#### Ejemplo -11: Extracción de ADN de esputo

a) Se añadieron 50  $\mu$ l de esputo a 150  $\mu$ l de tampón de lisis (40  $\mu$ l de 10 mg/ml de proteinasa K, tiocianato de guanidina 5,6 M, EDTA 100 mM, Tris 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %, pH 9.5). La solución resultante se calentó a

60 °C y se dejó a esa temperatura durante 3 minutos. Luego, la solución se calentó a 85 °C durante 6 minutos.

b) Se añadieron 150 µl de tampón de unión (agua con 0,1 g/ml de PEG 6000) a la solución anterior.

c) Se hizo 10 mg de algodón interaccionaran con la solución anterior

5 d) A continuación, el algodón se lavó específicamente con 3 ml de tampón de lavado 3 (etanol al 50 % que contiene MgCl<sub>2</sub> 50 mM).

e) El algodón se lavó con agua (3 x 1 ml).

f) Los ácidos nucleicos se eluyeron en 100 ul de tampón de elución (bicina 10 mM, KCl 10 mM, pH 9. 8) a 95 °C.

**Ejemplo -12:** Extracción de ADN de esputo

10 a) Se añadieron 50 µl de esputo a 75 µl de tampón de lisis (40 µl de 10 mg/ml de proteinasa K, tiocianato de guanidina 5,6 M, EDTA 100 mM, Tris 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %, pH 9. 5). La solución resultante se calentó a 60 °C y se dejó a dicha temperatura durante 5 minutos.

b) Se añadieron 150 µl de tampón de unión (agua con 0,1 g/ml de PEG 6000) a la solución anterior.

15 c) Se hizo 10 mg de algodón interaccionaran con la solución anterior.

d) A continuación, el algodón se lavó específicamente con 3 ml de tampón de lavado 3 (etanol al 50 % que contiene MgCl<sub>2</sub> 100 mM).

e) El algodón se lavó con agua (3 x 1 ml).

20 f) Los ácidos nucleicos se eluyeron en 100 ul de tampón de elución (bicina 10 mM, KCl 10 mM, pH 9. 8) a 95 °C.

**Ejemplo -13:** Extracción de ARN de tejido

25 a) Se añadieron 50 µl de tejido positivo para la rabia a 175 µl de tampón de lisis (40 µl de 10 mg/ml de proteinasa K, tiocianato de guanidina 5,6 M, EDTA 100 mM, Tris 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %, pH 9. 5), se agitó en vórtex durante 7 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo. La solución resultante se calentó a 60 °C y se dejó a esa temperatura durante 3 minutos.

b) Se añadieron 350 µl de tampón de unión (agua con 0,1 g/ml de PEG 6000) a la solución anterior.

c) Se hizo 20 mg de algodón interaccionaran con la solución anterior.

30 d) A continuación, el algodón se lavó específicamente con 3 ml de tampón de lavado 3 (etanol al 50 % que contiene MgCl<sub>2</sub> 100 mM).

e) El algodón se lavó con agua (3 x 1 ml).

f) Los ácidos nucleicos se eluyeron en 100 ul de tampón de elución (bicina 10 mM, KCl 10 mM, pH 9. 8) a 95 °C.

**Ejemplo -14:** Extracción de ARN de sangre

35 a) El tampón de lisis, el tampón de unión, los tampones de lavado y el tampón de elución se prepararon en agua DEPC.

b) Se colocaron 50 µl de sangre Chikungunya en 50 µl de 10 mg/ml de proteinasa K y 250 µl de tampón de lisis tiocianato de guanidina 5,6 M, EDTA 20 mM, Tris 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, Triton X-100 al 0,01 %,). El tubo se calentó a 60 °C y se dejó a esa temperatura durante 3 minutos. Luego, la solución se calentó a 80 °C durante 2 minutos.

b) Se añadió 1 ml de tampón de unión (10 % de PEG 6000) a la solución anterior.

40 d) Se hizo que una jeringa de 3 ml con algodón (jeringa de algodón, como se muestra en la Figura 1 [a]) interaccionara con la solución tirando del émbolo de la jeringa hacia adelante y hacia atrás cinco veces.

45 e) A continuación, la jeringa de algodón se lavó específicamente con un tampón de lavado 1 de 3 ml (etanol al 50 % que contenía MgCl 100 mM) tirando del émbolo de la jeringa hacia adelante y hacia atrás siete veces.

f) La jeringa de algodón se lavó con agua (3 x 2 ml) tirando del émbolo de la jeringa hacia adelante y hacia atrás tres veces durante cada lavado.

50 g) Los ácidos nucleicos se eluyeron en 200 ul de tampón de elución (bicina 10 mM, KCl 10 mM, pH 9. 8) a 95 °C tirando del émbolo de la jeringa hacia adelante y hacia atrás dos veces.

h) Los ácidos nucleicos presentes en la sangre se obtuvieron en forma de PCR preparada y el protocolo total tardó aproximadamente 9 minutos.

**Ejemplo -15:** Extracción de ácidos peptidonucleicos (APN)

55 a) Se añadieron 50 µl de solución estándar con PNA a 75 µl de tampón de lisis (10 µl de 10 mg/ml de proteinasa K, hidrocloreuro de guanidina 5,6 M, EDTA 100 mM, Tris 20 mM, Triton X-100 al 0,01 %, pH 9. 5), se agitó en vórtex durante 7 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo. La solución resultante se calentó a 60 °C y se dejó a esa temperatura durante 3 minutos. Luego, la solución se calentó a 75 °C durante 3 minutos.

60 b) Se añadieron 150 µl de tampón de unión (agua con 0,1 g/ml de PEG 6000) a la solución anterior.

c) Se hizo 10 mg de algodón interaccionaran con la solución anterior.

d) A continuación, el algodón se lavó específicamente con 3 ml de tampón de lavado 3 (etanol al 50 % que contiene MgCl<sub>2</sub> 100 mM).

e) A continuación, el algodón se lavó con agua (3 x 1 ml).

65 f) Los ácidos nucleicos proteicos se eluyeron en 100 ul de tampón de elución (bicina 10 mM, KCl 10 mM, pH 9. 8) a 95 °C.

**Ejemplo -16:** Amplificación por PCR

- Las muestras de ADN/ARN purificadas mediante el protocolo de la divulgación instantánea se someten a amplificación por PCR seguida de electroforesis en gel. Los resultados se muestran en las figuras 4, 5, 6 y 7. La
- 5 Figura 4 proporciona bandas comparativas de muestras de ADN aisladas y purificadas usando viscosa, hisopo de viscosa comercial, algodón empaquetado en una punta de pipeta de 1 ml, columna de sílice comercial y torunda de algodón. De manera similar, la figura 5 proporciona bandas comparativas de muestras de ADN purificadas por diferentes protocolos, a saber, algodón envasado en punta de pipeta de 1 ml, algodón empaquetado en una jeringa de 2 ml, columna de sílice comercial marcador de peso molecular.
- 10 Asimismo, la figura 6 proporciona bandas comparativas de muestras de ADN purificadas por diferentes protocolos, a saber, marcador de peso molecular, protocolo de sílice comercial, algodón empaquetado en una punta de pipeta de 1 ml, papel de filtro Whatman No 1 empaquetado en una punta de pipeta y protocolo de la tarjeta de FTA.
- 15 Además, la figura 7 proporciona bandas comparativas de una muestra de ARN de 30 ct amplificada por RT-PCR, que se purificaron mediante diferentes protocolos. Los protocolos utilizaron diferentes fuentes de la matriz de algodón, a saber, algodón quirúrgico, Algodón esterilizado en autoclave, algodón lavado con hidróxido sódico, algodón lavado con ácido clorhídrico y algodón absorbente.
- 20 Aunque se han descrito varios aspectos y realizaciones en el presente documento, otros aspectos y realizaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los diversos aspectos y realizaciones divulgados en el presente documento son a título de ilustración y no pretenden ser limitantes, con el verdadero alcance indicado por las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para el aislamiento de ácido nucleico de una muestra, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 5 (a) añadir tampón de lisis que tiene pH básico a la muestra que contiene ácido nucleico para obtener una solución lisada; o  
 (b) añadir a la muestra tampón de lisis que tiene pH básico en combinación con tampón de unión para obtener una solución lisada;
- 10 (c) añadir un tampón de unión a la solución obtenida de la etapa (a) para unir el ácido nucleico a una matriz de algodón o para la unión directa de la solución de la etapa (b) a una matriz de algodón, en donde el pH de unión es de 8 a 10; y  
 (d) lavar con tampón de lavado y eluir el ácido nucleico unido a la matriz de algodón con tampón de elución para aislar y purificar el ácido nucleico;
- 15 en donde el tampón de lisis comprende tiocianato de guanidina o hidrocloreuro de guanidina, EDTA, Tris, un detergente y, opcionalmente, urea, un poliol, una sal monovalente que contiene un catión del grupo IA y/o una sal divalente que contiene un catión del grupo IIA y enzima digestiva de proteínas.
- 20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en ADN, ARN y PNA y/o en donde dicha muestra es una muestra biológica o no biológica, y, opcionalmente, en donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en extractos de sangre, esputo, suero, saliva o tejido, y la muestra no biológica se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en PNA sintetizado químicamente.
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho EDTA tiene una concentración que varía de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 300 mM, preferentemente de aproximadamente 100 mM; y/o en donde dicho tiocianato de guanidina o dicho hidrocloreuro de guanidina tiene una concentración que varía de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 7 M; y/o
- 30 en donde dicha urea tiene una concentración que varía de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 7 M; y/o en donde dicho Tris tiene una concentración que varía de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 100 mM, preferentemente aproximadamente 20 mM; y/o en donde dicho poliol tiene una concentración que varía de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 30 % (v/v); y/o
- 35 en donde dicho detergente se selecciona del grupo que consiste en laurilsulfato sódico, dodecilsulfato sódico, Triton X-100, NP-40 y Tween 20 o cualquier combinación de los mismos y en donde la enzima de digestión de proteínas es proteinasa K.
- 40 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho tampón de unión es agua opcionalmente junto con polioles o no polioles, en donde dicho poliol comprende, opcionalmente, compuestos de poliol solubles en agua seleccionados del grupo que consiste en polietilenglicol, glicerol, polipropilenglicol, etilenglicol y propilenglicol; y en donde dicho no poliol comprende alcoholes seleccionados del grupo que consiste en metanol, etanol, propanol o cualquier líquido soluble en agua con un grupo funcional que consiste en ácido, amina, alcohol, fenol, amida o éster como uno de los grupos funcionales; o cualquier combinación de los mismos.
- 45 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho lavado comprende un primer lavado con un tampón de lavado que comprende de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 99 % (v/v), preferentemente de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 70 % (v/v) y, óptimamente, aproximadamente el 50 % (v/v) de alcohol acuoso seguido de lavados múltiples con un tampón de lavado que comprende el 100 % de agua.
- 50 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho alcohol acuoso se selecciona del grupo que consiste en etanol, metanol, n-propanol, 2-propanol, glicerol, PEG, PPG, etilenglicol y propilenglicol.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicha agua se selecciona del grupo que consiste en agua desionizada, agua libre de DNasa, agua libre de RNasa, agua MilliQ, agua filtrada, agua corriente y agua subterránea o cualquier combinación de las mismas.
- 55 8. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho tampón de lavado comprende sales seleccionadas de un grupo que consiste en MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaCl y KCl, o tampones seleccionados del grupo que consiste en bicina, tricina, Tris, HEPES, CHAPS, fosfato, acetato, MES, piridina, piperazina, Bis-tris, PIPES, ACES, BES, TES, borato, TAPS, CHES, CAPS, etanolamina y piperidina, que tienen un pH que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 12.
- 60 9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho tampón de elución comprende agua caliente que tiene una temperatura que varía de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 99 °C junto con tampón o sal, que tiene un pH que varía de aproximadamente 8 a aproximadamente 11, en donde dicha agua se selecciona del grupo
- 65

- que consiste en agua desionizada, agua libre de DNasa, agua libre de RNasa, agua MilliQ, agua filtrada, agua corriente y agua subterránea o cualquier combinación de las mismas; en donde dicho tampón se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en bicina, tricina, Tris, HEPES, CHAPS, fosfato, acetato, MES, piridina, piperazina, Bis-tris, PIPES, ACES, BES, TES, borato, TAPS, CHES, CAPS, etanolamina y piperidina o cualquier combinación de las mismas que tiene un pH que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 12; y en donde dicho sal se selecciona, opcionalmente, del grupo que consiste en  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ , NaCl y KCl o cualquier combinación de las mismas en una concentración que varía de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 100 mM, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM.
- 5
- 10 10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el algodón se selecciona de entre el grupo que consiste en algodón natural, algodón quirúrgico, algodón de grado clínico, algodón comercial, algodón hilado, algodón lavado con agua, algodón lavado con ácido o base, algodón esterilizado en autoclave, algodón tratado con tampón que tiene pH que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 14, algodón tratado con solución salina, algodón tratado con disolvente orgánico, algodón prensado y algodón procesado.
- 15
11. Un kit para el aislamiento de ácido nucleico de una muestra, comprendiendo dicho kit una matriz de algodón, un tampón de lisis que tiene un pH básico, un tampón de unión en el que el pH de unión es de 8 a 10, un tampón de lavado y un tampón de elución, en donde el tampón de lisis comprende tiocianato de guanidina o hidrocloreuro de guanidina, EDTA, Tris, un detergente y, opcionalmente, urea, un poliol, una sal monovalente que contiene un catión del grupo IA y/o una sal divalente que contiene un catión del grupo IIA y enzima digestiva de proteínas.
- 20
12. El kit de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el algodón se selecciona de entre el grupo que consiste en algodón natural, algodón quirúrgico, algodón de grado clínico, algodón comercial, algodón hilado, algodón lavado con agua, algodón lavado con ácido o base, algodón esterilizado en autoclave, algodón tratado con tampón que tiene pH que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 14, algodón tratado con solución salina, algodón tratado con disolvente orgánico, algodón prensado y algodón procesado.
- 25
13. El kit de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el tampón de lisis es como se define en la reivindicación 3, el tampón de unión es como se define en la reivindicación 4, el tampón de lavado es como se define en las reivindicaciones 5 a 8 y/o el tampón de elución es como se define en la reivindicación 9.
- 30
14. El kit de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha muestra comprende muestras biológicas o no biológicas; en donde la muestra biológica se selecciona, opcionalmente, del grupo que consiste en extractos de sangre, esputo, suero, saliva o tejido, y la muestra no biológica se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en PNA sintetizado químicamente.
- 35

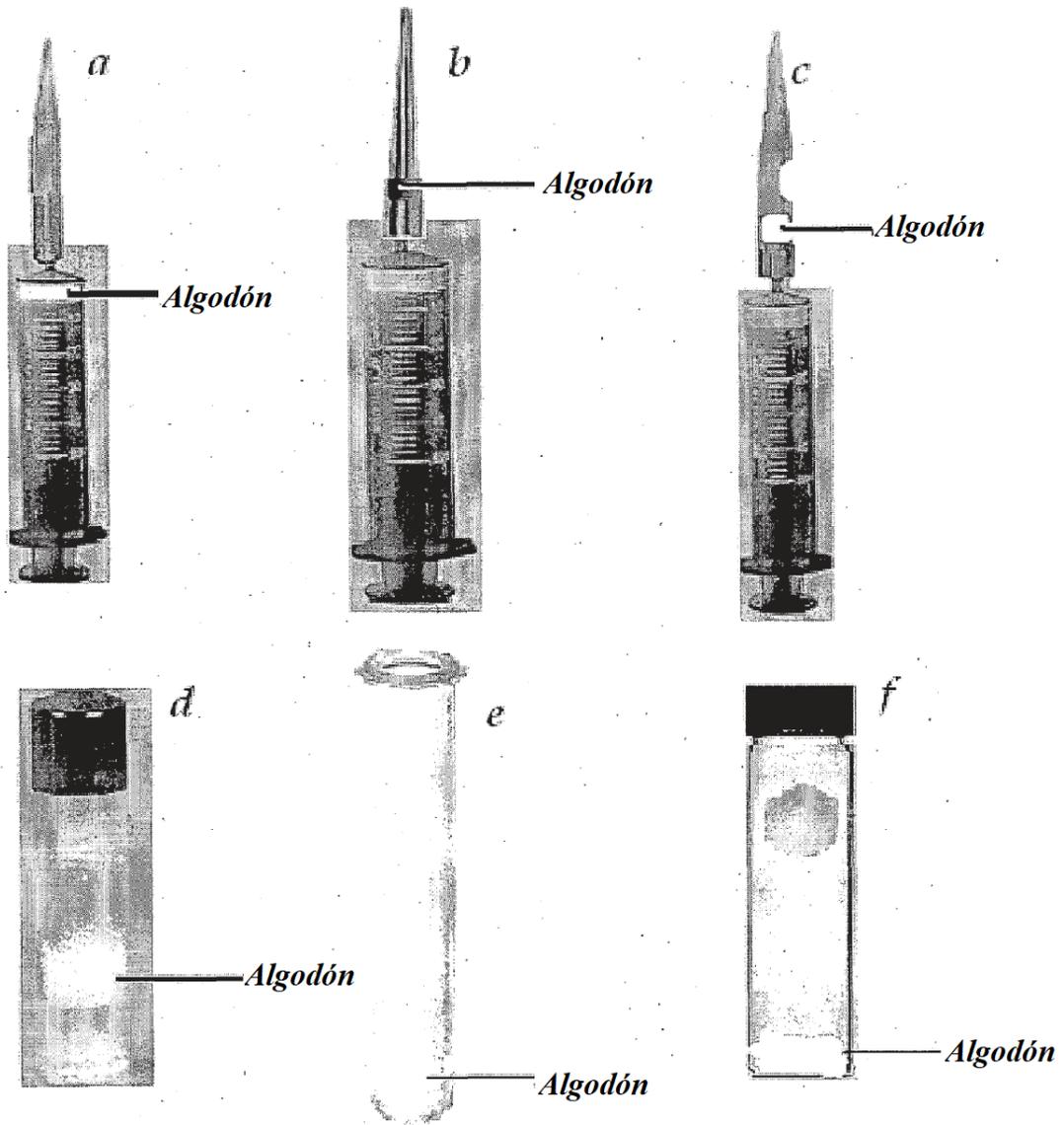


Figura 1

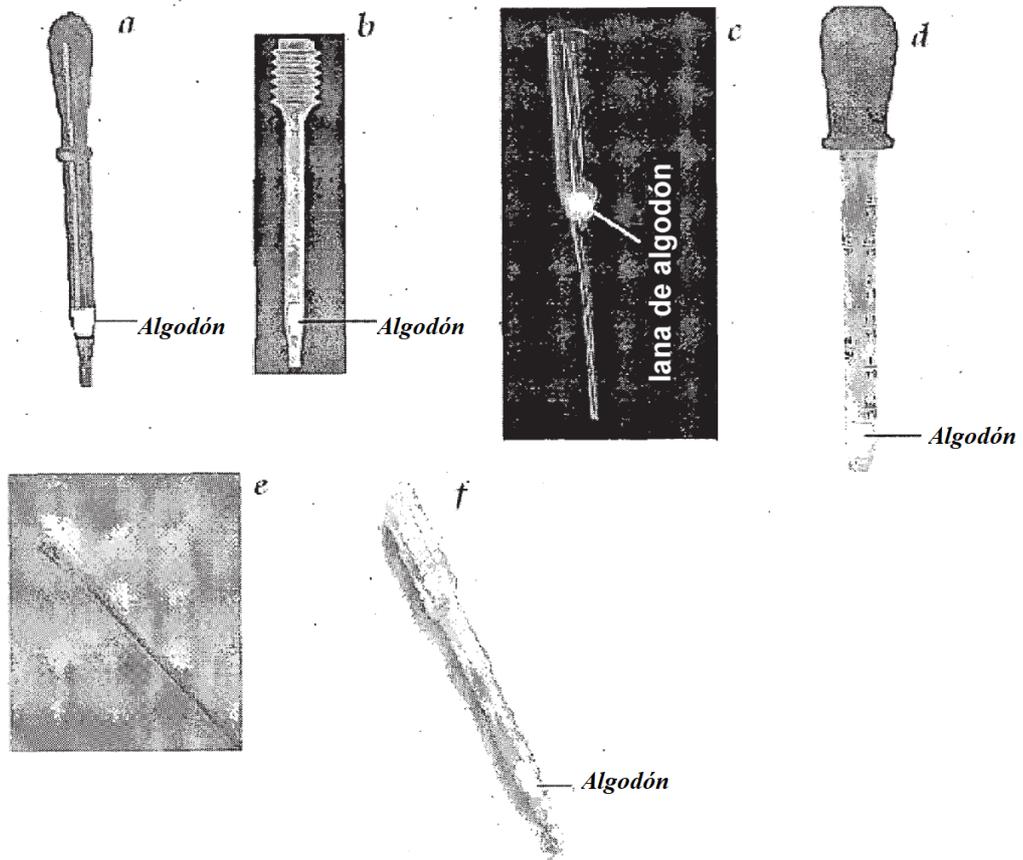


Figura 2

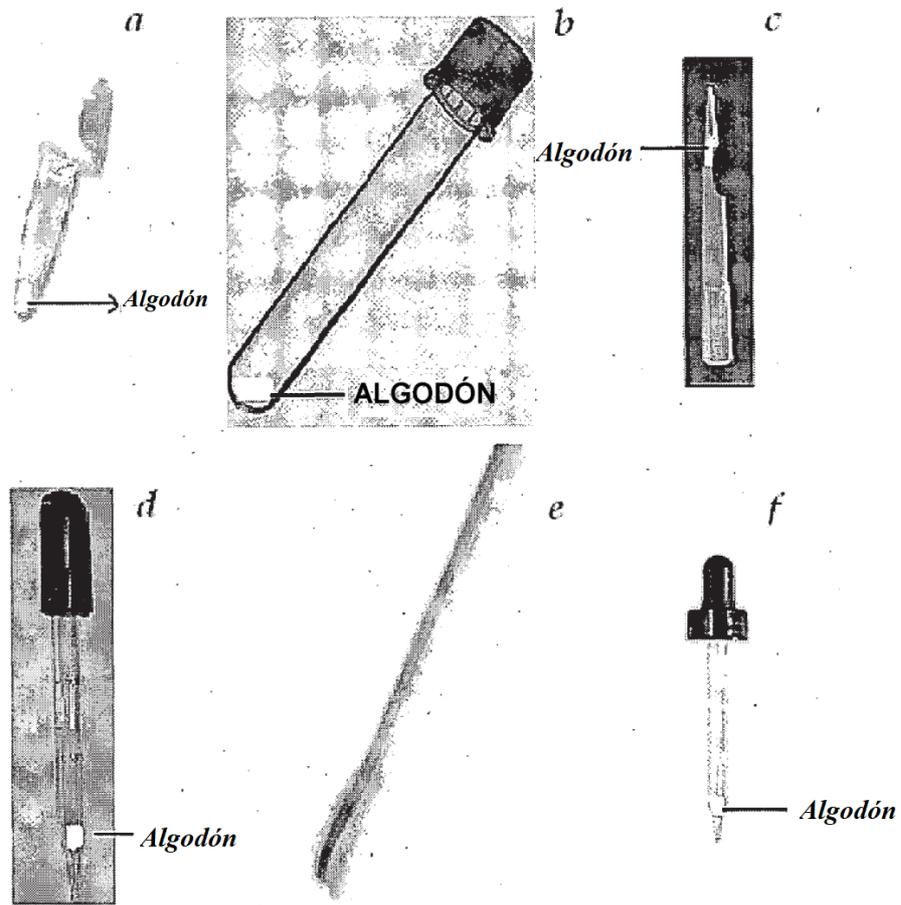


Figura 3

calle 1 calle 2 calle 3 calle 4 calle 5 calle 6 calle 7 calle 8

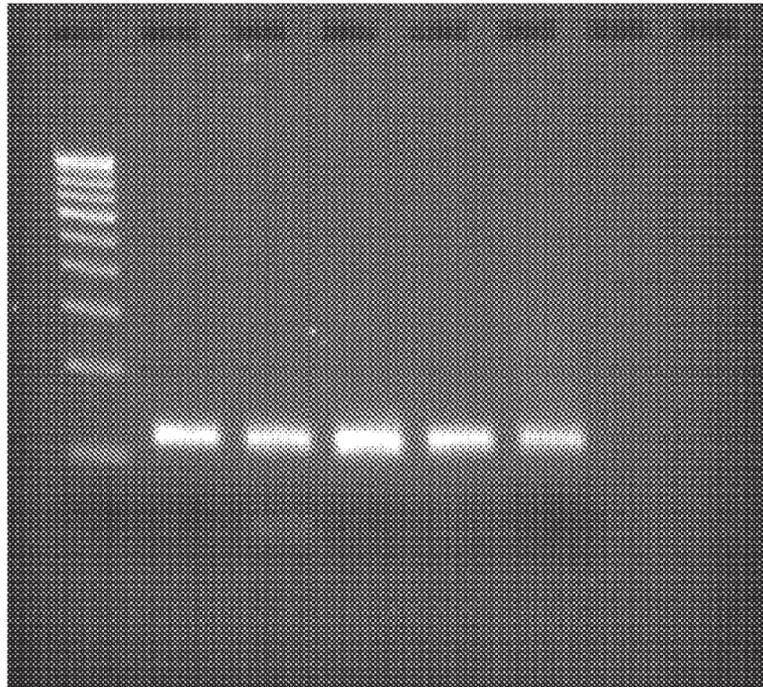


Figura 4

calle 1 calle 2 calle 3 calle 4 calle 5

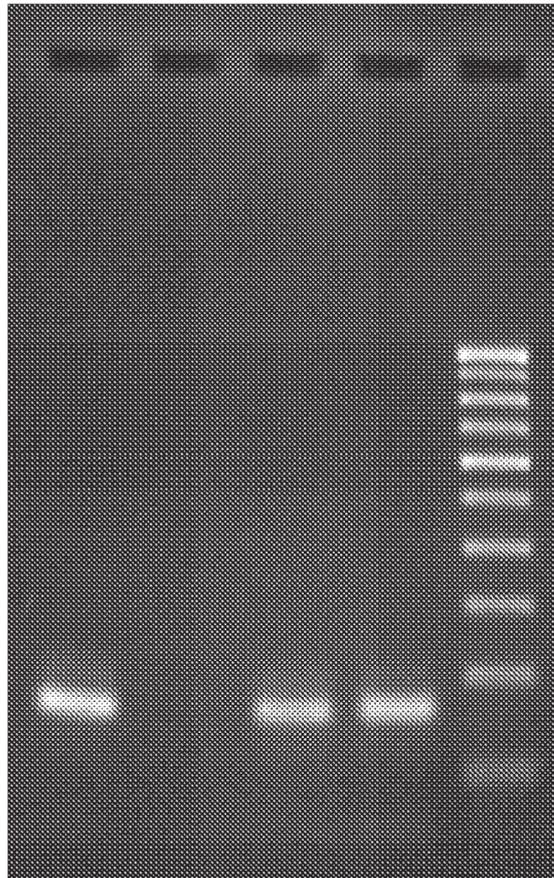


Figura 5

calle 1 calle 2 calle 3 calle 4 calle 5

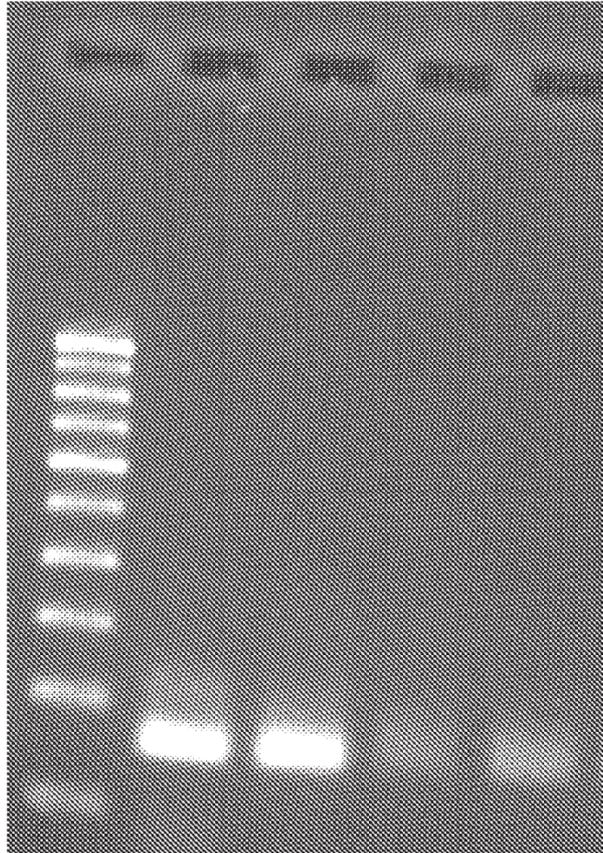


Figura 6

**Calle 1 Calle 2 Calle 3 Calle 4 Calle 5 Calle 6 Calle 7 Calle 8**

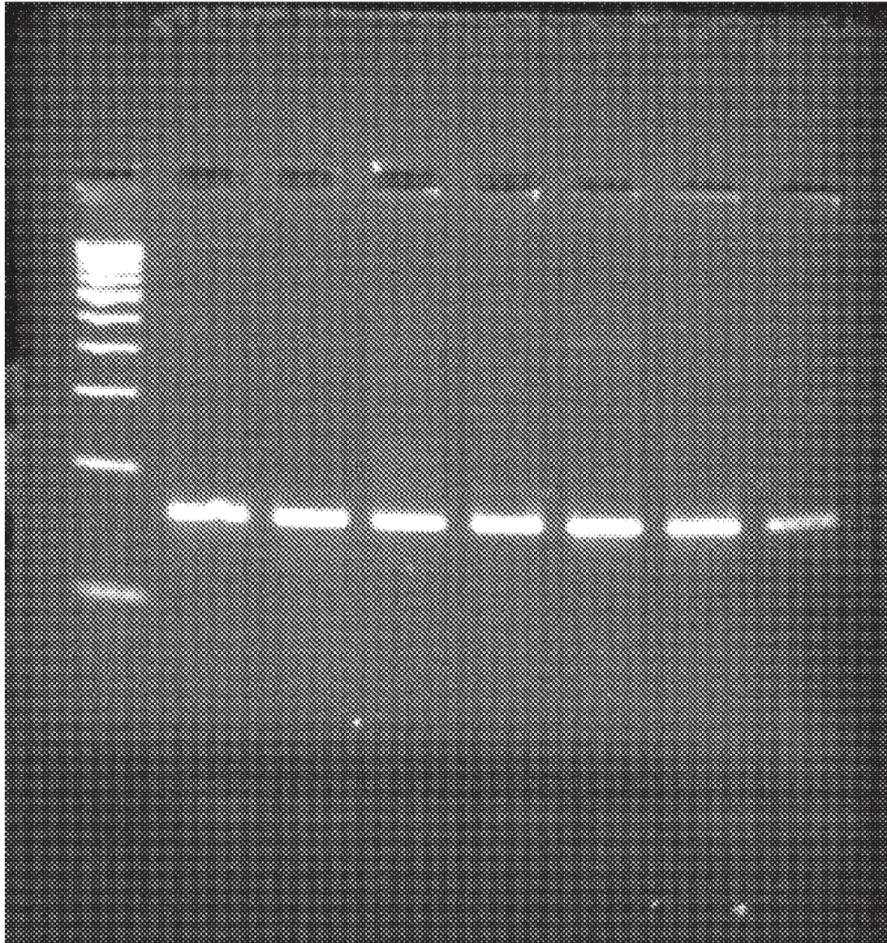


Figura 7

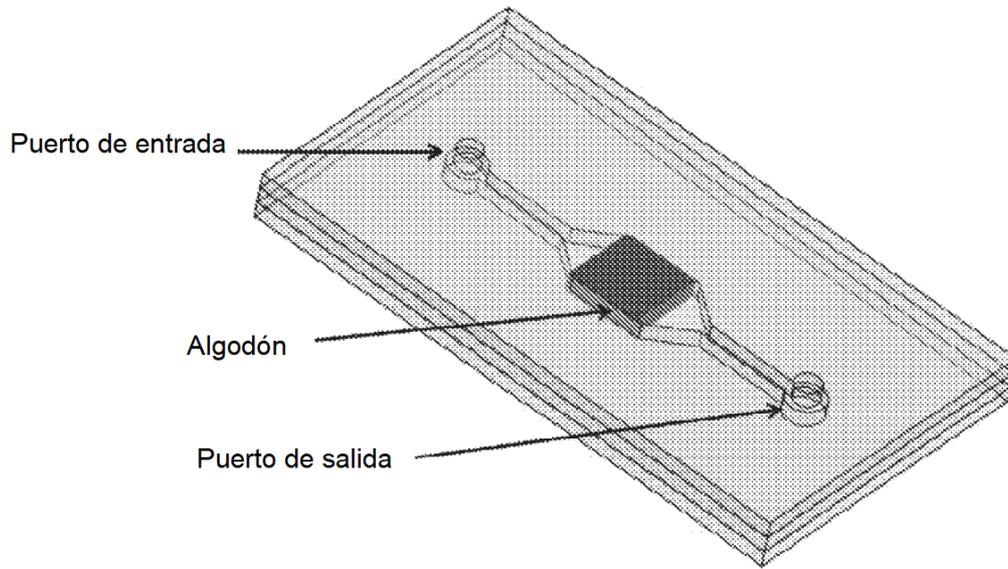


Figura 8