

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 198**

51 Int. Cl.:

C12P 19/34 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C07H 1/08 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/028472**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14144174**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14765076 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2971032**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de extracción de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361799768 P

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

10.02.2020

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018, US**

72 Inventor/es:

GUNDLING, GERARD, J.

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 741 198 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

Composiciones y procedimientos de extracción de ácidos nucleicos

5 Antecedentes

[0001] Los procedimientos de la técnica anterior para la extracción de ácidos nucleicos a partir de materiales de origen celular y, en particular, muestras de tejido embebidas en parafina (por ejemplo, muestras embebidas en parafina fijadas con formalina: FFPE) involucran procedimientos complicados de varias etapas.

10

[0002] La extracción de ácidos nucleicos de micobacterias en el esputo, por ejemplo, es un desafío porque el esputo es muy viscoso y no se procesa fácilmente para la extracción de ácido nucleico. Las muestras de esputo se solubilizan típicamente con el tratamiento con N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC-NaOH) (Coulter and Charache, Sputum digestion/decontamination for Mycobacteriology culture - Guidelines, SMILE, John Hopkins University, 2008) y las micobacterias se acumulan por centrifugación. El tratamiento con NALC-NaOH no destruye a las micobacterias y se realiza un tratamiento adicional con calor y/o productos químicos para inactivar las muestras. Los ácidos nucleicos pueden extraerse del sedimento celular utilizando varias técnicas para lisar las células. El tratamiento con ultrasonidos (Colin, y col., Method and apparatus for ultrasonic lysis of biological cells, la patente de los EE.UU. n.º 6.686.195, 2004), batido con perlas (Melendes, y col., Cell disrupting apparatus, la patente de los EE.UU. n.º 5.464.773, 1995), enzimas (Salazar y Asenjo, Enzymatic lysis of microbial cells, Biotechnol Lett (2007) 29:985-994), mezcla (agitación con formación de vórtice), cizallamiento mecánico y soluciones caotrópicas (Das, tycol., Method for detecting pathogenic mycobacteria in clinical specimens, la patente de los EE.UU. n.º 7.638.309, 2009) son algunos de los procedimientos utilizados para romper las células sedimentadas para la extracción de ácido nucleico. Estas etapas son adicionales a los procedimientos de extracción reales y añaden complejidad y tiempo a todo el procedimiento.

25

[0003] La extracción de ácido nucleico de la levadura también es una de las técnicas más desafiantes en la preparación de muestras de ácido nucleico (por ejemplo, ADN). Las levaduras son hongos y tienen paredes celulares que son difíciles de lisar (Lipke y Ovalle, Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges, J Bacteriol 1998, 180(15):3735). Los tampones de lisis que usan sales caotrópicas y detergentes o los protocolos de lisis alcalina de la técnica anterior no son muy efectivos para lisar células de levadura directamente, pero se usan con etapas adicionales. Estas etapas adicionales se pueden dividir en dos grupos principales: procedimientos físicos y procedimientos enzimáticos. Los procedimientos físicos pueden incluir el tratamiento con ultrasonidos de las células (patente n.º 6.686.195) con o sin la presencia de partículas de molienda, agitación de alta potencia con partículas de molienda (patente de los EE.UU. n.º 5.464.773) (batido con perlas, molinos de bolas) o el uso de cizallamiento mecánico de alta presión (por ejemplo, prensa francesa de celdas de presión, como se conoce en la técnica). Los procedimientos enzimáticos se basan en enzimas particulares, tales como la zimoliasa (Salazar y Asenjo, ibid; la patente de los EE.UU. n.º 5.688.644) para debilitar las paredes celulares de modo que las células puedan ser lisadas por técnicas más convencionales.

40

[0004] La extracción, enriquecimiento y aislamiento de ácidos nucleicos del material FFPE es un procedimiento muy complicado que requiere la desparafinación del tejido con disolventes orgánicos, la digestión del tejido con proteasa y luego la extracción de los ácidos nucleicos del tejido. Estos procedimientos de la técnica anterior utilizan múltiples soluciones y múltiples etapas. Los disolventes orgánicos utilizados no suelen ser miscibles con soluciones acuosas.

45

[0005] Por lo tanto, lo que se necesita son composiciones y procedimientos que permitan la extracción, el enriquecimiento, el aislamiento y la purificación eficientes de ácidos nucleicos a partir de materiales de origen celular, particularmente muestras de micobacterias, levaduras y FFPE.

50

Resumen de la invención

[0006] Basándose en la descripción contenida en este documento, la presente invención proporciona un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular, comprendiendo dicho procedimiento: a) proporcionar i) material de origen celular que comprende material embebido en parafina fijado con formalina (FFPE) y ii) un solución de extracción acuosa que comprende uno o más monómeros de amina, un caótopo, un detergente, un tampón y un alcohol, en el que dichos monómeros de amina se seleccionan de entre el grupo que consiste en 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDBE), 1,3-diaminopropano y 3-amino-1-propanol, y en el que la concentración de monómero de amina en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 50 %; y b) poner en contacto dicho material de origen celular que comprende material FFPE con dicha solución de extracción dando como resultado la lisis del material celular y la extracción de los ácidos nucleicos.

60

[0007] La presente invención proporciona además una composición que comprende una solución de extracción acuosa adecuada para la extracción de ácidos nucleicos de material de origen celular que comprende material embebido en parafina fijada con formalina (FFPE), comprendiendo dicha composición uno o más monómeros de

65

amina; uno o más reactivos caotrópicos, uno o más detergentes y uno o más alcoholes, en la que dichos monómeros de amina se seleccionan de entre el grupo que consiste en 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDBE), 1,3-diaminopropano y 3-amino-1-propanol, y en la que la concentración de monómero de amina en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 50 %.

5

[0008] La presente invención y sus realizaciones se establecen en las reivindicaciones adjuntas.

[0009] La presente invención resuelve el problema de la técnica anterior de extracción de ácidos nucleicos proporcionando un procedimiento de una sola etapa para la extracción de ácidos nucleicos de material de origen celular que incluye bacterias, levadura y tejido embebido en parafina fijado con formalina (FFPE). En una realización, la presente invención comprende una solución de extracción acuosa capaz de lisar células y purificar ácido nucleico en una sola etapa.

10

La presente invención se refiere a un procedimiento de extracción de ácidos nucleicos que permite la extracción directa de ácidos nucleicos de muestras que incluyen tejido FFPE. Este procedimiento utiliza una combinación de disolventes orgánicos polares y no polares, así como caótopos y detergentes para solubilizar la parafina, descomponer el tejido y liberar los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se pueden capturar, por ejemplo, en partículas que contienen sílice en una única solución. Las partículas de captura, si se utilizan, pueden ser magnéticas. No hay etapas separadas de desparafinación o digestiones con proteasa en este procedimiento. Los disolventes orgánicos son completamente miscibles y no hay separación de fases en este procedimiento. El procedimiento de extracción utiliza monómeros de amina tales como 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) en combinación con una solución acuosa que contiene un caótopo tal como urea o tiocianato de guanidina y detergente. El procedimiento de extracción también puede contener, opcionalmente, otros disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido (DMSO), diversos alcoholes y limoneno. El procedimiento es extremadamente simple. La muestra (por ejemplo, una muestra de tejido FFPE) se mezcla con el tampón de extracción que contiene el monómero de amina (por ejemplo, uno o más de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDBE), 1,3-diaminopropano (DAP), 2-amino-1-butanol (AB), 2-(2-aminoetoxi)etanol (AEE), 2-amino-6-metilheptano (AMH), 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), amino-2-propanol (A2P), 1,5-diamino-2-metilpentano (DMP) y 3-amino-1-propanol (3A1P)). La mezcla se puede entibiar o calentar opcionalmente para ayudar en la liberación de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos pueden capturarse en micropartículas (u otro sustrato sólido adecuado conocido por un experto en la materia). Por ejemplo, pueden añadirse partículas magnéticas recubiertas de sílice a la mezcla y los ácidos nucleicos capturados en las partículas. Otros procedimientos de captura de los ácidos nucleicos que son conocidos por un experto en la materia también son adecuados para su uso en la presente invención. No se necesitan soluciones adicionales y no hay etapas de desparafinación o digestiones con proteasa. Las partículas se lavan (o se procesan de otro modo) para eliminar cualquier impureza y los ácidos nucleicos se liberan de las partículas de sílice con agua o una solución tampón diluida.

15

20

25

30

35

[0010] Con respecto al enriquecimiento, extracción, aislamiento y purificación de ácidos nucleicos de otras muestras de origen celular, tales como, pero sin limitarse a, micobacterias y levaduras, los procedimientos y composiciones resumidas anteriormente también son adecuados.

40

[0011] Una ventaja de la presente invención es que, a diferencia de los procedimientos de la técnica anterior, la extracción del ácido nucleico de la muestra objeto no requiere el uso de enzimas para la lisis del material celular.

[0012] La presente invención contempla un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular, comprendiendo dicho procedimiento: proporcionar i) material de origen celular y ii) una solución de extracción acuosa que comprende uno o más monómeros de amina; poner en contacto dicho material de origen celular con dicha solución de extracción dando como resultado la lisis del material celular y la extracción de los ácidos nucleicos. La presente invención también contempla que el monómero de amina es un monómero de amina primaria. La presente descripción contempla además que el monómero de amina es uno o más de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDBE), 1,3-diaminopropano (DAP), 2-amino-1-butanol (AB), 2-(2-aminoetoxi)etanol (AEE), 2-amino-6-metilheptano (AMH), 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), amino-2-propanol (A2P), 1,5-diamino-2-metilpentano (DMP) y 3-amino-1-propanol (3A1P). Se contempla además que la solución de extracción acuosa puede comprender un caótopo y que el caótopo se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol y butanol. Se contempla además que la solución de extracción acuosa puede comprender uno o más de un detergente y un alcohol y que el detergente se puede seleccionar de entre uno o más del grupo que consiste en Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecil sulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100. Además, la concentración final de dicho detergente puede ser de aproximadamente el 1 % al 15 %, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 15 % o aproximadamente el 10 %. Se contempla además que el alcohol se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en etanol y butanol y que la concentración final del alcohol es de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 40 % o de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 35 %.

45

50

55

60

[0013] Se contempla que la concentración de monómero de amina en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 50 % o de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 45 %. Se contempla además que la concentración del caótopo en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M.

65

- 5 **[0014]** La presente descripción contempla que el material de origen puede seleccionarse de entre material de origen celular vivo y material de origen celular fijo. Además, se contempla que el material de origen celular vivo puede comprender una suspensión de células y, en algunos casos, la suspensión de células individuales comprende bacterias. Las bacterias pueden comprender micobacterias. En otros casos, la suspensión de células puede comprender levadura.
- [0015]** Se contempla además que la solución de extracción acuosa de la presente invención puede estar libre de enzimas y, además, puede estar libre de proteasas.
- 10 **[0016]** Se contempla además que la solución de extracción acuosa tiene preferentemente un pH de aproximadamente 10 a aproximadamente 13 y más preferentemente un pH de aproximadamente 12 a aproximadamente 13.
- [0017]** Se contempla además que el material de origen celular fijo puede comprender material embebido en
15 parafina fijada con formalina (FFPE).
- [0018]** La presente invención contempla una solución de extracción acuosa adecuada para la extracción de ácidos nucleicos de material de origen celular, comprendiendo dicha composición uno o más monómeros de amina; uno o más reactivos caotrópicos, uno o más detergentes y uno o más disolventes orgánicos. Se contempla además
20 que el monómero de amina es un monómero de amina primaria y que el monómero de amina puede seleccionarse de entre uno o más de 2,2'-etilendioxibis(etilamina) (EDBE), 1,3-diaminopropano (DAP), 2-amino-1-butanol (AB), 2-(2-aminoetoxi)etanol (AEE), 2-amino-6-metilheptano (AMH), 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), amino-2-propanol (A2P), 1,5-diamino-2-metilpentano (DMP) y 3-amino-1-propanol (3A1P)). Se contempla además que la concentración de monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 50 %
25 o de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 45 %. Además, se contempla que el caótro se puede seleccionar de entre uno o más del grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol y butanol. Se contempla además que la concentración del caótro en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M. Se contempla además que el detergente se puede seleccionar de entre uno o más del grupo que consiste en Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecil sulfato de sodio (SDS),
30 NP-40 y Triton™ X-100 y la concentración final puede ser de aproximadamente el 1 % al 15 %, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 15 % o aproximadamente el 10 %. Se contempla además que el alcohol se puede seleccionar de entre uno o más del grupo que consiste en etanol y butanol y que la concentración final del alcohol puede ser de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 40 % o de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 35 %.
35
- [0019]** La presente descripción contempla un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular, comprendiendo dicho procedimiento: proporcionar i) material de origen celular y ii) una solución de extracción acuosa que comprende hidróxido de amonio; poner en contacto dicho material de origen celular con dicha solución de extracción dando como resultado la lisis del material celular y la extracción de los ácidos nucleicos. La
40 presente descripción contempla además que dicha solución de extracción acuosa comprende además uno o más caótrofos. La presente descripción contempla además que el caótro se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol y butanol. La presente descripción contempla además que la solución de extracción acuosa comprende además uno o más de un detergente y un alcohol. La presente descripción contempla además que el detergente se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en
45 Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100 y que la concentración del detergente es de aproximadamente el 1 % al 15 %, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 15 % o aproximadamente el 10 %. La presente descripción contempla además que el alcohol se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en etanol y butanol y que la concentración del alcohol es de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 40 % o de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 35 %. La
50 presente descripción contempla además que la concentración del caótro en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M. La presente descripción contempla además que el material de origen celular se selecciona de entre material de origen celular vivo y material de origen celular fijo. La presente descripción contempla además que el material de origen celular vivo comprende una suspensión de células individuales. La presente descripción contempla además que la suspensión de células comprende bacterias. La presente descripción
55 contempla además que las bacterias son micobacterias. La presente descripción contempla además que la suspensión de células comprende levadura. La presente descripción contempla además que la solución de extracción acuosa está libre de enzimas. La presente descripción contempla además que la solución de extracción acuosa está libre de proteasas. La presente descripción contempla además que el material de origen celular fijo comprende material embebido en parafina fijada con formalina (FFPE).
60
- [0020]** La presente invención contempla un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular, comprendiendo dicho procedimiento: proporcionar i) material de origen celular y ii) una solución de extracción acuosa que comprende uno o más de urea y tiocianato de guanidina (GITC); poner en contacto dicho material de origen celular con dicha solución de extracción dando como resultado la lisis del material celular y la extracción de los
65 ácidos nucleicos. La presente invención contempla además que la solución de extracción acuosa comprende además

uno o más de un detergente y un alcohol. La presente invención contempla además que el detergente se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100 y que la concentración de dicho detergente es de aproximadamente el 1 % al 15 %, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 15 % o aproximadamente el 10 %. La presente invención contempla además que el alcohol se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en etanol y butanol y que la concentración de dicho alcohol es de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 40 % o de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 35 %. La presente invención contempla además que la concentración total del uno o más de urea y tiocianato de guanidina (GITC) en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M. La presente descripción contempla además que el material de origen celular se selecciona de entre material de origen celular vivo y material de origen celular fijo. La presente descripción contempla además que el material de origen celular vivo comprende una suspensión de células individuales. La presente descripción contempla además que la suspensión de células comprende bacterias. La presente descripción contempla además que las bacterias son micobacterias. La presente descripción contempla además que la suspensión de células comprende levadura. La presente invención contempla además que la solución de extracción acuosa está libre de enzimas. La presente invención contempla además que la solución de extracción acuosa está libre de proteasas. La presente invención contempla además que el material de origen celular fijo comprende material embebido en parafina fijada con formalina (FFPE). La solución de extracción acuosa de la presente descripción este caso también puede comprender un monómero de amina en una concentración del 15 % a aproximadamente el 50 % o de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 45 %.

[0021] La presente descripción contempla un procedimiento de inactivación y muerte de *mycobacterium*, comprendiendo dicho procedimiento: proporcionar i) material de origen celular que comprende *mycobacterium* y ii) una solución de extracción acuosa que comprende uno o más monómeros de amina; poner en contacto dicho material de origen celular con dicha solución de extracción dando como resultado la lisis del material celular y la extracción de los ácidos nucleicos. La presente descripción contempla además que el monómero de amina es un monómero de amina primaria. La presente descripción contempla además que el monómero de amina es 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDBE). La presente descripción contempla además que el monómero de amina es 1,3-diaminopropano. La presente descripción contempla además que el monómero de amina es 3-amino-1-propanol. La presente descripción contempla además que el monómero de amina es 2-amino-1-butanol (AB), 2-(2-aminoetoxi)etanol (AEE), 2-amino-6-metilheptano (AMH), 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), amino-2-propanol (A2P), 1,5-diamino-2-metilpentano (DMP). La presente descripción contempla además que la solución de extracción acuosa comprende además un caótropro. La presente descripción contempla además que el caótropro se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol y butanol. La presente descripción contempla además que la solución de extracción acuosa comprende además uno o más de un detergente y un alcohol. La presente descripción contempla además que el detergente se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100. La presente descripción contempla además que la concentración de dicho detergente es de aproximadamente el 1 % al 15 %, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 15 % o aproximadamente el 10 %. La presente descripción contempla además que el alcohol se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en etanol y butanol. La presente descripción contempla además que la concentración de dicho alcohol es de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 40 % o de aproximadamente el 20 a aproximadamente el 35 %. La presente descripción contempla además que la concentración de monómero de amina en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 50 % o de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 45 %. La presente descripción contempla además que la concentración del caótropro en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M. La presente descripción contempla además que el material origen que comprende *mycobacterium* comprende una suspensión de células individuales. La presente descripción contempla además que la solución de extracción acuosa está libre de enzimas. La presente descripción contempla además que la solución de extracción acuosa está libre de proteasas. La presente descripción contempla además que el procedimiento extrae además ácido nucleico de dicha *mycobacterium*.

[0022] La presente invención también contempla que el material origen puede comprender muestras analizadas previamente mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH). FISH es conocido por los expertos en la materia. El análisis FISH se puede utilizar, por ejemplo, para la preselección de objetivos o como un ensayo complementario. Las muestras positivas para objetivos pueden luego cuantificarse mediante la extracción del ácido nucleico con las composiciones y procedimientos de la presente invención seguidos, por ejemplo, por PCR.

[0023] En una realización, la presente invención contempla un procedimiento de extracción de ácido nucleico de un material de origen celular, comprendiendo dicho procedimiento: proporcionar i) material de origen celular y ii) una solución de extracción acuosa que comprende uno o más monómeros de amina; poner en contacto dicho material de origen celular con dicha solución de extracción dando como resultado la lisis del material celular y la extracción de los ácidos nucleicos. La presente invención contempla además que el monómero de amina es un monómero de amina primaria. La presente invención contempla además que el monómero de amina es 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDBE). La presente invención contempla además que el monómero de amina se selecciona de entre uno o más de 1,3-diaminopropano y 3-amino-1-propanol. La presente invención contempla además que la solución de extracción acuosa comprende además un caótropro. La presente invención contempla además que el caótropro se selecciona de

entre uno o más del grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol y butanol. La presente invención contempla además que la solución de extracción acuosa comprende además uno o más de un detergente y un alcohol. La presente invención contempla además que el detergente se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100. La presente invención contempla además que el detergente es de aproximadamente el 8 % v/v a aproximadamente el 15 % v/v. La presente invención contempla además que el alcohol se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en etanol y butanol. La presente invención contempla además que la concentración de dicho alcohol es de aproximadamente el 15 % v/v a aproximadamente el 25 % v/v. La presente invención contempla además, que la concentración de monómero de amina en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 30 % v/v a aproximadamente el 50 % v/v. La presente invención contempla además que la concentración del caótropro en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M. La presente descripción contempla además que el material de origen celular se selecciona de entre material de origen celular vivo y material de origen celular fijo. La presente descripción contempla además que el material de origen celular vivo comprende una suspensión de células individuales. La presente descripción contempla además que la suspensión de células comprende bacterias. La presente descripción contempla además que las bacterias son micobacterias. La presente descripción contempla además que la suspensión de células comprende levadura. La presente invención contempla además que la solución de extracción acuosa está libre de enzimas. La presente invención contempla además que la solución de extracción acuosa está libre de proteasas. La presente invención contempla además que el material de origen celular fijo comprende material embebido en parafina fijada con formalina (FFPE).

[0024] La presente invención contempla una composición que comprende una solución de extracción acuosa adecuada para la extracción de ácidos nucleicos de material de origen celular, comprendiendo dicha composición uno o más monómeros de amina; uno o más reactivos caotrópicos, uno o más detergentes y uno o más disolventes orgánicos. La presente invención contempla además que el monómero de amina es un monómero de amina primaria. La presente invención contempla además que el monómero de amina es 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDBE). La presente invención contempla además que el monómero de amina se selecciona de entre uno o más de 1,3-diaminopropano y 3-amino-1-propanol. La presente invención contempla además que la solución de extracción acuosa comprende además un caótropro. La presente invención contempla además que el caótropro se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol y butanol. La presente invención contempla además que la solución de extracción acuosa comprende además uno o más de un detergente y un alcohol. La presente invención contempla además que el detergente se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100. La presente invención contempla además que el detergente es de aproximadamente el 8 % v/v a aproximadamente el 15 % v/v. La presente invención contempla además que el alcohol se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en etanol y butanol. La presente invención contempla además que la concentración de dicho alcohol es de aproximadamente el 15 % v/v a aproximadamente el 25 % v/v. La presente invención contempla además, que la concentración de monómero de amina en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 30 % v/v a aproximadamente el 50 % v/v. La presente invención contempla además que la concentración del caótropro en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M.

[0025] La presente descripción contempla un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular, comprendiendo dicho procedimiento: proporcionar i) material de origen celular y ii) una solución de extracción acuosa que comprende hidróxido de amonio; poner en contacto dicho material de origen celular con dicha solución de extracción dando como resultado la lisis del material celular y la extracción de los ácidos nucleicos. La presente descripción contempla además que la solución de extracción acuosa comprende además un caótropro. La presente descripción contempla además que el caótropro se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol y butanol. La presente descripción contempla además que la solución de extracción acuosa comprende además uno o más de un detergente y un alcohol. La presente descripción contempla además que el detergente se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X100. La presente descripción contempla además que el detergente es de aproximadamente el 8 % v/v a aproximadamente el 15 % v/v. La presente descripción contempla además que el alcohol se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en etanol y butanol. La presente descripción contempla además que la concentración de dicho alcohol es de aproximadamente el 15 % v/v a aproximadamente el 25 % v/v. La presente descripción contempla además que la concentración del caótropro en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M. La presente descripción contempla además que el material de origen celular se selecciona de entre material de origen celular vivo y material de origen celular fijo. La presente descripción contempla además que el material de origen celular vivo comprende una suspensión de células individuales. La presente descripción contempla además que la suspensión de células comprende bacterias. La presente descripción contempla además que las bacterias son micobacterias. La presente descripción contempla además que la suspensión de células comprende levadura. La presente descripción contempla además que la solución de extracción acuosa está libre de enzimas. La presente descripción contempla además que la solución de extracción acuosa está libre de proteasas. La presente descripción contempla además que el material de origen celular fijo comprende material embebido en parafina fijada con formalina (FFPE).

[0026] La presente invención contempla un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen

celular, comprendiendo dicho procedimiento: proporcionar i) material de origen celular y ii) una solución de extracción acuosa que comprende uno o más de urea y tiocianato de guanidina (GITC); poner en contacto dicho material de origen celular con dicha solución de extracción dando como resultado la lisis del material celular y la extracción de los ácidos nucleicos. La presente invención contempla además que la solución de extracción acuosa comprende además
5 uno o más de un detergente y un alcohol. La presente invención contempla además que el detergente se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100. La presente invención contempla además que el detergente es de aproximadamente el 8 % v/v a aproximadamente el 15 % v/v. La presente invención contempla además que el alcohol se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en etanol y butanol. La presente invención contempla
10 además que la concentración de dicho alcohol es de aproximadamente el 15 % v/v a aproximadamente el 25 % v/v. La presente invención contempla además que la concentración total del uno o más de urea y tiocianato de guanidina (GITC) en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M. La presente descripción contempla además que el material de origen celular se selecciona de entre material de origen celular vivo y material de origen celular fijo. La presente descripción contempla además que el material de origen celular vivo
15 comprende una suspensión de células individuales. La presente descripción contempla además que la suspensión de células comprende bacterias. La presente descripción contempla además que las bacterias son micobacterias. La presente descripción contempla además que la suspensión de células comprende levadura. La presente invención contempla además que la solución de extracción acuosa está libre de enzimas. La presente invención contempla además que la solución de extracción acuosa está libre de proteasas. La presente invención contempla además que
20 el material de origen celular fijo comprende material embebido en parafina fijada con formalina (FFPE).

[0027] La presente descripción contempla un procedimiento de inactivación y muerte de *mycobacterium*, comprendiendo dicho procedimiento: proporcionar i) material de origen celular que comprende *mycobacterium* y ii) una solución de extracción acuosa que comprende uno o más monómeros de amina; poner en contacto dicho material
25 de origen celular con dicha solución de extracción dando como resultado la lisis del material celular y la extracción de los ácidos nucleicos. La presente descripción contempla además que el monómero de amina es un monómero de amina primaria. La presente descripción contempla además que el monómero de amina es 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDBE). La presente descripción contempla además que el monómero de amina se selecciona de entre uno o más de 1,3-diaminopropano y 3-amino-1-propanol. La presente descripción contempla
30 además que la solución de extracción acuosa comprende además un caótropro. La presente descripción contempla además que el caótropro se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol y butanol. La presente descripción contempla además que la solución de extracción acuosa comprende además uno o más de un detergente y un alcohol. La presente descripción contempla además que el detergente se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio
35 y dodecilsulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100. La presente descripción contempla además que el detergente es de aproximadamente el 8 % v/v a aproximadamente el 15 % v/v. La presente descripción contempla además que el alcohol se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en etanol y butanol. La presente descripción contempla además que la concentración de dicho alcohol es de aproximadamente el 15 % v/v a aproximadamente el 25 % v/v. La presente descripción contempla además, que la concentración de monómero de amina en dicha solución
40 de extracción acuosa es de aproximadamente el 30 % v/v a aproximadamente el 50 % v/v. La presente descripción contempla además que la concentración del caótropro en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M. La presente descripción contempla además que el material origen que comprende *mycobacterium* comprende una suspensión de células individuales. La presente descripción contempla además que la solución de extracción acuosa está libre de enzimas. La presente descripción contempla además que la solución de
45 extracción acuosa está libre de proteasas. La presente descripción contempla además que el procedimiento extrae además ácido nucleico de dicha *mycobacterium*.

[0028] La presente invención contempla un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto material de origen celular con una solución de
50 extracción acuosa capaz de la lisis del material celular y la extracción del ácido nucleico en una sola etapa, en el que dicha solución de extracción acuosa comprende un disolvente que contiene nitrógeno.

[0029] La presente invención contempla un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular de tejido fijo, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto material de origen celular con una solución
55 de extracción acuosa capaz de la lisis del material celular y la extracción del ácido nucleico en una sola etapa, en el que dicha solución de extracción acuosa comprende un disolvente que contiene nitrógeno.

[0030] La presente invención contempla un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular bacteriano, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto material de origen celular con una solución
60 de extracción acuosa capaz de la lisis del material celular y la extracción del ácido nucleico en una sola etapa, en el que dicha solución de extracción acuosa comprende un disolvente que contiene nitrógeno.

[0031] La presente invención contempla un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular de levadura, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto material de origen celular con una solución
65 de extracción acuosa capaz de la lisis del material celular y la extracción del ácido nucleico en una sola etapa, en el

que dicha solución de extracción acuosa comprende un disolvente que contiene nitrógeno.

Breve descripción de las figuras

5 [0032]

La figura 1 muestra las curvas de amplificación de los ensayos del ejemplo 1.

La figura 2 muestra los resultados de un análisis ANOVA de una vía en los datos de la figura 1.

La figura 3 muestra las curvas de amplificación de los ensayos del ejemplo 2.

10 La figura 4 muestra los resultados de un análisis ANOVA de una vía en los datos de la figura 3.

La figura 5 muestra las curvas de amplificación de los ensayos del ejemplo 3.

La figura 6 muestra los resultados de un análisis ANOVA de una vía en los datos de la figura 5.

La figura 7 muestra los resultados de la concentración de ADN después de la extracción de levadura del ejemplo 4.

La figura 8 muestra las curvas de amplificación para los ensayos del ejemplo 4.

15 La figura 9 muestra los resultados de un análisis ANOVA de una vía en los datos de la figura 8.

La figura 10 muestra las curvas de amplificación para los ensayos del ejemplo 5.

La figura 11 muestra la extracción de ADN de los bucles de 5 micrómetros de FFPE (no montados en portaobjetos de vidrio) de muestras de cáncer colorrectal (CRC) por Qiagen, Promega y el protocolo de extracción con disolvente de amina (3A1P) de la presente invención.

20 La figura 12 muestra el deltaCt (dCt) de las muestras analizadas para la figura 11.

La figura 13 muestra la extracción de ADN de los bucles de 5 micrómetros de FFPE (no montados en portaobjetos de vidrio) de muestras de cáncer de pulmón por Qiagen, Promega y el protocolo de extracción con disolvente de amina (3A1P) de la presente invención.

La figura 14 muestra el deltaCt (dCt) de las muestras analizadas para la figura 13.

25 La figura 15 muestra la extracción de ADN de los bucles de 5 micrómetros de FFPE (no montados en portaobjetos de vidrio) de muestras de melanoma por Qiagen, Promega y el protocolo de extracción con disolvente de amina (3A1P) de la presente invención.

La figura 16 muestra el deltaCt (dCt) de las muestras analizadas para la figura 15.

La figura 17 muestra el protocolo de extracción con disolvente de amina utilizado en muestras FFPE montadas en portaobjetos. Las muestras fueron de control interno del virus de la hepatitis B (HBV-IC; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Estos portaobjetos se eligieron porque la cantidad de ADN es una variable conocida. Los portaobjetos IC del VHB se extrajeron en LB-EtOH-3A1P, se aislaron con las CSC o se incubaron en LB-3A1P con portaobjetos de vidrio antes del aislamiento del ADN, se añadió EtOH después de la extracción. La figura muestra que los portaobjetos de vidrio unían una cantidad sustancial de ADN.

30 La figura 18 muestra que la adición de micropartículas magnéticas (MMP) durante el procedimiento de extracción resultó en una recuperación que fue equivalente a la recuperación sin portaobjetos de vidrio.

La figura 19 muestra un experimento equivalente en portaobjetos de vidrio de tumor de mama FFPE.

La figura 20 muestra la extracción de 1 a 4 portaobjetos, lo que demuestra que la recuperación se puede aumentar con la adición de portaobjetos al procedimiento de extracción.

40 La figura 21 muestra un análisis ANOVA de una vía de los datos en la figura 20.

La figura 22 (A & B) muestra los resultados de un análisis de una vía de los datos por disolvente para *C. albicans* y *S. aureus*, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

45

[0033] En una realización, la presente invención comprende una solución de extracción acuosa capaz de lisar células y purificar ácido nucleico en una sola etapa. A este respecto, la presente invención proporciona procedimientos y composiciones adecuados para la extracción de ácidos nucleicos de materiales de origen celular utilizando una solución de extracción acuosa o de base acuosa (composición de extracción), comprendiendo dicha solución de extracción uno o más compuestos que tienen al menos un grupo nitrogenado. En una realización preferida, el compuesto es un monómero de amina. Acuosa y de base acuosa se define como que tiene agua como disolvente. Sin embargo, esto no excluye la inclusión de componentes no acuosos siempre que sean miscibles en agua.

50

[0034] El término "material de origen celular" se define en este documento como cualquier material biológico que comprende células o, en algunos casos, materia celular (es decir, constituyentes celulares previamente lisados). El material de origen celular puede ser nuevo (es decir, no fijo) o puede fijarse mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia. La fijación con formalina (y los procedimientos que usan otros aldehídos) es un procedimiento de fijación común, aunque existen otros procedimientos y son conocidos por los expertos en la materia. El material de origen celular también puede estar compuesto por uno o más tejidos.

60

[0035] "Extracción de ácido(s) nucleico(s)" significará, en este documento, la liberación de los ácidos nucleicos del material de origen celular en cantidad suficiente de otros componentes celulares en la medida en que puedan eliminarse del lisado para un procesamiento adicional, si se desea. En otras palabras, los ácidos nucleicos están enriquecidos.

65

[0036] “Enriquecido” o “enriquecimiento” con respecto a los ácidos nucleicos de la presente invención significará que los ácidos nucleicos están en una mayor concentración en relación con los otros continuos del material de origen celular que antes de que el material celular esté sujeto a los procedimientos y composiciones. de la presente invención. En otras palabras, los ácidos nucleicos están “parcialmente purificados” o “parcialmente aislados”.

5

[0037] “Purificación” o “purificar” con respecto a los ácidos nucleicos de la presente invención significará la eliminación de continuos del material de origen celular de una muestra. Como se usa en este documento, el término “purificado” se refiere a secuencias de ácido nucleico que se eliminan de su entorno natural, se aíslan o se separan. “Aislamiento” y “purificación” con respecto a los ácidos nucleicos de la presente invención significará que los ácidos nucleicos están más de un 10 % libres, más de un 20 % libres, más de un 30 % libres, más de un 40 % libres, más de un 50 % libres, más de un 60 % libres, más de un 70 % libres, más de un 80 % libres, más de un 90 % libres, más de un 95 % libres y más de un 99 % libres de otros componentes celulares con los que están asociados de forma natural.

10

[0038] “Etapa única”, como se usa en este documento, pretende referirse a un procedimiento de extracción de ácido nucleico del material de origen celular, mediante el cual el ADN se libera del material y se enriquece o purifica, en una sola etapa.

15

[0039] En una realización de la presente invención relacionada con tejido fijo, el procedimiento de una sola etapa descrito en este documento elimina la necesidad de una desparafinización separada de los materiales o una digestión enzimática de los materiales para liberar el ADN. En determinadas realizaciones, el ADN se captura en un soporte sólido (por ejemplo, una superficie que contiene sílice) sin la necesidad de desparafinizar los materiales o una digestión enzimática de los materiales para liberar el ADN. En una realización de la presente invención relacionada con tejido fijo, el procedimiento de una sola etapa descrito en este documento elimina la necesidad de otros procedimientos de lisis o una digestión enzimática del material. En determinadas realizaciones, el ADN se captura en un soporte sólido (por ejemplo, una superficie que contiene sílice) sin la necesidad de una lisis de la muestra para liberar el ADN del material de origen celular. En determinadas realizaciones, el ADN de levadura se captura en un soporte sólido (por ejemplo, una superficie que contiene sílice) sin la necesidad de una lisis de la muestra para liberar el ADN del material de origen celular. En una realización de la presente invención relacionada con material de origen celular bacteriano, el procedimiento de una sola etapa descrito en este documento elimina la necesidad de otros procedimientos de lisis o una digestión enzimática del material. En determinadas realizaciones, el ADN se libera del material y se enriquece o purifica, sin necesidad de inactivación de las bacterias. En determinadas realizaciones diferentes, el ADN se captura en un soporte sólido (por ejemplo, una superficie que contiene sílice) sin la necesidad de una lisis de la muestra o una digestión enzimática del material para liberar el ADN del material de origen celular.

20

25

30

35

[0040] La presente invención no se limita a ninguna fuente particular de material de origen celular. El material de origen celular puede obtenerse de cualquier tipo de célula o tejido que contenga ácido nucleico. Esto incluye virus y células que contienen virus, bacterias (por ejemplo, una o más de *Mycobacteria spp.*, por ejemplo, *M. tuberculosis*) y células que contienen bacterias, todas las demás células procarióticas, levadura (por ejemplo, una o más de *Saccharomyces spp.* o *Candida spp.*, por ejemplo, *C. albicans*), todos los demás hongos, células botánicas (es decir, plantas) y células animales, etc. El material de origen celular puede obtenerse recientemente y ser vivo o puede no estar vivo. Del mismo modo, el material de origen celular puede ser muestras conservadas a través de compuestos de conservación y fijación y técnicas conocidas por los expertos en la materia, cuyo breve resumen se puede encontrar a continuación. Los tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina (FFPE) son especialmente adecuados para su uso en la presente invención. Los procedimientos y composiciones de la presente invención lisan las micobacterias y otros organismos patógenos, matándolos y disminuyendo o eliminando el peligro de contaminación de la muestra.

40

45

[0041] La presente invención no requiere ningún tratamiento previo o manipulación previa de material de origen celular nuevo (es decir, no fijo). Además, si se utilizan procedimientos de tratamiento previo o de manipulación previa, la presente invención no se limita a ningún procedimiento de tratamiento previo o manipulación de extracción previa en particular. Sin embargo, en algunos casos, el tratamiento previo o la manipulación previa del material de origen celular puede ser ventajoso. Por ejemplo, puede ser deseable concentrar las células suspendidas por centrifugación. Además, los tejidos grandes (nuevos, fijos o fijos y embebidos) son más fáciles de manipular si se procesan (por ejemplo se cortan o trituran) en secciones más pequeñas. Los procedimientos adecuados para el preprocesamiento de muestras son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con ultrasonidos de células (patente n.º 6.686.195) con o sin la presencia de partículas de molienda, mezcla (por ejemplo, agitación con formación de vórtice), agitación de alta potencia con partículas de molienda (patente de los EE.UU. n.º 5.464.773) (batido con perlas, molinos de bolas) o el uso de cizallamiento mecánico de alta presión (por ejemplo, prensa francesa de celdas de presión, como se conoce en la técnica). Además, los procedimientos enzimáticos que utilizan enzimas particulares como la zimoliasa (Salazar y Asenjo, *ibid*; patente de los EE.UU. n.º 5.688.644) debilitan las paredes celulares. Aún más, si se está seleccionando un tipo de célula particular, se puede preferir el aislamiento de ese tipo de célula particular de una población más grande. Sin embargo, estos procedimientos se sugieren para facilitar la manipulación y la conveniencia y no porque la presente invención requiera un tratamiento previo o una manipulación previa.

50

55

60

[0042] En una realización de la presente invención, la presente invención usa una solución de extracción (composición) que comprende uno o más monómeros de amina. Aunque la presente invención no se limita a ninguna

65

teoría particular, en el contexto de la presente invención se cree que el reactivo que tiene uno o más monómeros de amina actúa como un disolvente. Los ejemplos de reactivos que comprenden uno o más monómeros de amina son, por ejemplo, incluyen 2,2'-etilendioxibis(etilamina): $C_6H_{16}N_2O_2$ (EDBE). EDBE es un monómero de amina primaria. Además, la presente descripción no se limita a ningún monómero de amina particular o monómero de amina primaria.

5 Por ejemplo, el monómero de amina primaria diaminopropano (por ejemplo, 1,2-diaminopropano y 1,3-diaminopropano) también es útil en la presente descripción, como se ejemplifica a continuación. Además, el 3-amino-1-propanol (3A1P) es útil en la presente invención, como se ejemplifica a continuación, y muestra una toxicidad más baja que los otros dos monómeros de amina mencionados anteriormente. La concentración final del monómero de amina en la solución de extracción de la presente descripción es de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el
10 50 % o de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 45 % o aproximadamente el 40 %. Los resultados preliminares sugieren que el hidróxido de amonio (NH_4OH) es eficaz como sustituto de los monómeros de amina, aunque con una efectividad reducida.

[0043] Con respecto a la presente invención, una "amina primaria" se define como una amina en la que solo se ha reemplazado uno de los átomos de hidrógeno en la molécula de amoníaco. Eso significa que la fórmula de la amina
15 primaria será RNH_2 . Una amina secundaria se define como una amina en la que se han reemplazado dos de los átomos de hidrógenos en la molécula de amoníaco. Eso significa que la fórmula de la amina primaria será $RNHR$. Una "amina terciaria" se define como una amina en la que se han reemplazado tres de los átomos de hidrógenos en la molécula de amoníaco. Un "monómero de amina" es un compuesto que tiene uno o más grupos amina.
20

[0044] En otros casos, se contempla que pueden usarse combinaciones de reactivos en las soluciones de extracción acuosa de la presente descripción con resultados adecuados. Por ejemplo, los monómeros de amina explicados anteriormente (uno o más de 2,2'-etilendioxibis(etilamina) (EDBE), 1,3-diaminopropano (DAP), 2-amino-1-butanol (AB), 2-(2-aminoetoxi)etanol (AEE), 2-amino-6-metilheptano (AMH), 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP),
25 amino-2-propanol (A2P), 1,5-diamino-2-metilpentano (DMP) y 3-amino-1-propanol (3A1P) se pueden usar con urea y/o GITC y/o NH_4OH . Un experto en la materia es capaz de determinar las concentraciones y condiciones aceptables con solo la experimentación habitual.

[0045] En otro caso, se contempla que las soluciones de extracción acuosas de la presente descripción pueden comprender urea y/o GITC sin la adición de un monómero de amina. De nuevo, un experto en la materia será capaz de determinar las concentraciones y condiciones aceptables con solo la experimentación habitual.
30

[0046] La solución de extracción (composición) de la presente invención también puede, opcionalmente, comprender otros disolventes orgánicos tales como, por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO), alcoholes y limoneno. La concentración final del disolvente orgánico en la composición de extracción de la presente invención, si está presente, es de aproximadamente el 10 % al 30 %, de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 25 % o aproximadamente el 20 %.
35

[0047] La solución de extracción (composición) de la presente invención también puede comprender un agente caotrópico tal como, por ejemplo, urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol o butanol. Otros son conocidos por los expertos en la materia. Un agente caotrópico es una sustancia que altera la estructura y desnaturaliza macromoléculas tales como las proteínas. Los agentes caotrópicos actúan interfiriendo con las interacciones intermoleculares mediadas por la fuerza no covalente, tales como los enlaces de hidrógeno. La concentración final del agente caotrópico en la composición de extracción de la presente invención es de aproximadamente 3,0 M a aproximadamente 6,0 M, de
45 aproximadamente 4,0 M a aproximadamente 5,0 M o aproximadamente 4,7 M.

[0048] Además, la solución de extracción (composición) de la presente invención comprende uno o más detergentes. Los detergentes se caracterizan por una cabeza hidrófila y una cola hidrófoba. Los detergentes se utilizan típicamente en el trabajo celular y tisular. Se prefieren los detergentes no iónicos. Los detergentes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La concentración final del detergente en la composición de extracción de la presente invención es de aproximadamente el 1 % al 15 %, de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 15 % o aproximadamente el 10 %. Aunque la presente invención no está limitada por la teoría, en general se piensa que concentraciones moderadas de detergentes suaves (es decir, no
55 iónicos) comprometen la integridad de las membranas celulares facilitando así la lisis de células y la extracción de componentes solubles.

[0049] El pH de la solución de lisis de la presente invención es superior a aproximadamente 7. El pH de la solución de lisis de la presente invención puede ser tan alto como aproximadamente pH 10-13 o 12-13. El pH puede ajustarse y mantenerse mediante la selección de los componentes de la composición de extracción de la presente invención o mediante el uso de tampones. El uso de tampones es bien conocido por los expertos en la materia. Un tampón ejemplar es Tris-HCL.
60

[0050] Además, a diferencia de los procedimientos de la técnica anterior, el presente procedimiento se puede realizar sin el uso de enzimas (por ejemplo, proteasas) para la descomposición de, por ejemplo, tejidos, aunque el uso
65

de enzimas no está contraindicado.

[0051] La mezcla se puede entibiar o calentar opcionalmente para ayudar en la liberación de los ácidos nucleicos. La temperatura utilizada puede variar de aproximadamente 70 °C a aproximadamente 90 °C y de 5 aproximadamente 80 °C a aproximadamente 90 °C y temperaturas de aproximadamente 85 °C.

[0052] La presente invención es adecuada para su uso en células y tejidos fijos. Los ejemplos de agentes fijadores y procedimientos de fijación no limitantes incluyen, por ejemplo, fijadores de reticulación (por ejemplo, aldehídos, tales como glutaraldehído, formaldehído (formalina), etc.). Los fijadores de reticulación actúan creando 10 enlaces químicos covalentes entre las proteínas del tejido. Estos fijadores de reticulación, especialmente el formaldehído, tienden a conservar la estructura secundaria de las proteínas y también pueden proteger una estructura terciaria significativa. También se conocen fijadores precipitantes (o desnaturalizantes) tales como metanol, etanol, ácido acético y acetona.

15 **[0053]** Los fijadores oxidantes pueden reaccionar con diversas cadenas laterales de proteínas y otras biomoléculas, lo que permite la formación de enlaces cruzados que estabilizan la estructura del tejido. El tetróxido de osmio, el dicromato de potasio, el ácido crómico y el permanganato de potasio encuentran uso en determinadas preparaciones histológicas específicas.

20 **[0054]** El efecto de protección del disolvente orgánico mediado por el tampón ácido hepes glutámico (HOPE) proporciona una morfología similar a la formalina, una excelente conservación de antígenos proteicos para inmunohistoquímica e histoquímica enzimática, buenos rendimientos de ARN y ADN y ausencia de proteínas reticulantes.

25 **[0055]** La muestra de material de origen celular fijo, tales como las muestras de tejido y células, a menudo se embeben para conservar toda la estructura y proporcionar soporte para el procesamiento posterior. Tradicionalmente, tales muestras se han embebido en parafina. Las muestras de material de origen celular fijo típicamente se fijan en, por ejemplo, formalina antes de la incrustación en parafina, creando muestras embebidas en parafina y fijadas con 30 formalina (FFPE). Los procedimientos para la fijación de células y tejidos y la incrustación de células y tejidos son conocidos para un experto en la materia (véase, por ejemplo, Leeson y Leeson, *Histología*, 1981, WB Saunders Co., páginas 6-8 y en World Wide Web en en.wikipedia.org/wiki/Histology#Embedding). En la técnica anterior, la extracción de ácido nucleico de material de origen celular FFPE se ha realizado únicamente mediante el uso de procedimientos difíciles, de muchas etapas y que requieren mucho tiempo. Las composiciones y procedimientos de la presente invención se dirigen hacia un procedimiento simplificado y eficiente.

35 **[0056]** La presente invención se dirige hacia un procedimiento nuevo y no obvio que elimina la necesidad de las etapas de desparafinación y digestión con proteasa de los tejidos para la extracción, enriquecimiento, aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos. Se utiliza una única solución de base acuosa para la extracción y unión de los ácidos nucleicos a una matriz sólida (si se desea la unión). Los disolventes orgánicos contenidos en la solución son 40 completamente miscibles sin separación de fases de los disolventes orgánicos. El tejido FFPE se mezcla con la solución, el tejido se rompe, los ácidos nucleicos se liberan y los ácidos nucleicos se capturan, por ejemplo, en una matriz sólida tal como una matriz sólida que contiene sílice o se eliminan de la solución por cualquier otro procedimiento conocido para los expertos en la materia. La matriz puede ser partículas y puede ser partículas magnéticas. Una vez que los ácidos nucleicos se capturan en la matriz sólida, el procedimiento utiliza etapas de lavado simples y la elución 45 de los ácidos nucleicos de la matriz para la purificación o uso final. El ácido nucleico extraído puede purificarse adicionalmente, si se desea, mediante procedimientos conocidos por un experto en la materia.

[0057] El ácido nucleico extraído se puede usar por cualquier procedimiento conocido por los expertos en la materia. Los ejemplos de tales usos incluyen ensayos de hibridación (transferencias Northern, transferencias 50 Southern, etc.), ensayos de amplificación (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de los EE.UU. n.º 4.683.195), secuenciación, copia, incorporación a vectores de expresión o cualquier combinación útil de los mismos. Además, las composiciones y los procedimientos de la presente invención son adecuados para su uso en muestras previamente utilizadas para el análisis FISH (hibridación fluorescente *in situ*) u otro protocolo en el que el ácido nucleico no se destruye.

55 **[0058]** Todas las citas (patentes, publicaciones de solicitudes de patentes, artículos de revistas, libros de texto y otras publicaciones) mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la materia a los que se refiere la descripción.

60 **[0059]** La invención descrita ilustrativamente en este documento se puede poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento(s) o limitación(es), que no se describe específicamente en este documento. Así, por ejemplo, cada caso en este documento de cualquiera de las expresiones “que comprende”, “que consiste esencialmente en” y “que consiste en” se puede reemplazar con cualquiera de los otros dos términos. Del mismo modo, las formas singulares “un”, “una” y “el”, “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique 65 claramente lo contrario. Así, por ejemplo, las referencias a “el procedimiento” incluyen uno o más procedimientos y/o

etapas del tipo, que se describen en este documento y/o que serán evidentes para los expertos en la materia al leer la descripción.

Realizaciones de la extracción de ácido nucleico de material de origen celular en una sola etapa

5

[0060] En una realización, la presente invención se dirige a un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto material de origen celular con una solución de extracción acuosa capaz de la lisis del material celular y la extracción del ácido nucleico en una sola etapa. En un caso, la solución de extracción acuosa comprende un disolvente que contiene nitrógeno seleccionado de entre uno o más monómeros de amina y una o más amidas. En un caso, la solución de extracción acuosa comprende un monómero de amina y una amida. En otra realización, la solución de extracción acuosa comprende un monómero de amina primaria. En una realización, el monómero de amina es 2,2'-(etilendioxo)bis(etilamina) (EDBE). En una realización, el monómero de amina es 1,3-diaminopropano. En una realización, el monómero de amina es 3-amino-1-propanol. En una realización, se usan simultáneamente dos o más monómeros de amina. En un caso, el monómero de amina se selecciona de entre uno o más de 2,2'-(etilendioxo)bis(etilamina) (EDBE), 1,3-diaminopropano (DAP), 2-amino-1-butanol (AB), 2-(2-aminoetoxi)etanol (AEE), 2-amino-6-metilheptano (AMH), 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), amino-2-propanol (A2P), 1,5-diamino-2-metilpentano (DMP) y 3-amino-1-propanol (3A1P). En un caso, la concentración del monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 50 %. En una realización, la concentración del monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 45 %. En una realización, la concentración del monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 45 % a aproximadamente el 50 %. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende además un caótropro. En una realización, el caótropro se selecciona de entre el grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol y butanol. En una realización, el caótropro en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M. En una realización, el caótropro en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4,5 M a aproximadamente 5 M. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende además uno o más de un detergente y un alcohol. Los detergentes adecuados incluyen Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100. Los alcoholes adecuados incluyen etanol, butanol. En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 15 % o de aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 15 %. En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 15 %. En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 12 % y aproximadamente el 15 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 15 % y aproximadamente el 25 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 40 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 25 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 23 % y aproximadamente el 25 %. En otra realización, el material de origen celular se selecciona de entre el grupo que consiste en tejido, tejido animal, tejido de mamífero, tejido humano, tejido tumoral humano, tejido humano que contiene virus, tejido humano fijo, células animales, células de mamífero, células humanas, células humanas que contienen virus, bacterias, micobacterias, hongo, levadura y tejidos vegetales o células vegetales, células que contiene la sangre, células que contiene el esputo.

Realizaciones de la extracción de ácido nucleico de material de origen celular de tejido fijo en una sola etapa

45 **[0061]** En una realización, la presente invención se dirige a un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular de tejido fijo, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto material de origen celular con una solución de extracción acuosa capaz de la lisis del material celular y la extracción del ácido nucleico en una sola etapa. En una realización, el material de origen celular fijo es tejido embebido en parafina fijado con formalina. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende un disolvente que contiene nitrógeno
50 seleccionado de entre uno o más monómeros de amina y una o más amidas. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende un monómero de amina y una amida. En otra realización, la solución de extracción acuosa comprende un monómero de amina primaria. En una realización, el monómero de amina es 2,2'-(etilendioxo)bis(etilamina) (EDBE). En una realización, el monómero de amina es 1,3-diaminopropano. En una realización, el monómero de amina es 3-amino-1-propanol. En una realización, se usan simultáneamente dos o más
55 monómeros de amina. En un caso, el monómero de amina se selecciona de entre uno o más de 2,2'-(etilendioxo)bis(etilamina) (EDBE), 1,3-diaminopropano (DAP), 2-amino-1-butanol (AB), 2-(2-aminoetoxi)etanol (AEE), 2-amino-6-metilheptano (AMH), 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), amino-2-propanol (A2P), 1,5-diamino-2-metilpentano (DMP) y 3-amino-1-propanol (3A1P). En un caso, la concentración del monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 50 %. En una realización, la
60 concentración del monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 45 %. En una realización, la concentración del monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 45 % a aproximadamente el 50 %. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende además un caótropro. En una realización, el caótropro se selecciona de entre el grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol y butanol. En una realización, el caótropro en dicha solución de
65 extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M. En una realización, el caótropro en dicha

solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4,5 M a aproximadamente 5 M. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende además uno o más de un detergente y un alcohol. Los detergentes adecuados incluyen Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100. Los alcoholes adecuados incluyen etanol, butanol. En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 15 % o de aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 15 %. En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 15 %. En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 40 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 25 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 23 % y aproximadamente el 25 %.

Realizaciones de la extracción de ácido nucleico de material de origen celular bacteriano en una sola etapa

[0062] En una realización, la presente invención se dirige a un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular bacteriano, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto material de origen celular con una solución de extracción acuosa capaz de la lisis del material celular y la extracción del ácido nucleico en una sola etapa. En una realización, el material de origen celular bacteriano son células micobacterianas. En otra realización, el material de origen celular bacteriano es *mycobacterium tuberculosis*. En otra realización, las bacterias se encuentran en el esputo humano. En otra realización, la bacteria se inactiva en la etapa única. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende un disolvente que contiene nitrógeno seleccionado de entre uno o más monómeros de amina y una o más amidas. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende un monómero de amina y una amida. En otra realización, la solución de extracción acuosa comprende un monómero de amina primaria. En una realización, el monómero de amina es 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDBE). En una realización, el monómero de amina es 1,3-diaminopropano. En una realización, el monómero de amina es 3-amino-1-propanol. En una realización, se usan simultáneamente dos o más monómeros de amina. En un caso, el monómero de amina se selecciona de entre uno o más de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDBE), 1,3-diaminopropano (DAP), 2-amino-1-butanol (AB), 2-(2-aminoetoxi)etanol (AEE), 2-amino-6-metilheptano (AMH), 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), amino-2-propanol (A2P), 1,5-diamino-2-metilpentano (DMP) y 3-amino-1-propanol (3A1P). En un caso, la concentración del monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 50 %. En una realización, la concentración del monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 45 %. En una realización, la concentración del monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 45 % a aproximadamente el 50 %. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende además un caótropro. En una realización, el caótropro se selecciona de entre el grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol y butanol. En una realización, el caótropro en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M. En una realización, el caótropro en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4,5 M a aproximadamente 5 M. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende además uno o más de un detergente y un alcohol. Los detergentes adecuados incluyen Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100. Los alcoholes adecuados incluyen etanol, butanol. En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 15 % o de aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 15 %. En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 15 %. En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 40 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 25 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 23 % y aproximadamente el 25 %.

Realizaciones de la extracción de ácido nucleico de material de origen celular de levadura en una sola etapa

[0063] En una realización, la presente invención se dirige a un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular de levadura, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto material de origen celular con una solución de extracción acuosa capaz de la lisis del material celular y la extracción del ácido nucleico en una sola etapa. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende un disolvente que contiene nitrógeno seleccionado de entre uno o más monómeros de amina y una o más amidas. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende un monómero de amina y una amida. En otra realización, la solución de extracción acuosa comprende un monómero de amina primaria. En una realización, el monómero de amina es 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDBE). En una realización, el monómero de amina es 1,3-diaminopropano. En una realización, el monómero de amina es 3-amino-1-propanol. En una realización, se usan simultáneamente dos o más monómeros de amina. En un caso, el monómero de amina se selecciona de entre uno o más de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDBE), 1,3-diaminopropano (DAP), 2-amino-1-butanol (AB), 2-(2-aminoetoxi)etanol (AEE), 2-amino-6-metilheptano (AMH), 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), amino-2-propanol (A2P), 1,5-diamino-2-metilpentano (DMP) y 3-amino-1-propanol (3A1P). En un caso, la concentración del monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 50 %. En una realización, la concentración del monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 45 %. En una realización, la concentración del monómero de amina en la solución de extracción

acuosa es de aproximadamente el 45 % a aproximadamente el 50 %. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende además un caótropro. En una realización, el caótropro se selecciona de entre el grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol y butanol. En una realización, el caótropro en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M. En una realización, el caótropro en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4,5 M a aproximadamente 5 M. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende además uno o más de un detergente y un alcohol. Los detergentes adecuados incluyen Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100. Los alcoholes adecuados incluyen etanol, butanol. En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 15 % o de aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 15 %.

10 En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 15 %. En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 40 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 25 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 23 % y aproximadamente el 25 %.

15

Realizaciones de la extracción de ácido nucleico de material de origen celular analizado por FISH en una sola etapa

[0064] En una realización, la presente invención se dirige a un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular analizado por FISH, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto material de origen celular con una solución de extracción acuosa capaz de la lisis del material celular y la extracción del ácido nucleico en una sola etapa. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende un disolvente que contiene nitrógeno seleccionado de entre uno o más monómeros de amina y una o más amidas. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende un monómero de amina y una amida. En otra realización, la solución de extracción acuosa comprende un monómero de amina primaria. En una realización, el monómero de amina es 2,2'-(etilendioxo)bis(etilamina) (EDBE). En una realización, el monómero de amina es 1,3-diaminopropano. En una realización, el monómero de amida es 3-amino-1-propanol. En un caso, el monómero de amina se selecciona de entre uno o más de 2,2'-(etilendioxo)bis(etilamina) (EDBE), 1,3-diaminopropano (DAP), 2-amino-1-butanol (AB), 2-(2-aminoetoxi)etanol (AEE), 2-amino-6-metilheptano (AMH), 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), amino-2-propanol (A2P), 1,5-diamino-2-metilpentano (DMP) y 3-amino-1-propanol (3A1P). En una realización, se usan simultáneamente dos o más monómeros de amina. En un caso, la concentración del monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 50 %. En una realización, la concentración del monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 45 %. En una realización, la concentración del monómero de amina en la solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 45 % a aproximadamente el 50 %. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende además un caótropro. En una realización, el caótropro se selecciona de entre el grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol y butanol. En una realización, el caótropro en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M. En una realización, el caótropro en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4,5 M a aproximadamente 5 M. En una realización, la solución de extracción acuosa comprende además uno o más de un detergente y un alcohol. Los detergentes adecuados incluyen Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecilsulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100. Los alcoholes adecuados incluyen etanol, butanol. En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 1 % y aproximadamente el 15 % o de aproximadamente el 8 % y aproximadamente el 15 %. En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 15 %. En una realización, la concentración del detergente está entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 40 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 35 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 25 %. En una realización, la concentración del alcohol está entre aproximadamente el 23 % y aproximadamente el 25 %.

EJEMPLIFICACIÓN

50

Ejemplo 1

[0065] El concepto de la presente invención es que los ácidos nucleicos pueden enriquecerse fácilmente, purificarse o aislarse de, por ejemplo, tejido embebido en parafina fijada con formaldehído (FFPE) usando un tampón de lisis de una sola etapa que permitirá que el ADN sea liberado de la muestra y capturado en un soporte sólido (por ejemplo, una superficie que contiene sílice) o enriquecido o aislado de otra manera, sin la necesidad de desparafinar la muestra ni una digestión enzimática de la muestra para liberar el ADN del material de origen celular, por ejemplo, tejido fijo. Un experto en la materia entenderá que los procedimientos de la presente invención también son adecuados para la extracción, purificación, aislamiento y enriquecimiento de ácidos nucleicos de muestras que no son FFPE, tales como, pero sin limitación, bacterias, levaduras, tejidos, etc.

[0066] El tampón de lisis básico (LB) utilizado en las extracciones contiene tiocianato de guanidina (GITC) 4,7 M, 10 % de Tween-20 y tampón tris 100 mM, pH 7,8. La solución de lisis-etanol (LB-EtOH) se preparó utilizando 70 ml del tampón de lisis y añadiendo 35 ml de etanol al 95 %. La solución de extracción FFPE que contenía 2,2'-(etilendioxo)bis(etilamina) (EDBE, número CAS 929-59-9) se preparó mezclando 9 ml de la solución LB-EtOH con 6 ml

65

de EDBE para una solución de 40 % de EDBE en LB-EtOH (LB-EtOH-EDBE). La solución de lavado 1 para todas las muestras es la solución LB-EtOH. La solución de lavado 2 para todas las muestras es el 70 % de etanol y agua. La solución de elución es agua. Las micropartículas magnéticas recubiertas con sílice (MMP) utilizadas en el protocolo son los puntos de código de ADN de Abbott Laboratories mMicroparticles MD205A aunque hay partículas equivalentes disponibles en el mercado (por ejemplo, Promega Corp., Madison, WISCONSIN; Life Technologies, Grand Isle, NY; Bangs Laboratories, Fishers, IN).

[0067] Las extracciones de muestra se realizaron utilizando un extractor Promega Maxwell. Este procedimiento transfiere partículas magnéticas entre cámaras en un cartucho que contiene diversas soluciones utilizadas en el protocolo de extracción. El protocolo de extracción implica la transferencia de partículas magnéticas de una cámara a otra. La transferencia se realiza capturando las partículas magnéticas en una cámara en la superficie de un émbolo en el que se ha insertado una barra magnética. El émbolo se mueve entonces a una cámara diferente y las partículas se liberan de la superficie del émbolo moviendo la barra magnética fuera del émbolo. El émbolo sin la barra magnética se puede utilizar para mezclar el fluido en la cámara mediante un movimiento hacia arriba y hacia abajo en el fluido. En el protocolo utilizado para la extracción de FFPE, la incubación del lisado y las partículas y los lavados se realizaron a temperatura ambiente. La etapa de elución se realizó en un tubo de elución separado que se calentó a 70 °C. El cartucho de extracción tenía siete cámaras. La primera cámara se utilizó para la solución de lisados FFPE y las otras cámaras se utilizaron para contener partículas magnéticas o soluciones de lavado. La cámara 2 contenía 200 microlitros (μ l) de LB-EtOH y 25 microlitros de MMP. La cámara 3 contenía 800 microlitros de lavado 1. Las cámaras 4, 5 y 6 contenían 900 microlitros de lavado 2. La cámara 7 estaba vacía. El tubo de elución contenía 100 microlitros de agua. El protocolo primero transfirió las MMP de la cámara 2 a la cámara 1 que contiene la solución de lisados FFPE. La solución de lisados de FFPE se mezcló con las partículas magnéticas durante diez minutos. Todos las etapas de lavado se mezclaron durante un minuto. La etapa de elución fue una incubación durante diez minutos con mezcla.

[0068] El material de muestra consistió en un bloque de tejido tiroideo FFPE, seccionado en secciones de 5 micrómetros, con secciones individuales que contenían parafina colocadas en tubos de microcentrifuga de polipropileno de 2 ml de tapa a presión. Las secciones fueron numeradas secuencialmente en los tubos.

[0069] Se extrajeron diez secciones secuenciales de la siguiente manera. A cada sección se añadieron 1,5 ml de LB-EtOH o 1,5 ml de LB-EtOH-EDBE de manera que cada sección diferente contenía la misma solución de tampón de lisis. Las muestras con números impares contenían LB-EtOH y las muestras con números pares contenían LB-EtOH-EDBE. De esta manera, cualquier diferencia en la sección de parafina fue minimizada. Todas las muestras se incubaron luego a 78 °C durante cuatro horas en un bloque de calefacción de temperatura controlada estacionaria sin mezclar. Después de que se completó la etapa de calentamiento, los lisados se añadieron directamente a la cámara 1 de los cartuchos de extracción Promega Maxwell y se extrajeron como se describe anteriormente.

[0070] Los eluidos de la extracción se analizaron mediante un ensayo de PCR para el ADN genómico humano. La PCR es bien conocida por los expertos en la materia. Este ensayo detecta la presencia del exón 13 del gen BRAF. Este gen codifica una proteína llamada B-Raf que participa en la dirección del crecimiento celular. El ensayo de PCR se utilizó para medir la cantidad relativa de ADN aislado de las muestras. En el ensayo, la señal generada por una sonda fluorescente aumenta con cada ciclo de calentamiento-enfriamiento en la amplificación por PCR. Cuanto más ADN haya en la muestra original, más pronto se detectará la señal. El ciclo en el que se detecta la señal se llama umbral de ciclo (CT). Una muestra con el doble de ADN genómico que otra muestra tendrá un valor de CT 1 CT más bajo que la otra muestra. Una muestra con cuatro veces la cantidad de ADN que otra muestra tendrá un valor de CT 2 CT más bajo que la otra muestra. Los valores de CT de los extractos se determinaron utilizando este procedimiento. Se realizaron dos ensayos repetidos para cada muestra. Las curvas de amplificación de los ensayos se muestran en la figura 1. La figura 1 muestra una clara diferencia entre las muestras extraídas con el tampón de lisis LB-EtOH y el tampón de lisis LB-EtOH-EDBE. Un cálculo de los umbrales de ciclo muestra que hay una diferencia de más de 2 CT entre los dos tampones de lisis, lo que se traduce en un aumento de más de cuatro veces la cantidad de ADN extraído con el tampón de lisis que contiene EDBE. La figura 2 muestra una prueba ANOVA de medias de una vía en los datos presentados en la figura 1.

Medias para el Anova de una vía de la figura 2

Nivel	Número	Media	Error estándar	Inferior del 95 %	Superior del 95 %
LB-EtOH	10	28,8520	0,21190	28,407	29,297
LB-EtOH-EDBE	10	26,5170	0,21190	26,072	26,962

55 Ejemplo 2

[0071] El concepto de la presente invención se exploró adicionalmente usando un segundo disolvente, el 1,3-diaminopropano. La extracción se realizó como se describe anteriormente, aunque solo se realizaron dos muestras repetidas con cada tampón de lisis. El primer tampón de lisis fue el tampón LB-EtOH y el segundo fue el LB-EtOH que contenía un 20 % de 1,3-diaminopropano (DP, número CAS 109-76-2). Las secciones de FFPE eran de la misma muestra de tejido que se usó anteriormente. Las condiciones de incubación, extracción y ensayo fueron las mismas

que las descritas anteriormente. Las curvas de amplificación del ensayo se muestran a continuación en la figura 3. La figura 3 muestra una clara diferencia entre las muestras extraídas con el tampón de lisis LB-EtOH y el tampón de lisis LB-EtOH-diaminopropano. Un cálculo de los umbrales de ciclo muestra que hay una diferencia de más de 2 CT entre los dos tampones de lisis, lo que se traduce en un aumento de más de cuatro veces la cantidad de ADN extraído con el tampón de lisis que contiene 1,3-diaminopropano. La figura 4 muestra una prueba ANOVA de medias de una vía en los datos presentados en la figura 3.

Medias para el Anova de una vía para la figura 4

Nivel	Número	Media	Error estándar	Inferior del 95 %	Superior del 95 %
diaminopropano	2	26,0000	0,23033	25,009	26,991
LB-EtOH	2	28,2400	0,23033	27,249	29,231

10 Ejemplo 3

[0072] La presente invención se exploró adicionalmente utilizando la adición de hidróxido de amonio al tampón de lisis para determinar si los grupos de amina presentes en los disolventes utilizados anteriormente influyen en la extracción de ADN de muestras de FFPE. Se realizaron las extracciones como se ha descrito anteriormente, pero el segundo tampón de lisis probado contenía hidróxido de amonio aproximadamente al 0,6 % (NH₄OH). Esto se hizo mediante la adición de 200 microlitros de hidróxido de amonio concentrado (28 a 30 %) a 10 ml de LB-EtOH. Se usaron cinco muestras repetidas que contenían el mismo material de muestra descrito anteriormente con cada tampón de extracción. Los eluidos se ensayaron como duplicados con el ensayo BRAF como se describe anteriormente. Las curvas de amplificación del ensayo se muestran a continuación en la figura 5. La figura 5 muestra una diferencia entre las muestras extraídas con el tampón de lisis LB-EtOH y el tampón LB-EtOH-NH₄OH. Un cálculo de los umbrales de ciclo muestra que hay una diferencia de más de 1,4 CT entre los dos tampones de lisis, lo que se traduce en un aumento de más de dos veces la cantidad de ADN extraído con el tampón de lisis que contiene NH₄OH. La figura 6 muestra una prueba ANOVA de medias de una vía en los datos presentados en la figura 5. Si bien el aumento en el ADN extraído con el tampón de lisis que contiene NH₄OH no parece ser tan grande como el extraído con los otros dos disolventes, muestra que la presencia de iones amonio o grupos amina es importante en la extracción de ADN de muestras FFPE.

Medias para el Anova de una vía para la figura 5

Nivel	Número	Media	Error estándar	Inferior del 95 %	Superior del 95 %
LB-EtOH	10	30,0000	0,27787	29,416	30,584
NH ₄ OH	10	28,5970	0,27787	28,013	29,181

30 Ejemplo 4

Ejemplo de extracción de *C. albicans* de sangre completa.

[0073] La presente invención se exploró adicionalmente para la extracción de ácidos nucleicos de levadura de sangre completa. Este procedimiento se comparó con el procedimiento de extracción estándar para levadura de sangre completa que utiliza el batido con perlas para lisar la levadura.

[0074] La muestra utilizada fue *C. albicans* a 200 unidades formadoras de colonias por mililitro de sangre completa humana. El tampón de lisis y otros reactivos utilizados en la extracción se describen en el ejemplo 1. La solución de LB-EtOH-EDBE contenía 20 % de EDBE y se preparó mezclando 15 ml de EDBE con 60 ml de LB-EtOH.

[0075] Las extracciones de EDBE se realizaron mediante la adición de 1,25 ml de la muestra a 3,75 LB-EtOH-EDBE e incubando a 80 °C durante 45, 60, 75 y 90 minutos. A las extracciones se les dio un comienzo escalonado para que todas las incubaciones terminaran al mismo tiempo. Se procesaron cuatro muestras de cada condición. Cuatro muestras también se incubaron con LB-EtOH (sin EDBE añadido) durante 90 minutos.

[0076] El batido con perlas de la muestra se realizó utilizando un conjunto Abbott PlexIDBB a tres ciclos de 90 segundos de batido con perlas a una velocidad de 6200. Cada muestra contenía 1,25 ml de muestra, 150 microlitros de tampón de lisis (sin etanol) y aproximadamente 950 miligramos de circonio/perlas de itrio Glenn Mills (Clifton, NJ) n.º 7361-00010. Después de batir con perlas, los tubos se centrifugaron en una centrifuga Beckman 22R durante 3 minutos a 14.000 rpm. El volumen total de sobrenadante se extrajo luego junto con los lisados tratados con EDBE.

[0077] Las extracciones se realizaron utilizando un extractor PlexIDsp con un protocolo que tiene una incubación a temperatura ambiente de los lisados con partículas magnéticas recubiertas de sílice. El extractor utiliza placas de 24 pocillos con cada placa que contiene un reactivo separado para la extracción. Los reactivos se describen en el ejemplo 1. La etapa de unión fue durante 15 minutos a temperatura ambiente con 125 microlitros de las partículas

magnéticas en los pocillos. Los pocillos que contenían el lisado de batido con perlas contenían 125 microlitros de partículas magnéticas más 1,5 ml de LB-EtOH, mientras que los lisados de EDBE solo tenían las partículas magnéticas sin reactivos adicionales. El protocolo usó una sola placa de lavado 1 con 2 ml de LB-EtOH y tres placas de lavado 2 con 2 ml de etanol al 70 %. La placa de elución contenía 300 microlitros de agua para la elución. La etapa de elución fue a 70 °C durante 10 minutos.

[0078] El contenido de ADN de las muestras se midió utilizando un Nanodrop Lite (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Véase la figura 7A. Puede haber ácido nucleico más bajo en las muestras tratadas con EDBE que en el batido con perlas. La muestra sin EDBE o batido con perlas proporciona un rendimiento menor. El protocolo de batido con perlas elimina una gran cantidad de proteínas de la solución y la extracción de ácido nucleico parece ser más eficiente con la etapa de batido con perlas. La relación A260/A280 es mayor con las muestras EDBE. Véase la figura 7B.

[0079] Ensayo de eluidos. Configurar los ensayos como antes.

15

para 30 ensayos

Ensayo de *C. albicans*.

1) Cebador IDT n.º 42562400	0,075 ul/rx	2,25 ul
2) Cebador IDT n.º 42562401	0,075 ul/rx	2,25 ul
3) Sonda 186591515-1	0,5 ul/rx	1,5 ul
4) Tampón 2X Taqman AB n.º 4324018	12,5 ul/rx	375 ul
5) Mezcla 10X IPC AB n.º 4308332	2,5 ul/rx	75 ul
6) Plantilla 50X IPC AB n.º 4304662	0,5 ul/rx	15 ul
7) Agua. (MD203A-tampón de elución)	4,3 ul/rx	129 ul

Prepare la mezcla madre y añada 20 ul a cada pocillo en la placa

8) Muestra	5,0 ul/rx	cada uno por separada
------------	-----------	-----------------------

Coloque las muestras a -20 C cuando haya terminado.

Cargue 24 posiciones, luego añada 5 ul de muestra.

posición en el ciclador

	n.º 1	n.º 2	n.º 3
A	1	9	17
B	2	10	18
C	3	11	19
D	3	12	20
E	5	13	21
F	6	14	22
G	7	15	23
H	8	16	24
G	7	15	23
H	8	16	24

[0080] El tampón Taqman es la mezcla maestra de PCR universal de Applied Biosystems (Life Technologies, Grand Island, NY), n.º de pieza 4324018. La mezcla de IPC (n.º 408332) y la plantilla de IPC (n.º 4304662) son controles positivos internos exógenos de Applied Biosystems. Se utilizó el programa ibisQPCR (ngul) LDA en el ciclador AM01789 en B132 para amplificar el ácido nucleico. La amplificación de carga en un Multianalyse 4. La figura 8A combina los resultados de las figuras 8B-F. La figura 8B muestra los resultados del batido con perlas y 90 minutos sin EDBE. La figura 8C muestra los resultados del batido con perlas, 45 minutos de EDBE y 90 minutos sin EDBE. La figura 8D muestra los resultados del batido con perlas, 60 minutos de EDBE y 90 minutos sin EDBE. La figura 8E muestra los resultados del batido con perlas, 75 minutos de EDBE y 90 minutos sin EDBE. La figura 8F muestra los resultados del batido con perlas, 90 minutos de EDBE y 90 minutos sin EDBE.

[0081] La figura 9 muestra los resultados de Ct después de la amplificación de ácidos nucleicos. Las incubaciones de 75 y 90 minutos con EDBE fueron tan efectivas como la técnica de la técnica anterior que incorpora el batido con perlas. La muestra sin EDBE no extrajo bien la muestra de levadura con más de 10 veces menos de

20

30

ADN de levadura en la muestra.

Ejemplo 5

5 Extracción con EDBE de *M. tuberculosis* (MTB) de esputo.

[0082] Se utilizaron muestras de esputo para probar la capacidad de la solución de LB-EtOH-EDBE para lisar y extraer el ácido nucleico de MTB. Tres muestras de esputo se dividieron en alícuotas en tubos de polipropileno de 15 ml tarados de la siguiente manera. Se usó una pipeta de 5 ml con el extremo cónico eliminado para transferir el esputo. Se calculó el volumen de esputo en el tubo y luego se añadió un cultivo de MTB destruido por calor a la muestra a 3000 ufc/ml, con 12,3 microlitros añadidos por ml de esputo.

muestra	tubo	tara	Total	muestra
A	1	6,67	7,547	0,8784
A	2	6,72	8,199	1,4798
B	3	6,59	8,349	1,7588
B	4	6,56	7,79	1,2261
B	5	6,57	8,6	2,0339
B	6	6,66	7,744	1,0811
C	7	6,67	7,928	1,2563
C	8	6,74	8,269	1,5299

[0083] El objetivo fue MTB destruido por calor. La reserva estaba a 245.000 ufc/ml y se diluyó a 3000 ufc por ml de esputo. 12,3 ul por ml de esputo. Véase a continuación las cantidades añadidas.

[0084] A las muestras de esputo se añadió 3 veces el volumen de esputo como LB-EtOH-20 % EDBE

tubo	ml de muestra	ml de LB	ul de objetivo	Vol. total
1	0,8784	2,6352	10,80432	3,5136
2	1,4798	4,4394	18,20154	5,9192
3	1,7588	5,2764	21,63324	7,0352
4	1,2261	3,6783	15,08103	4,9044
5	2,0339	6,1017	25,01697	8,1356
6	1,0811	3,2433	13,29753	4,3244
7	1,2563	3,7689	15,45249	5,0252
8	1,5299	4,5897	18,81777	6,1196

20 **[0085]** Los tubos se colocaron en el bloque de calor fijado a 80 °C y se incubaron 70 minutos. Las extracciones se llevaron a cabo utilizando Abbott PlexIDsp como se describe anteriormente. Los reactivos utilizados se describen anteriormente. Después de que las muestras se hayan incubado, añada los lisados a la placa de extracción. La carga máxima fue de 5 ml.

pocillo	carga
1	3,5136
2	5
3	5
4	4,9044
5	5
6	4,3244
7	5,0252
8	5

25

[0086] El contenido de ácido nucleico (ADN) se midió utilizando el Nanodrop Lite AM03366 en B130.

ml de esputo	volumen recuperado	conc. ng/ul	ug de ADN	A260	260/280
0,88	200	569,3	113,86	11,386	1,75
1,25	200	343,6	68,72	6,87	1,75

(continuación)

1,25	200	39,8	7,96	0,796	1,79
1,22	200	78,2	15,64	1,564	1,7
1,25	200	25,6	5,12	0,512	1,69
1,08	200	50,9	10,18	1,018	1,7
1,25	200	324,3	64,86	6,4886	1,87
1,25	200	334,2	66,84	6,684	1,88

[0087] Las muestras extraídas se probaron utilizando una prueba de PCR para el ADN de MTB. La figura 10A muestra los resultados combinados de las figuras 10B-E. La figura 10B muestra los resultados del control negativo y 30.000 copias (control positivo). La figura 10C muestra los resultados de la muestra de esputo A, 4 ensayos repetidos de cada una de las dos extracciones. También se muestra la muestra de control positivo alto. La figura 10D muestra los resultados de la muestra de esputo B, 4 ensayos repetidos de cada una de las cuatro extracciones. También se muestra la muestra positiva alta. La figura 10E muestra los resultados de la muestra de esputo C. 4 ensayos repetidos de cada una de las dos extracciones. También se muestra la muestra positiva alta. La mezcla LB-EtOH-EDBE puede solubilizar el esputo y extraer el MTB en una sola etapa.

10

Ejemplo 6

[0088] La identificación de monómeros de amina adecuados para la extracción de ácido nucleico de materiales celulares. Se identificaron varios monómeros de amina adicionales como adecuados para la extracción de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN, etc.) de material de origen celular, incluidos, pero sin limitarse a, materiales nuevos, fijos y FFPE. Se eligieron los monómeros de amina probados porque parecían ser menos peligrosos que el disolvente EDDBE y tienen propiedades similares a las de EDDBE. El tamizado inicial se hizo para determinar si cualquiera de los disolventes funcionaría en la extracción de levadura (*C. albicans*) y ADN de *S. aureus* de sangre completa. CASA (mezcla de muestra de *C. albicans* y *S. aureus*; véase a continuación) fue usada como control. EDDBE pudo extraer ADN de material FFPE y de los objetivos enumerados en la sangre completa. Este ejemplo probó los 7 monómeros de amina enumerados a continuación y se comparó con la extracción con EDDBE.

20

Disolventes

1,5-diamino-2-metilpentano	Sigma-Aldrich	329665-25ml	15520-10-2
2-(2-aminoetoxi)etanol	Sigma-Aldrich	A54059-100g	929-06-6
2,2'-etilendioxibis(etilamina)	Sigma-Aldrich	385506-500ml	929-59-9
2-amino-1-butanol	Sigma-Aldrich	A43804-100ml	96-20-8
2-amino-2-metil-1-propanol	Sigma-Aldrich	A9199-100ml	124-68-5
2-amino-6-metilheptano	Sigma-Aldrich	D161292-25g	543-82-8
3-amino-1-propanol	Sigma-Aldrich	A76400-100g	156-87-6
Amino-2-propanol	Sigma-Aldrich	110248-100ml	78-96-6

[0089] El tampón de lisis (LB: véase, anteriormente) y el etanol se mezclaron en una relación de 2:1, lo que hace que la mezcla sea del 33,3 % de etanol (EtOH). El lavado 1 fue 50 % de EtOH. El lavado 2 fue aproximadamente 74 % de EtOH. Las muestras se diluyeron a 200 ufc/ml de *C. albicans* o *S. aureus*. Se añadió sangre a las muestras objetivo 9:1. Se añadió estándar CASA en 18 µl (el estándar CASA contiene 100.000 ufc.ml de *C. albicans* y 100.000 ufc.ml de *S. aureus*) en diluyente negativo (formulación diseñada para imitar la composición de plasma; Abbott Molecular código de producto n.º 60217; Abbott Park, IL). Se probaron tres replicantes de cada uno junto con un control de LB-EtOH y un control de NaOH.

30

Extracciones

3 replicantes de cada mezcla.

1	LB-EtOH	LB-EtOH
2	NaOH	NaOH
3	2,2'-etilendioxibis(etilamina)	EDBE
4	2-amino-1-butanol	AB
5	2-(2-aminoetoxi)etanol	AEE
6	2-amino-6-metilheptano	AMH
7	2-amino-2-metil-1-propanol	AMP
8	3-amino-1-propanol	3A1P

ES 2 741 198 T3

(continuación)

9	Amino-2-propanol	A2P
10	1,5-diamino-2-metilpentano	DMP

n.º 1	1,5 ml de LB-EtOH
n.º 2	1,5 ml de LB-EtOH + 30 ul de NaOH 5 M
n.º 3	1,3 ml de LB-EtOH + 200 ul de EDDBE
n.º 4	1,3 ml de LB-EtOH + 200 ul de AB
n.º 5	1,3 ml de LB-EtOH + 200 ul de AEE
n.º 6	1,3 ml de LB-EtOH + 200 ul de AMH
n.º 7	1,3 ml de LB-EtOH + 200 ul de AMP
n.º 8	1,3 ml de LB-EtOH + 200 ul de 3A1P
n.º 9	1,3 ml de LB-EtOH + 200 ul de A2P
n.º 10	1,3 ml de LB-EtOH + 200 ul de DMP

[0090] Primera ejecución. Quince tubos de 2 ml con 1,5 ml de los reactivos anteriores (3 repetidos de cada mezcla). Se prepararon muestras de prueba nuevas y se añadieron 50 µl de muestra a cada tubo. Las muestras se incubaron a 58 °C durante 4 horas. Los casetes se configuraron para la PCR en Maxwell (Promega, Madison WI) con 50 µl de MMP en cada pocillo. Después de la lisis, las muestras se decantaron en el pocillo de lisis y se procesaron de la siguiente manera: las muestras se lavaron 2 veces en los lavados 1 y 2 veces en el lavado 2. Las MMP lavadas se eluyeron con 100 µl de solución de elución.

10 **[0091]** Segunda ejecución. Las muestras se lisaron a 80 °C durante 45 minutos. El resto fue el mismo que la primera ejecución.

[0092] Después de la lisis y el procesamiento, se realizó una PCR en cada muestra de la siguiente manera.

Ensayo de <i>C. albicans</i>	µl por 25 µl Rx	50 Rx
Cebador IDT n.º 42562400 - <i>Candida</i> NC-009782 Cebador directo: 5'-TGCGATACGTAATATGAATTGCAGAT [SEQ ID NO:1]	0,075	3,75
Cebador IDT n.º 42562401 - <i>Candida</i> NC-009782 Cebador inverso: 5'-CCAGAGGGCGCAATGTG [SEQ ID NO:2]	0,075	3,75
Sonda 185896025-1 - Sonda Taqman MGB de <i>Candida</i> : FAM-TGAATCATCGAATCTTTGAAC-MGB [SEQ ID NO:3]	0,05	2,5
Tampón 2X Taqman AB n.º 42562400	12,5	625
Mezcla 10X IPC AB n.º 4308332	2,5	125
Plantilla 50X IPC AB n.º 4304662	0,5	25
Vol. total	15,7	
muestra	9	
Ensayo de <i>S. aureus</i>	µl por 25 µl Rx	50 Rx
Cebador IDT n.º 39048657 - <i>S. aureus</i> NC-009782 Cebador directo: 5'-CATGGTTGACGATGAAGAATTATTAGA [SEQ ID NO:4]	0,075	3,75
Cebador IDT n.º 39233248 - <i>S. aureus</i> NC-009782 Cebador inverso: 5'-TGGAAGTCATATTCGCTTAATAAGTC [SEQ ID NO:4]	0,057	3,75
Sonda 18583685-1 - Sonda Taqman MGB de <i>S. aureus</i> : 5'- FAMAGTAGAAATGGAAGTTTCG-MGB [SEQ ID NO:6]	0,05	2,5
Tampón 2X Taqman AB n.º 42562400	12,5	625
Mezcla 10X IPC AB n.º 4308332	2,5	125
Plantilla 50X IPC AB n.º 4304662	0,5	25
Vol. total	15,7	
Muestra	9	

[0093] La figura 22 muestra los resultados de un análisis de una vía de los datos por disolvente para *C. albicans* y *S. aureus*, respectivamente. La figura 22 muestra los valores de CT FAM generados a partir de células de *C. albicans* y *S. aureus* extraídas de sangre completa. Las muestras de sangre se mezclaron con una reserva tanto de *C. albicans* como *S. aureus* (muestras CASA) y se extrajeron en la misma reacción. *C. albicans* es una levadura patógena y *S. aureus* es una bacteria gram positiva patógena. Aunque las paredes celulares de los dos organismos difieren en estructura y contenido, se sabe que ambos son difíciles de lisar para la extracción de ADN. La figura 22A muestra los resultados para la extracción de *C. albicans* utilizando diversos disolventes añadidos al tampón de lisis Abbott. La señal de *C. albicans* mejora (un valor de CT más bajo) en todas las condiciones a las que se añaden los diversos disolventes de amina cuando se comparan con los resultados observados utilizando LB-EtOH. LB-EtOH es el tampón de lisis Abbott del kit de extracción de ADNm del sistema de preparación de muestras m2000 que contiene 33 % de etanol añadido. La adición de NaOH a la extracción parece mejorar algo la extracción, pero no en la medida observada con los disolventes de amina. El segundo gráfico muestra los resultados obtenidos con *S. aureus* extraída de sangre completa en las mismas condiciones que anteriormente. Una vez más, en este caso todos los disolventes de amina mejoran la extracción pero el uso de NaOH también mejoró la extracción más que la observada con *C. albicans*. Los gráficos tienen un análisis estadístico de los datos en el lado derecho. Los círculos que no se tocan se consideran estadísticamente diferentes entre sí. Como se puede ver en ambos gráficos, la extracción de LB-EtOH que no tiene componentes añadidos es el procedimiento menos efectivo (que tiene el valor más alto de Ct) y es estadísticamente diferente de los otros procedimientos. Los datos adicionales se proporcionan a continuación.

20

Medias y desviaciones estándar de *C. albicans*

Nivel	Número	Media	Desv. estándar	Error estándar de la media	Inferior del 95 %	Superior del 95 %
3A1P	3	32,4267	0,041633	0,02404	32,323	32,530
A2P	3	32,6667	0,406981	0,23497	31,656	33,678
AB	3	33,7333	0,322542	0,18622	32,932	34,535
AEE	3	33,3567	0,092376	0,05333	33,127	33,586
AMH	3	32,9667	0,137961	0,07965	32,624	33,309
AMP	3	33,6900	0,409512	0,23643	32,673	34,707
DMP	3	32,2700	0,115326	0,06658	31,984	32,556
EDBE	3	32,8733	0,298385	0,17227	32,132	33,615
LB-EtOH	3	38,5300	0,596574	0,34443	37,048	40,012
NaOH	3	36,2567	0,352751	0,20366	35,380	37,133

Medias y desviaciones estándar de *S. aureus*

Nivel	Número	Media	Desv. estándar	Error estándar de la media	Inferior del 95 %	Superior del 95 %
3A1P	3	35,5733	0,306649	0,17704	34,812	36,335
A2P	3	34,7933	0,355012	0,20497	33,911	35,675
AB	3	34,7267	0,100167	0,05783	34,478	34,975
AEE	3	34,9367	0,656531	0,37905	33,306	36,568
AMH	3	35,5500	0,838272	0,48398	33,468	37,632
AMP	3	34,0967	0,351046	0,20268	33,225	34,969
DMP	3	33,9033	0,221435	0,12785	33,353	34,453
EDBE	3	34,6433	0,106927	0,06173	34,378	34,909
LB-EtOH	3	36,7567	0,479618	0,27691	35,565	37,948
NaOH	3	34,4700	0,294449	0,17000	33,739	35,201

[0094] 3A1P, A2P y DMP funcionaron mejor para *C. albicans* mostrando una mejora de aproximadamente cinco CT sobre el control de LB-EtOH. Todos fueron ligeramente mejores que EDBE. AMP, DMP y NaOH funcionaron bien con *S. aureus*. Otros estudios confirmaron la eficacia de DMP, AEE, 2A1B, 3A1P y A2P para la extracción de ADN de las muestras de ensayo enumeradas (datos no mostrados) que muestran una amplia aplicabilidad a la presente invención con respecto a los monómeros de amina que son eficaces para la extracción de ADN. Aún más, un amplio intervalo de condiciones relacionadas con la temperatura y el tiempo se consideraron adecuados para su uso con la presente invención, aunque algunas temperaturas y tiempos proporcionaron mejores resultados (datos no mostrados).

Ejemplo 7

[0095] Extracción con 3-amino-1-propanol (3A1P) de muestras de FFPE. Se probaron tres tipos de muestras. CCR (cáncer colorrectal), melanoma y tejidos pulmonares. Las muestras se compararon con los sistemas de extracción FFPE conocidos en la técnica y disponibles por Qiagen (Valencia, CA) y Promega (Madison, WI). Las

secciones de muestra (5 micrómetros de espesor, no montadas en portaobjetos de vidrio) del bloque de parafina se tomaron secuencialmente de manera que cada tercera muestra probó la misma condición de extracción para disminuir y variar la sección. Las condiciones de lisis para este experimento para el procedimiento de la presente invención (extracción 3A1P) son las siguientes. Condiciones de lisis: 60 % de tampón de lisis (LB); 20 % de EtOH y 20 % de 3A1P, volumen total de 1,5 ml. Las incubaciones se probaron a 78 °C y 94 °C y durante períodos de tiempo de 30 minutos a 4 horas. Después de la incubación de lisis, se añadieron MMP (25 µl) a las muestras. El tiempo de captura fue de 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Las MMP se lavaron 1 vez en 0,5 ml de LB y 33 % de EtOH durante 2 minutos a TA, seguido de 2 veces de 70 % de EtOH durante 2 minutos cada vez a TA. Las muestras se secaron durante 5 minutos y se eluyeron con 100 µl de agua DI durante 10 minutos a 70 °C. Las muestras procesadas con los protocolos Qiagen y Promega se procesaron según las instrucciones del fabricante. Se utilizó PCR para la detección de BRAF-E. El ensayo BRAF-E detecta una mutación en el gen con FAM y el gen normal con CY5. Se determinaron los valores de Ct, una medida relativa de la concentración de objetivo en la reacción de PCR, como es sabido por un experto en la materia. Los datos de Ct se muestran en la figura 11 para muestras de CRC y delta-Ct (dCt: cambio en los valores de Ct entre controles y muestras de ensayo) se muestra en la figura 12. Un valor inferior a 13 para dCt se considera positivo para el marcador tumoral probado. Como se puede ver en los datos, el procedimiento de extracción de amina de la presente invención es al menos tan bueno, si no mejor, que los procedimientos de Qiagen y Promega de la técnica, al mismo tiempo que requieren menos etapas de manipulación y con un tiempo de procesamiento más rápido. En mayor detalle, en la figura 11 se ilustran los valores de umbral de ciclo (valores de CT) para las dos señales. El valor umbral de ciclo se refiere al número de ciclos en la reacción de PCR donde la señal está significativamente por encima del fondo. La mayor cantidad de objetivo en el ensayo permite que la señal se genere con un número menor de ciclos, por lo que los números más bajos indican una mayor cantidad de objetivo. Esta figura muestra los resultados de dos bloques separados de material FFPE de tejido de cáncer colorrectal, C9 y C13. Las secciones en serie se hicieron a partir de los bloques y las secciones separadas representadas por los números se extrajeron con tres procedimientos diferentes. Las señales FAM son columnas azules y las señales CY5 son columnas rojas. Las señales de las secciones procesadas de Qiagen están representadas por columnas de color azul claro y rojo y están etiquetadas como Qia. Las señales de las secciones procesadas de Promega están representadas por columnas de color azul oscuro y rojo y están etiquetadas como CSC. Ambos procedimientos utilizan la digestión con proteasa en el aislamiento del ADN del tejido FFPE. Las señales del sistema de disolventes de amina Abbott están representadas por columnas de color azul brillante y rojo. Como se puede ver en el gráfico, las señales de las extracciones de Abbott son comparables a las obtenidas con los otros dos procedimientos. La figura 12 muestra la diferencia entre las señales FAM y CY5 en la figura 11. Este valor dCT se utiliza para ayudar a determinar si el tejido extraído es canceroso o no. Una diferencia de menos de 13 indica que hay una cantidad relativamente mayor del gen mutante en la muestra (un valor de CT más bajo) y la muestra puede ser cancerosa. Los tres procedimientos diferentes se ilustran mediante las columnas verde claro, verde oscuro y verde brillante para los procedimientos Qiagen, Promega y Abbott, respectivamente. En ambas muestras, C9 y C13, los procedimientos de Abbott proporcionan un valor dCT comparable a los otros dos procedimientos.

[0096] En la figura 13 y la figura 14, los valores de umbral de ciclo (valores de CT) y los valores de dCT se muestran para el tejido FFPE de tumor de pulmón. Esta figura muestra los resultados de dos bloques separados de material FFPE de tejido tumoral de pulmón L1 y L4. Nuevamente, las secciones en serie se hicieron a partir de los bloques y las secciones separadas representadas por los números se extrajeron con tres procedimientos diferentes. Las señales FAM son columnas azules y las señales CY5 son columnas rojas. Las señales de las secciones procesadas de Qiagen están representadas por columnas de color azul claro y rojo y están etiquetadas como Qia. Las señales de las secciones procesadas de Promega están representadas por columnas de color azul oscuro y rojo y están etiquetadas como CSC. Ambos procedimientos utilizan la digestión con proteasa en el aislamiento del ADN del tejido FFPE. Las señales del sistema de disolventes de amina Abbott están representadas por columnas de color azul brillante y rojo. Como se puede ver en la gráfica, las señales de las extracciones de Abbott son comparables a las obtenidas con el sistema Promega y una de las muestras (L1) procesadas con el procedimiento Qiagen. Sin embargo, la muestra L4 procesada del procedimiento Qiagen no aisló el ADN, así como el procedimiento Promega o el procedimiento Abbott. La figura 14 muestra la diferencia entre las señales FAM y CY5 en la figura 13. Los tres procedimientos diferentes se ilustran mediante las columnas verde claro, verde oscuro y verde brillante para los procedimientos Qiagen, Promega y Abbott, respectivamente. En ambas muestras de L1, los procedimientos de Abbott proporcionan un valor dCT comparable al de los otros dos procedimientos en su totalidad. La muestra de L4 no pareció extraerse tan bien con el procedimiento de Qiagen.

[0097] El experimento del protocolo de extracción se duplicó en muestras de melanoma. Las condiciones de extracción y procesamiento fueron como las anteriores. La figura 15 muestra los datos Ct y la figura 16 muestra los datos dCt. En la figura 15 se ilustran los valores de umbral de ciclo (valores de CT) para las dos señales. El valor umbral de ciclo se refiere al número de ciclos en la reacción de PCR donde la señal está significativamente por encima del fondo. La mayor cantidad de objetivo en el ensayo permite que la señal se genere con un número menor de ciclos, por lo que los números más bajos indican una mayor cantidad de objetivo. Esta figura muestra los resultados de dos bloques separados de material FFPE de tejido de melanoma M11 y M14. Las secciones en serie se hicieron a partir de los bloques y las secciones separadas representadas por los números se extrajeron con tres procedimientos diferentes. Las señales FAM son columnas azules y las señales CY5 son columnas rojas. Las señales de las secciones procesadas de Qiagen están representadas por columnas de color azul claro y rojo y están etiquetadas como Qia. Las

señales de las secciones procesadas de Promega están representadas por columnas de color azul oscuro y rojo y están etiquetadas como CSC. Ambos procedimientos utilizan la digestión con proteasa en el aislamiento del ADN del tejido FFPE. Las señales del sistema de disolventes de amina Abbott están representadas por columnas de color azul brillante y rojo. Como se puede ver en el gráfico, las señales de las extracciones de Abbott son comparables a las obtenidas con los otros dos procedimientos. La figura 16 muestra la diferencia entre las señales FAM y CY5 en la figura 15. Este valor dCT se utiliza para ayudar a determinar si el tejido extraído es canceroso o no. Una diferencia de menos de 13 indica que hay una cantidad relativamente mayor del gen mutante en la muestra (un valor de CT más bajo) y la muestra puede ser cancerosa. Los tres procedimientos diferentes se ilustran mediante las columnas verde claro, verde oscuro y verde brillante para los procedimientos Qiagen, Promega y Abbott, respectivamente. En las muestras M11, los procedimientos de Abbott parecen proporcionar un mejor valor dCT (dCT más bajo) que los otros dos procedimientos. Las muestras M14 muestran un patrón interesante porque algunas secciones del tejido tienen un valor dCT alto, pero a medida que las secciones se adentran en la muestra, disminuyen. Esto indica que algunas secciones de un bloque de tejido pueden no contener células tumorales y es necesario probar múltiples secciones. La capacidad para aislar ADN de secciones múltiples se explica a continuación.

[0098] Estos tres experimentos muestran que el procedimiento de extracción con disolvente de amina de la presente invención se realiza al menos tan bien como los protocolos de Qiagen y Promega a la vez que requiere menos etapas de manipulación y con un tiempo de procesamiento más rápido.

20 Ejemplo 8

[0099] La versatilidad de las composiciones y procedimientos de la presente invención proporciona mejoras con respecto a los procedimientos de la técnica anterior. Por ejemplo, para muestras montadas en portaobjetos, los procedimientos de la técnica anterior requieren el raspado de la muestra del portaobjetos de vidrio. La etapa está sujeta a error del operador. El raspado requerido requiere mucho tiempo, utiliza instrumentos afilados y tiene una alta probabilidad de contaminación cruzada. Las composiciones y procedimientos de la presente invención permiten la extracción del ADN directamente del portaobjetos sin raspar la muestra del portaobjetos. Además, varios portaobjetos se pueden procesar juntos para aliviar la posible variación de ensayo causada por la variación de la sección (es decir, "impredecible" causado por la variación entre las secciones de muestra) o para ayudar a detectar objetivos de bajo nivel. Los portaobjetos se pueden procesar en recipientes de recepción (RV) diseñados para contener múltiples portaobjetos. El ADN en la muestra tiene una mayor afinidad por la MMP que por el portaobjetos de vidrio (esto puede ser el resultado de diferentes tipos de vidrio y/o MMP añadidas al exceso). La figura 17 muestra un gráfico con los resultados del procesamiento con las composiciones y procedimientos de la presente invención para el control del virus de la hepatitis B y la figura 18 muestra el mismo procedimiento con MMP añadida durante el procedimiento de lisis-incubación. La adición de la MMP en este punto del protocolo da como resultado la captura del ADN en la MMP. Un experimento realizado en portaobjetos de FFPE de mama demuestra la efectividad de este procedimiento. Las muestras se extrajeron con LB-EtOH-3A1P o LB-3A1P con EtOH añadido después de la incubación. Las muestras también se incubaron con o sin MMP. La incubación fue a 90 °C durante 2 horas y 20 minutos para cada condición. La figura 19 muestra que la adición de MMP en la incubación de lisis, con o sin EtOH, da como resultado la unión del ADN a la MMP como se muestra por los valores de dRn. dRn se refiere a la respuesta normalizada delta, que es el valor de la señal fluorescente de la reacción de PCR después de que se haya realizado una línea base utilizando un programa llamado Multianalyze4 (Abbott Molecular, el programa de software interno, Abbott Park, IL. Otros programas adecuados están disponibles en el mercado, como es conocido por los expertos en la materia, como lo demuestran las enseñanzas en sitios web tales como www.gene-quantification.de/hkg.html y similares). El valor CT se genera desde el punto donde el dRn cruza un valor de umbral particular para el dRn.

Ejemplo 9

[0100] En este ejemplo se procesaron varios portaobjetos simultáneamente. Se procesaron de 1 a 4 portaobjetos en el mismo recipiente de reacción. Los portaobjetos en blanco se utilizaron como marcadores de posición en condiciones donde se procesaron menos de 4 portaobjetos. El procesamiento de más de un portaobjetos a la vez puede ayudar en la detección de objetivos de bajo número de copias. La figura 20 muestra los resultados del procesamiento de 1 a 4 portaobjetos simultáneamente. La detección se mejoró con cada portaobjetos adicional procesado. Se probaron tanto el tejido mamario FFPE como los portaobjetos PathVysion-A probe check normal (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). La figura 21 muestra un análisis ANOVA de una vía de los datos.

[0101] Con mayor detalle, la figura 20 es una ilustración de las curvas de amplificación generadas cuando se extrajeron de 1 a 4 portaobjetos que contenían material FFPE en el mismo recipiente de reacción. Se utilizaron dos conjuntos diferentes de portaobjetos. Un juego consistió en portaobjetos de tejido mamario FFPE que aún contenían la parafina. El otro conjunto contenía portaobjetos PathVyson-A Probe Chek Normal (células tratadas con FFPE) que se habían analizado utilizando el procedimiento FISH y se había eliminado la parafina durante el procesamiento de FISH. La figura 21 tiene dos gráficos. El primero muestra los valores de CY5 CT para ambos conjuntos de extracciones. B1, B2, B3 y B4 contenían 1, 2, 3 y 4 portaobjetos de tejido mamario respectivamente. El valor de CT disminuye con cada portaobjetos adicional, lo que indica que había más ADN en la reacción de amplificación con un mayor número de portaobjetos. El nivel no disminuye después de 3 portaobjetos y puede indicar que se extrajo un nivel máximo de

material en ese punto. El valor MR significa MaxRatio e indica la amplitud de la reacción de amplificación. Un valor de MR más alto indica que la reacción de amplificación es más robusta. El valor de MR disminuye con las muestras de tejido mamario con 4 portaobjetos, y esto puede indicar que el nivel máximo de material se extrajo con 3 portaobjetos de este tejido o que el aumento del nivel de parafina puede ser un problema. El material de los portaobjetos procesados con FISH, PV1 a PV4, también muestra una disminución en el valor de CT con un mayor número de portaobjetos y, por lo tanto, más ADN en la reacción. Los valores de CT continúan disminuyendo con el cuarto portaobjetos. Los valores de MR no disminuyen con los portaobjetos añadidos. Este conjunto de portaobjetos no tiene parafina y eso puede reflejarse en estos datos.

10 Ejemplo 10

[0102] En este ejemplo, los portaobjetos procesados previamente para el análisis de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) se procesan con las composiciones y procedimientos de la presente invención. Los resultados muestran que el ácido nucleico se extrae de los portaobjetos procesados previamente para el análisis FISH y que el ADN aislado es adecuado para un análisis posterior después de la extracción de los portaobjetos del procedimiento FISH.

Ejemplo 11

[0103] Extracción de ácido nucleico de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). La lisis con la composición de lisis 3A1P disolverá el esputo y extraerá el ácido nucleico de la MTB. Además, esta composición puede usarse para inactivar la MTB objetivo. Si bien no se desea que la presente invención esté limitada por la teoría, se cree que el alto pH de la composición de lisis 3A1P de la presente invención puede ser responsable de la inactivación de la MTB objetivo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de extracción de ácido nucleico de material de origen celular, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5 a) proporcionar i) material de origen celular que comprende material embebido en parafina y fijado con formalina (FFPE) y ii) una solución de extracción acuosa que comprende uno o más monómeros de amina, un caótropro, un detergente, un tampón y un alcohol, en el que dichos monómeros de amina se seleccionan de entre el grupo que consiste en 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDBE), 1,3-diaminopropano y 3-amino-1-propanol, y en el que la
- 10 concentración de monómero de amina en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 50 %; y
- b) poner en contacto dicho material de origen celular que comprende material de FFPE con dicha solución de extracción dando como resultado la lisis del material celular y la extracción de los ácidos nucleicos.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho material de FFPE comprende bacterias o levadura, opcionalmente en el que dichas bacterias son micobacterias.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha solución de extracción acuosa está libre de enzimas, opcionalmente, en el que dicha solución de extracción acuosa está libre de proteasas.
- 20 4. Una composición que comprende una solución de extracción acuosa adecuada para la extracción de ácidos nucleicos de material de origen celular que comprende material embebido en parafina fijada con formalina (FFPE), comprendiendo dicha composición uno o más monómeros de amina; uno o más reactivos caótrópicos, uno o más detergentes y uno o más alcoholes, en la que dichos monómeros de amina se seleccionan de entre el grupo que
- 25 consiste en 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (EDBE), 1,3-diaminopropano y 3-amino-1-propanol, y en la que la concentración de monómero de amina en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 50 %.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, o la composición de la reivindicación 4, en los que la
- 30 concentración de monómero de amina en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 50 %.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, o la composición de la reivindicación 4, en los que dicho caótropro se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en urea, tiocianato de guanidina (GITC), etanol y butanol.
- 35 7. El procedimiento de la reivindicación 6, o la composición de la reivindicación 6, en los que la concentración del caótropro en dicha solución de extracción acuosa es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 5 M.
- 40 8. El procedimiento de la reivindicación 1, o la composición de la reivindicación 4, en los que dicho detergente se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en Tween™, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecil sulfato de sodio (SDS), NP-40 y Triton™ X-100, opcionalmente en el que la concentración de dicho detergente es de aproximadamente el 8 % a aproximadamente el 15 %.
- 45 9. El procedimiento de la reivindicación 1, o la composición de la reivindicación 4, en los que dicho alcohol se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en etanol y butanol, opcionalmente en el que la concentración de dicho alcohol es de aproximadamente el 15 % a aproximadamente el 25 %.

LB-EtOH frente a LB-EtOH-EDBE y
extracción FFPE

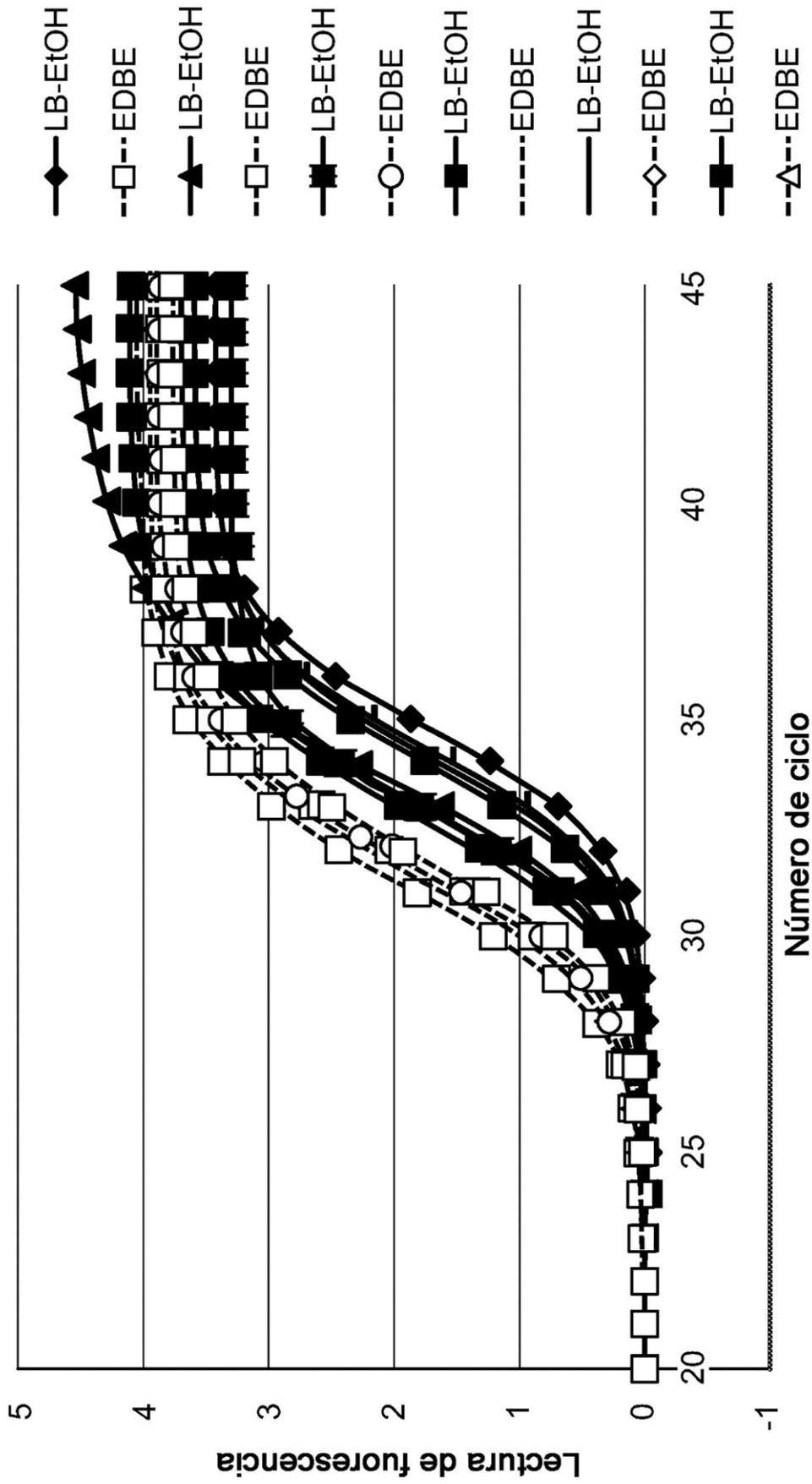


FIG. 1

Análisis de una vía de CY5-Ct mediante la ID de la muestra

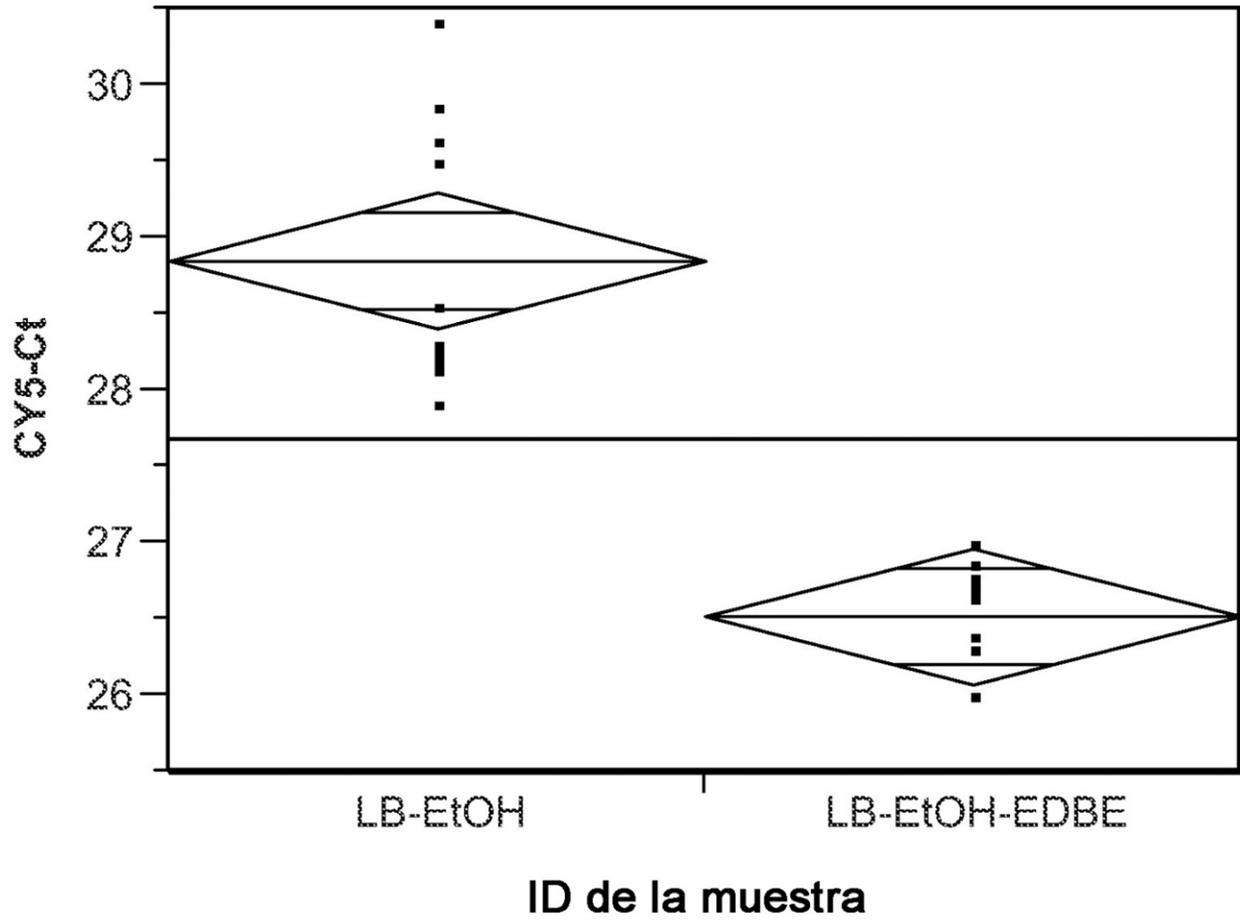


FIG. 2

LB-EtOH frente a LB-EtOH-EDBE que
contiene 1,3-diaminopropano y extracción
FFPE

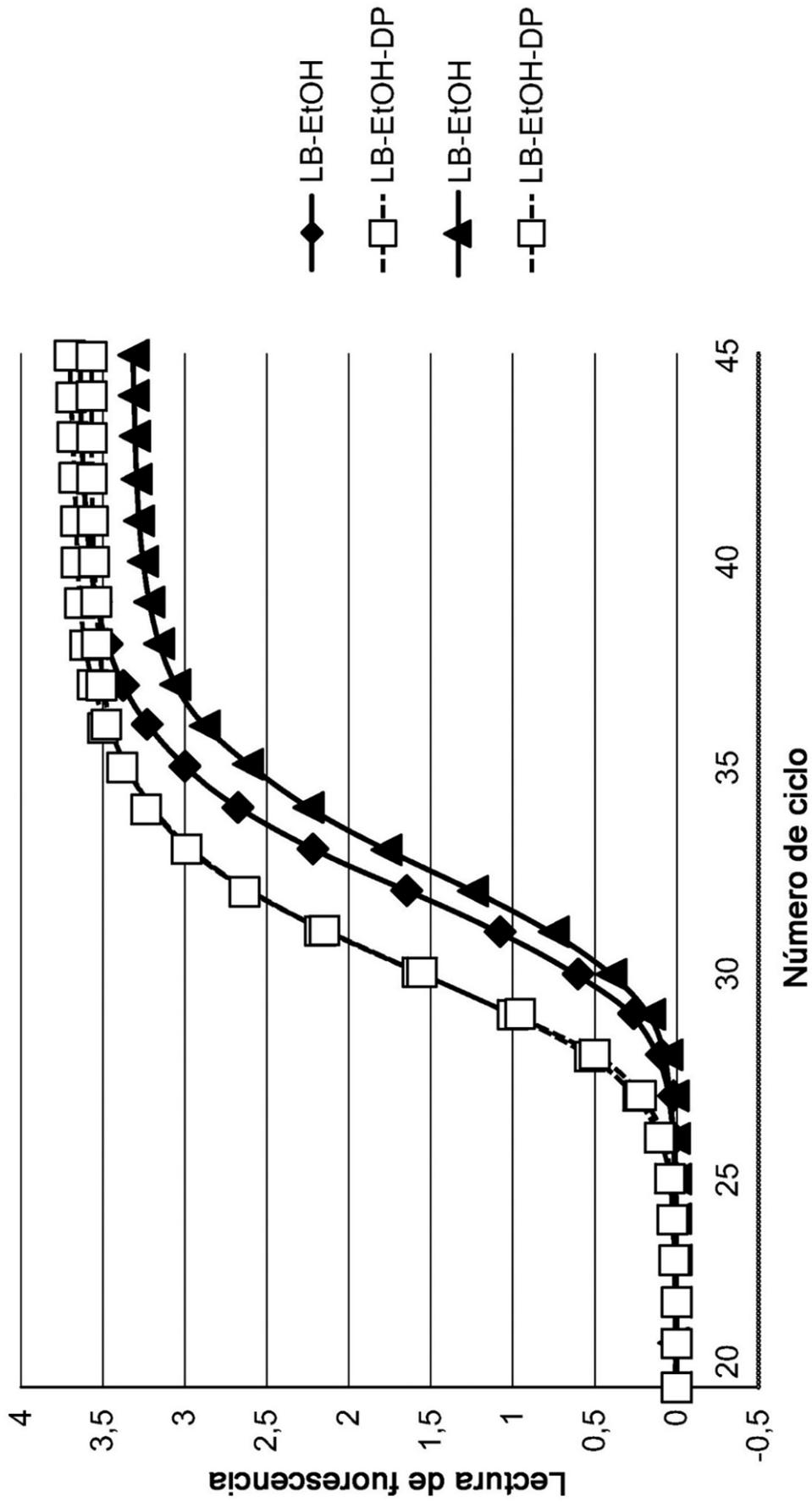


FIG. 3

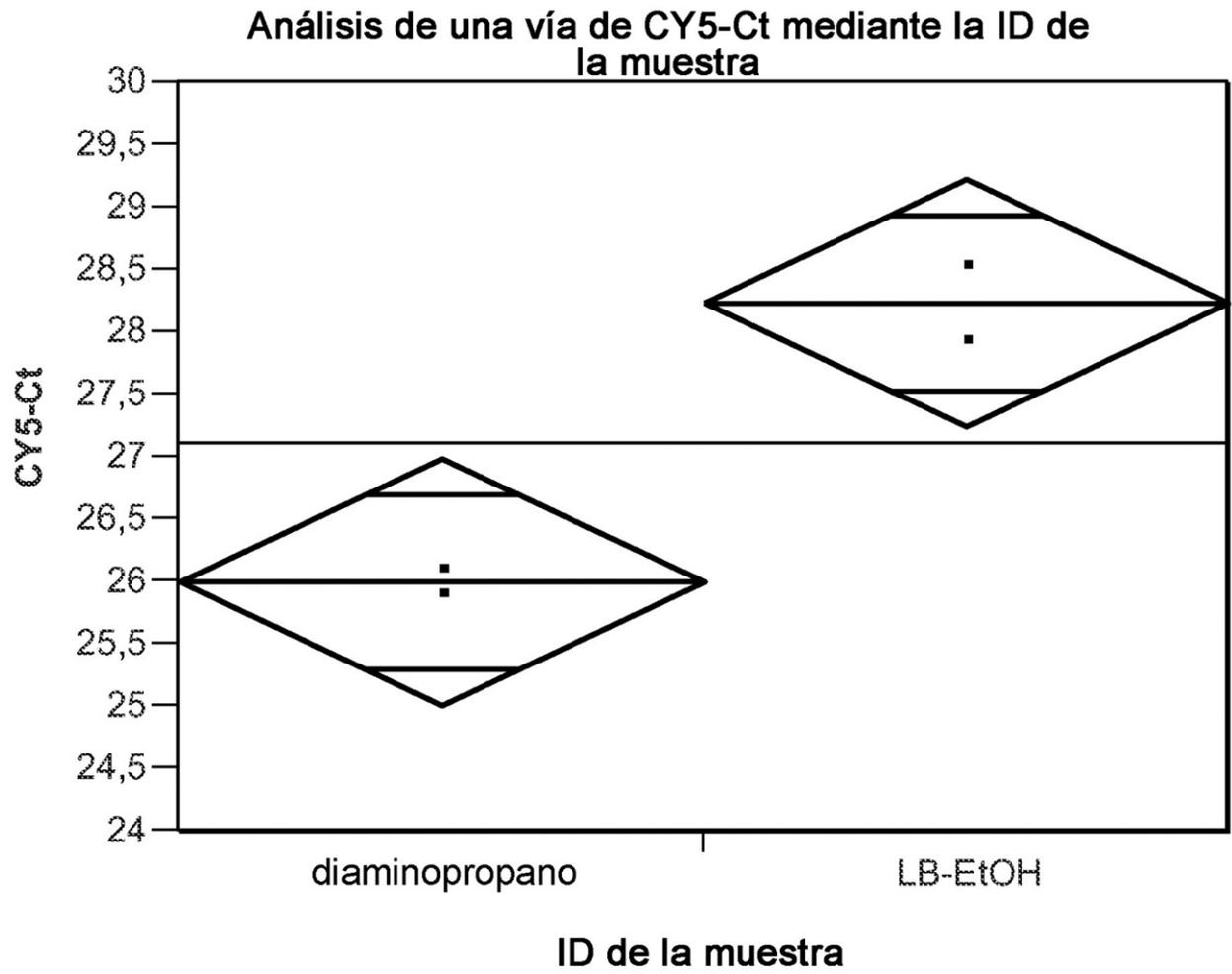


FIG. 4

LB-EtOH frente a LB-EtOH-NH4OH y
extracción FFPE

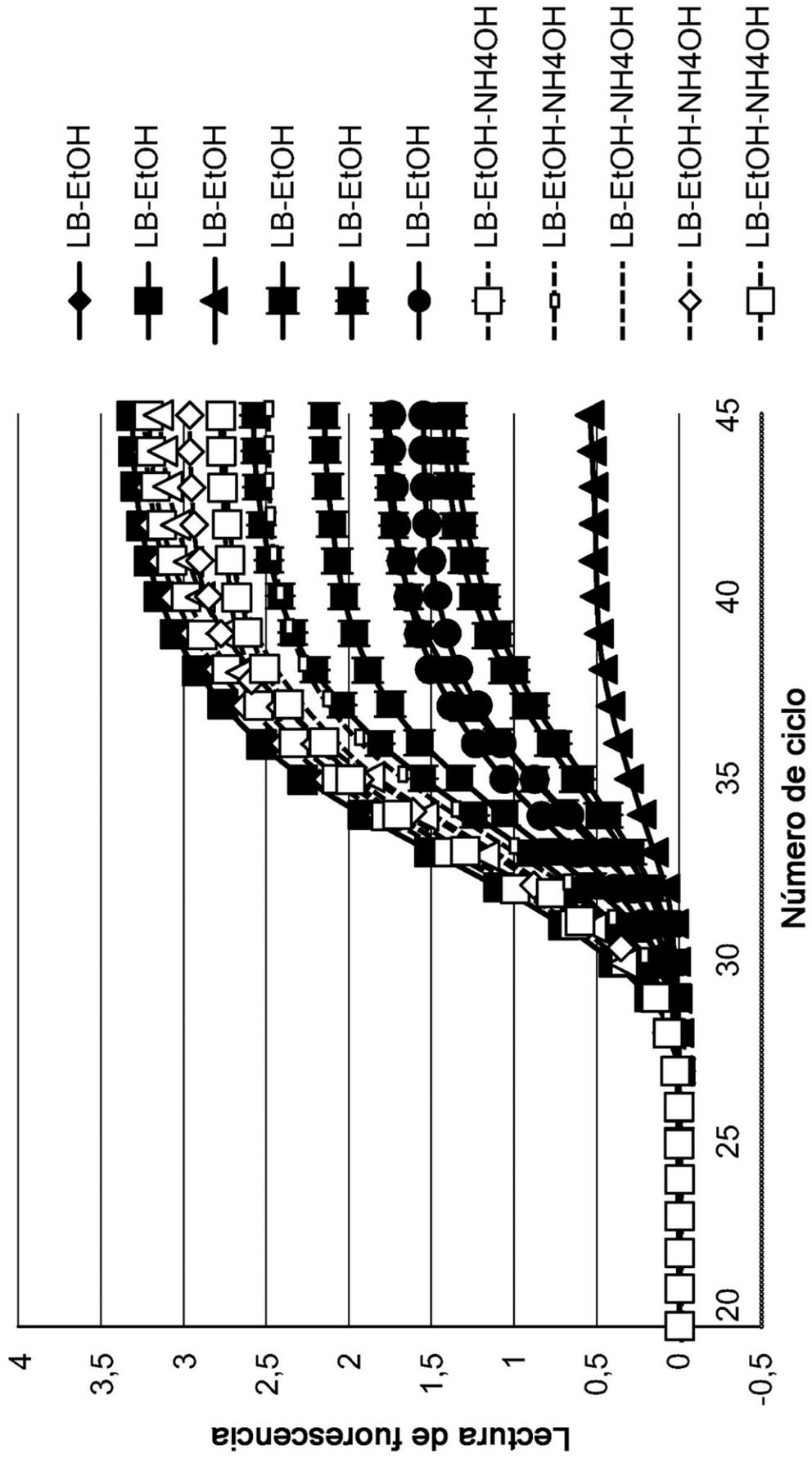


FIG. 5

Análisis de una vía de CY5-Ct mediante la ID de la muestra

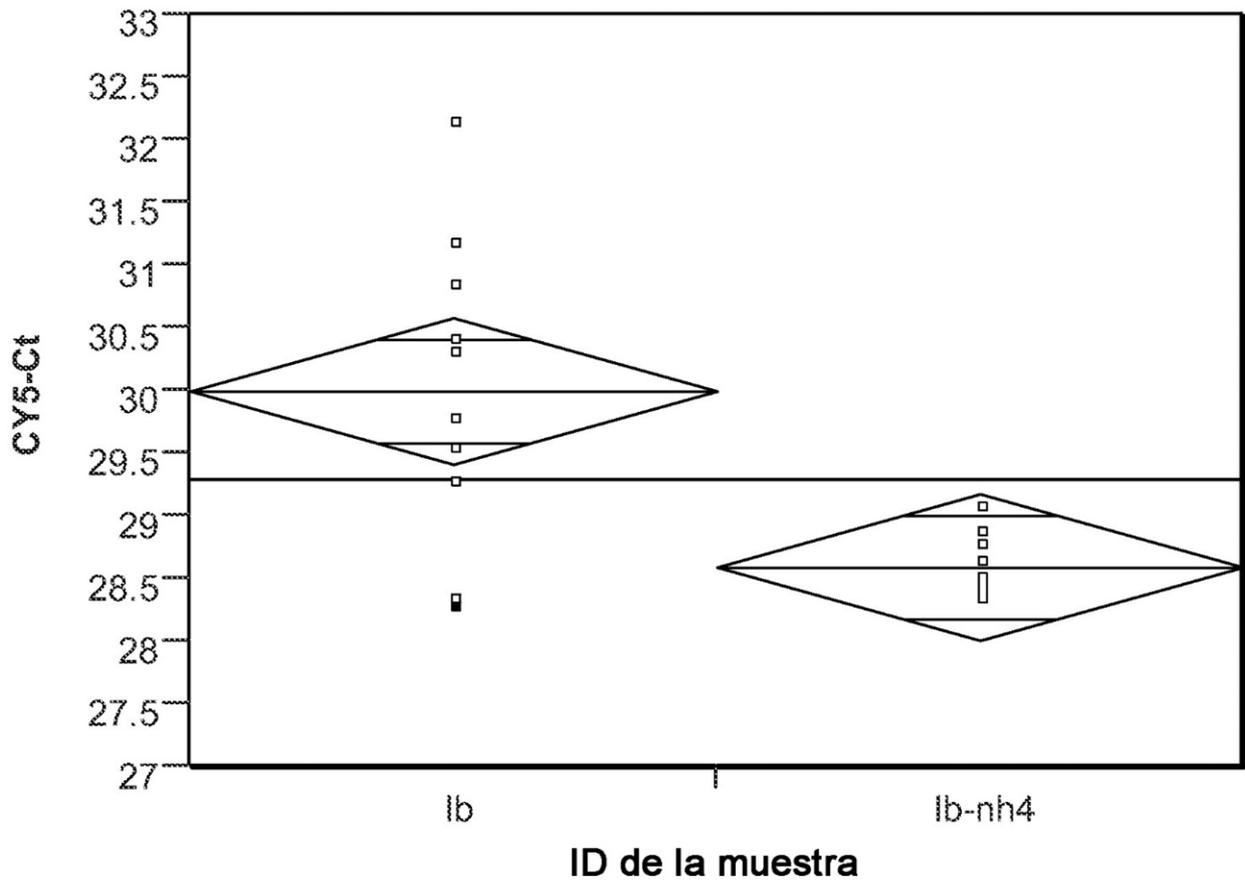
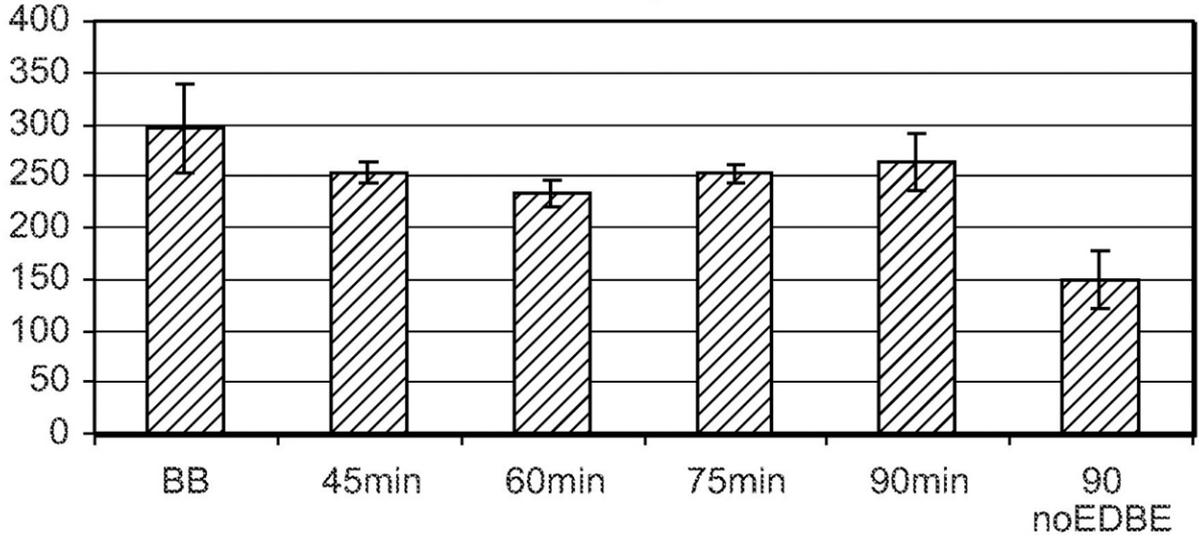


FIG. 6

A

Concentración de ADN, ug/ml en el eluido. Promedio de 4 muestras. Los tiempos se refieren a los tiempos de incubación a 80C.



B

A260/A280

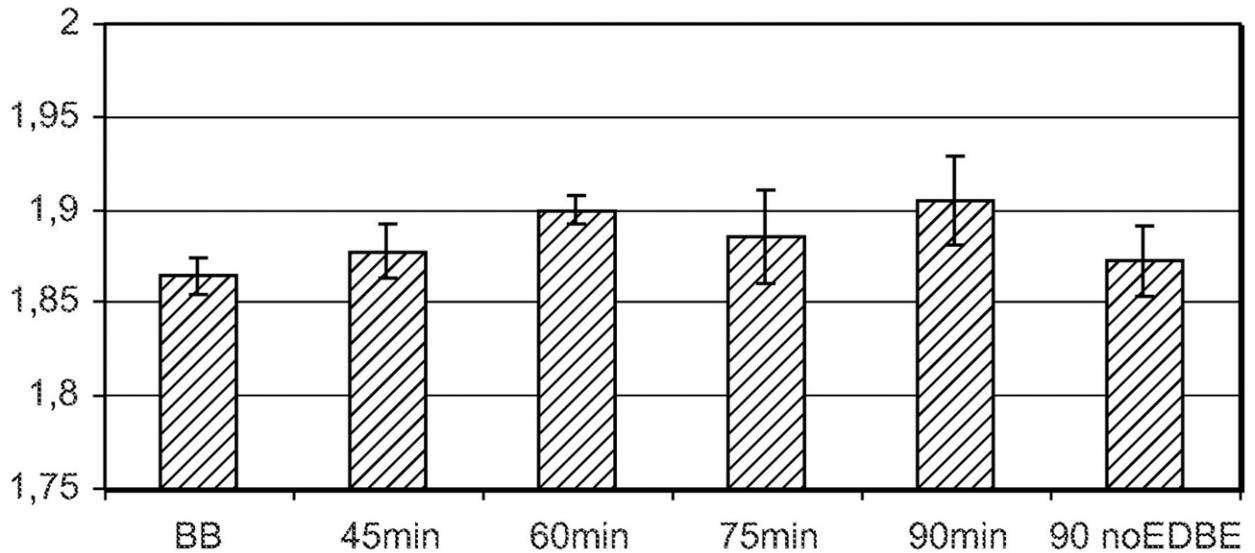


FIG. 7

FIG. 8A

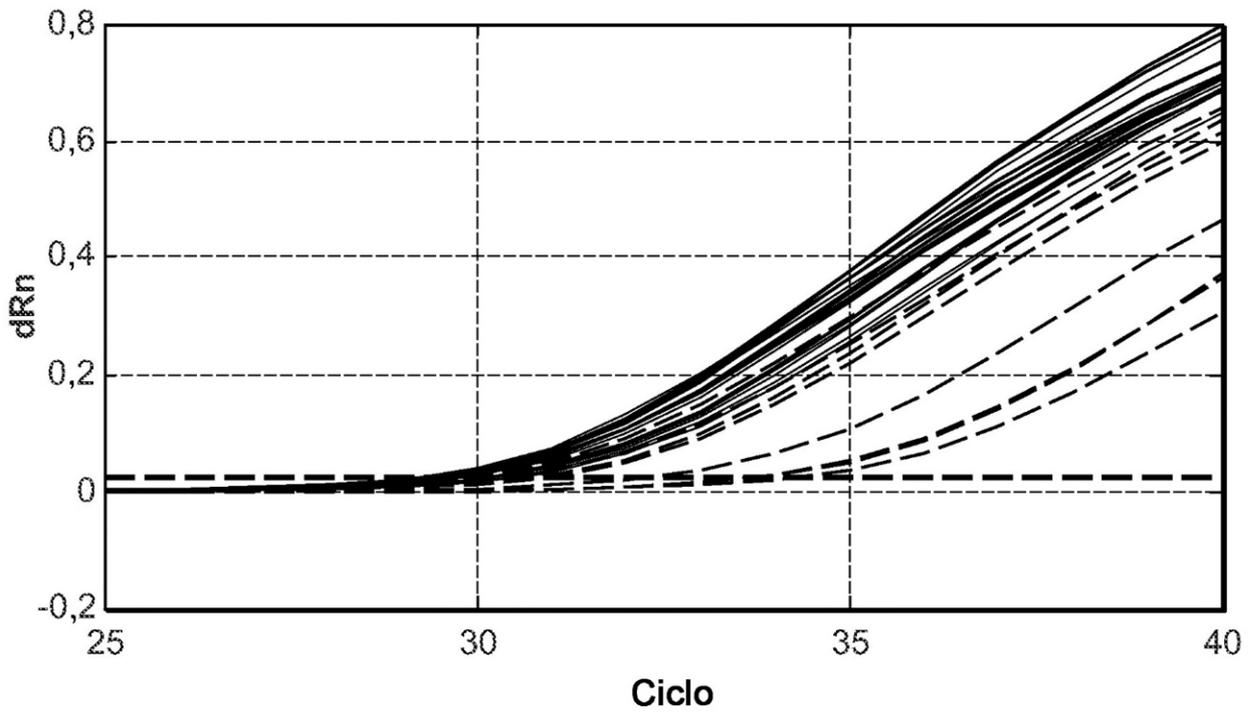


FIG. 8B

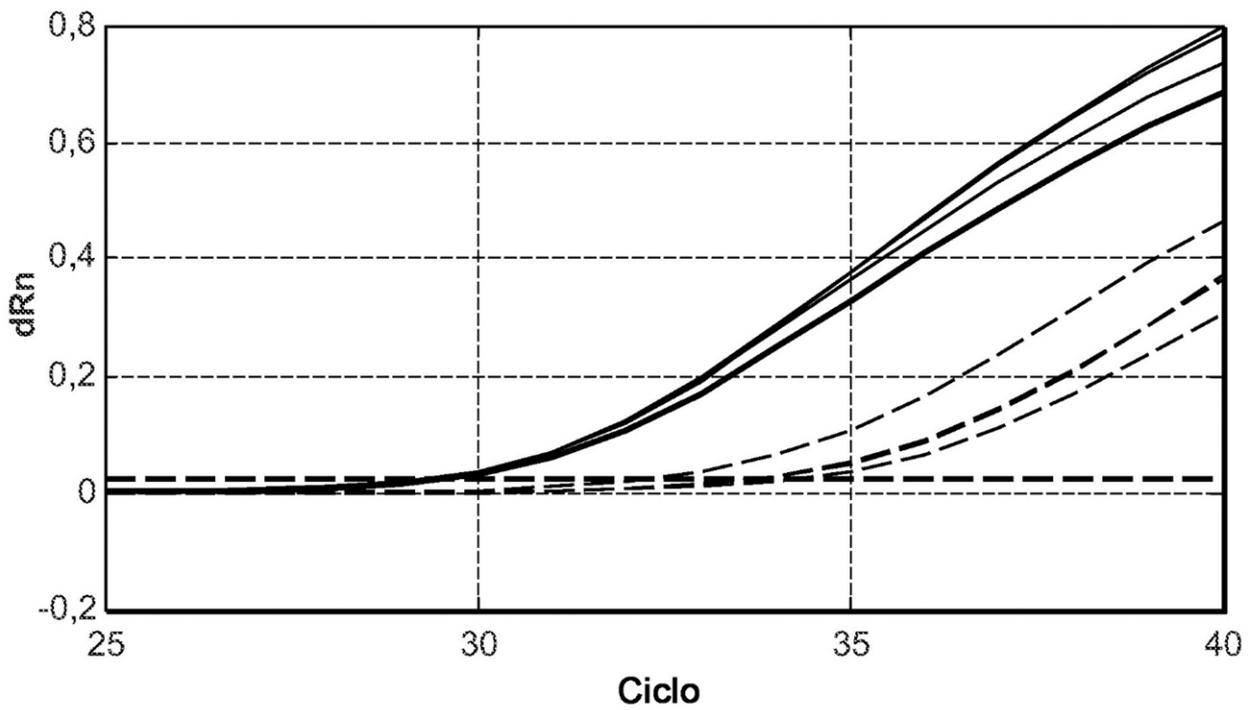


FIG. 8C

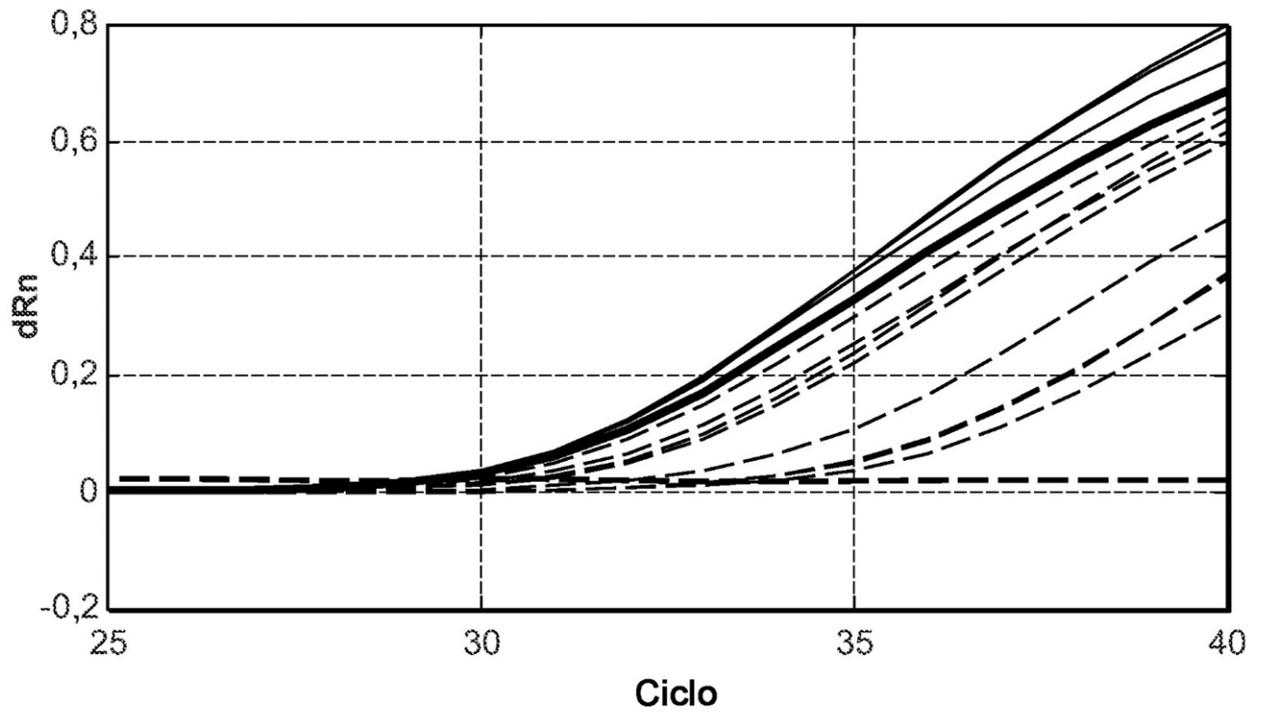


FIG. 8D

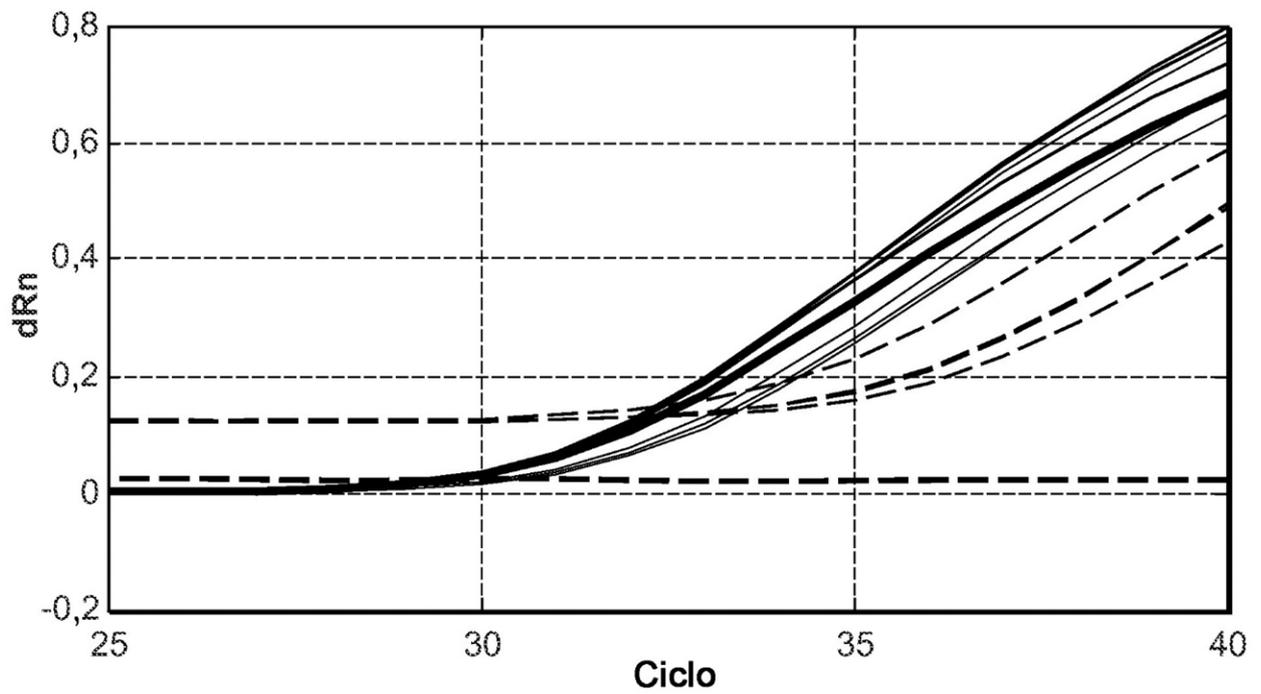


FIG. 8E

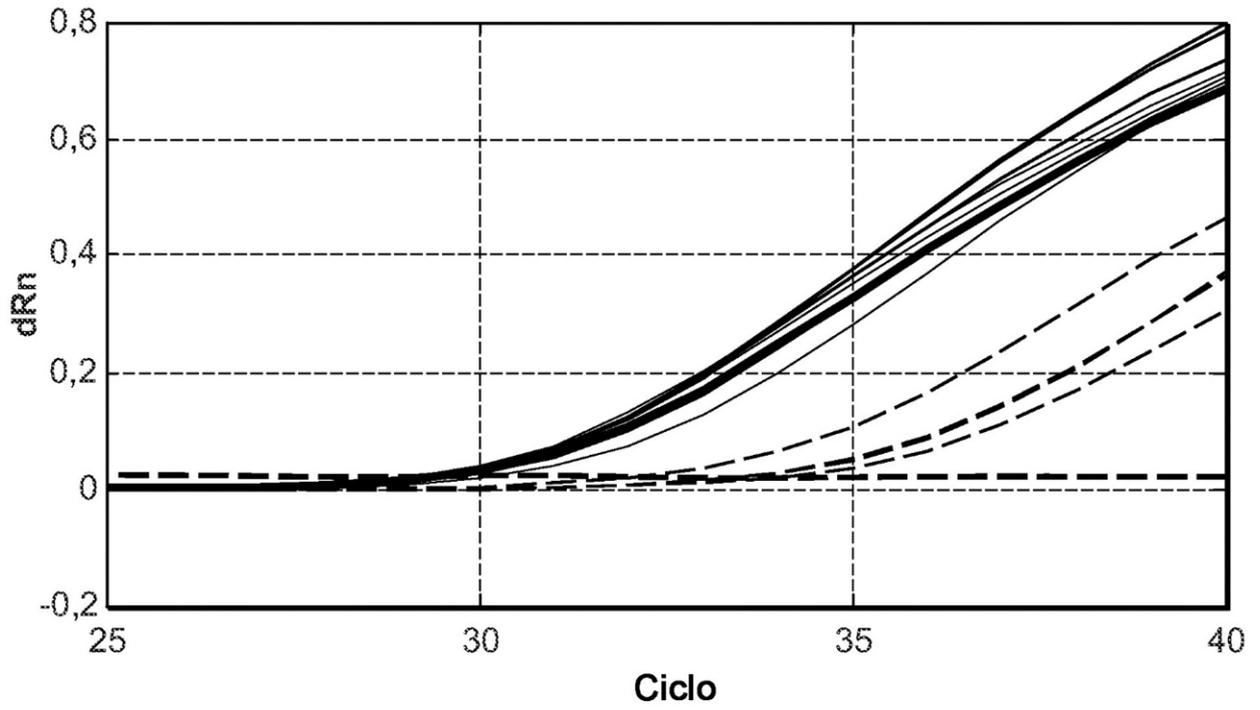
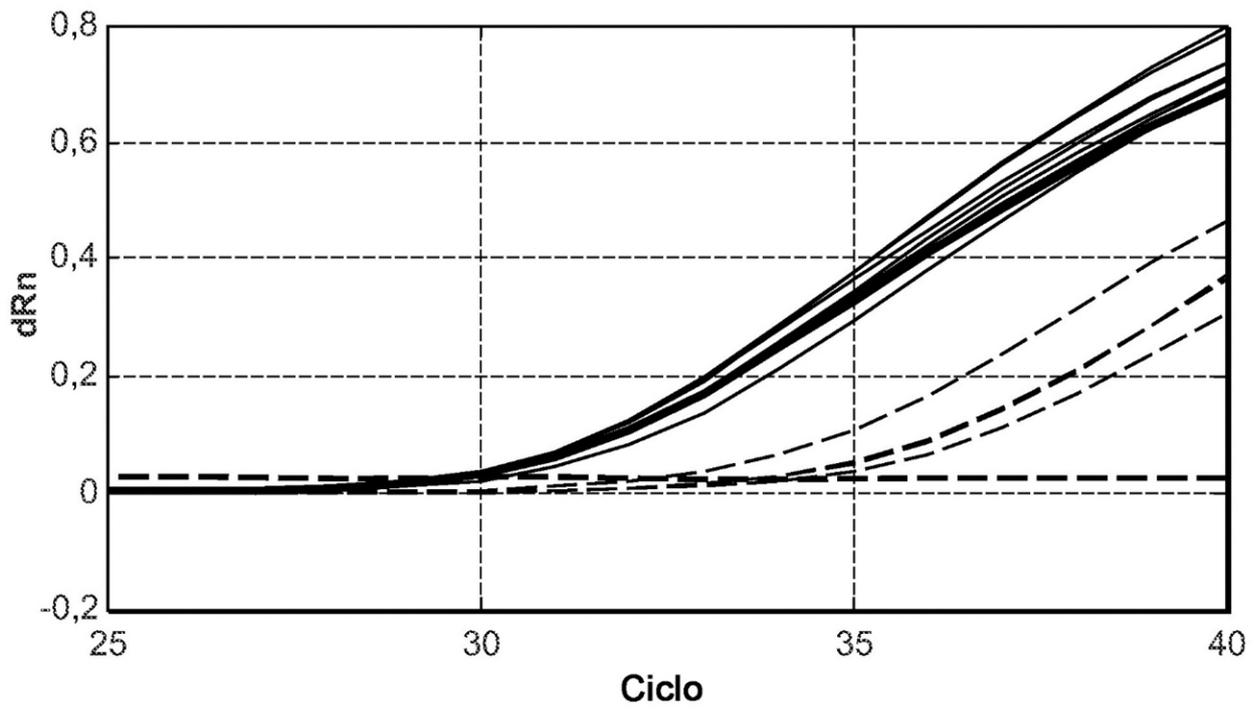


FIG. 8F



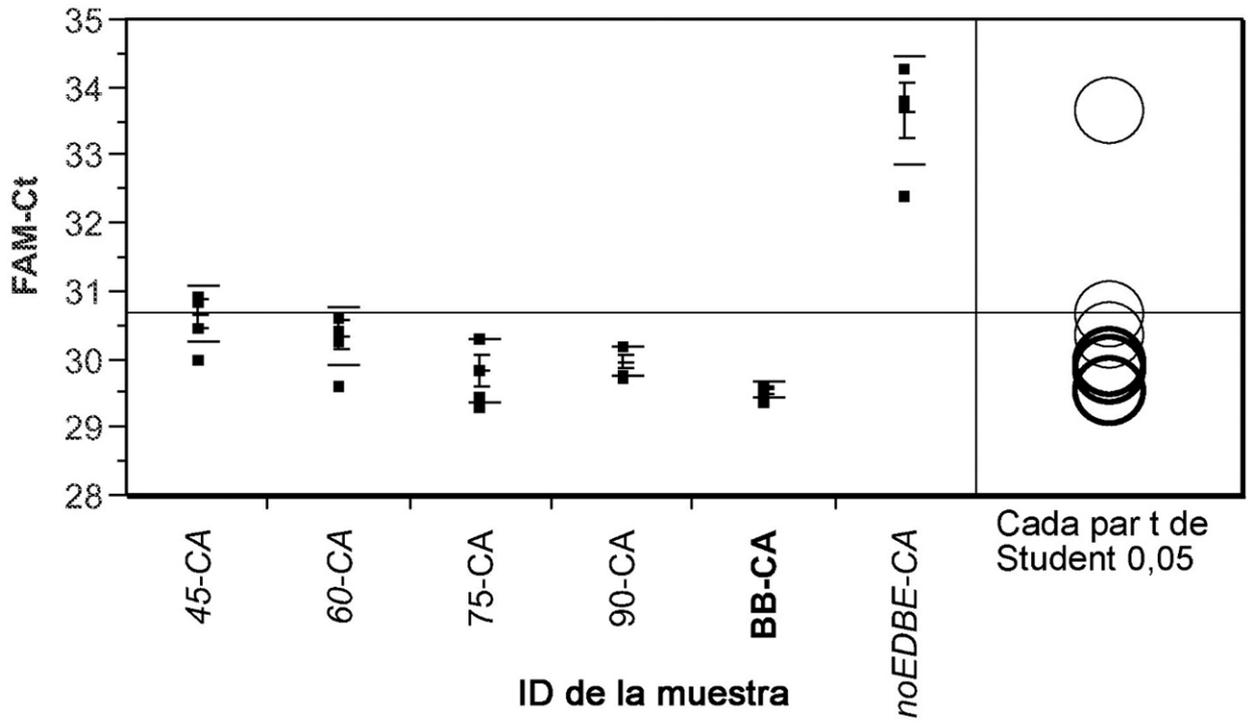


FIG. 9

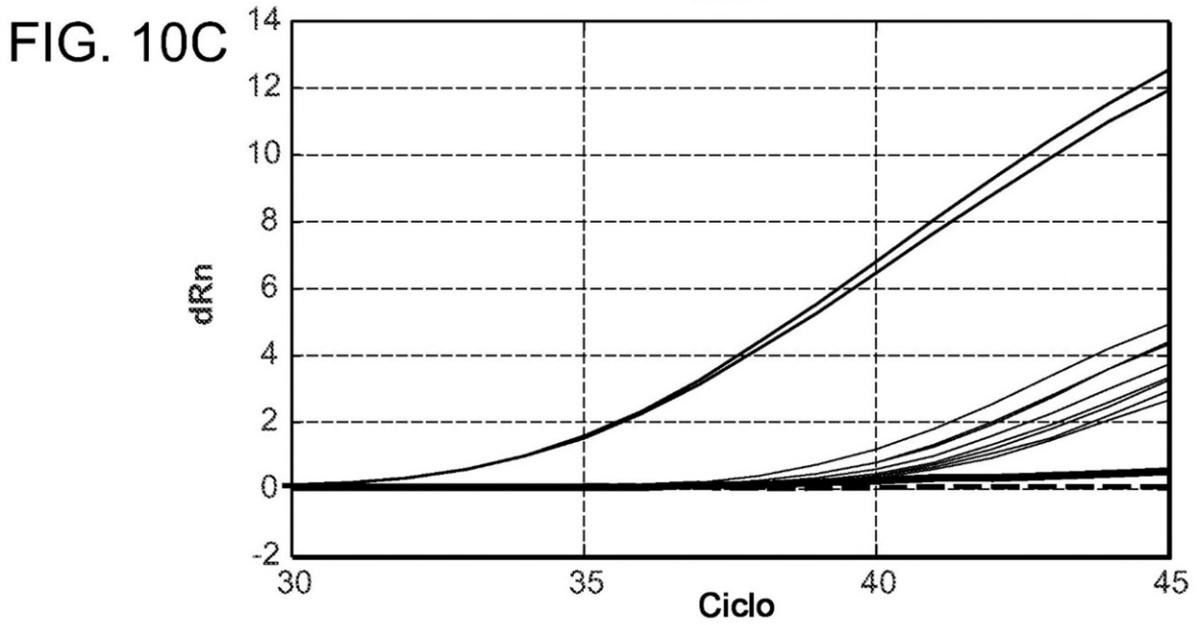
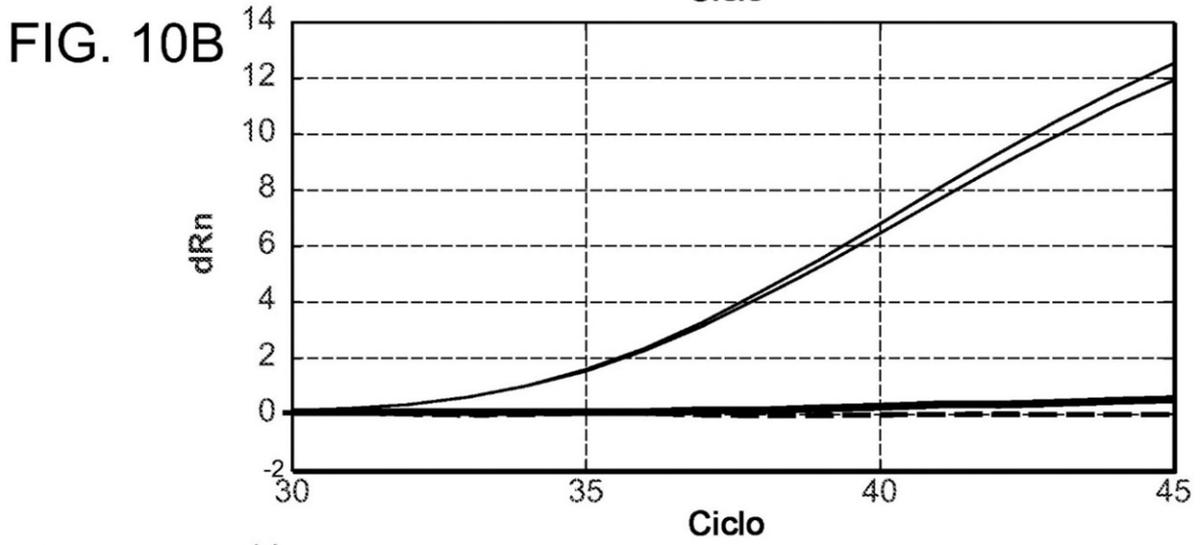
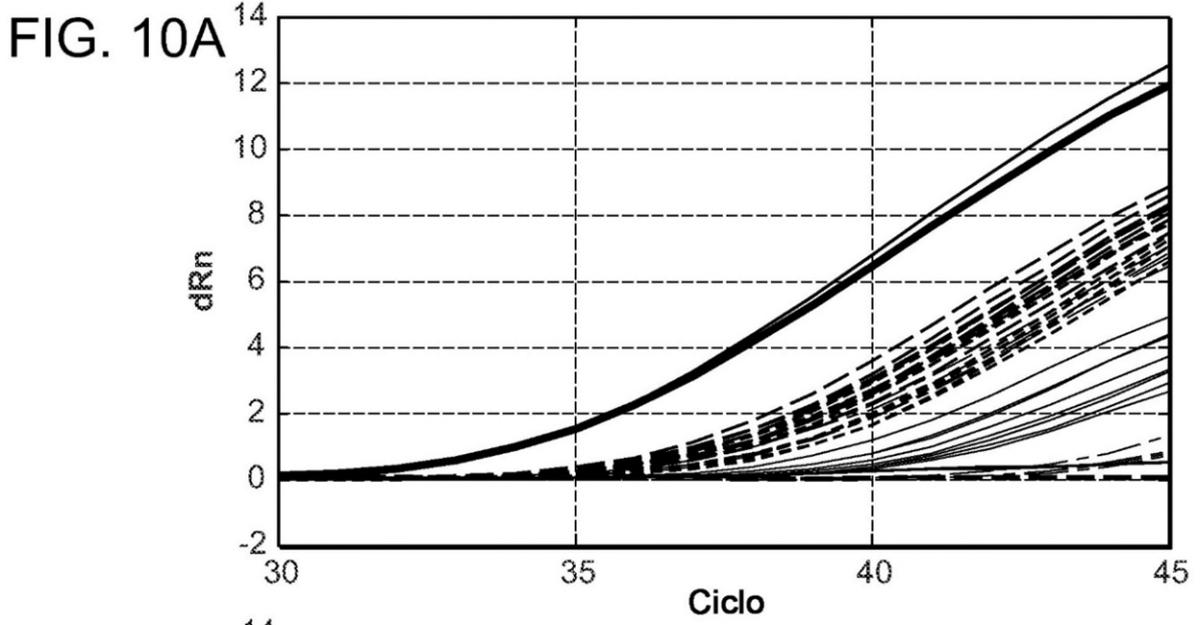


FIG. 10D

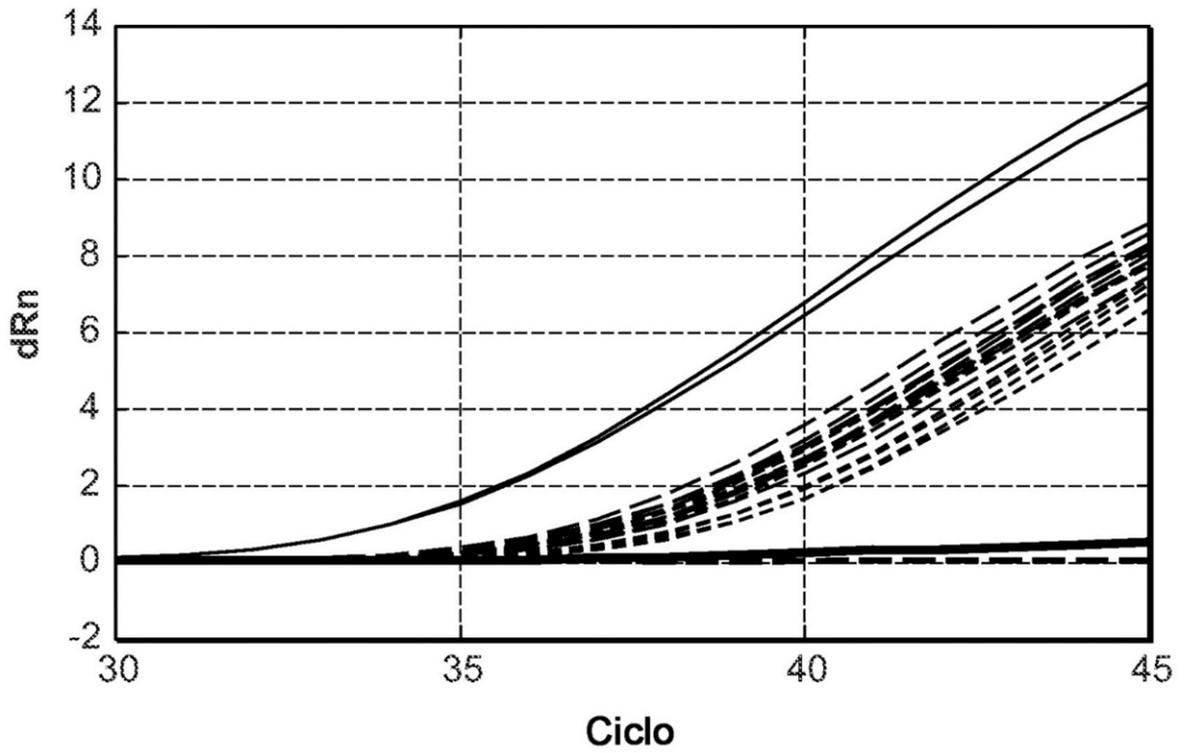
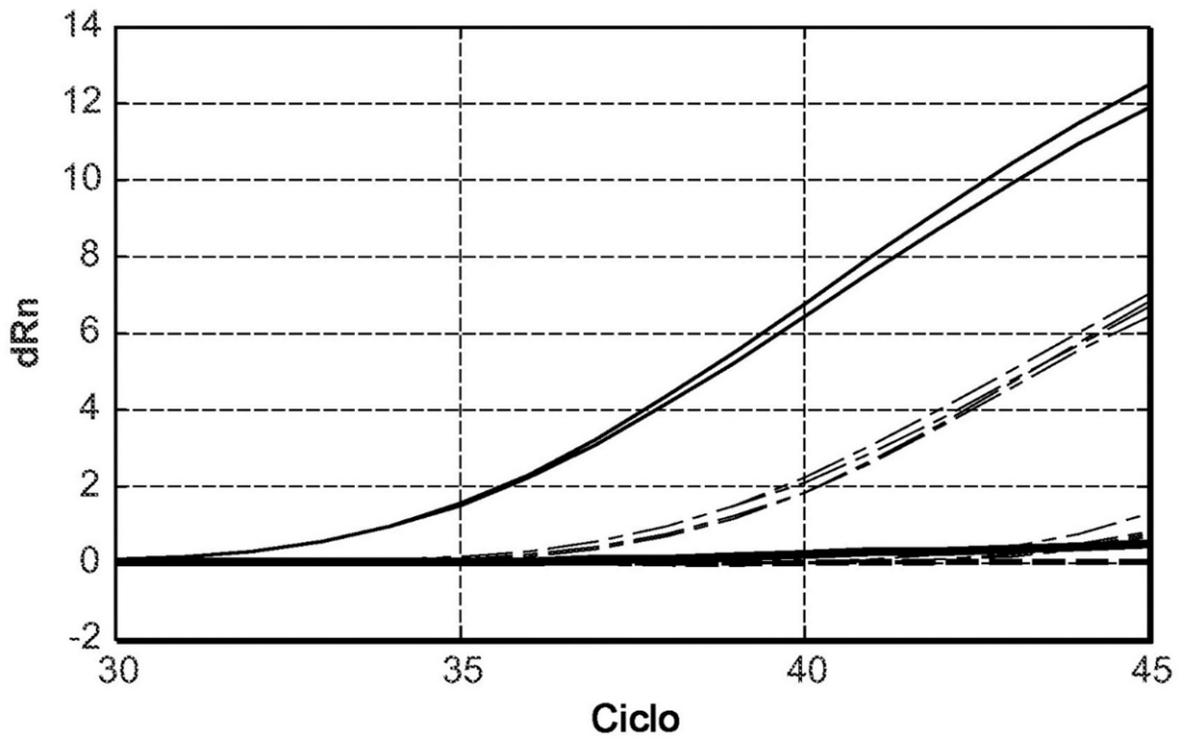
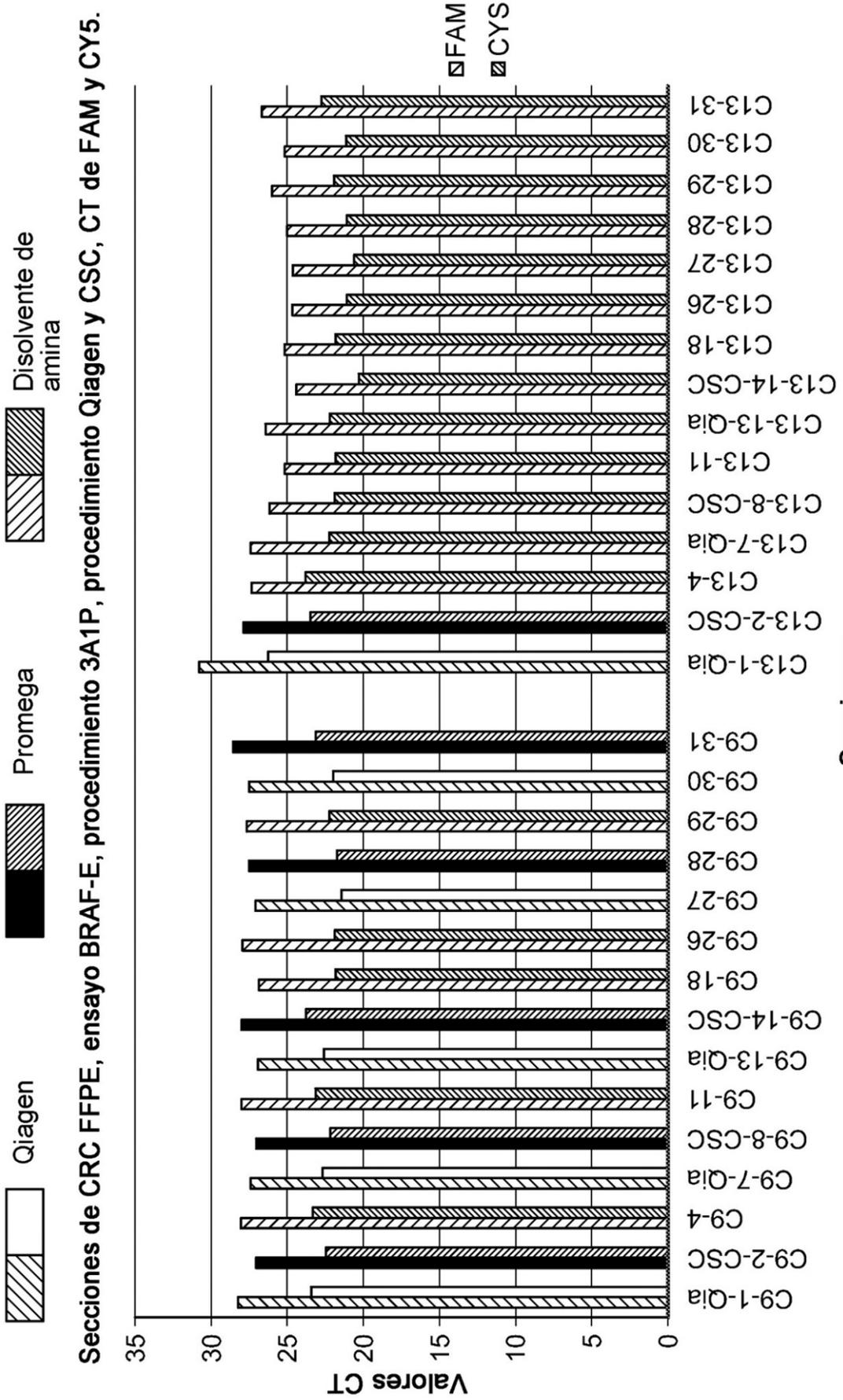


FIG. 10E





Secciones

FIG. 11

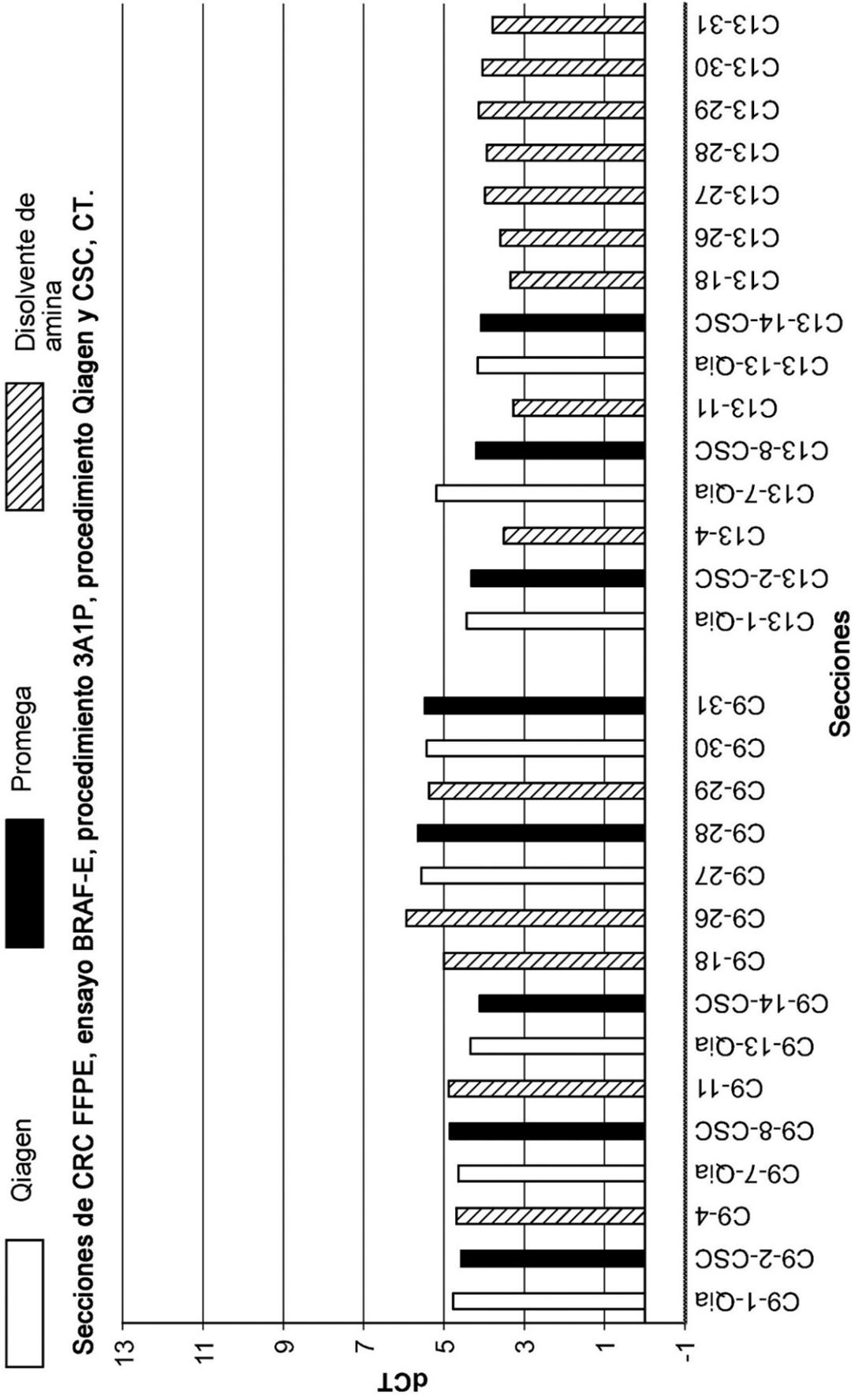


FIG. 12

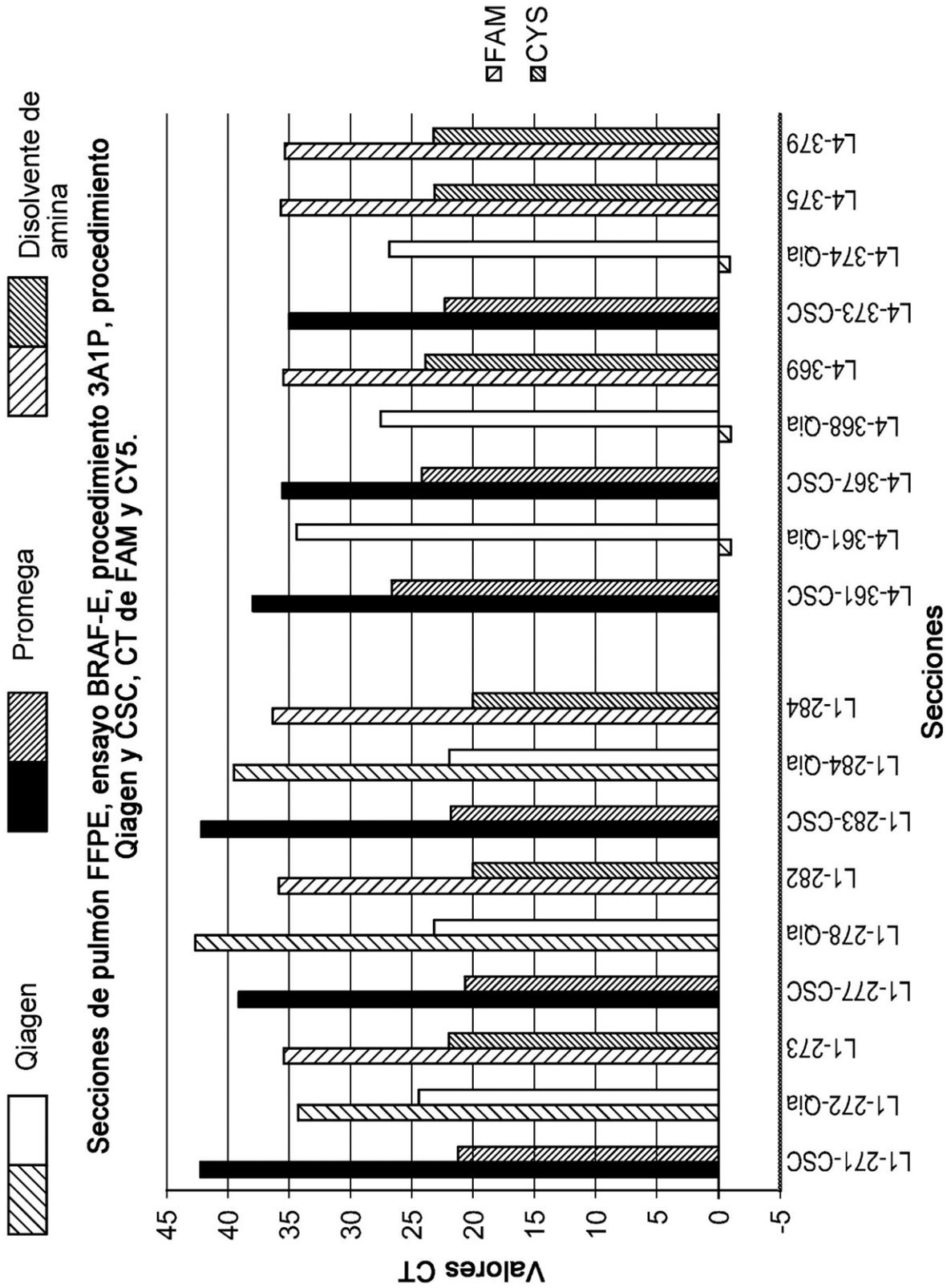


FIG. 13

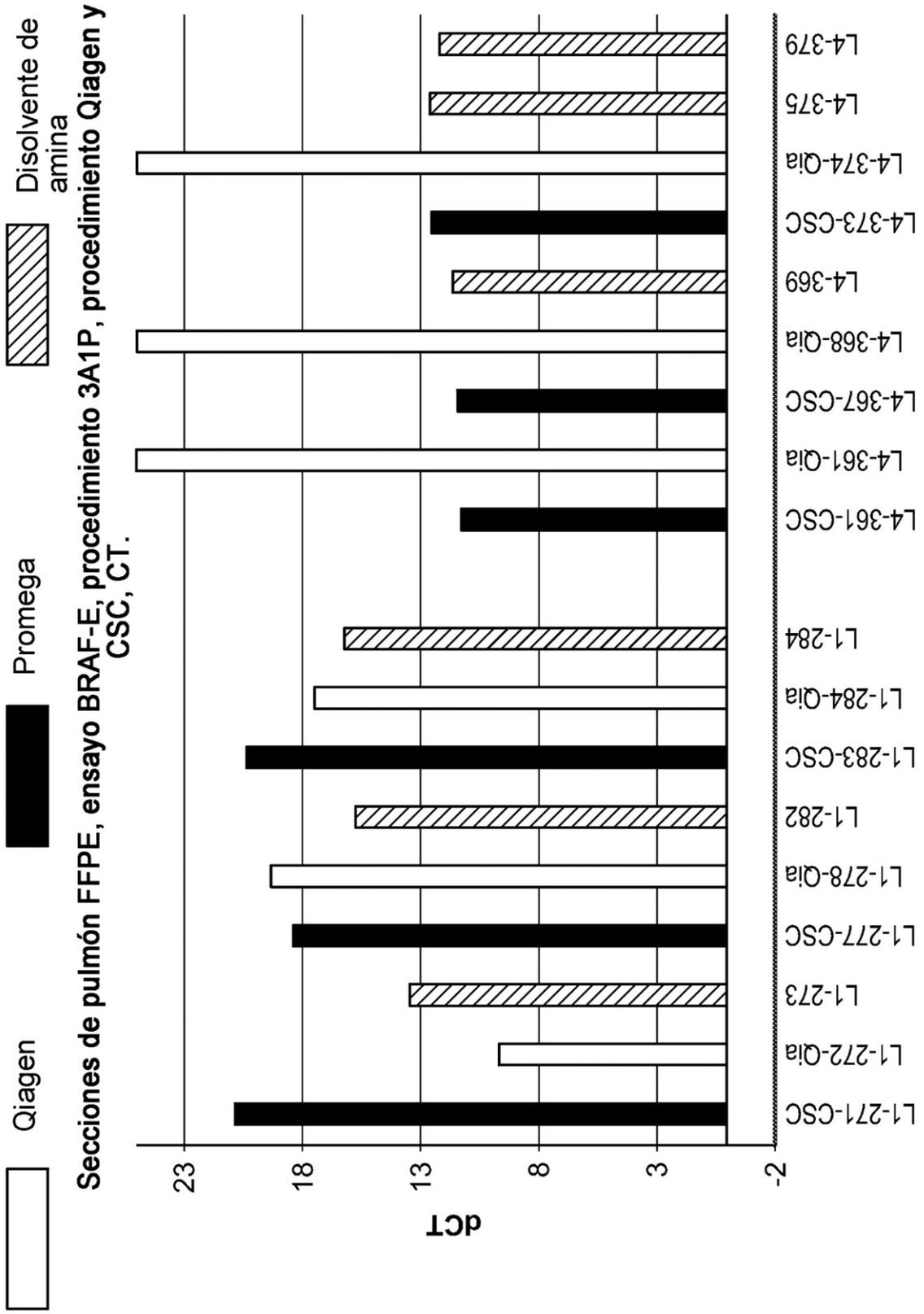


FIG. 14

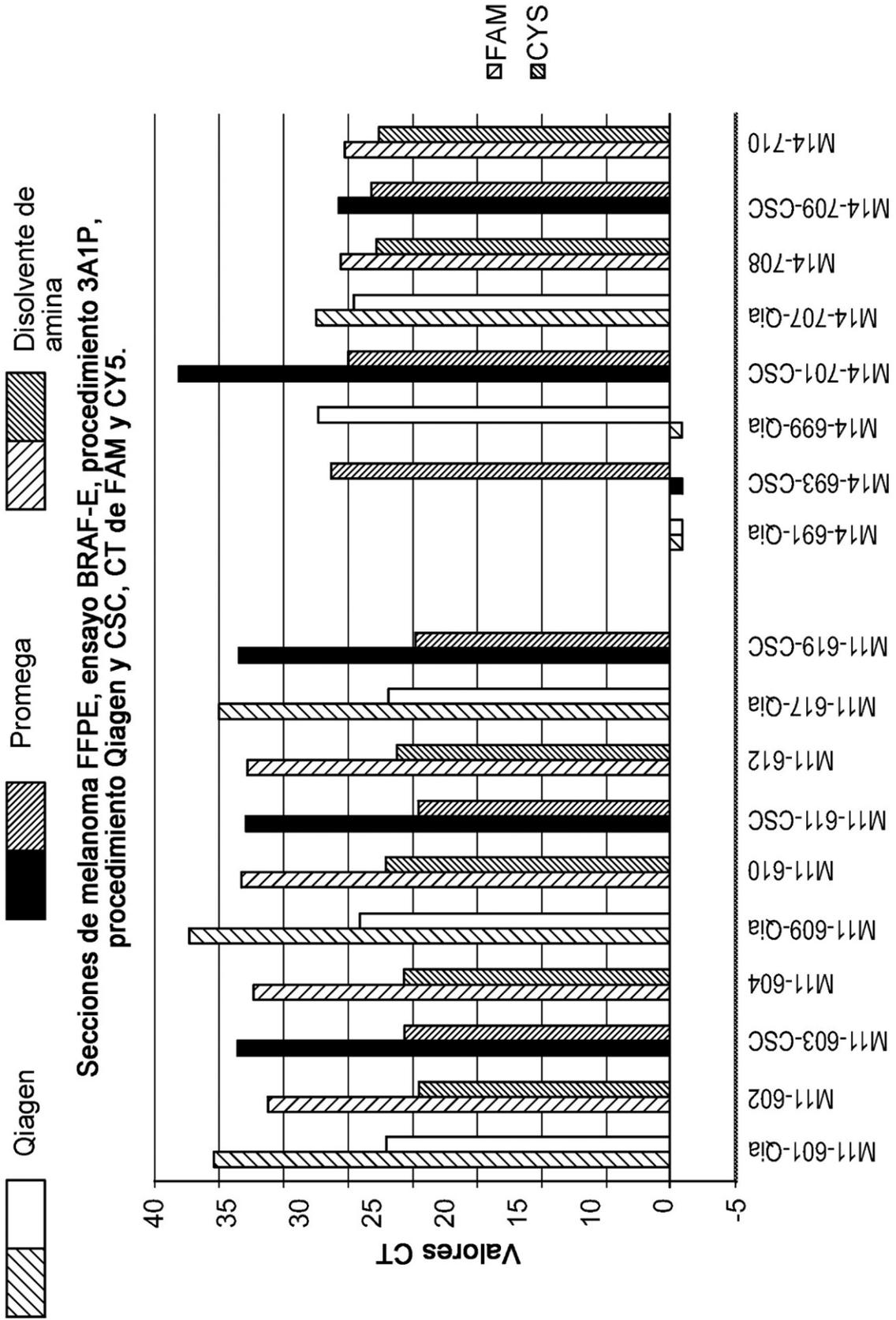


FIG. 15

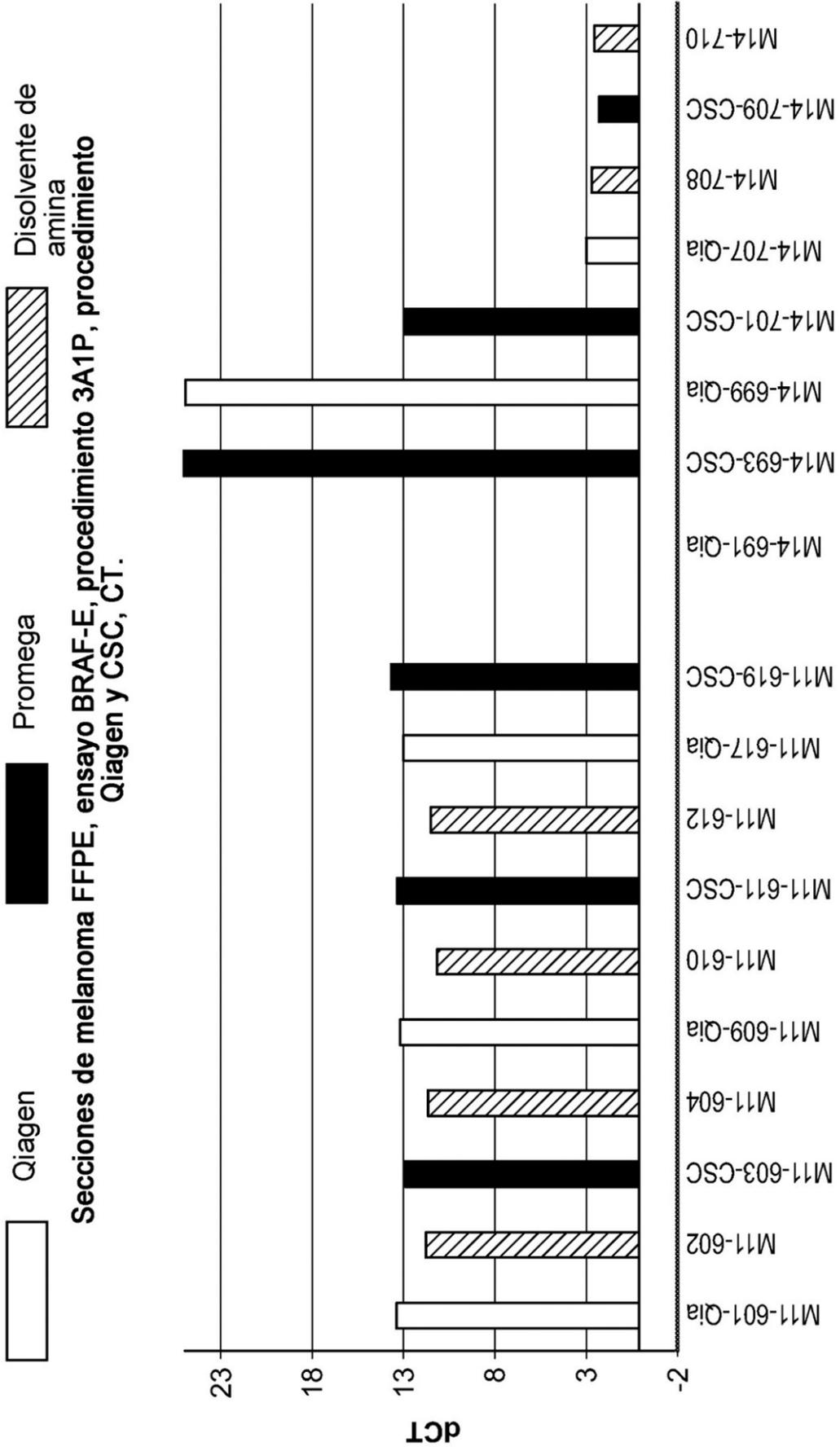


FIG. 16

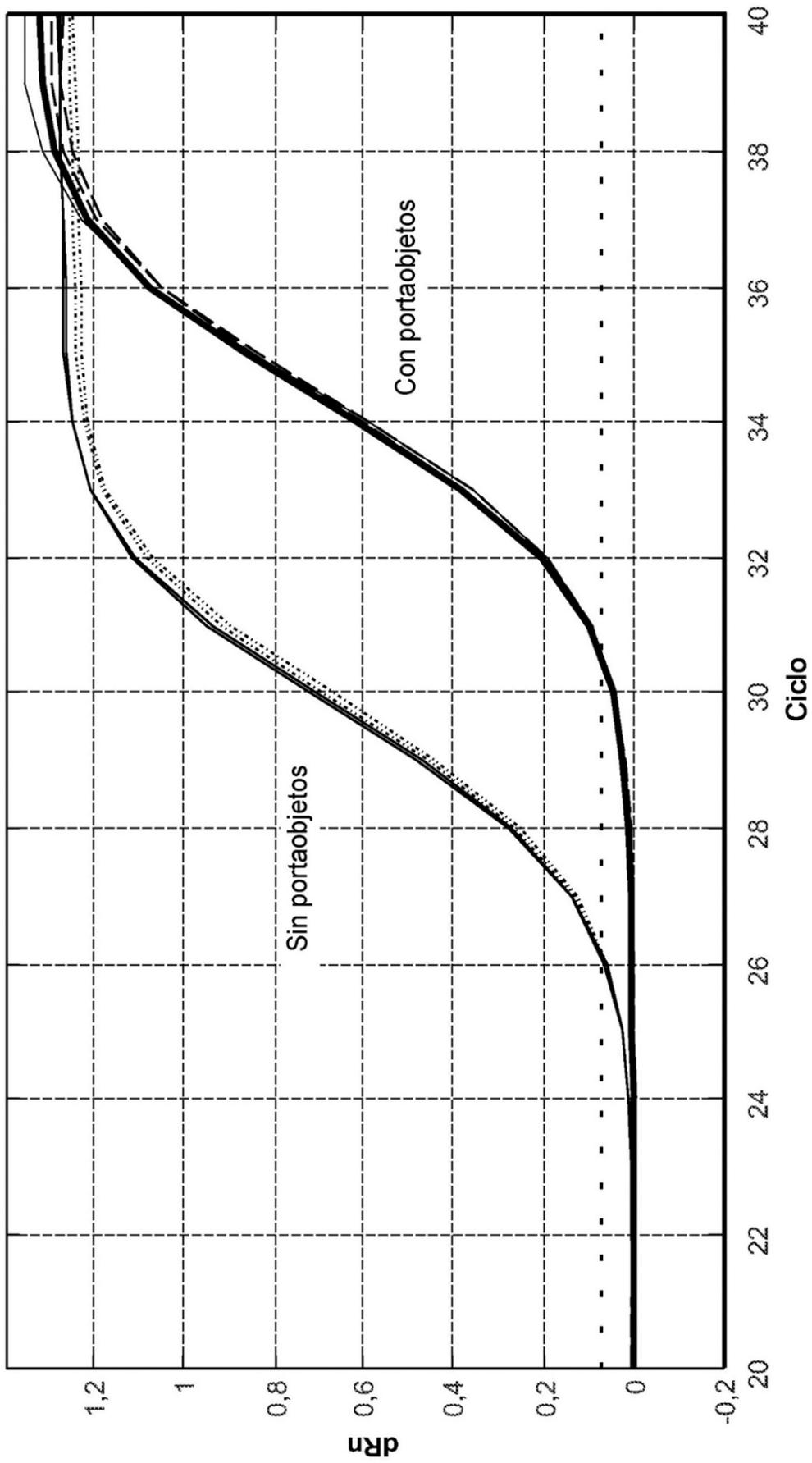


FIG. 17

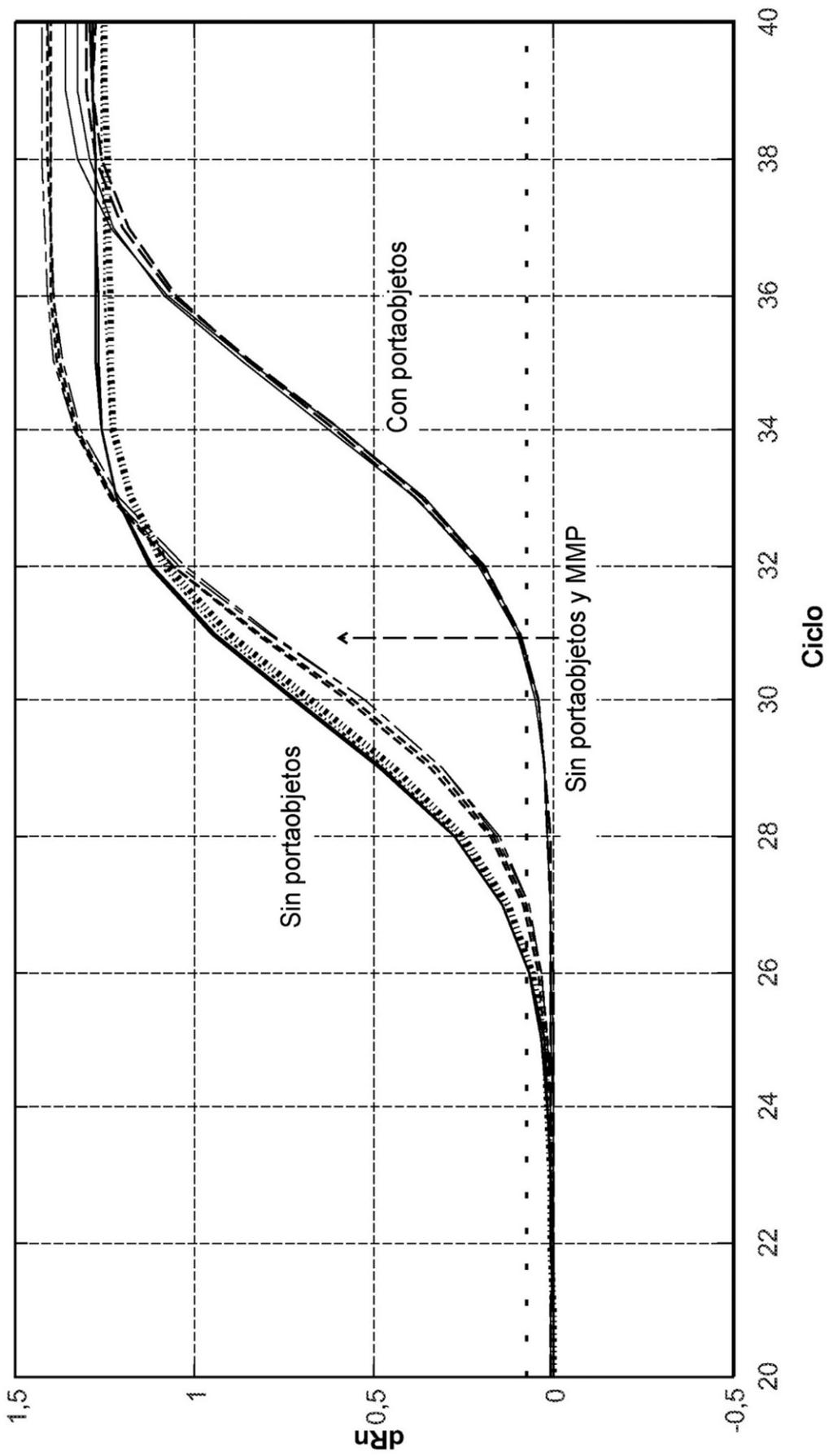


FIG. 18

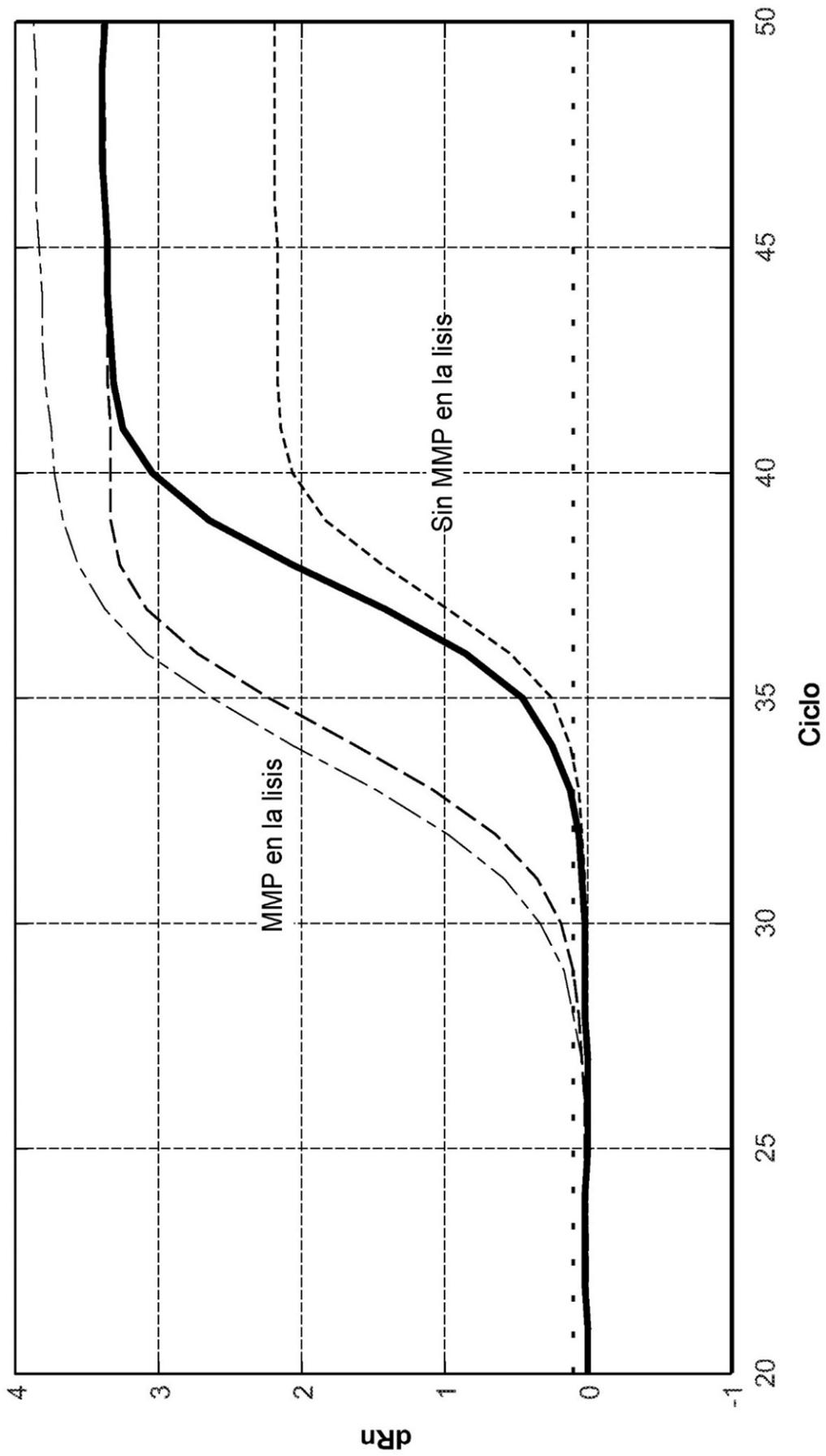


FIG. 19

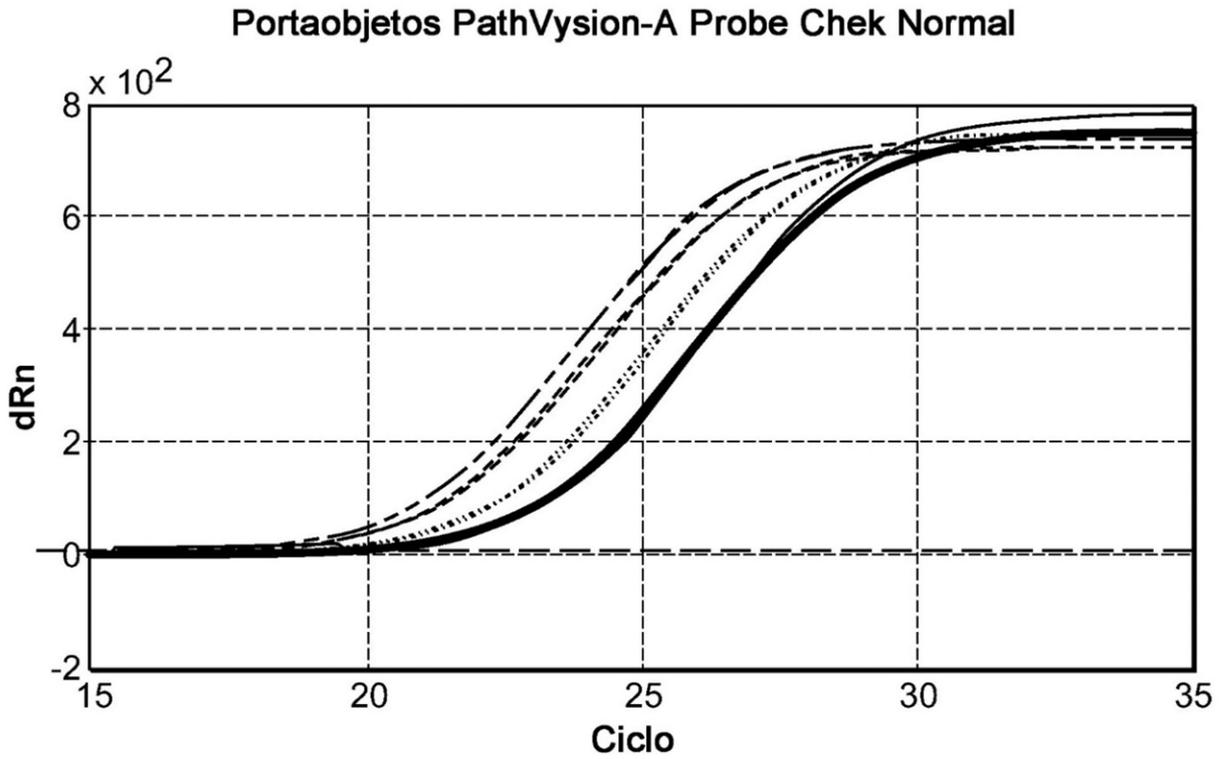
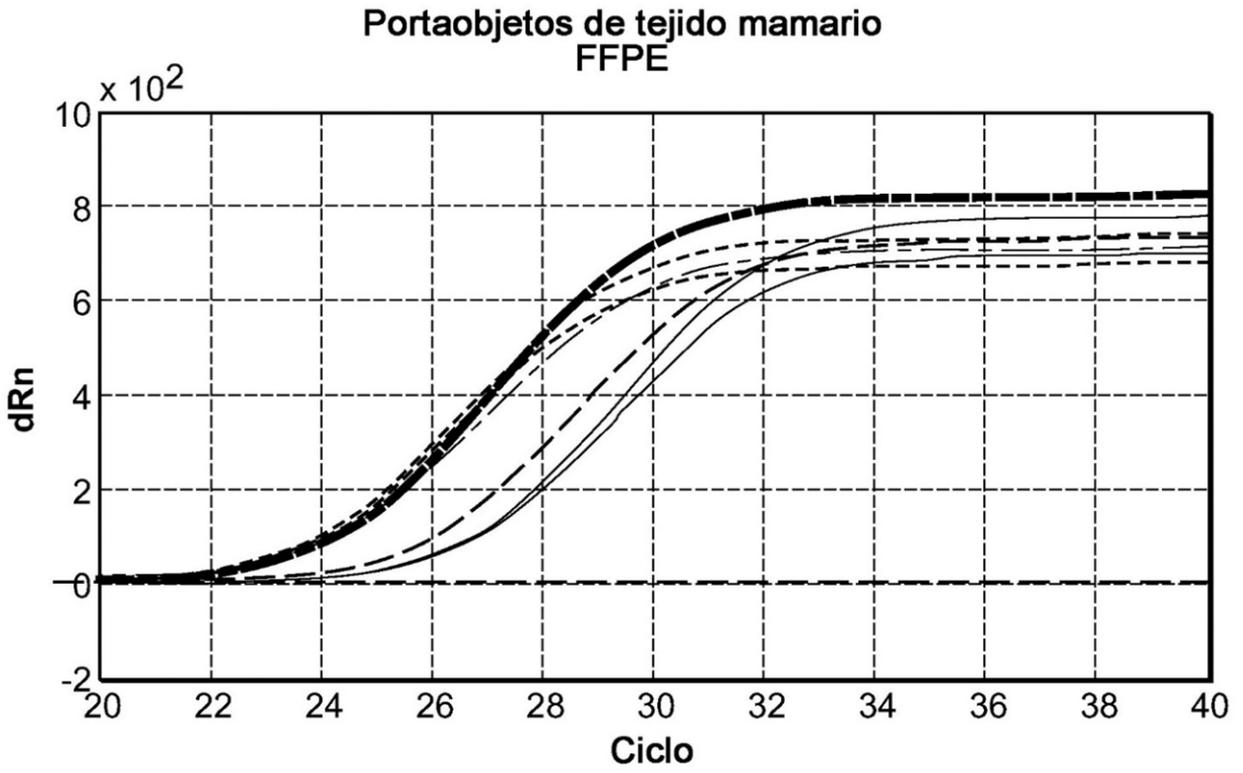


FIG. 20

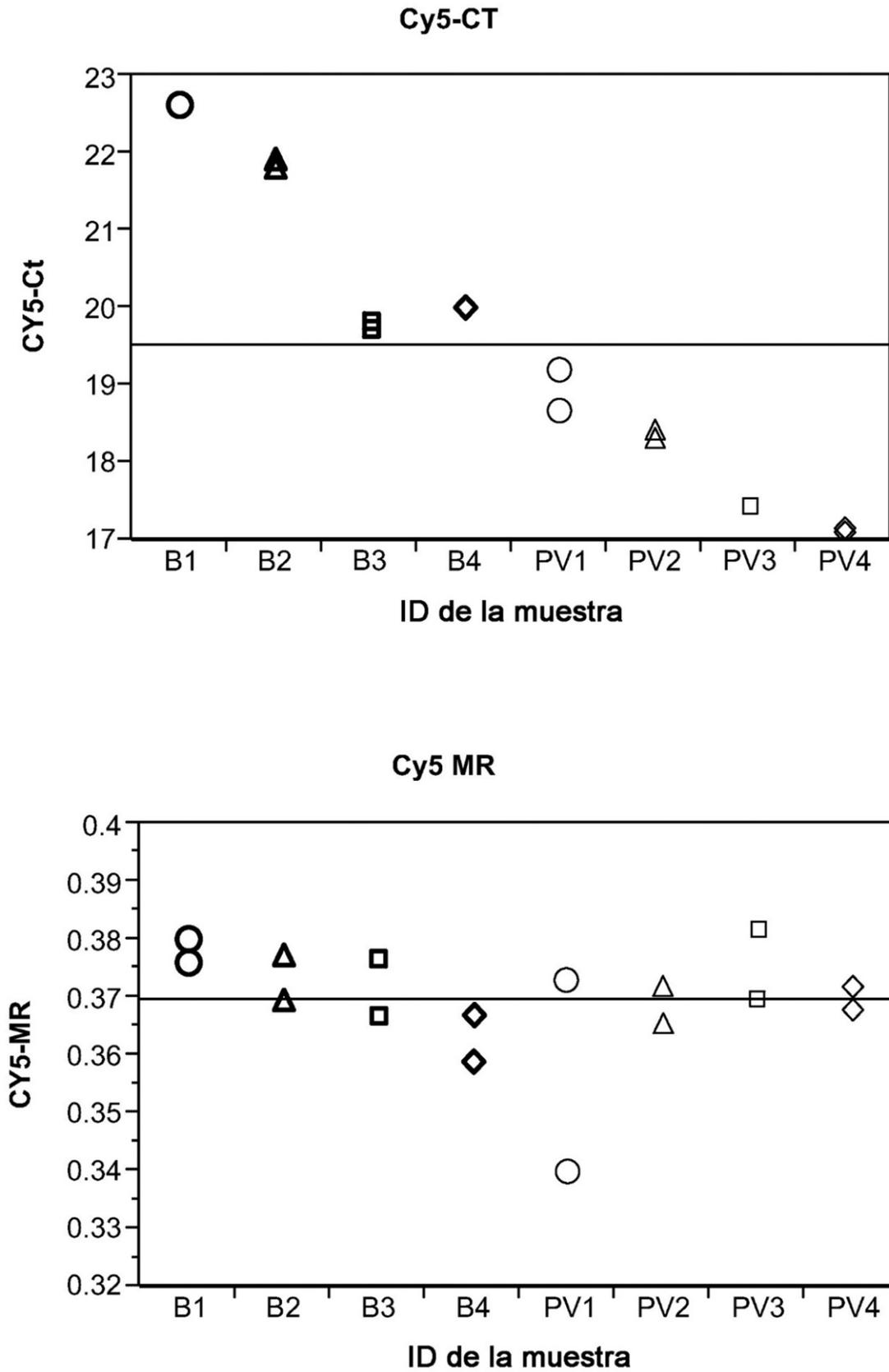


FIG. 21

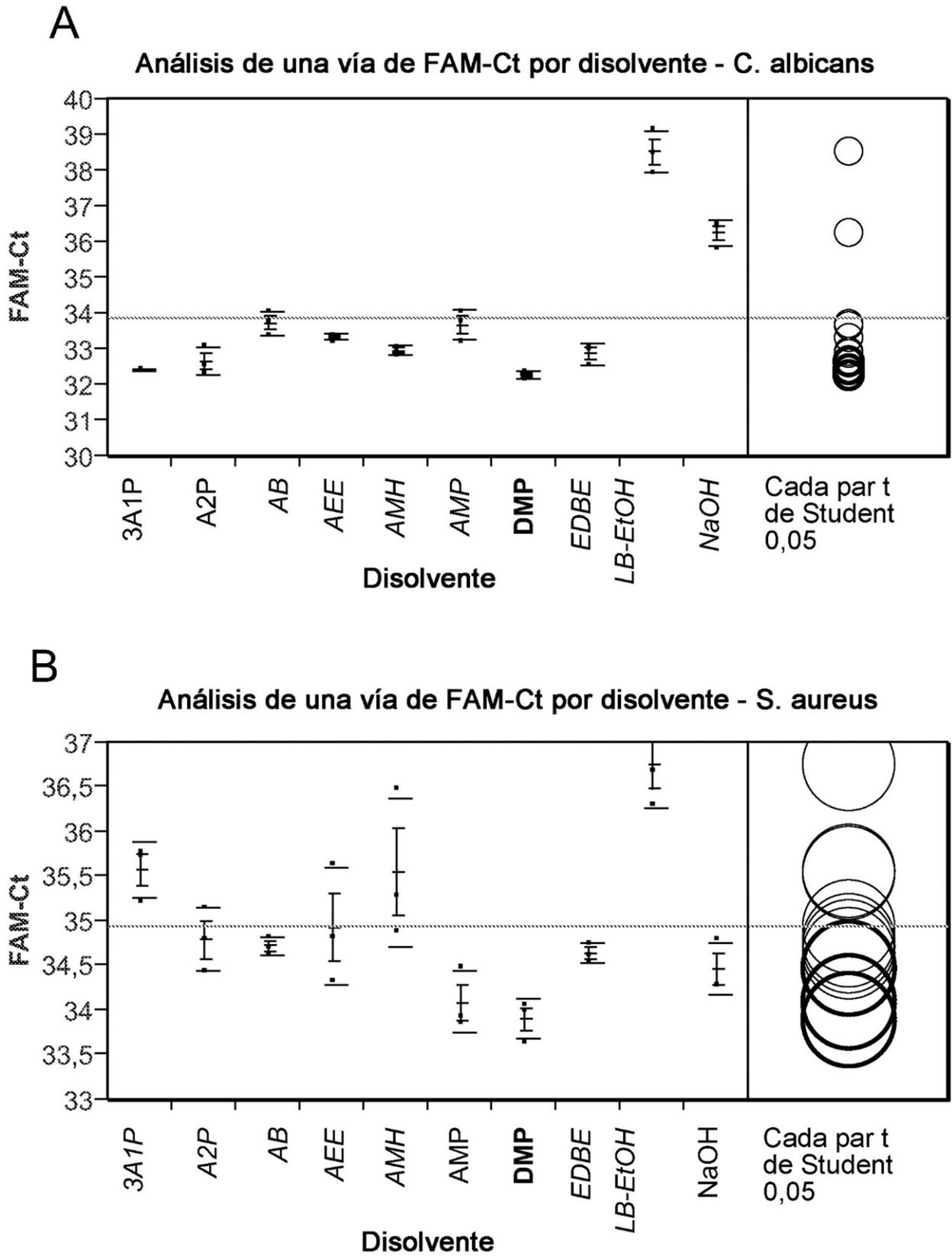


FIG. 22