

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 012**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2011 PCT/SE2011/050848**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO12002887**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2011 E 11801242 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2588609**

54 Título: **Procedimiento y kit para el aislamiento secuencial de especies nucleotídicas de una muestra**

30 Prioridad:

**22.11.2010 SE 1100480**  
**29.06.2010 SE 1000701**

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

**24.04.2018**

73 Titular/es:

**EXSCALE BIOSPECIMEN SOLUTIONS AB**  
**(100.0%)**  
**Dag Hammarskjölds väg 26**  
**752 37 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

**SJÖBLOM, TOBIAS y**  
**MATHOT, LUCY**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 665 012 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 y kit para el aislamiento secuencial de especies nucleotídicas de una muestra

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere al campo de la genética molecular. Particularmente, la presente invención se refiere a una única solución y a procedimientos de uso de la misma para separar y purificar materiales biológicos. Más particularmente, la presente invención se refiere a una purificación en serie de ADN y ARN a partir de la misma muestra, en que se usan dos materiales silíceos con diferente selectividad de unión a ADN y ARN para unirse al ADN o ARN diana. La presente invención proporciona ADN y ARN altamente purificados que pueden usarse ampliamente, especialmente en investigación médica y biológica, atención sanitaria e industrias farmacéuticas.

**Antecedentes**

Un procedimiento para separar y/o preparar sustancias diana altamente purificadas a partir de diferentes biomateriales es difícil, debido a que los biomateriales naturales, tales como tejidos, células, sangre y bacterias, son mezclas complejas. Sin embargo, el aislamiento y purificación de sustancias diana a partir de tales biomateriales son a menudo necesarios en diagnóstico, investigación biomédica y/u otras aplicaciones. Por ejemplo, en estado natural, los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) y ácidos ribonucleicos (ARN) están a menudo mezclados con otras sustancias tales como proteínas, lípidos y carbohidratos; aislar y purificar estas moléculas de ADN y ARN que contienen un gen diana o un transcrito de gen diana, respectivamente, es a menudo necesario para investigar el gen.

Con los rápidos avances de la biología molecular y otros campos relacionados, existe la necesidad de un nuevo procedimiento para el aislamiento y purificación consecutivos de ADN y ARN a partir de la misma muestra que sea seguro, efectivo y adecuado para automatización e industrialización. Se ha reseñado que ciertos materiales que contienen silicio pueden absorber sustancias diana en presencia de agentes de unión o potenciadores de unión. Las sustancias diana pueden purificarse entonces eluyéndose del vehículo de silicio después de eliminar las impurezas. La pat. de EE.UU. n° 6.218.531 divulga un procedimiento para aislar ARN a partir de biomateriales lisados con un vehículo de unión de silicio en presencia de reactivos caotrópicos.

El mecanismo subyacente para estos procedimientos de aislamiento y purificación de ácido nucleico es que los materiales que contienen silicio pueden unirse reversiblemente a ADN, ARN y moléculas híbridas de ADN y ARN en presencia de reactivos de unión. Algunos reactivos de unión caotrópicos comunes incluyen NaI, urea, clorhidrato de guanidina, NaClO<sub>4</sub> y KBr. El alcohol, tal como etanol al 100 %, es también un reactivo de unión usado comúnmente para purificación de ácido nucleico (véanse los antecedentes de la sol. de pat. de n°0512676 A1 y la pat. de EE.UU. n° 5.783.686).

Los procedimientos de purificación de ácidos nucleicos usando matrices silíceas implican frecuentemente lavados del soporte con ácidos nucleicos unidos en soluciones que contienen alcohol para retirar impurezas. Preferiblemente, un proceso sencillo y robusto para la purificación de ácido nucleico está basado en matrices donde pueden lavarse los ácidos nucleicos con soluciones que no contienen alcohol. En la pat. de EE.UU. n° 6.355.792, se divulga un procedimiento para aislar y purificar ácidos nucleicos que comprende un vehículo sólido que expone grupos hidroxilo, donde los ácidos nucleicos se unen al material de vehículo en una solución que contiene agentes caotrópicos en el intervalo de pH ácido y se eluyen en el intervalo de pH alcalino.

La unión de moléculas de ARN pequeñas, tales como miARN, sobre materiales silíceos puede potenciarse mediante la adición de acetona o acetonitrilo al tampón de lisis (sol. de pat. de EE.UU. n° 2009/0143570).

Se han ideado procedimientos para la purificación secuencial de ADN y ARN a partir de la misma muestra. Por ejemplo, el documento WO2004/108925 divulga un procedimiento basado en las diferentes afinidades de ARN y ADN por una matriz silícea bajo diferentes concentraciones de etanol en el tampón de unión.

La recuperación de ARN de mezclas complejas con matrices de silicio puede afectarse adversamente a través de la competición por la unión del ADN presente en tales mezclas. Para aliviar estos problemas, se ha sabido usar una matriz para la retirada selectiva de ADN antes de la unión de ARN para potenciar la unión del segundo.

Debería advertirse que, al usar materiales silíceos como materiales absorbentes reversibles para ácidos nucleicos, el uso de alcoholes en tampones de lavado puede dar como resultado la contaminación con alcohol del producto final eluido. Tal contaminación puede ser perjudicial para el desempeño del producto final en procesos posteriores.

Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un proceso nuevo y efectivo para la recuperación de diferentes especies de ácido nucleico a partir de la misma muestra y donde puedan retirarse las impurezas lavando con tampón acuoso sin alcoholes, y que el proceso sea susceptible de automatización.

5

## Resumen

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de aislamiento secuencial de diferentes especies de ácido nucleico, tales como ADN o y ARN, a partir de una muestra biológica. El procedimiento comprende las etapas de:

- en una primera etapa de unión, unión selectiva de una primera especie de ácido nucleico a una primera fase sólida poniendo en contacto la muestra biológica con la primera fase sólida que se une selectivamente a la primera especie de ácido nucleico;
- 15 • separación de la primera fase sólida con la primera especie de ácido nucleico unida de la porción no unida de la muestra biológica;
- en una segunda etapa de unión, unión selectiva de una segunda especie de ácido nucleico a una segunda fase sólida, diferente de la primera fase sólida, poniendo en contacto la porción no unida de la muestra biológica con la segunda fase sólida que se une a la primera y segunda especies de ácido nucleico;
- 20 • digestión enzimática de la primera especie de ácido nucleico unida a la segunda fase sólida; y

aislamiento de la segunda especie de ácido nucleico de la segunda fase sólida.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un kit que comprende un tampón combinado de lisis y unión de ácido nucleico, una primera fase sólida que se une selectivamente a ADN en el tampón de unión de ácido nucleico, una segunda fase sólida que es diferente de la primera fase sólida y se une a ARN y ADN en el tampón de unión de ácido nucleico, un tampón de lavado para digestión de ADN y un tampón de elución. El kit puede comprender también una sustancia para potenciar la unión de ARN a la segunda fase sólida.

## 30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es un diagrama de flujo de un procedimiento de acuerdo con la presente invención para aislamiento en serie de ADN y ARN, donde: (S1) se homogeneiza y se lisa el material biológico; (S2) se incuban las partículas magnéticas que se unen preferentemente a ADN en lugar de ARN; (S3) se separan las partículas magnéticas con ADN unido del sobrenadante que contiene ARN; (S5) se lavan las perlas magnéticas para retirar impurezas; (S6) se eluye el ADN unido; (S4) se incuban las partículas magnéticas que se unen a ARN con el lisado resultante después de la recuperación de ADN; (S7) se separan las partículas magnéticas con ARN unido del sobrenadante; (S8) se lavan las partículas magnéticas con ARN unido para retirar impurezas y (S9) se eluye el ARN. Tampón de lisis (LB): HCl de guanidina 7 M, Tris 50 mM pH 7, proteinasa K 0,95 mg/ml, 2 % de Tween 20; tampón de lavado (WB): Tris-HCl 10 mM, pH 6,5; tampón de elución (EB): Tris-HCl 10 mM, pH 8,6, EDTA 1 mM).

La FIG. 2 presenta los datos para apoyar la recuperación de ADN genómico de alta calidad a partir de muestras de tejido congeladas usando partículas de sílice magnéticas MagPrep HS. **A.** Se cuantificó la recuperación de ADN de lisados de  $3 \times 10^6$   $\mu$ M de bazo congelado embebido en OCT empleando diferentes perlas de sílice mediante espectrofotometría (barras blancas) y amplificación por PCR instantánea de los elementos LINE1 (barras negras). Media y DE de 3 experimentos diferentes. **B.** Longitud de fragmento del ADN extraído de cáncer de mama, de colon, bazo y amígdala usando partículas MagPrep HS. **C.** Amplificación por PCR de exones de *PRPS1* que codifican proteína. Se amplificaron los 7 exones que codifican proteína de *PRPS1* por PCR en ADN genómico obtenido de tejido de colon mediante extracción con fenol-cloroformo (P), y en ADN genómico obtenido a partir de colon usando partículas MagPrep HS (M). **D.** Señales de secuenciación capilar del exón 7 de *PRPS1* en ADN genómico obtenido a partir de colon usando partículas MagPrep HS.

La FIG. 3 presenta los datos para apoyar la recuperación de ARN total de alta calidad a partir de lisados de tejido después de recuperación de ADN. **A.** Rendimientos de ARN total después de la unión de ARN total de tejido de amígdala congelado a perlas síliceas de diferentes tipos, seguido de lavado y elución. Media y DE de 3 experimentos. **B.** Separación electroforética de las muestras de ARN total extraído de cáncer de mama, de colon, médula ósea y amígdala. **C.** Amplificación por PCR acoplada a transcripción inversa de *ACTB* en ARN purificado en serie a partir de lisados de cáncer de mama, de colon, sedimentos celulares de médula ósea congelados y amígdala. NTC, control sin molde; -RT, sin transcriptasa inversa; +RT, control positivo.

60

La FIG. 4 ilustra que el ADN extraído mediante el procedimiento descrito puede compararse con la integridad del ADN extraído mediante extracción estándar con fenol/cloroformo. También el procedimiento describe resultados de elución de ADN sin contaminación con ARN. **A.** Dimensionamiento electroforético del ADN<sub>g</sub> de colon extraído mediante el protocolo de fenol-cloroformo (PC) o extraído mediante el protocolo esquematizado en la Fig. 1 (MP); **B.**

5 Amplificación sin RT PCR de *ACTB* usando ADN extraído de cáncer de mama, de colon, bazo y amígdala, es decir, sin contaminación de ARN en el ADN extraído.

La FIG. 5 ilustra que el ADN<sub>g</sub> no contiene fragmentos cortos de entre 50 pb y 17 kpb (marcadores) como se ilustra por el dimensionamiento de ADN en un Agilent Bioanalyzer. **A.** ADN de tejido de cáncer de mama, **B.** ADN de tejido de colon, **C.** ADN de tejido de bazo, **D.** ADN de tejido de amígdala.

La FIG. 6 apoya la reivindicación de que la extracción de ARN, como se describe en el Ejemplo 2, no afecta a la integridad de la muestra, como se muestra por la separación electroforética en un gel de ARN de Agilent Bioanalyzer. **A.** Entrada de ARN (RIN= 7,1), **B.** Eluido de ARN (RIN= 8,7).

15 La FIG. 7 presenta una gráfica para apoyar la reivindicación de que la recuperación previa de ADN facilita la recuperación de ARN. Se ilustra la recuperación de ARN porcentual por MagPrep Basic Silica solo mediante barras blancas y se ilustra la recuperación de ARN porcentual por perlas MagPrep Silica HS seguidas de MagPrep Basic Silica mediante barras negras.

20 La FIG. 8 ilustra la aplicación de la extracción secuencial de ADN y ARN (como se describe) a muestras de tejido de colon tumoral y normal de pacientes similares. **A.** Rendimientos de ADN (barras negras) y ARN (barras blancas) totales de 6 muestras de tejido de colon normal de pacientes similares. **B.** Rendimientos de ADN (barras negras) y ARN (barras blancas) totales de 6 muestras de tejido de colon tumoral de pacientes similares.

#### 25 Descripción detallada de la invención

Los procedimientos de la presente invención pueden usarse para aislar consecutivamente ADN y ARN de una cualquiera de una serie de diferentes fuentes, incluyendo material biológico tal como células o tejido. La descripción del presente procedimiento a continuación está dirigida al aislamiento de ADN y ARN a partir de material biológico, ya que tal material es el más difícil de todas las fuentes descritas anteriormente de las que aislar ADN y ARN intacto funcional. Esta descripción, sin embargo, no pretende limitar el alcance de la presente invención al aislamiento de ARN solo a partir de tales fuentes, ya que el presente procedimiento puede aplicarse a materiales obtenidos usando procedimientos distintos de los descritos a continuación.

35 La Fig. 1 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento de aislamiento secuencial de diferentes especies de ácido nucleico, tales como ADN y ARN, a partir de una muestra biológica de acuerdo con un aspecto de las realizaciones. El procedimiento comprende las etapas de:

- 40 • en una primera etapa de unión, unión selectiva de una primera especie de ácido nucleico a una primera fase sólida poniendo en contacto la muestra biológica con la primera fase sólida que se une selectivamente a la primera especie de ácido nucleico;
  - separación de la primera fase sólida con la primera especie de ácido nucleico unida de la porción no unida de la muestra biológica;
  - 45 • en una segunda etapa de unión, unión preferente de una segunda especie de ácido nucleico a una segunda fase sólida, diferente de la primera fase sólida, poniendo en contacto la porción no unida de la muestra biológica con la segunda fase sólida que se une a la primera y segunda especies de ácido nucleico;
  - digestión enzimática de la primera especie de ácido nucleico unida a la segunda fase sólida; y
- 50 aislamiento de la segunda especie de ácido nucleico de la segunda fase sólida.

En una realización particular, el procedimiento comprende:

- etapa S1: lisis, homogeneización y digestión con proteasa del tejido en un tampón de lisis, generando así un lisado;
- 55 • etapa S2: adición de un primer soporte sólido al lisado, unión de la primera especie nucleotídica al primer soporte sólido, y etapa S3: recuperación del primer soporte sólido con la primera especie nucleotídica unida al mismo;
- etapa S5: lavado del primer soporte sólido con la primera especie nucleotídica unida al mismo;
- etapa S6: elución de la primera especie de ácido nucleico del primer soporte sólido;
- etapa S4: adición de un segundo soporte sólido al lisado, unión de la segunda especie nucleotídica al segundo
- 60 soporte sólido, y etapa S7: recuperación del segundo soporte sólido con la segunda especie nucleotídica unida al

mismo;

- etapa S8: lavado del segundo soporte sólido con la segunda especie nucleotídica unida al mismo; y
- etapa S9: elución de la segunda especie de ácido nucleico del segundo soporte sólido.

5 En una realización, el tampón de lisis, el tampón de lavado usado para lavar el primer y segundo soportes sólidos y el tampón de elución usado para la elución del primer y segundo soportes sólidos están desprovistos de cualquier alcohol. Por tanto, en una realización preferida, ninguno de los tampones de las realizaciones comprende etanol ni ningún otro alcohol.

10 En una realización del procedimiento, la primera especie de ácido nucleico es ácido desoxirribonucleico (ADN) y la segunda especie de ácido nucleico es ácido ribonucleico (ARN). En una realización adicional, el primer soporte sólido se une preferente/selectivamente a ADN frente a ARN cuando se pone en contacto con una mezcla que contiene ADN y ARN. En una realización adicional más, el segundo soporte sólido tiene una afinidad mayor o igual por ARN que por ADN cuando se pone en contacto con una mezcla que contiene ADN y ARN.

15 En otra realización de dicho procedimiento, la primera especie de ácido nucleico es ácido ribonucleico (ARN) y la segunda especie de ácido nucleico es ácido desoxirribonucleico (ADN). En tal realización, el primer soporte sólido se une preferentemente a ARN frente a ADN. En una realización adicional más, el segundo soporte sólido tiene una afinidad mayor o igual por ADN que por ARN.

20 El primer y/o segundo soporte sólido puede estar compuesto por partículas magnéticas o superparamagnéticas. En una realización, el primer y/o segundo soporte sólido está compuesto por cristales de magnetita recubiertos con SiOH en el intervalo de tamaño 100-200 nm, con >90 % de contenido de magnetita. En otra realización, el primer soporte sólido está constituido por perlas MagPrep Silica HS. En otra realización, el segundo soporte sólido está  
25 constituido por perlas MagPrep Basic Silica. En una realización adicional, el primer soporte sólido está constituido por perlas MagPrep Silica HS y el segundo soporte sólido está constituido por perlas MagPrep Basic Silica.

La muestra biológica puede seleccionarse, por ejemplo, de entre tejido, células frescas o congeladas de cualquier organismo, incluyendo un mamífero, tejidos embebidos en resina de protección de congelación tal como el  
30 compuesto OCT, sedimentos de células frescas o congeladas de sangre o médula ósea, plasma sanguíneo o capa leucocítica y secciones rehidratadas de tejido de mamífero fijado con formaldehído y embebido en parafina.

El procedimiento de la presente invención usa sales caotrópicas en la etapa de lisis para asegurar que el material biológico se desestabiliza suficientemente para liberar el ADN y ARN contenidos en la muestra a la solución de lisis,  
35 y para inactivar las enzimas que es probable que degraden el ADN tales como ADNasas, o que degraden el ARN tales como ARNasas. Tales agentes caotrópicos, en asociación con detergentes tales como Tween-20, sirven también para desestabilizar las interacciones de proteínas con ácidos nucleicos, liberando adicionalmente así los ácidos nucleicos en solución. En asociación con proteasas tales como proteinasa K, puede potenciarse  
40 adicionalmente la liberación de ácidos nucleicos. El calentamiento suave y la molienda mecánica, tal como se consigue agitando el lisado en presencia de una bola de acero, pueden potenciar adicionalmente la liberación de ácidos nucleicos de tejidos. Las sales caotrópicas son potenciadores de la unión adecuados para incluir en la mezcla de unión puesta en contacto con un material silíceo, formando un complejo de ácido nucleico y matriz silícea en las etapas de procesamiento adicionales de algunos de los aspectos de los procedimientos de la presente invención. Las sales caotrópicas incluyen clorhidrato de guanidina, tiocianato de guanidina, yoduro de sodio, perclorato de  
45 sodio y tricloroacetato de sodio. Se prefieren las sales de guanidinio, más preferiblemente clorhidrato de guanidina o tiocianato de guanidina, pero lo más preferiblemente clorhidrato de guanidina.

Las realizaciones preferidas de los procedimientos de la presente invención usan una matriz de sílice para aislar en primer lugar el ADN de un lisado producido de acuerdo con los procedimientos de pretratamiento de esta invención.  
50 La matriz de sílice usada para aislar ADN en los procedimientos preferidos es preferiblemente una matriz de sílice en forma de una partícula magnética. La matriz de sílice más preferida es una partícula magnética que se une selectivamente a ADN en lugar de a ARN, tal como perlas MagPrep Silica HS (Merck Estapor). Se describen específicamente a continuación solo la matriz de sílice más preferida y su uso en los procedimientos de la presente invención. Sin embargo, la presente invención no está limitada a la forma particular de matriz de sílice discutida a  
55 continuación.

En la primera etapa de unión S1 de la Fig. 1, puede lisarse una muestra biológica en HCl de guanidina 7 M, Tris 50 mM, pH 7, 2 % de Tween 20. La muestra biológica puede molerse en tampón de lisis usando una bola de acero y agitación rotatoria a 55-65 °C durante 15-45 min. El lisado puede comprender también proteinasa K a una  
60 concentración final de 1 mg/ml y puede incubarse a 37-65 °C, tal como a 55-65 °C, durante 15-45 min para retirar la

proteína. En una realización particular, pueden practicarse molienda e incubación a 58 °C durante 35 min.

La unión de ADN en el presente procedimiento se logra poniendo en contacto el lisado con la matriz de sílice preferida a temperatura ambiente durante más de 30 segundos en la etapa S2. En una realización preferida, el tiempo de contacto está en el intervalo de 1-15 min. Después de la unión de ADN a la matriz de sílice preferida, se retiene la matriz por centrifugación, filtración, sedimentación o aplicación de un campo magnético en la etapa S3. Lo más preferiblemente, se retiene el complejo de matriz de sílice y ADN por un campo magnético aplicado desde abajo o desde el lado del recipiente que contiene la mezcla de lisado y matriz. En una realización preferida, están contenidas en los pocillos de una placa estándar, tal como una placa de 96 o 384 pocillos, varias mezclas independientes de lisado y matriz, y el campo magnético se aplica aproximando una placa a postes o anillos magnéticos que rodean los recipientes por medios manuales o automáticos.

Aunque el sobrenadante se transfiere a un recipiente novedoso para la captura posterior de ARN, el complejo de matriz de sílice y ADN se retiene en el primer recipiente para lavados en la etapa S5 y elución en la etapa S6. Las soluciones de lavado usadas en las etapas de lavado de los procedimientos de aislamiento de ADN de la presente invención se elaboran todas usando soluciones de lavado diseñadas para retirar material de la matriz de sílice sin retirar el ADN unido a la misma. Las soluciones de lavado usadas en el presente procedimiento comprenden preferiblemente una sal y tampón a un pH ligeramente ácido en el intervalo de 6-7. La sal está preferiblemente en forma de un tampón, y lo más preferiblemente en forma de un tampón Tris, tal como Tris-HCl, a pH 6,5. En una realización preferida, el complejo de matriz de sílice y ADN se lava tres veces con una solución de lavado mientras se retiene en un campo magnético.

La solución de elución usada para eluir el ADN del complejo de matriz de sílice en la etapa de elución del presente procedimiento es preferiblemente una solución acuosa de baja fuerza iónica, más preferiblemente un tampón de baja fuerza iónica en el intervalo de pH básico en el que el material de ácido nucleico es estable y está sustancialmente intacto. Cualquier solución acuosa con una fuerza iónica menor o igual al tampón de TE (es decir, Tris-HCl 10 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, pH 8,0) es adecuada para uso en las etapas de elución de los presentes procedimientos, pero la solución de elución se tampona preferiblemente a un pH entre 8,0 y 10,0. Los tampones de PE a pH 8,6 o 9 son soluciones de elución particularmente preferidas para uso en la presente invención. Otras soluciones de elución adecuadas para uso en los procedimientos de esta invención resultarán fácilmente evidentes para el especialista en esta materia. En una realización particular, la elución puede practicarse en Tris-HCl 10 mM, pH 8,6, EDTA 1 mM con mezclado hasta 20 veces y calentamiento a 55-65 °C, tal como a 58 °C, durante 5-10 min, tal como 10 min.

El ADN eluido de las partículas magnéticas silíceas mediante el procedimiento de la presente invención es adecuado, sin aislamiento adicional, para análisis o procesamiento adicional mediante procedimientos biológicos moleculares. El ADN eluido puede secuenciarse, analizarse directamente usando electroforesis en gel y usarse en reacciones en cadena de polimerasa. Por tanto, los procedimientos de la invención pueden aplicarse, como parte de procedimientos basados en el análisis de ADN, para, entre otras cosas, el diagnóstico de enfermedades; la identificación de patógenos; el ensayo de contaminación por patógenos en alimentos, cosméticos, sangre o productos sanguíneos u otros productos; el ensayo forense, el ensayo de paternidad y la identificación del sexo de fetos o embriones.

En la etapa de unión a ARN de la presente invención, es esencial que la cantidad de ADN se haya reducido en el lisado, puesto que el ADN residual compite con el ARN por la unión a muchas matrices de sílice. En la realización más preferida, se consigue la reducción del contenido de ADN mediante la captura en una matriz de sílice en forma de una partícula magnética como se describe anteriormente y la recuperación del lisado restante. Se añaden al lisado restante matrices de sílice en forma de partículas magnéticas con afinidad por ARN, dadas las condiciones en el lisado, en una realización preferida en la etapa S4. En la realización más preferida, se incuban con el lisado partículas magnéticas silíceas que se unen a ARN con igual o mejor afinidad que a ADN en las condiciones del lisado, tales como partículas MagPrep Silica Basic (Merck Estapor). La unión de ARN y ADN residual en el presente procedimiento se logra poniendo en contacto el lisado con la matriz de sílice preferida a temperatura ambiente durante más de 30 segundos. En una realización preferida, el tiempo de contacto está en el intervalo de 1-15 min. En la realización más preferida, el tiempo de contacto es de 15 min. Se describen específicamente a continuación solo la matriz de sílice más preferida y su uso en los procedimientos de la presente invención. Sin embargo, la presente invención no está limitada a la forma particular de matriz de sílice discutida a continuación.

Después de la unión de ARN a la matriz de sílice preferida, se retiene la matriz por centrifugación, filtración, sedimentación o aplicación de un campo magnético en la etapa S7. Lo más preferiblemente, se retiene el complejo de matriz de sílice y ARN por un campo magnético aplicado desde abajo o desde el lado del recipiente que contiene

la mezcla de lisado y matriz. En una realización preferida, están contenidas en los pocillos de una placa estándar, tal como una placa de 96 o 384 pocillos, varias mezclas independientes de lisado y matriz, y el campo magnético se aplica aproximando una placa a postes o anillos magnéticos que rodean los recipientes por medios manuales o automáticos.

- 5 Las soluciones de lavado usadas en las etapas de lavado de los procedimientos de aislamiento de ARN de la presente invención en la etapa S8 se elaboran todas usando soluciones de lavado diseñadas para retirar material de la matriz de sílice, incluyendo ADN, sin retirar el ARN unido a la misma. Las soluciones de lavado usadas en el presente procedimiento comprenden preferiblemente una sal y tampón a un pH ligeramente ácido en el intervalo de
- 10 6-7. La sal está preferiblemente en forma de un tampón, y lo más preferiblemente en forma de un tampón Tris, tal como Tris-HCl, a pH 6,5. En una realización preferida, los complejos de matriz de sílice y ARN se lavan tres veces con una solución de lavado mientras se retienen en un campo magnético. Para retirar el ADN residual, se realiza el tratamiento con ADNasa, preferiblemente incubando la matriz de sílice complejada con ARN con solución de lavado que contiene 1-2 U, tal como 1 U, de ADNasa I después de al menos una etapa de lavado. Después de lavar con la
- 15 solución de lavado que contiene ADNasa, se lavan preferiblemente los complejos una vez con solución de lavado sin ADNasa para asegurar que el producto eluido no contiene ADNasa. En la realización más preferida, se lavan los complejos de matriz de sílice y ARN una vez con Tris-HCl pH 6,5, entonces una vez con Tris-HCl pH 6,5 que contiene 1-2 U, tal como 1 U, de ADNasa I y finalmente una vez con Tris-HCl pH 6,5.
- 20 La solución de elución usada para eluir el ARN del complejo de matriz de sílice en la etapa de elución S9 del presente procedimiento es preferiblemente una solución acuosa de baja fuerza iónica, más preferiblemente agua o un tampón de baja fuerza iónica en el intervalo de pH básico en el que el material de ácido nucleico es estable y está sustancialmente intacto. Cualquier solución acuosa con una fuerza iónica menor o igual al tampón de TE (es decir, Tris-HCl 10 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, pH 8,0) es adecuada para uso en las etapas de
- 25 elución de los presentes procedimientos, pero la solución de elución se tampona preferiblemente a un pH entre 8,0 y 10,0. Los tampones de PE a pH 8,6 o 9 son soluciones de elución particularmente preferidas para uso en la presente invención. Otras soluciones de elución adecuadas para uso en los procedimientos de esta invención resultarán fácilmente evidentes para el especialista en esta materia. En una realización particular, se practica la elución con Tris-HCl 10 mM, pH 8,6, EDTA 1 mM.
- 30 El ARN eluido de las partículas magnéticas silíceas mediante el procedimiento de la presente invención es adecuado, sin aislamiento adicional, para análisis o procesamiento adicional mediante procedimientos biológicos moleculares. El ARN eluido puede secuenciarse o analizarse directamente usando electroforesis en gel. El ARN eluido puede usarse también para transcripción inversa con una reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa
- 35 inversa (RT-PCR). Por tanto, los procedimientos de la invención pueden aplicarse, como parte de procedimientos basados en el análisis de ARN, para, entre otras cosas, el diagnóstico de enfermedades; la identificación de patógenos; el ensayo de contaminación por patógenos en alimentos, cosméticos, sangre o productos sanguíneos u otros productos; el ensayo forense, el ensayo de paternidad y la identificación del sexo de fetos o embriones.
- 40 El procedimiento ilustrado en la Fig. 1 muestra las etapas en orden secuencial. Sin embargo, la extracción secuencial de ADN y ARN puede practicarse al menos parcialmente en paralelo. Por ejemplo, las etapas S5 y S6 pueden practicarse al menos parcialmente en paralelo con las etapas S8 y S9. Por tanto, el lavado de la primera fase sólida y la segunda fase sólida puede practicarse al menos parcialmente en paralelo y la elución del ADN de la primera fase sólida y la elución del ARN de la segunda fase sólida pueden practicarse al menos parcialmente en
- 45 paralelo.
- De acuerdo con otro aspecto de las realizaciones, se proporciona un kit que comprende un tampón combinado de lisis y unión de ácido nucleico, una primera fase sólida que se une selectivamente a ADN en el tampón de unión de ácido nucleico, una segunda fase sólida que es diferente de la primera fase sólida y se une a ARN y ADN en el
- 50 tampón de unión de ácido nucleico, un tampón de lavado, un tampón de lavado para digestión de ADN y un tampón de elución. El kit puede comprender también una sustancia para potenciar la unión de ARN a la segunda fase sólida. El tampón de lavado para la digestión de ADN es preferiblemente el tampón de lavado descrito anteriormente complementado con una ADNasa, preferiblemente ADNasa I.
- 55 La primera fase sólida, es decir, las perlas de unión a ADN, son preferiblemente perlas Magprep Silica HS que se diluyen preferiblemente 1 a 3 en tampón de lisis a partir de una solución madre de 50 mg/ml para obtener en total 833,3 mg de perlas a un volumen de 50 ml. Correspondientemente, la segunda fase sólida, es decir las perlas de unión a ARN, son preferiblemente perlas Magprep Silica Basic que se diluyen preferiblemente 1 a 3 en tampón de lisis de una solución madre de 50 mg/ml, para obtener en total 833,3 mg de perlas a un volumen de 50 ml. El kit
- 60 comprende preferiblemente también tampón de lisis con proteinasa K, preferiblemente en forma de HCl de guanidina

7 M, Tris 50 mM, 2 % de Tween (pH 7,0) y proteinasa K 20 mg/ml. El volumen total de tampón de lisis y proteinasa K en el kit podría ser de 110 ml con 95/100 partes de tampón de lisis y 5/100 partes de proteinasa K. Cuando se extraen ADN y ARN de una muestra, se añaden 800 µl de tampón de lisis y 40 µl de proteinasa K por muestra de extracción. El tampón de lavado, preferiblemente Tris-HCl 10 mM (pH 6,5), puede proporcionarse a un volumen de 5 265 ml y el tampón de lavado con ADNasa podría proporcionarse a un volumen total de 75 ml y 98/100 partes de tampón de lavado, 1/100 parte de ADNasa a 1 U/µl y 1/100 parte de tampón de ADNasa. El kit comprende preferiblemente también un tampón de elución tal como TrisHCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8,6) a un volumen de 100 ml.

10 La presente invención puede usarse también para purificar especies nucleotídicas a partir de órganos y sangre de mamífero frescos y congelados. El aislamiento de especies nucleotídicas puede ser a partir de procariontas, eucariontas y mitocondrias.

Con modificaciones menores en el pretratamiento, la invención puede usarse para purificar especies nucleotídicas de tejidos fijados con formaldehído y embebidos en parafina y tejidos de planta.

Con la adición de acetona al tampón de lisis, podría potenciarse la recuperación de especies de ARN de bajo peso molecular.

20 Los siguientes ejemplos no limitantes enseñan diversas realizaciones de la invención.

## EJEMPLOS

**Ejemplo 1. Se evaluó en soportes síliceos magnéticos o superparamagnéticos su capacidad de unión y liberación de ADN de alta calidad de un lisado de tejido complejo.**

Se homogeneizaron tres secciones de tejido congeladas embebidas en OCT de 10 µm de grosor de mama, colon, bazo y amígdala o sedimentos de leucocitos congelados ( $3 \times 10^6$  células) en 1 ml de tampón de lisis (HCl de guanidina 7 M, Tris 50 mM, 4 U de proteinasa K (Roche), 2 % de Tween 20) por molienda con una bola de acero de 30 3 mm durante 15 min a 55 °C bajo agitación rotativa a 800 rpm. Se añadieron a 200 µl de lisado 0,5 mg de partículas MagPrep Silica HS (Merck) para capturar ADN. Para el cribado de unión a ADN, se usaron 0,5 mg de cada perla [MagPrep Silica HS (Merck), SiMg (Chemicell), Magnesil (Promega), MagsiDNA (Magnamedics), S1.0 y S1.0-COOH (Mobitec) y Accubead (Bioneer)]. Se recuperaron las perlas usando un imán durante 1 min y se lavaron 3 veces durante 1 min con 150 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH 6,5). Se eluyó el ADN de las perlas mediante la adición de 200 µl de tampón de elución (Tris-HCl 10 mM, pH 9, EDTA 1 mM), mezclado 20 veces y calentamiento a 35 65 °C durante 5 min. Se extrajo ADN de control de muestras similares a partir de tejido congelado embebido en OCT mediante digestión con proteinasa K durante una noche seguido de extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol.

40 Se llevó a cabo la cuantificación del elemento repetido LINE1 humano usando detección con SYBR Green I (Biochemika) y el cebador directo 5'-AAAGCCGCTCAACTACATGG-3' (SEQ ID NO. 1) y el cebador inverso 5'-TGCTTTGAATGCGTCCCAGAG-3' (SEQ ID NO. 2) en un sistema de PCR instantánea 7900 HT Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Los parámetros de termociclado fueron 94 °C durante 1 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C durante 10 segundos, 58 °C durante 15 segundos y 70 °C durante 15 segundos. Se muestran los resultados del cribado de perlas en la Fig. 2A.

Se practicó la valoración de la longitud del fragmento de ADN mediante separación electroforética en un gel de agarosa al 0,4 % con una escala de ADN High Range (Fermentas) como patrón de tamaño (Fig. 2B). Se llevó a cabo la amplificación por PCR y secuenciación de los exones 1 a 7 del gen *PRPS1* usando 6 ng de ADNg como molde. 50 Se sintetizaron todos los cebadores por Sigma (Tabla 1). Se practicó la PCR en reacciones de 10 µl que contenían 10 x tampón de PCR (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> 166 mM, Tris 670 mM, pH 8,8, MgCl<sub>2</sub> 67 mM, 2-mercaptoetanol 100 mM), dNTP 10 mM (Invitrogen), cebadores directo e inverso 10 µM, 6 % de DMSO, 0,5 U de Platinum *Taq* (Invitrogen) y 6 ng de ADN. Se llevaron a cabo las reacciones en un 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) usando un protocolo de PCR por ensayos con inicio en caliente (96 °C durante 2 min; 3 ciclos de 96 °C durante 10 s, 64 °C durante 10 s, 70 °C durante 30 s; 3 ciclos de 96 °C durante 10 s, 61 °C durante 10 s, 70 °C durante 30 s; 3 ciclos de 96 °C durante 10 s, 58 °C durante 10 s, 70 °C durante 30 s; 41 ciclos de 96 °C durante 10 s, 57 °C durante 10 s, 70 °C durante 30 s; 1 ciclo de 70 °C durante 5 min).

Tabla 1 Cebadores de *PRPS1*

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO.
Exón 1 M13F	5'-gtaaaacgacggccagtcgcttgattgagctctgtgg-3'	3
Exón 1 R	5'-gctagtcacagagctgcaccc-3'	4
Exón 2 M13F	5'-gtaaaacgacggccagtcacctatggatggagggctg-3'	5
Exón 2 R	5'-actccagaggagttggctt-3'	6
Exón 3 M13F	5'-gtaaaacgacggccagttgtctccttctatgaattctggg-3'	7
Exón 3 R	5'-cttctctcagctctcagcatc-3'	8
Exón 4 F	5'-tcccatcagttgaattgtgc-3'	9
Exón 4 M13R	5'-gtaaaacgacggccagtcacatgtgctacttacatcc-3'	10
Exón 5 F	5'-cctgacctgtgatccg-3'	11
Exón 5 M13R	5'-gtaaaacgacggccagtcagcaggctgaagacattc-3'	12
Exón 6 F	5'-tgttggaagcctaagcagg-3'	13
Exón 6 M13R	5'-gtaaaacgacggccagtgatgacaagactaatccttcagacc-3'	14
Exón 7 M13F	5'-gtaaaacgacggccagtcagcagggaaacagcacag-3'	15
Exón 7 R	5'-cgggtctctgctgaattg-3'	16

Se muestra la separación en gel de agarosa de productos de PCR en la Figura 2C.

- 5 Se purificaron los moldes por inmovilización reversible en fase sólida (SPRI) y se llevó a cabo la secuenciación con el cebador directo M13 (5'-GTA AAAACGACGGCCAGT-3', SEQ ID NO. 17) y el kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems) usando secuenciación de Sanger convencional (Fig. 2D).

**Ejemplo 2. Se evaluó en soportes silíceos, magnéticos o superparamagnéticos su capacidad de unirse a y liberar ARN de alta calidad de un lisado de tejido complejo.**

Se homogeneizaron tres secciones de tejido congeladas embebidas en OCT de 10 µm de grosor de mama, colon, bazo y amígdala o sedimentos de leucocitos congelados ( $3 \times 10^6$  células) en 1 ml de tampón de lisis (HCl de guanidina 7 M, Tris 50 mM, pH 7, 4 U de proteinasa K (Roche), 2 % de Tween 20) por molienda con una bola de acero de 3 mm durante 15 min a 55 °C bajo agitación rotativa a 800 rpm. Se añadieron a 200 µl de lisado 0,5 mg de partículas MagPrep Silica HS (Merck) para capturar ADN. Se recuperaron las partículas usando un imán durante 1 min y se lavaron 3 veces durante 1 min con 150 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH 6,5). Se eluyó el ADN de las perlas mediante la adición de 200 µl de tampón de elución (Tris-HCl 10 mM, pH 9, EDTA 1 mM), mezclado 20 veces y calentamiento a 65 °C durante 5 min. Para el cribado de unión a ARN, se añadieron 0,5 mg de cada perla [MagPrep Basic Silica (Merck), SiMag (Chemicell), Magnesil (Promega), MagsiDNA (Magnamedics), S1.0 y S1.0-COOH (Mobitec) y Accubead (Bioneer)] al sobrenadante después de recuperación de ADN, seguido de mezclado 5 veces e incubación durante 15 min. Se recuperaron las perlas usando un imán y se lavaron con tampón de lavado durante 1 min, tampón de lavado con 2 U de ADNasa I (Fermentas) durante 15 min a 37 °C y tampón de lavado durante 1 min. Se eluyó el ARN total de las perlas MagPrep mediante la adición de 100 µl de tampón de elución, mezclado 20 veces e incubación durante 5 min en hielo. Se ilustran los resultados del cribado de perlas en la Fig. 3A. Se determinaron la integridad y concentración de ARN en un instrumento Bioanalyzer (Agilent) usando un kit ARN 6000 Nano (Fig. 3B). Se transcribieron de forma inversa 5 ng de ARN a ADNc y se usaron para amplificar por PCR *ACTB*. Se sintetizó el ADNc de acuerdo con las instrucciones del fabricante mediante transcripción inversa usando el sistema RT-PCR AccessQuick™ (Promega) y se usó en un protocolo de PCR por ensayos (como se describe anteriormente) con los cebadores de *ACTB* directo e inverso 5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3' (SEQ ID NO. 18) y 5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3' (SEQ ID NO. 19) respectivamente. Se extrajo el ARN de control de sangre usando el kit QIAamp ARN Blood Mini de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se muestran los resultados en la Figura 3C.

**35 Ejemplo 3.**

Usando ADN extraído como se describe en el Ejemplo 2, el dimensionamiento por electroforesis como se esquematiza en el Ejemplo 1 demostró que los fragmentos de ADN recuperados después de purificación de MagPrep eran de hasta 48 kb de longitud, similar al ADN de tejidos extraídos con fenol-cloroformo (Fig. 4A). Tampoco se observó contaminación con ARN del ADN eluido en la amplificación por PCR-transcripción inversa de *ACTB* usando ADN eluido como molde (Fig. 4B).

**Ejemplo 4.**

Usando ADN extraído como se describe en el Ejemplo 2, el dimensionamiento por electroforesis en un Agilent Bioanalyzer mostró que el ADN extraído consistía únicamente en fragmentos largos (Fig. 5).

**Ejemplo 5.**

5

La integridad de una muestra de ARN total de control extraída usando partículas MagPrep Basic Silica como se describe en el Ejemplo 2 no se afectaba por el procedimiento. La separación electroforética de una muestra de ARN de referencia antes y después de la extracción con perlas Basic MagPrep Silica demuestra la retención de la integridad de la muestra de ARN como se ilustra en la Fig. 6A y 6B.

10

**Ejemplo 6. La extracción de ADN anterior facilita una mayor recuperación de ARN en un intervalo de relaciones de entrada de ADN:ARN.**

Se extrajo ARN de mezclas conocidas de ADN y ARN (Tabla 2) por Basic Silica solo y por perlas de Silica HS seguidas de Basic Silica como se describe en la Fig. 1. Se determinó la concentración de ARN usando un kit ARN Nano en Bioanalyzer (Agilent). La recuperación porcentual es consistentemente mayor tras la retirada de ADN antes de la extracción de ARN. La recuperación de ARN es también mayor con menor entrada de ARN.

15

**Tabla 2. Condiciones experimentales para las extracciones de ARN 1 a 5**

Extracción	ARN de entrada (µg)	ADN de entrada (µg)
1	2	8
2	2	4
3	2	2
4	4	2
5	8	2

20

Se muestran los resultados en la Figura 7. Barras blancas, MagPrep Basic Silica; Barras negras, MagPrep Silica HS seguido de MagPrep Basic Silica.

**Ejemplo 7. Extracción secuencial de ADN/ARN de muestras de colon normal y tumoral de pacientes similares.**

25

Se homogeneizaron tres secciones de tejido congeladas embebidas en OCT de 10 µm de 12 muestras de colon tumoral/normal de pacientes similares en 1 ml de tampón de lisis (HCl de guanidina 7 M, Tris 50 mM, pH 7, 4 U de proteinasa K (Roche), 2 % de Tween 20) por molienda con una bola de acero de 3 mm durante 15 min a 55 °C bajo agitación rotativa a 800 rpm. Se añadieron a 200 µl de lisado 0,5 mg de partículas MagPrep Silica HS (Merck) para capturar ADN. Se recuperaron las perlas usando un imán durante 1 min y se lavaron 3 veces durante 1 min con 100 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM, pH 6,5). Se eluyó el ADN de las perlas mediante adición de 100 µl de tampón de elución (Tris-HCl 10 mM, pH 9, EDTA 1 mM), mezclado 20 veces y calentamiento a 65 °C durante 5 min. Se añadieron al sobrenadante después de la recuperación de ADN 0,5 mg de perlas MagPrep Basic Silica, seguido de mezclado 5 veces e incubación durante 15 min. Se recuperaron las perlas usando un imán durante 1 min y se lavaron con 100 µl de tampón de lavado enfriado con hielo durante 1 min, tampón de lavado con 2 U de ADNasa I (Fermentas) durante 15 min a 37 °C y en tampón de lavado enfriado con hielo durante 1 min. Se eluyó el ARN total de las perlas MagPrep mediante la adición de 50 µl de tampón de elución, mezclado 20 veces e incubación durante 5 min a 65 °C. Se midió espectrofotométricamente la concentración de ADN extraído de los 6 tejidos normales en un Nanodrop, mientras que se midió la concentración de ARN usando un kit ARN Nano en Bioanalyzer (Agilent). Los rendimientos se ilustran en la Fig. 8A. Barras blancas, ADN; barras negras, ARN. Se tomaron las mismas medidas para las muestras tumorales y se ilustran los rendimientos obtenidos en la Fig. 8B. Barras blancas, ADN; barras negras, ARN.

30

35

40

**Ejemplo comparativo 1. Se añadió un disolvente orgánico al tampón de lavado.**

45

Se extrajo ADN usando el protocolo como se describe en el Ejemplo 2, pero usando etanol al 70 % v/v como tampón de lavado en paralelo con el tampón de lavado descrito por la presente invención. Se incluyó este ejemplo para ilustrar que los disolventes orgánicos no son requeridos en la etapa de lavado. Los resultados se ilustran en la Tabla

50 3.

**Tabla 3. El efecto de un tampón de lavado diferente sobre la concentración y pureza de ADN**

Tampón de lavado	Conc. de ADN (ng/μl)	relación 260:280	relación 260:230
etanol al 70 % v/v	26,19	1,81	0,82
TrisHCl 10 mM, pH 6,5	35,49	1,63	0,92

Por tanto, la inclusión de un disolvente orgánico en forma de etanol al 70 % en el tampón de lavado reducía realmente el rendimiento y no daba como resultado una mejora de la relación 260:230 en comparación con un 5 tampón de lavado de acuerdo con las realizaciones.

#### Ejemplo comparativo 2. Diferentes tampones de lisis/unión.

Se extrajeron ADN y ARN de tejido de colon como se describe anteriormente en la presente memoria, pero 10 reemplazando con los siguientes tampones de lisis/unión el tampón de lisis como se describe en el Ejemplo 2. El tampón de lisis de acuerdo con las presentes realizaciones estaba también incluido como control.

- (i) Tampón de lisis TAAN: sulfato de amonio 0,3 M en 99,2 ml de Tris-acetato 0,2 mol/l, pH 4,0, 0,8 % de Nonidet P40
- 15 (ii) tiocianato de guanidinio 3 M, citrato trisódico 20 mM
- (iii) etanol al 41,1 % v/v, tiocianato de guanidinio 2 M, citrato trisódico 14,4 mM
- (iv) isopropanol al 71,5 % v/v, tiocianato de guanidinio 1 M, citrato trisódico 7,2 mM
- (v) metanol al 42,8 % v/v, tiocianato de guanidinio 2 M, citrato trisódico 14,4 mM
- (vi) clorhidrato de guanidinio 6 M
- 20 (vii) etanol al 41,1 % v/v, clorhidrato de guanidinio 4,1 M.

Se valoró la pureza e integridad de las biomoléculas extraídas espectrofotométricamente y por electroforesis. Los resultados se esquematizan en la Tabla 4. Es evidente que la pureza e integridad de los ácidos nucleicos se 25 mantienen mejor cuando se usa el tampón de lisis de las presentes realizaciones.

**Tabla 4. Efecto de diferentes tampones de lisis (LB)/tampones de unión (BB) sobre la integridad del ácido nucleico**

LB/BB	Conc. de ADN (ng/μl)	260:280	Degradación de ADN	Conc. de ARN (ng/μl)	Degradación de ARN
LB de acuerdo con la presente invención	51,73	1,65	No	5	No
Tampón TAAN	39,79	1,56	Sí	0	N/A
GTC 3 M, citrato trisódico 20 mM	57,4	3,31	Sí	4,4	Sí
EtOH al 41,1 % v/v, tiocianato de guanidinio 2 M, citrato trisódico 14,4 mM	33,8	3,64	Sí	0,3	N/A
isopropanol al 71,5 % v/v, GTC 1 M, citrato trisódico 7,2 mM	45,8	2,52	Sí	0,2	N/A
MTOH al 42,8 % v/v, tiocianato de guanidinio 2 M, citrato trisódico 14,4 mM	62,9	2,79	Sí	3,8	Sí
GdnHCl 6 M	33	1,7	Sí	5,5	Algunos
EtOH al 41,1 % v/v, GdnHCl 4,1 M	37,1	1,65	Sí	4,5	Algunos

El tampón LB de las realizaciones da por lo tanto como resultado un alto rendimiento, pero sin ninguna degradación 30 del ADN y ARN recuperados. Los demás tampones ensayados daban como resultado menores rendimientos y/o mostraban degradación del ADN y/o ARN recuperados.

Las realizaciones descritas anteriormente han de entenderse como unos pocos ejemplos ilustrativos de la presente invención. Se entenderá por los especialistas en la materia que pueden hacerse diversas modificaciones,

combinaciones y cambios en las realizaciones sin apartarse del alcance de la presente invención. En particular, pueden combinarse diferentes soluciones parciales en las diferentes realizaciones en otras configuraciones, cuando sea técnicamente posible. El alcance de la presente invención se define, sin embargo, por las reivindicaciones adjuntas.

5

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> SJÄ\226BLOM, Tobias  
MATHOT, Lucy

10 <120> Procedimiento y kit para el aislamiento secuencial de especies nucleotídicas de una muestra

<130> P902PC00  
<150> SE1000701-1  
<151> 29-06-2010

15 <150> SE  
<151> 22-11-2010  
<160> 19  
<170> BiSSAP 1.0  
<210> 1

20 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<221> fuente

25 <222> 1..20  
<223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
<400> 1  
aaagccgctc aactacatgg 20

30 <210> 2  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<220>

35 <221> fuente  
<222> 1..21  
<223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
<400> 2  
tgctttgaat gcgtcccaga g 21

40 <210> 3  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

45 <220>  
<221> fuente  
<222> 1..38  
<223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
<400> 3

50 gtaaaacgac ggccagtcgc ttggattga gtctgtgg 38

<210> 4  
<211> 21  
<212> ADN

55 <213> Homo sapiens  
<220>  
<221> fuente  
<222> 1..21

60 <223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
<400> 4

ES 2 665 012 T3

gctagtcaca gagctgcacc c 21

<210> 5  
 <211> 38  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..38  
 10 <223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
 <400> 5  
 gtaaaacgac ggccagtacc tatggatag gagggctg 38

<210> 6  
 15 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> fuente  
 20 <222> 1..21  
 <223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
 <400> 6  
 actccagagg agttggtgct t 21

<210> 7  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 30 <221> fuente  
 <222> 1..41  
 <223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
 <400> 7  
 gtaaaacgac ggccagtgt ctcttctat gaattctgg g 41

35 <210> 8  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 40 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..22  
 <223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
 <400> 8  
 45 ctctctgca gtctcagca tc 22

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 50 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..21  
 <223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
 55 <400> 9  
 tcccatcagt ttgaatgtg c 21

<210> 10  
 <211> 41  
 60 <212> ADN

<213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..41  
 5 <223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
 <400> 10  
 gtaaaacgac ggccagtccc atgtgctagc tacttacatc c 41  
  
 <210> 11  
 10 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> fuente  
 15 <222> 1..18  
 <223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
 <400> 11  
 cctgaccttg tgatccgc 18  
  
 20 <210> 12  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 25 <221> fuente  
 <222> 1..37  
 <223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
 <400> 12  
 gtaaaacgac ggccagtcca gcaggctgaa gacattc 37  
 30  
 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 35 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..21  
 <223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
 <400> 13  
 40 tgttgtgaa gcctaagcag g 21  
  
 <210> 14  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 45 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..43  
 <223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
 50 <400> 14  
 gtaaaacgac ggccagtgat gacaagacta aatccttcag acc 43  
  
 <210> 15  
 <211> 38  
 55 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> fuente  
 <222> 1..38  
 60 <223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"

# ES 2 665 012 T3

<400> 15  
gtaaaacgac ggccagtcac gacagggaaa cagcacag 38

<210> 16  
5 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<221> fuente  
10 <222> 1..20  
<223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
<400> 16  
cgggtcttct gctgaattg 20

15 <210> 17  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<220>  
20 <221> fuente  
<222> 1..17  
<223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
<400> 17  
gtaaaacgac ggccagt 17

25  
30 <210> 18  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<221> fuente  
<222> 1..20  
<223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
<400> 18  
35 ctgggacgac atggagaaaa 20

<210> 19  
<211> 20  
<212> ADN  
40 <213> Homo sapiens  
<220>  
<221> fuente  
<222> 1..20  
<223> /mol\_type="ADN" /organism="Homo sapiens"  
45 <400> 19  
aaggaaggct ggaagagtc 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de recuperación en serie de dos especies de ácido nucleico diferentes de una muestra biológica, que comprende:
- 5
- en una primera etapa de unión, homogeneización y digestión enzimática de la muestra biológica en un tampón combinado de lisis y unión a ácido nucleico, generando así un lisado que comprende una primera especie de ácido nucleico, antes de unir selectivamente la primera especie de ácido nucleico a una primera fase sólida poniendo en contacto la muestra biológica con la primera fase sólida que se une selectivamente a la primera especie de ácido nucleico en el tampón combinado de lisis y unión a ácido nucleico;
  - 10 - separación de la primera fase sólida con la primera especie de ácido nucleico unida de la porción no unida de la muestra biológica;
  - en una segunda etapa de unión, unión de una segunda especie de ácido nucleico a una segunda fase sólida, diferente de la primera fase sólida, poniendo en contacto la porción no unida de la muestra biológica con la segunda fase sólida que se une a la primera y segunda especies de ácido nucleico en el tampón combinado de lisis y unión a ácido nucleico;
  - 15 - digestión enzimática de la primera especie de ácido nucleico unida a la segunda fase sólida; y
  - aislamiento de la segunda especie de ácido nucleico de la segunda fase sólida.
- 20 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde la muestra biológica se lisa en un tampón combinado de lisis y unión a ácido nucleico que comprende:
- una solución de sal caotrópica, preferiblemente HCl de guanidina,
  - o tampón débilmente ácido, y
  - 25 - opcionalmente proteinasa K.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, donde el tampón combinado de lisis y unión a ácido nucleico está desprovisto de alcoholes.
- 30 4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la primera especie de ácido nucleico es ácido desoxirribonucleico, ADN, y la segunda especie de ácido nucleico es ácido ribonucleico, ARN.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde
- 35
- el primer soporte sólido se une preferentemente a ADN frente a ARN cuando se pone en contacto con una mezcla que contiene ADN y ARN, y
  - el segundo soporte sólido se une a ARN mejor o igualmente bien que a ADN cuando se pone en contacto con una mezcla que contiene ADN y ARN.
- 40
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el primer y/o segundo soporte sólido está compuesto por cristales de magnetita recubiertos con SiOH con >90 % de contenido de magnetita en el intervalo de tamaño 100-200 nm.
- 45 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la primera especie de ácido nucleico separado:
- se lava con un tampón ligeramente ácido; y
  - se eluye del primer soporte sólido con un tampón de elución básico, y el segundo ácido nucleico separado:
  - 50 - se lava con un tampón ligeramente ácido que comprende opcionalmente ADNasa I; y
  - se eluye del segundo soporte sólido con un tampón de elución básico.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, donde el tampón de elución básico está desprovisto de alcoholes y el tampón de lavado está desprovisto de alcoholes.
- 55
9. Un kit para uso en un procedimiento para la recuperación en serie de dos especies de ácido nucleico diferentes de una muestra biológica, que comprende:
- un tampón combinado de lisis y unión a ácido nucleico,
  - 60 - una primera fase sólida que se une selectivamente a una primera especie de ácido nucleico en el tampón de unión

a ácido nucleico,

- una segunda fase sólida que es diferente de la primera fase sólida y se une a la segunda especie de ácido nucleico y a la primera especie de ácido nucleico en el tampón de unión a ácido nucleico.

- 5 10. El kit de acuerdo con la reivindicación 9, donde el tampón combinado de lisis y unión a ácido nucleico está desprovisto de alcoholes.
11. El kit de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, donde el tampón combinado de lisis y unión a ácido nucleico es una solución acuosa de HCl de guanidina 7 M, Tris 50 mM, pH 7, 2 % de Tween 20.
- 10 12. El kit de acuerdo con las reivindicaciones 9-11, que comprende además:
- un tampón de lavado, preferiblemente una solución acuosa de Tris-HCl 10 mM, pH 6,5,
  - un tampón de lavado para la digestión de la primera especie de ácido nucleico, preferiblemente una solución
- 15 acuosa de Tris-HCl 10 mM, pH 6,5 y 1-2 U de ADNasa, preferiblemente 1 U de ADNasa I, y
- un tampón de elución, preferiblemente una solución de TrisHCl 10 mM, pH 8-10, preferiblemente pH 8,6, y EDTA 1 mM, donde el tampón de lavado, el tampón de lavado para digestión de la primera especie de ácido nucleico y el tampón de elución están desprovistos de alcoholes.
- 20 13. El kit de acuerdo con las reivindicaciones 9-12, donde el primer y/o segundo soporte sólido está compuesto por cristales de magnetita recubiertos con SiOH con >90 % de contenido de magnetita en el intervalo de tamaño 100-200 nm.
14. El kit de acuerdo con las reivindicaciones 9-13, donde el primer soporte sólido se une preferentemente
- 25 a ADN frente a ARN cuando se pone en contacto con una mezcla de ADN y ARN y el segundo soporte sólido se une a ARN mejor o igualmente bien que a ADN cuando se pone en contacto con una mezcla que contiene ADN y ARN.

Fig. 1

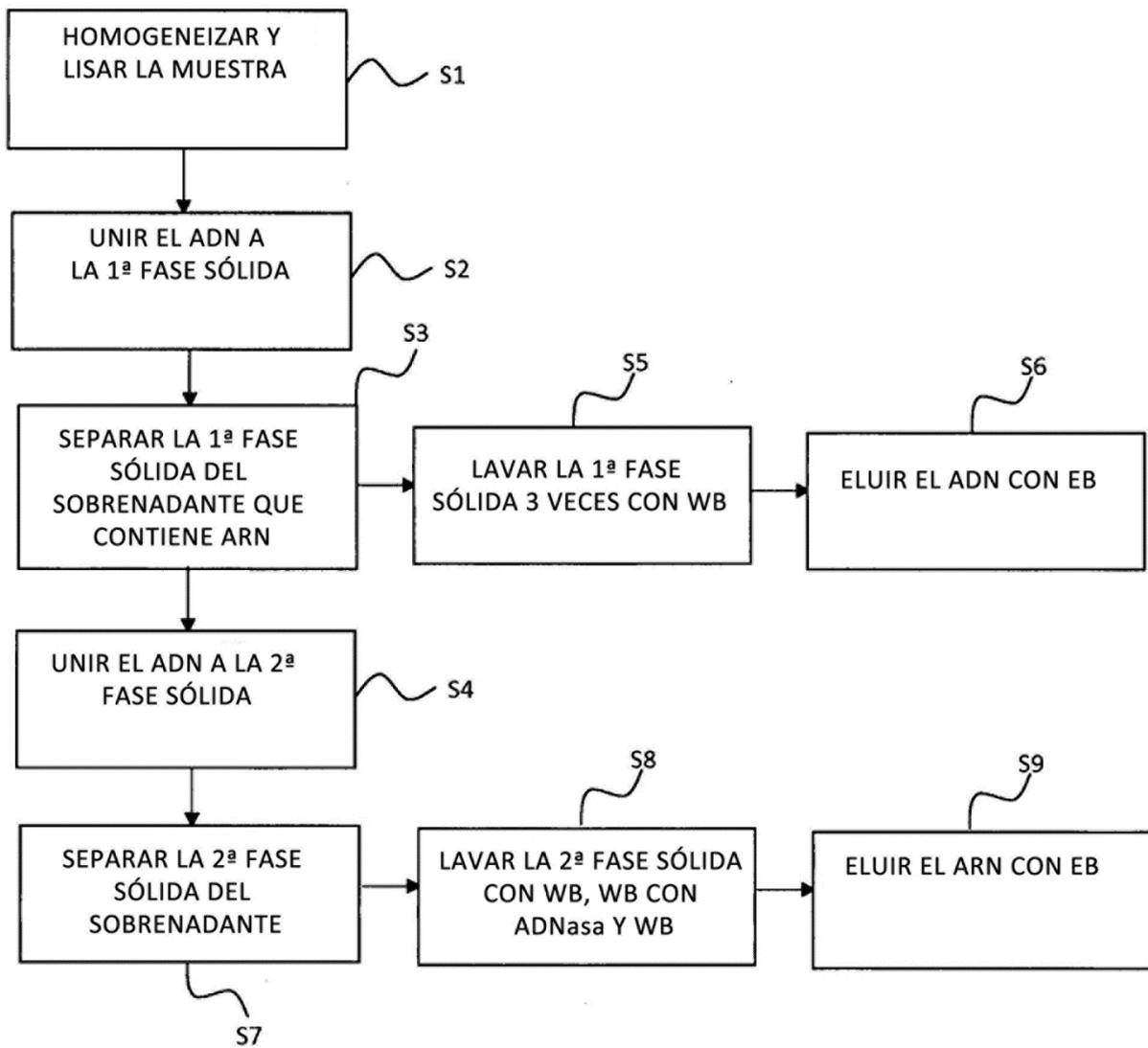


Fig. 2

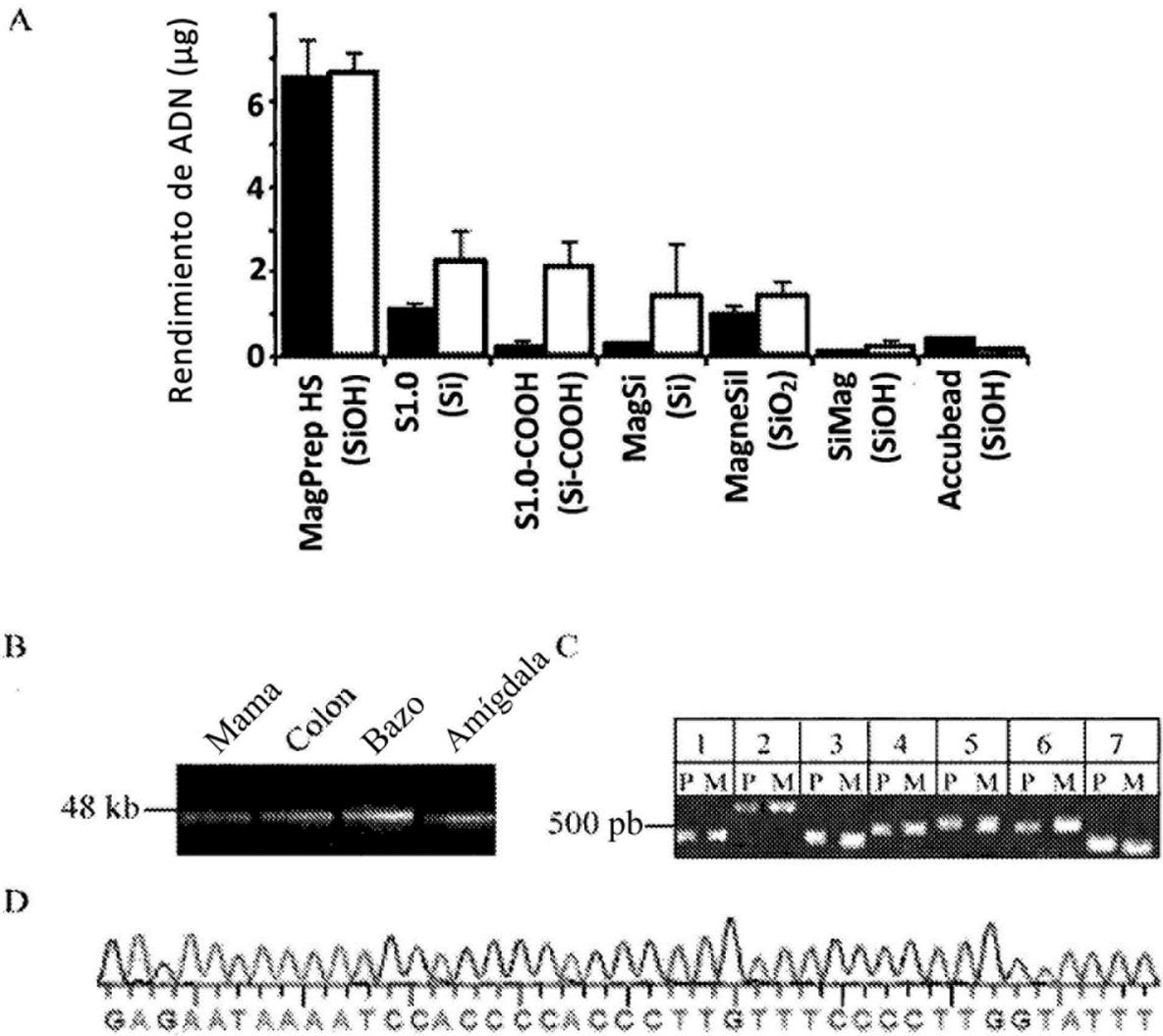
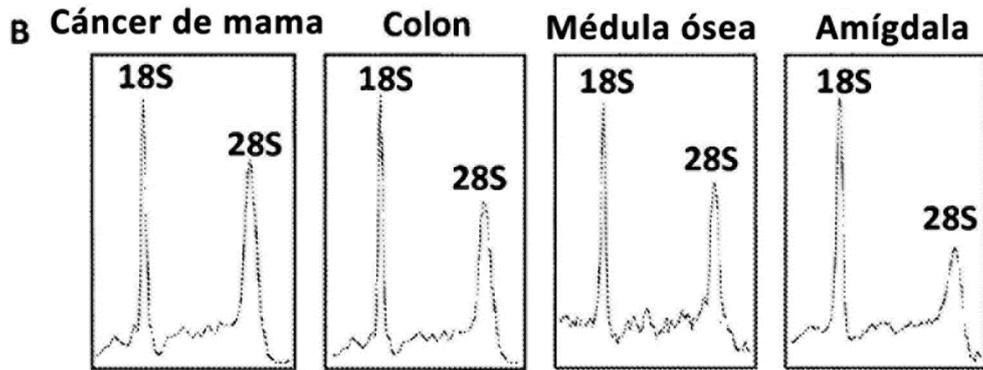
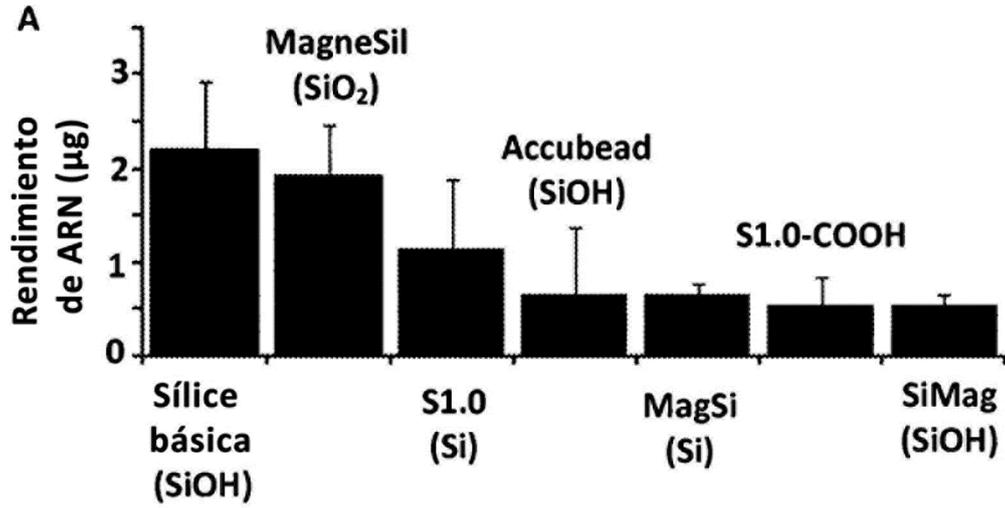
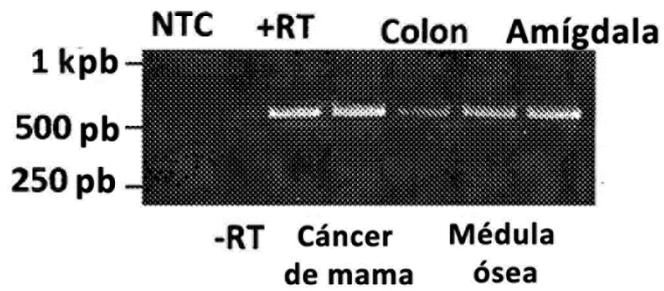


Fig. 3



**C**



**Fig. 4**

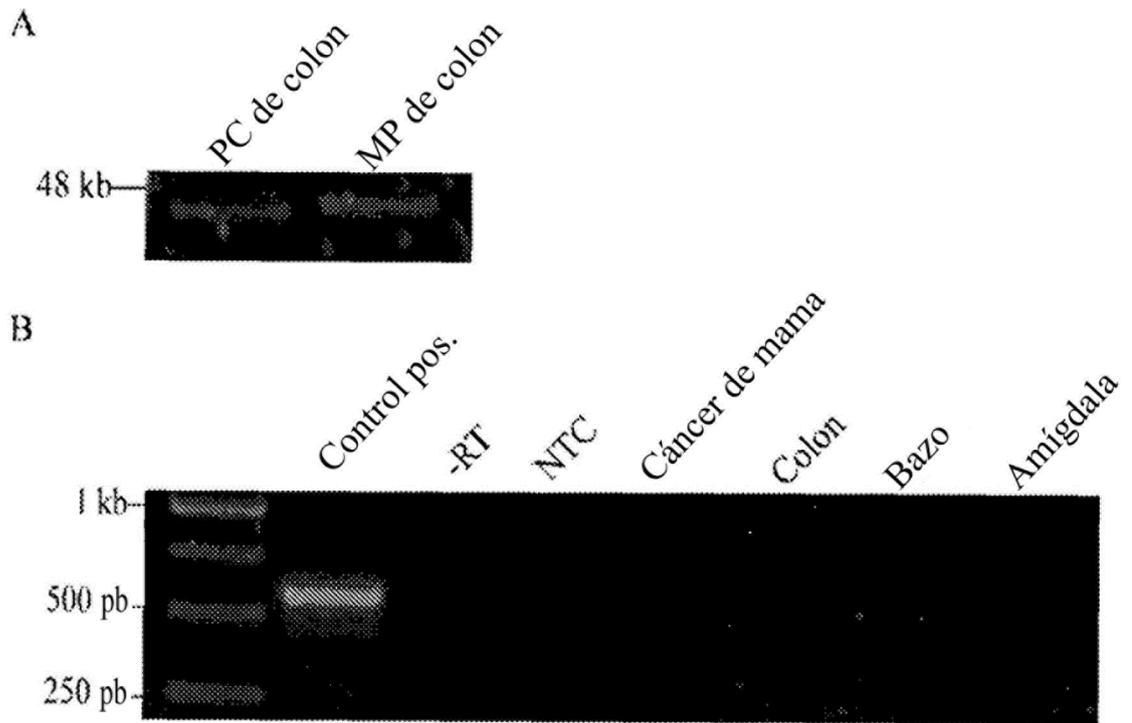


Fig. 5

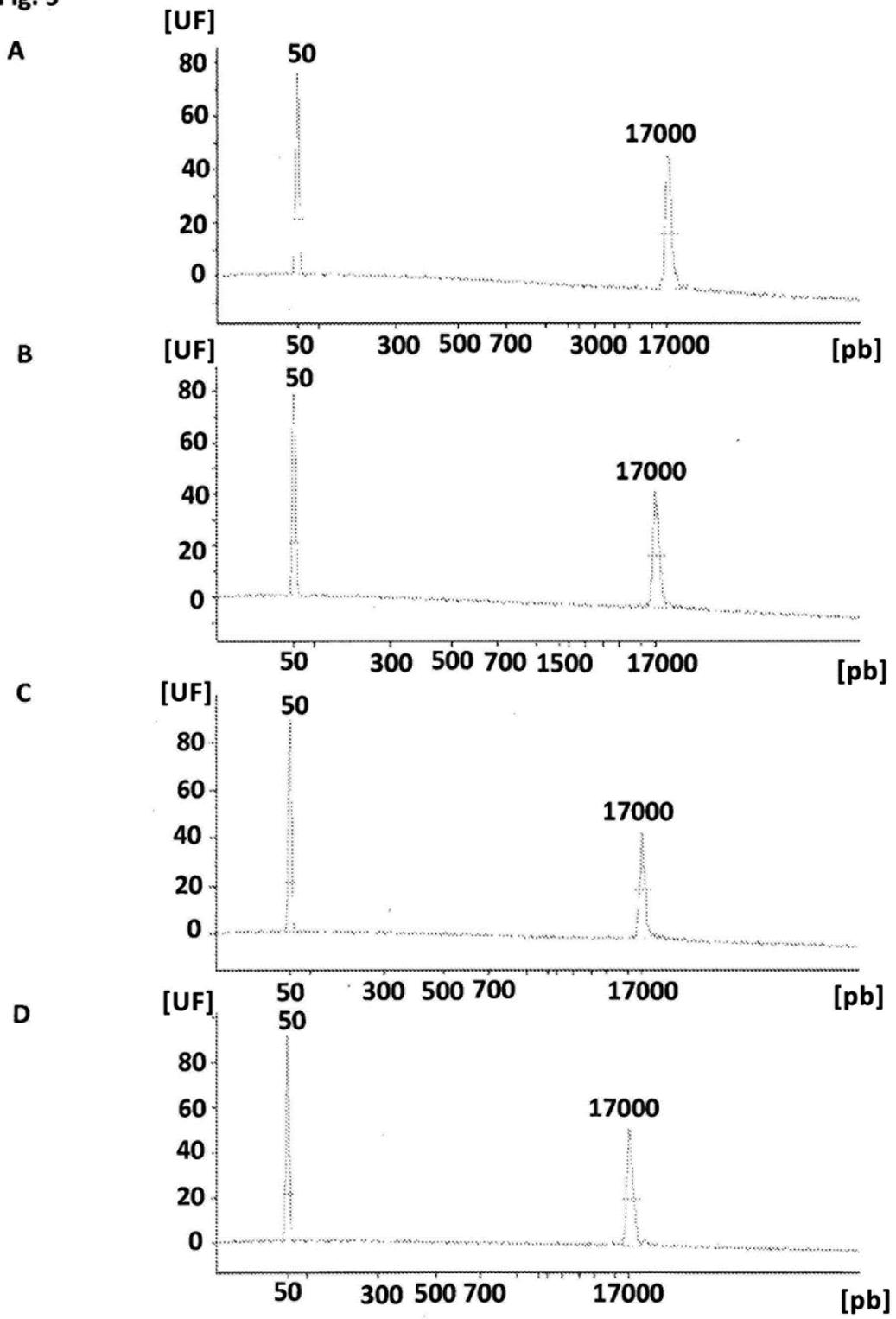


Fig. 6

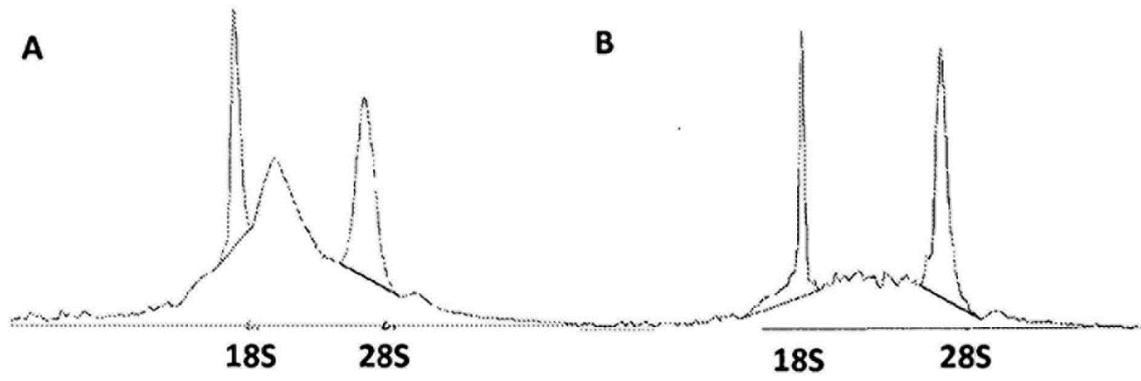


Fig. 7

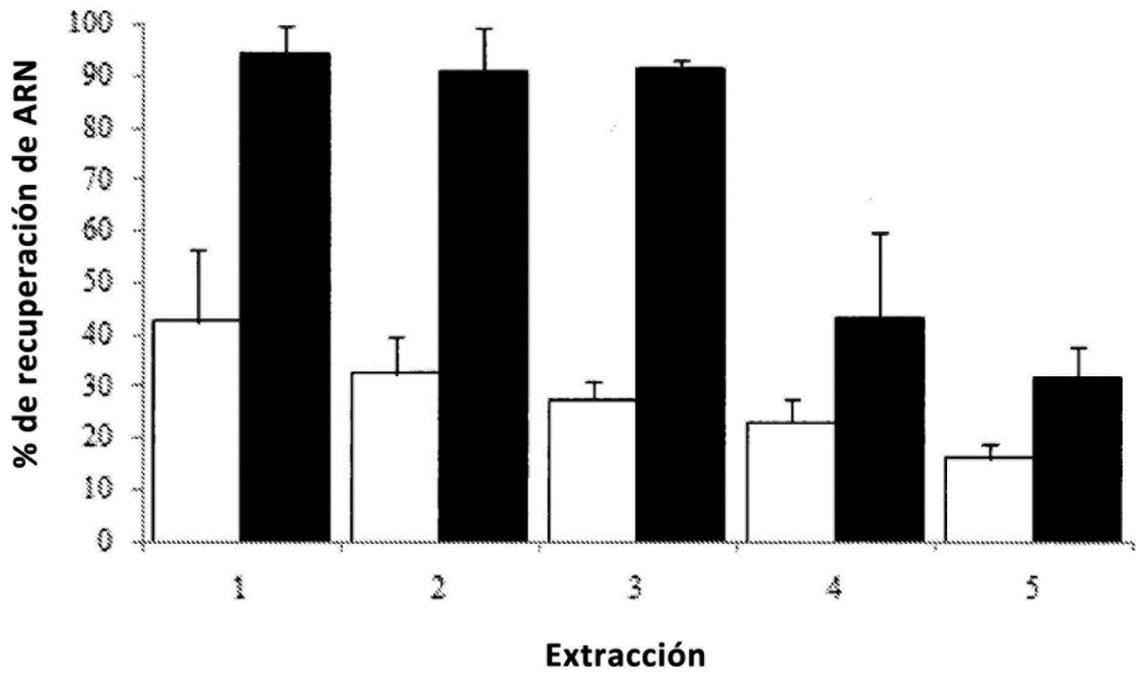


Fig. 8

