

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 539**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2002 PCT/EP2002/10823**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2003 WO03035903**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2002 E 02795056 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 1432830**

54 Título: **Procedimiento para el aislamiento de ADN a partir de muestras biológicas**

30 Prioridad:

**26.09.2001 DE 10147439**

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

**14.02.2018**

73 Titular/es:

**QIAGEN GMBH (100.0%)  
MAX-VOLMER-STRASSE 4  
40724 HILDEN, DE**

72 Inventor/es:

**LENZ, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 654 539 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el aislamiento de ADN a partir de muestras biológicas

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para el aislamiento de ADN a partir de muestras biológicas, en particular a partir de sangre entera humana.

5 La purificación de ácidos nucleicos juega un papel central en la biología molecular. El ADN purificado sirve en este caso, entre otros, como material de partida para el diagnóstico basado en ácidos nucleicos, para la creación de perfiles genéticos y para la farmacogenómica. Por lo tanto, se le otorga una particular importancia al aislamiento de ácidos nucleicos tales como ADN y ARN a partir de muestras biológicas - tal como, por ejemplo, sangre, secreciones corporales, muestras de tejido, orina, heces y similares - para el subsiguiente empleo en análisis genéticos.

10 En el caso de los métodos conocidos del estado de la técnica para la obtención de ácidos nucleicos, el aislamiento de ADN a partir de células y tejidos tiene lugar debido a que los materiales de partida se descomponen en condiciones fuertemente desnaturizantes y reductoras, utilizando, en parte, también enzimas de degradación de proteínas, las fracciones de ácidos nucleicos liberadas se purifican a través de etapas de extracción de fenol/cloroformo y los ácidos nucleicos se obtienen mediante diálisis o precipitación con etanol a partir de la fase acuosa [Sambrook, J., Fritsch, E.F. en T. Maniatis, CSH, "Molecular Cloning" 1989].

15 Estos procedimientos establecidos desde hace tiempo para el aislamiento de ADN a partir de células y, en particular, a partir de tejidos presentan, sin embargo, serios inconvenientes: por una parte, son muy largos y requieren un esfuerzo experimental nada desconsiderable. Junto a ello, modos de proceder de este tipo están ligados con el riesgo agudo de daños a la salud de las personas involucradas en el aislamiento debido a sustancias químicas a utilizar - tales como cloroformo o fenol - .

La consecuencia inevitable de las desventajas descritas anteriormente fue que, con el tiempo, se desarrollaron procedimientos alternativos para aislar ácidos nucleicos a partir de diferentes materiales biológicos de partida para evitar la extracción compleja y nociva para la salud de ácidos nucleicos mediante la extracción con fenol/cloroformo, así como reducir el tiempo necesario.

25 Todas estas propuestas de procedimiento conocidas del estado de la técnica se basan en un método desarrollado por Vogelstein y Gillespie [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 615-619] y descrito por primera vez para la purificación preparativa y analítica de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa. El método combina la disolución de la agarosa que contiene la banda de ADN en una disolución salina caotrópica con la unión del ADN a partículas portadoras. A continuación, se lava el ADN fijado con una solución de lavado (EDTA 20 mM; etanol al 50% v/v) y después se desprende de las partículas portadoras.

30 Este método experimentó hasta hoy en día una serie de modificaciones y en la actualidad todavía se utiliza para diferentes procedimientos de extracción y purificación de ácidos nucleicos a partir de diferentes fuentes (Marko, M. A., Chipperfield, R. y Birnboim, H.G., 1982, Anal. Biochem. 121, 383-387).

35 Además, hoy en día también existe un gran número de sistemas de reactivos en todo el mundo, ante todo para la purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa y para el aislamiento de ADN plasmídico a partir de lisados bacterianos, pero también para el aislamiento de ácidos nucleicos de cadena más larga (ADN genómico, ARN celular total) de la sangre, tejidos o cultivos celulares.

40 Muchos de estos sistemas de purificación comercialmente disponibles se basan en el ampliamente conocido principio de la unión de ácidos nucleicos a portadores minerales en presencia de disoluciones de diferentes sales caotrópicas. En estos sistemas, se utilizan como materiales portadores suspensiones de polvo de vidrio finamente molido, tierras de diatomeas o también geles de sílice.

45 Un procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos, que es practicable para una pluralidad de aplicaciones diferentes, se describe en el documento de patente de EE.UU. 5 234 809. Allí se da a conocer un procedimiento para aislar ácidos nucleicos a partir de materiales de partida que contienen ácidos nucleicos por incubación del material de partida con un tampón caotrópico y una fase sólida que une el ADN. Los tampones caotrópicos realizan tanto la lisis del material de partida como la unión de los ácidos nucleicos a la fase sólida. El procedimiento se utiliza para aislar ácidos nucleicos a partir de pequeñas cantidades de muestra, y encuentra su aplicación práctica especialmente en el sector del aislamiento de ácidos nucleicos virales.

50 El principio físico-químico de los sistemas empleados hoy en día según el estado de la técnica y comercialmente disponibles para aislar ácidos nucleicos, basados en la unión de los ácidos nucleicos a las superficies de portadores minerales, ha de consistir en este caso en la perturbación de estructuras dispuestas por encima del medio acuoso, a través de las cuales los ácidos nucleicos se adsorben a la superficie de materiales minerales, en particular de partículas de vidrio y de sílice. La perturbación de las estructuras dispuestas por encima del medio acuoso tiene lugar siempre bajo la presencia de iones caotrópicos, y es casi cuantitativa en altas concentraciones de éstos. Sobre esta base físico-química descrita, muchos sistemas disponibles comercialmente para aislar ácidos nucleicos

55 contienen composiciones tampón con sales caotrópicas de alta intensidad iónica, que se consideran necesarias para

unir los ácidos nucleicos a una fase sólida de unión de ácidos nucleicos.

Inconvenientes agravantes del procedimiento consisten, sin embargo, entre otros, en que la disgregación realizada por los tampones caotrópicos no se puede emplear ni mucho menos para todos los materiales o bien, también para grandes cantidades de materiales de partida, sólo se puede realizar de manera extremadamente ineficaz y bajo un gran consumo de tiempo. Además de ello, para diferentes planteamientos del problema, se han de emplear también siempre diferentes concentraciones elevadas de tampones caotrópicos diferentes, lo cual se manifiesta muy complejo.

Por otro lado, del estado de la técnica se conoce el aislamiento de ácidos nucleicos a base de una etapa de precipitación mediante sales [L.A. Salazar et al., Clin. Chem. 144 (1998) 1748; S.A. Miller et al., Nucleic Acids Res., 16 (3) (1988) 1215]. Sin embargo, estos procedimientos albergan el inconveniente de que durante la realización del procedimiento se requiere al menos una vez el cambio del recipiente de reacción, lo cual conlleva el riesgo de la confusión de la muestra. Además de ello, las proteínas precipitadas mediante sales solamente se pueden separar del ácido nucleico a purificar mediante el método experimentalmente complejo de la centrifugación.

Otro procedimiento para la purificación de ADN que se obtuvo a partir de sangre, se da a conocer por T.A. Ciulla [Analytical Biochemistry, 173 (1988) 485]. En este caso, los núcleos de las células se liberan primeramente mediante una etapa de lisis. El ADN contenido en los mismos se aísla utilizando *iso*-tiocianato de guanidinio y  $\beta$ -mercaptoetanol y mediante subsiguiente precipitación con 2-propanol. Este procedimiento contiene, sin embargo, etapas de resuspensión y centrifugación que requieren relativamente mucho tiempo. Además, este procedimiento utiliza un tampón de lisis que es susceptible al crecimiento microbiano y, en relación con la sangre, requiere un exceso de 9 veces. Además de ello, el  $\beta$ -mercaptoetanol se clasifica como una sustancia tóxica.

Parzer et al. (Biochem. J. (1991) 273, 229-231) describe un procedimiento relativamente rápido para el aislamiento de ADN mediante condiciones de lisis no caotrópicas, el cual puede renunciar ciertamente al uso de reactivos tóxicos, pero no puede llevarse a cabo en el mismo recipiente hasta obtener el ADN aislado.

En la bibliografía se describen diversos procedimientos para el aislamiento de ácidos nucleicos mediante etapas de lisis o bien de suspensión de múltiples pasos que se diferencian en particular en la composición de sus disoluciones de lisis y de suspensión.

Así, el documento US 6.130.073 describe un procedimiento basado en la PCR para el análisis de sistemas genéticos complejos. El ADN requerido para ello se obtiene a partir de sangre entera estabilizada con EDTA o citrato en un procedimiento de múltiples pasos, el cual presenta primeramente una etapa de lisis utilizando Triton X-100 y  $MgCl_2$  y, a continuación, resuspende el sedimento obtenido bajo condiciones caotrópicas.

De acuerdo con Davidson (Ann Clin Biochem (2002), 39, 273-280, en combinación con Am J. Clin Pathol (1993), 100, 371-2), concentraciones de EDTA óptimas en la sangre estabilizada se encuentran en este caso en 4-55 mmol por litro de sangre.

Grimberg et al. (Nucleic Acid Research (1989) Vol. 17, No. 20, pág. 8390) describe para el aislamiento del ácido nucleico un procedimiento similar, en el que, no obstante, el sedimento obtenido después de la lisis es suspendido bajo condiciones no caotrópicas en un tampón con contenido en proteinasa K.

Lahiri et al. (Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 25 (1992), 193-205) utiliza tanto para la lisis como para la resuspensión una combinación a base de EDTA y varias sales, en el caso de la lisis, adicionalmente todavía un detergente no iónico y en el caso de la resuspensión, adicionalmente todavía un detergente aniónico. No obstante, el procedimiento no puede llevarse a cabo en un recipiente de reacción hasta la obtención del ADN.

La misión de la presente invención consiste, por consiguiente, en proporcionar un procedimiento que evite los inconvenientes de los procedimientos conocidos del estado de la técnica.

En particular, el problema de la presente invención estriba en renunciar, en el aislamiento de ADN, a sustancias tóxicas o corrosivas.

Junto a ello, la presente invención se plantea el problema de proponer un procedimiento que ahorre tiempo y poco complejo para el aislamiento de ADN.

Otra misión de la presente invención es crear un procedimiento que se pueda llevar a cabo sin el cambio del recipiente de reacción - como la denominada "reacción en un solo recipiente" - y, con ello, se reduzca a un mínimo el riesgo de confusión o bien una contaminación de las muestras.

Los problemas antes mencionados se resuelven conforme a la invención debido a que la muestra biológica se mezcla en un recipiente de reacción con un reactivo de lisis que contiene sales de cationes monovalentes, sales de cationes bivalentes, uno o varios formadores de complejos elegidos de tetraacetato de etilendiamina, ácido etilendioxi-bis-(etilen-nitrilo)tetraacético, DTPA y  $Na_5P_3O_{10}$  y polietoxilato de octilfenol. En la siguiente etapa, los componentes que contienen el ADN se separan de los restantes componentes de la célula. Esta separación puede

tener lugar, por ejemplo, mediante centrifugación.

El ADN contenido en el sedimento se separa a continuación de otras impurezas, por ejemplo, proteínas. Esta separación se alcanza mediante la resuspensión del sedimento en una disolución salina, conteniendo la disolución salina al menos una sal caotrópica. Opcionalmente, las impurezas pueden separarse del ADN también mediante calentamiento y/o mediante el empleo de enzimas. A continuación, el ADN se precipita mediante la adición de alcohol y el precipitado se separa de la disolución. Esto puede tener lugar, por ejemplo, mediante centrifugación o mediante el enrollamiento del ADN en un gancho de vidrio. Después del lavado con líquido de lavado en el que se disuelven las sales, pero no el ADN, y del secado, el ADN se resuspende en un tampón adecuado. El aislamiento se lleva a cabo en un recipiente de reacción.

5 Como muestra biológica con contenido en ácido nucleico pueden utilizarse material de muestra exento de células, plasma, líquidos corporales tales como, por ejemplo, sangre, capa leucoplaquetaria, células, fracciones de leucocitos, crusta flogística, esputo, orina, esperma u organismos (monocelulares o pluricelulares; insectos, etc.) o bien eucariontes o procariontes.

15 Para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención se adecuan, en particular, sangre (sangre entera humana), capa leucoplaquetaria, fracciones de leucocitos y cultivos celulares.

Para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención se adecua muy particularmente sangre (sangre entera humana).

20 Como reactivos de lisis se adecuan para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención los reactivos de lisis con contenido en detergentes conocidos del estado de la técnica. Detergentes adecuados son conocidos en gran número del estado de la técnica.

Para la solución del problema de acuerdo con la invención se adecúa, en particular, Triton X-100 (polietoxilato de octilfenol).

De acuerdo con la invención, se emplean preferiblemente reactivos de lisis a base de detergente al 0,5 hasta 7,5% en vol., siendo particularmente preferido un contenido de 1,0 a 5,0% en vol.

25 Al reactivo de lisis se le añaden sales de cationes monovalentes y bivalentes, así como formadores de complejos.

De acuerdo con la invención, se emplean preferiblemente reactivos de lisis a base de cloruro de magnesio 0,5 a 200 mM, cloruro de potasio 0,5 a 200 mM, así como tetraacetato de etilendiamina y/o ácido etilendioxi-bis-(etilen-nitrilo)-tetra-acético 0,5 a 100 mM.

30 De manera particularmente preferida, se emplean reactivos de lisis a base de cloruro de magnesio 1 a 30 mM, cloruro de potasio 1 a 20 mM, así como tetraacetato de etilendiamina 1 a 10 mM y/o ácido etilendioxi-bis-(etilen-nitrilo)-tetraacético 1 a 10 mM.

35 Eventualmente, al reactivo de lisis pueden añadirse una o varias sustancias tampón. El valor del pH del reactivo de lisis puede variar a lo largo de un amplio intervalo y, para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención, se encuentra preferiblemente en un intervalo de pH de 2 a 10 y de manera particularmente preferida en un intervalo de pH de 3 a 9. En este caso, pueden utilizarse los sistemas tampón para el ajuste del valor del pH, conocidos por el experto en la materia. Conforme a la invención, se utilizan sistemas tampón basados preferiblemente en tris(hidroximetil)aminometano. Se prefiere particularmente un sistema tampón a base de hidrocloreuro de tris(hidroximetil)aminometano 0,5 a 250 mM.

40 De manera muy particularmente preferida se emplea un tampón de lisis que contiene hidrocloreuro de tris(hidroximetil)aminometano 13 mM, pH 8,0, cloruro de magnesio(II) hexahidrato 10 a 14,5 mM, cloruro potásico 10 mM, tetraacetato de etilendiamina 2 a 5 mM y/o ácido etilendioxi-bis(etilen-nitrilo)tetraacético 1 a 2 mM, así como Triton X-100 al 2% en vol.

45 Como disolución salina para la resuspensión del sedimento con contenido en ácido nucleico se adecuan para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención las disoluciones conocidas de forma correspondiente del estado de la técnica a base de elevadas concentraciones de sal con al menos una sal caotrópica, en particular utilizando sales caotrópicas. Por sales caotrópicas se entiende en el sentido de la invención sales que tienen una elevada afinidad por el agua y, por lo tanto, configuran una gran envoltura de hidrato; sales caotrópicas adecuadas son conocidas en gran número del estado de la técnica.

50 De acuerdo con la invención, se emplean preferiblemente disoluciones con contenido en urea, con contenido en *iso*-tiocianato de guanidinio o con contenido en hidrocloreuro de guanidinio, individualmente o en combinación, siendo estas últimas particularmente preferidas.

En particular, se emplean preferiblemente disoluciones a base de hidrocloreuro de guanidinio 0,5 a 7,0 M para la resolución de los problemas de acuerdo con la invención.

De manera particularmente preferida se emplean disoluciones a base de hidrocloreuro de guanidinio 2,0 a 4,0 M.

Disoluciones de desnaturalización de este tipo pueden contener, eventualmente, otras sustancias - tales como, p. ej., formadores de complejos o sustancias tampón - . El valor del pH del tampón de desnaturalización puede variar a lo largo de un amplio intervalo para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención; se encuentra preferiblemente en un intervalo de pH de 3 a 10 y de manera particularmente preferida en un intervalo de pH de 7,5 a 9,5. En este caso, pueden utilizarse los sistemas tampón para el ajuste del valor del pH conocidos por el experto en la materia. De acuerdo con la invención, se utilizan sistemas tampón basados en tris(hidroximetil)aminometano. Se prefiere particularmente un sistema tampón a base de hidrocloreuro de tris(hidroximetil)aminometano 0,5 a 250 mM.

- 5
- 10 De manera muy particularmente preferida, pasa a utilizarse un tampón de desnaturalización con hidrocloreuro de guanidinio 3 M e hidrocloreuro de tris(hidroximetil)aminometano 50 mM, pH 8,5.

Para sustentar el efecto desnaturalizante del tampón de desnaturalización, la muestra puede ser eventualmente calentada. En este caso, la temperatura de reacción de esta etapa opcional del procedimiento de acuerdo con la invención se encuentra en un intervalo de 15 a 95°C, preferiblemente en un intervalo de 30 a 85°C y de manera particularmente preferida esta etapa se lleva a cabo a una temperatura de 65°C.

- 15
- Para la separación ulterior del ADN de impurezas, la muestra puede ser tratada eventualmente con enzimas. Para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención son adecuadas proteasas, lipasas, amilasas y otras enzimas degradantes o sus mezclas conocidas por el experto en la materia.

- 20
- Para la precipitación del ADN se adecuan para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención alcoholes conocidos de manera correspondiente del estado de la técnica tales como alcanoles C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> ramificados o no ramificados. Se manifiestan particularmente adecuados propan-2-ol (*iso*-propanol) y etanol.

Como líquido de lavado se emplea en particular una mezcla a base de un alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> ramificado o no ramificado con agua, prefiriéndose entre ellas particularmente disoluciones acuosas de etanol. Se prefiere particularmente una disolución al 70 por ciento en vol. de etanol en agua.

- 25
- Como "disoluciones bajas en sal" para la resuspensión de los precipitados de ADN se adecuan todos los líquidos que son capaces de disolver el ADN. Disoluciones o tampones adecuados son conocidos en gran número asimismo del estado de la técnica.

De acuerdo con la invención, se prefieren disoluciones bajas en sal (disoluciones con escaso poder iónico), entre las cuales, de acuerdo con la invención, cae también el agua.

- 30
- Disoluciones de este tipo pueden contener eventualmente otras sustancias - tales como, p. ej., formadores de complejos o sustancias tampón - . El valor del pH del tampón puede variar a lo largo de un amplio intervalo y se encuentra preferiblemente en un intervalo de pH 6 a 10 y de manera particularmente preferida en un intervalo de pH de 7,5 a 9,5. En este caso, pueden utilizarse los sistemas tampón para el ajuste del valor del pH conocidos por el experto en la materia. De acuerdo con la invención, se utilizan preferiblemente sistemas tampón basados en tris(hidroximetil)aminometano. Se prefiere de manera particular un sistema tampón a base de hidrocloreuro de tris(hidroximetil)aminometano 0,5 a 150 mM.

- 35
- De manera muy particularmente preferida, como tampón de hidrogenación pasa a emplearse una disolución con hidrocloreuro de tris(hidroximetil)aminometano 10 mM, pH 8,5.

Explicación de los dibujos:

- 40
- La Fig. 1 muestra el análisis electroforético de un ADN aislado a partir de sangre entera humana de acuerdo con el Ejemplo 1.

La Fig. 2 muestra el análisis electroforético de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el objetivo de la amplificación de un gen de copia única (análogo humano del gen de larva gigante).

La Fig. 3 muestra el análisis electroforético de un ADN aislado conforme al Ejemplo 3 a partir de un cultivo celular.

- 45
- Los siguientes ejemplos han de demostrar la presente invención:

### **Ejemplo 1**

#### **Aislamiento de ADN a partir de sangre entera humana**

- 50
- Se pipetea sangre entera humana en un recipiente de reacción que contiene 2,5 volúmenes de tampón de lisis (Tris-Cl 13 mM; KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O 14,5 mM; EDTA 2 mM; Triton X-100 al 2,0%; pH 8). Después de la inversión durante 5 veces, el lisado se separa por centrifugación, con lo cual se sedimentan los componentes celulares con contenido en ADN tales como núcleos de la célula y mitocondrias. El sobrenadante se desecha. A continuación, el

5 sedimento se homogeneiza en tampón de desnaturalización (HCl de guanidinio 3 M; Tris-Cl 50 mM pH 8,5) mediante vórtices o pipeteado. Las proteínas se separan en una incubación durante 10 min a 65°C a través de proteasa de QIAGEN. A partir de esta disolución, el ADN se precipita mediante la adición de 1 volumen de isopropanol y se sedimenta mediante centrifugación. Después de la decantación del sobrenadante, el sedimento de ADN se lava con etanol al 70%, se separa de nuevo por centrifugación, el sobrenadante se separa por completo, el ADN se seca y se resuspende en un tampón bajo en sales o en agua.

La siguiente Tabla 1 muestra los resultados a partir de 6 purificaciones de ADN llevadas a cabo en paralelo en cada caso a partir de 3 ml de sangre entera humana que fue anticoagulada con EDTA potásico:

Tabla 1:

Prep. N°	Rendimiento [µg]	A260/A280
1	62	1,84
2	76	1,92
3	67	1,94
4	68	1,93
5	66	1,92
6	58	1,95

10 El rendimiento medio de las 6 extracciones asciende a 66 µg, esto corresponde a 98% del rendimiento esperado del recuento de células de leucocitos. El coeficiente de variación asciende a 8%.

En la Fig. 1 se incorporan en cada caso 2 µl de las disoluciones de ADN obtenidas en un gel de agarosa al 0,8%.

15 La Fig. 2 muestra el análisis electroforético de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el objetivo de la amplificación de un gen de copia única (análogo humano del gen de larva gigante) utilizando el ADN genómico purificado como matriz. El ensayo demuestra que las seis extracciones proporcionan ADN puro que puede ser amplificado sin problemas.

## Ejemplo 2

### Aislamiento de ADN a partir de capa leucoplaquetaria

20 La purificación del ADN a partir de capa leucoplaquetaria tiene lugar según el mismo protocolo que el descrito en el Ejemplo 1 para la sangre entera. A diferencia del protocolo de sangre entera, se ...

La Tabla 2 muestra los resultados de 3x6 purificaciones llevadas a cabo paralelamente con cantidades crecientes (200; 300; 500 µl) de capa leucoplaquetaria:

Tabla 2:

Vol. placa leucoplaquetaria	Prep. N°	Rendimiento [µg]	A260/A280	Valor medio Rendimiento [µg]	Coef. var. [%]
	1	47	1,80		
	2	52	1,82		
200 µl	3	50	1,80		
	4	51	1,83		
	5	53	1,81		
	6	49	1,83	50	4
	7	74	1,83		
	8	75	1,84		

300 µl	9	71	1,85		
	10	75	1,84		
	11	73	1,83		
	12	70	1,85	73	3
	13	125	1,83		
	14	111	1,85		
500 µl	15	118	1,84		
	16	122	1,83		
	17	118	1,84		
	18	122	1,86	119	4

El ensayo demuestra que el rendimiento asciende linealmente hacia el volumen de partida de la capa leucoplaquetaria.

**Ejemplo 3**

5 **Aislamiento de ADN a partir de células de cultivo celular**

La purificación del ADN a partir de células del cultivo celular (línea celular HeLa) tiene lugar según el mismo protocolo que el descrito en el Ejemplo 1 para la sangre entera.

La Tabla 3 muestra los resultados de 8 purificaciones de ADN llevadas a cabo de forma paralela a partir de en cada caso  $1 \times 10^6$  células por cada 200 µl de PBS:

10 Tabla 3:

Prep. N°	Rendimiento [µg]	A260/A280
1	21	1,91
2	20	1,91
3	20	1,92
4	21	1,93
5	19	1,94
6	19	1,94
7	18	1,93
8	19	1,95

El rendimiento medio de las 8 extracciones asciende a 20 µg. El coeficiente de variación asciende a 6%. En la Fig. 3 se aplicaron en cada caso 15 µl de las disoluciones de ADN obtenidas sobre un gel de agarosa al 0,8%.

**Ejemplo 4**

15 **Aislamiento de ADN a partir de sangre entera humana con diferentes variantes del protocolo**

La purificación del ADN tiene lugar tal como se describe en el Ejemplo 1. En una variante del protocolo se renuncia a la adición de la proteasa de QIAGEN. En una segunda variante del protocolo tampoco se añade asimismo una proteasa de QIAGEN y, además de ello, se renuncia a la incubación a 65°C. Todas las otras etapas de las 3 variantes son idénticas.

La Tabla 4 recopila los resultados de este ensayo.

Tabla 4:

**+Proteasa/+65°C**

Volumen de sangre	Rend. [%]	Rend. CV [%]	260/280	220/260	PCR hugl [%]
≤ 500 µl	104	3	1,84	0,79	93
≤ 3 ml	93	10	1,87	0,73	98
≤ 10 ml	94	8	1,85	0,71	98
Valor medio	97	7	1,85	0,75	97

5 **-Proteasa/+65°C**

Volumen de sangre	Rend. [%]	Rend. CV [%]	260/280	220/260	PCR hugl [%]
≤ 500 µl	94	5	1,84	0,78	98
≤ 3 ml	86	12	1,86	0,75	94
≤ 10 ml	84	11	1,86	0,75	95
Valor medio	88	9	1,85	0,76	96

**-Proteasa/-65°C**

Volumen de sangre	Rend. [%]	Rend. CV [%]	260/280	220/260	PCR hugl [%]
≤ 500 µl	94	7	1,85	0,83	90
≤ 3 ml	74	14	1,78	0,90	100
≤ 10 ml	85	10	1,85	0,78	100
Valor medio	84	10	1,83	0,84	97

Las tres variantes del protocolo proporcionan ADN de pureza y capacidad de amplificación equiparables.

10 **Ejemplo 5**

**Uso de reactivos de lisis con diferentes sales:**

A partir de sangre entera humana se purifica ADN genómico conforme al Ejemplo 1. Para la lisis de la sangre se emplean tampones de lisis con diferentes sales. La siguiente Tabla recopila las alternativas de tampones de lisis utilizados con los correspondientes rendimientos relativos:

15 Tabla 5:

Tampón	Rendimiento [%]
Tris-Cl 13 mM; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 14,5 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%; pH 8	100
Tris-Cl 20 mM; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 5/10 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%	105/96
Tris-Cl 20 mM; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 14,5 mM; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10/20/50 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%	108/103/103
Tris-Cl 20 mM; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 15 mM; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 150/200/250 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%	102/93/97



Tris-Cl 20 mM; KCl 10 mM; ZnCl <sub>2</sub> 1/2,5 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%	108/88
Tris-Cl 20 mM; KCl 10 mM; ZnCl <sub>2</sub> 1/2,5/3/4/5 mM; MgCl <sub>2</sub> 5 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%	91/94/96/100/99
Tris-Cl 20 mM; KCl 10 mM; CaCl <sub>2</sub> 15 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%	111
Tris-Cl 20 mM; KCl 10 mM; CaCl <sub>2</sub> 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 2 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%	104

### Ejemplo 6

#### Uso de reactivos de lisis con diferentes sustancias tampón/valores del pH:

- 5 A partir de sangre entera humana se purifica ADN genómico conforme al Ejemplo 1. Para la lisis de la sangre se emplean tampones de lisis con diferentes sustancias tampón/valores del pH. La siguiente tabla recopila las alternativas de tampones de lisis utilizados con los correspondientes rendimientos relativos:

Tabla 6:

Tampón	Rendimiento [%]
Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 14,5 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%; pH 8	100
Acetato de Na 50/100 mM pH 4,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 15 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%	107/110
Glicina-HCl 50/100 mM pH 3,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 15 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%	99/106
Lisina-HCl 50/100/160 mM pH 3,0/3,3/3,4; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 15 mM; EGTA 4 mM; Triton-X-100 al 2%	103/107/124
Lisina-HCl 50/100/160 mM pH 3,3/3,5/3,7; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 15 mM; EGTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%	109/101/100
Lisina-HCl 50/100/160 mM pH 4,3/4,7/4,6; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 15 mM; Triton-X-100 al 2%	109/116/113
Ornitina-HCl 50 mM pH 3,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 14,5 mM; EGTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%	111

### Ejemplo 7

- 10 **Uso de reactivos de lisis con diferentes formadores de complejos:**

A partir de sangre entera humana se purifica ADN genómico conforme al Ejemplo 1. Para la lisis de la sangre se emplean tampones de lisis con diferentes formadores de complejos. La siguiente Tabla recopila las alternativas de tampones de lisis utilizados con los correspondientes rendimientos relativos (EGTA = ácido etilendioxo-bis-(etileno-nitrilo)-tetra-acético; DTPA = ácido dietilentriamina-penta-acético):

- 15 Tabla 7:

Tampón	Rendimiento [%]
Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 14,5 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%	100
Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 14,5 mM; EDTA 3/5/4,5/5 mM; Triton-X-100 al 2%	97/113/101/103
Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 14,5 mM; EGTA 1 mM; Triton-X-100 al 2%	124
Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 14,5 mM; EDTA 2 mM; EGTA 1 mM; Triton-X-100 al 2%	106
Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 14,5 mM; DTPA 1/2 mM; Triton-X-100 al 2%	101/99
Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 14,5 mM; DTPA 1/2 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%	95/102

Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 14,5 mM; Na <sub>5</sub> P <sub>3</sub> O <sub>10</sub> 1/2 mM; Triton-X-100 al 2%	79/197
Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 14,5 mM; Na <sub>5</sub> P <sub>3</sub> O <sub>10</sub> 1/2 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 2%	95/92
Tris-Cl 20 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 15 mM; EGTA 1/2 mM; Triton-X-100 al 1%	110/102
Tris-Cl 20 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 15 mM; EGTA 2/4 mM; Triton-X-100 al 2%	111/140

### Ejemplo 8

#### Uso de reactivos de lisis con diferentes concentraciones de detergentes:

5 A partir de sangre entera humana se purifica ADN genómico conforme al Ejemplo 1. Para la lisis de la sangre se emplean tampones de lisis con diferentes concentraciones de detergentes. La siguiente Tabla recopila las alternativas de tampones de lisis utilizados con los correspondientes rendimientos relativos:

Tabla 8:

Tampón	Rendimiento [%]
Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl <sub>2</sub> 14,5 mM; EDTA 2 mM; Triton-X-100 al 1/2/2,5/3/4%	103/100/103/102/98

### Ejemplo 9

#### 10 Uso de disoluciones salinas para la resuspensión del material con contenido en ADN con diferentes sustancias tampón/valores del pH:

15 A partir de sangre entera humana se purifica ADN genómico conforme al Ejemplo 1. Como reactivo de lisis se emplea Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 14,5 mM; EGTA 1 mM; Triton X-100 al 2%. Para la resuspensión del material con contenido en ADN se emplean disoluciones de sales con diferentes sustancias tampón/valores del pH. La siguiente Tabla recopila las alternativas de tampones de lisis utilizados con los correspondientes rendimientos relativos:

Tabla 9:

Tampón	Rendimiento [%]
Hidrocloreuro de guanidinio 3 M; Tris-Cl 50 mM pH 8,5	100
Hidrocloreuro de guanidinio 3 M; CaCl <sub>2</sub> 5 mM; Tris-Cl 50 mM pH 8,5	118
Hidrocloreuro de guanidinio 3 M; CaCl <sub>2</sub> 5 mM; Tris-Cl 50 mM pH 9,5	129
Hidrocloreuro de guanidinio 3 M; glicina-NaOH 50 mM pH 10,0	124
Hidrocloreuro de guanidinio 3 M; CaCl <sub>2</sub> 5 mM; glicina-NaOH 50 mM pH 10,0	124

### Ejemplo 10

#### 20 Uso de disoluciones salinas para la resuspensión del material con contenido en ADN con diferentes sales caotrópicas:

25 A partir de sangre entera humana se purifica ADN genómico conforme al Ejemplo 1. Como reactivo de lisis se emplea Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 14,5 mM; EGTA 1 mM; Triton X-100 al 2%. Para la resuspensión del material con contenido en ADN se emplean disoluciones de sales con diferentes caótopos. La siguiente Tabla recopila las alternativas utilizadas con los correspondientes rendimientos relativos:

Tabla 10:

Tampón	Rendimiento [%]
Hidrocloreuro de guanidinio 3 M; Tris-Cl 50 mM pH 8,5	100
Hidrocloreuro de guanidinio 3 M; urea 0,1 M; Tris-Cl 50 mM pH 8,5	100
Hidrocloreuro de guanidinio 2,5 M; urea 0,5 M; Tris-Cl 50 mM pH 8,5	98
Hidrocloreuro de guanidinio 2 M; urea 1 M; Tris-Cl 50 mM pH 8,5	94
Hidrocloreuro de guanidinio 1,5 M; urea 1,5 M; Tris-Cl 50 mM pH 8,5	101
Urea 1,5 M; Tris-Cl 50 mM pH 8,5	86

**Ejemplo 11****Diferentes temperaturas durante la incubación de la proteasa**

- 5 A partir de sangre entera humana se purifica ADN genómico conforme al Ejemplo 1. Como reactivo de lisis se emplea Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 14,5 mM; EGTA 1 mM; Triton X-100 al 2%. La incubación con proteasa tuvo lugar durante 5 o bien 10 min a diferentes temperaturas. La siguiente Tabla recopila los resultados:

Tabla 11:

Incubación	Rendimiento [%]
5 min 65°C	100
10 min 65°C	99
5 min 75°C	95
10 min 75°C	85
5 min 85°C	84
10 min 85°C	70

**10 Ejemplo 12****Incubación de lipasa**

- 15 A partir de sangre entera humana se purifica ADN genómico conforme al Ejemplo 1. Como reactivo de lisis se emplea a) Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 14,5 mM; EDTA 2 mM; EGTA 1 mM; Triton X-100 al 2% o bien b) Tris-Cl 13 mM pH 8,0; KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 14,5 mM; EDTA 2 mM; Triton X-100 al 2%. Se comparan variantes con y sin incubación de lipasa (5 min 60°C) antes de la incubación de la proteasa:

Tabla 12:

Incubación	Rendimiento [%]
a) -lipasa	100
a) +lipasa	93
b) -lipasa	100
b) +lipasa	91

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el aislamiento de ADN, en el que una muestra biológica se mezcla con un reactivo de lisis que contiene sales de cationes monovalentes, sales de cationes bivalentes, uno o varios formadores de complejos elegidos de tetraacetato de etilendiamina, ácido etilendioxi-bis-(etilen-nitrilo)tetraacético, DTPA y  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  y polietoxilato de octilfenol, después se separan los componentes celulares con contenido en ADN de los restantes componentes celulares, el material celular con contenido en ADN se resuspende en una disolución salina, conteniendo la disolución salina al menos una sal caotrópica, eventualmente componentes contaminantes se separan mediante un tratamiento químico, térmico y/o enzimático, el ADN se precipita, lava, seca y eventualmente se resuspende en una disolución baja en sales, llevándose a cabo el aislamiento en un recipiente de reacción.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el reactivo de lisis contiene 0,5 a 7,5% en vol., preferiblemente 1,0 a 5,0% en vol. de detergente.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que el reactivo de lisis puede contener cloruro de magnesio 0,5 a 200 mM y/o cloruro de potasio 0,5 a 200 mM y/o tetraacetato de etilendiamina 0,5 a 100 mM y/o ácido etilendioxi-bis-(etilen-nitrilo)tetraacético 0,5 a 100 mM, y de manera particularmente preferida cloruro de magnesio 1 a 30 mM y/o cloruro de potasio 1 a 20 mM y/o tetraacetato de etilendiamina 1 a 10 mM y/o ácido etilendioxi-bis-(etilen-nitrilo)tetraacético 1 a 10 mM.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el reactivo de lisis puede contener, además, una o varias sustancias tampón.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que como sistema tampón se puede emplear hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano, acetato de sodio, hidrocloreto de glicina, hidrocloreto de lisina o hidrocloreto de ornitina, preferiblemente en una concentración de 0,5 a 250 mM.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 o 5, caracterizado por que el valor del pH del tampón de lisis se encuentra en un intervalo de 2 a 10 y preferiblemente en un intervalo de 3 a 9.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1, 4, 5 o 6, caracterizado por que el tampón de lisis contiene hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano 13 mM, pH 8,0, cloruro de magnesio(II) hexahidrato 10 a 14,5 mM, cloruro de potasio 10 mM, tetraacetato de etilendiamina 2 a 5 mM y/o ácido etilendioxi-bis(etilen-nitrilo)tetraacético 1 a 2 mM, así como polietoxilato de octilfenol al 2% en vol. en disolución acuosa.
8. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la disolución salina para la resuspensión del material con contenido en ADN contiene urea, *iso*-tiocianato de guanidinio o hidrocloreto de guanidinio o una mezcla de estas sales.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que la disolución salina para la resuspensión del material con contenido en ADN es una disolución acuosa de hidrocloreto de guanidinio 0,5 a 7,0 M, que eventualmente puede contener como otros coadyuvantes sustancias tampón, detergentes o formadores de complejos.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por que la disolución salina para la resuspensión del material con contenido en ADN es una solución acuosa de hidrocloreto de guanidinio 2,0 a 4,0 M, que eventualmente puede contener otros coadyuvantes tales como sustancias tampón, detergentes o formadores de complejos.
11. Procedimiento según la reivindicación 9 o 10, caracterizado por que la disolución salina contiene un sistema tampón basado en tris(hidroximetil)aminometano o en glicina-hidróxido de sodio, preferiblemente en una concentración de 0,5 a 250 mM.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 10 a 11, caracterizado por que el valor del pH de la disolución salina tamponada se encuentra en un intervalo de 3 a 10, preferiblemente en un intervalo de 7,5 a 9,5.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 10 a 12, caracterizado por que la disolución salina tamponada para la resuspensión del material con contenido en ADN se compone esencialmente de una disolución acuosa de hidrocloreto de guanidinio 3 M e hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano 50 mM, pH 8,5.
14. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que para la separación de contaminaciones la muestra se calienta preferiblemente a una temperatura en un intervalo de 15 a 95°C y de manera particularmente preferida a una temperatura en un intervalo de 30 a 85°C.
15. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que para la degradación de impurezas se emplean enzimas, preferiblemente enzimas del grupo de las proteasas, lipasas, amilasas o mezclas de enzimas.
16. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el ácido nucleico se precipita mediante la adición de un alcohol  $\text{C}_1\text{-C}_4$  ramificado o no ramificado, preferiblemente propan-2-ol (*iso*-propanol) o de mezclas de estos

alcoholes.

17. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que como líquido de lavado se emplea una mezcla a base de un alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> ramificado o no ramificado y agua, preferiblemente una mezcla a base de una disolución de etanol en agua y de manera particularmente preferida una disolución al 70 por ciento en vol. de etanol en agua.
- 5 18. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que como disolución baja en sales se emplea un disolvente o una disolución salina en la que se disuelve el ADN.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, caracterizado por que como disolvente se emplea agua.
20. Procedimiento según la reivindicación 18 o 19, caracterizado por que la disolución baja en sales o el disolvente de las otras sustancias tampón contiene preferiblemente un tampón basado en tris(hidroximetil)aminometano y de  
10 manera particularmente preferida hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano hasta 150 mM y/o eventualmente formadores de complejos.
21. Procedimiento según la reivindicación 20, caracterizado por que el valor del pH del tampón bajo en sales se encuentra en un intervalo de 6 a 10 y preferiblemente en un intervalo de 7,5 a 9,5.
- 15 22. Procedimiento según la reivindicación 21, caracterizado por que como disolución baja en sales se utiliza una disolución acuosa a base de hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano 10 mM con un valor del pH de 8,5.
23. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 22, caracterizado por que como muestra biológica se emplea sangre entera humana.
24. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 22, caracterizado por que como muestra biológica se emplea capa leucoplaquetaria.
- 20 25. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 22, caracterizado por que como muestra biológica se emplea un cultivo celular.
26. Kit que contiene reactivos, también en forma concentrada, para la mezcladura final en el usuario que contiene las siguientes soluciones acuosas:
- 25 a) polietoxilato de octilfenol, así como sales de cationes monovalentes, sales de cationes bivalentes y uno o varios formadores de complejos elegidos de tetraacetato de etilendiamina, ácido etilendioxi-bis-(etilen-nitrilo)tetraacético, DTPA y Na<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub>, preferiblemente 0,5 a 200 mM de cloruro de potasio(II) y/o 0,5 a 200 mM de cloruro de potasio y/o 0,5 a 100 mM de tetraacetato de etilendiamina y/o 0,5 a 100 mM de ácido etilendioxi-bis-(etilen-nitrilo)tetraacético y particularmente preferiblemente 1 a 30 mM de cloruro de magnesio y/o 1 a 20 mM de cloruro de potasio y/o 1 a 10  
30 mM de tetraacetato de etilendiamina y/o 1 a 10 mM de ácido etilendioxi-bis-(etilen-nitrilo)tetraacético, y cuando sea apropiado un sistema tampón a base hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano, acetato de sodio, hidrocloreto de glicina, hidrocloreto de lisina o hidrocloreto de ornitina, preferiblemente en una concentración de 0,5 a 250 mM;
- b) una disolución salina para la resuspensión del material con contenido en ADN que contiene al menos una sal caotrópica, preferiblemente urea, *iso*-tiocianato de guanidinio o hidrocloreto de guanidinio o una mezcla de estas dos sales;
- 35 c) eventualmente enzimas para la degradación de impurezas, preferiblemente enzimas del grupo de las proteasas, lipasas, amilasas o mezclas de enzimas;
- d) un alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> ramificado o no ramificado, preferiblemente propan-2-ol (*iso*-propanol) o mezclas de estos alcoholes para la precipitación de los ácidos nucleicos;
- 40 e) eventualmente un líquido de lavado que se compone de una mezcla a base de un alcohol C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> ramificado o no ramificado y agua, preferiblemente una mezcla a base de una disolución de etanol en agua y de manera particularmente preferida una disolución al 70 por ciento en vol. de etanol en agua.
- f) una solución de bajo contenido en sales o un disolvente en el que los ácidos nucleicos se disuelven, y eventualmente tampones que están basados preferiblemente en tris(hidroximetil)aminometano y de manera particularmente preferida hasta 150 mM de hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano y/o eventualmente  
45 formadores de complejos.

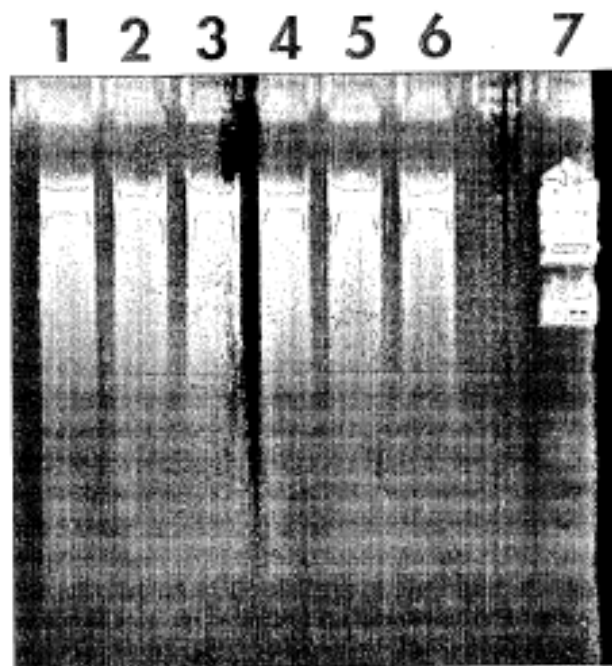


Fig 1

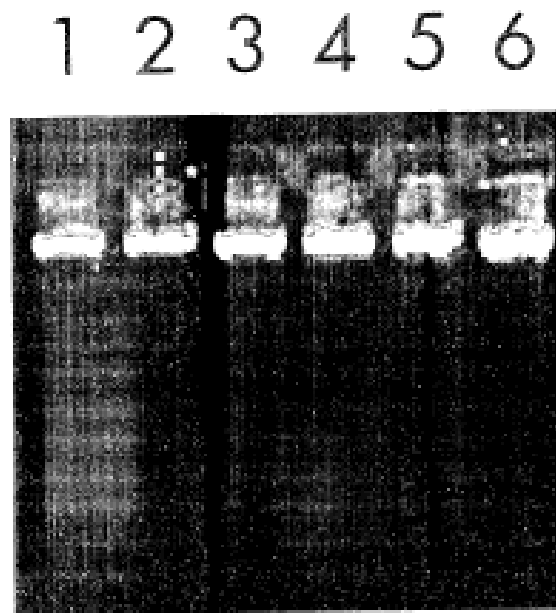


Fig.2

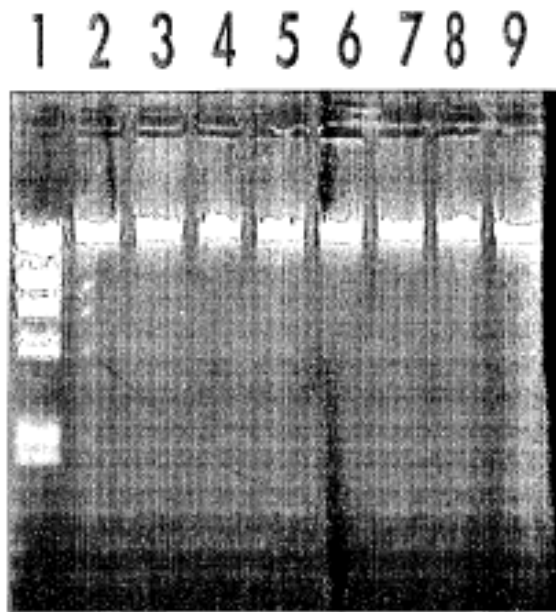


Fig.3