

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 928 055**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6806** (2008.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2016** **PCT/EP2016/054178**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016** **WO16169677**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2016** **E 16711778 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2022** **EP 3286325**

54 Título: **Procedimiento y kit de test para el aislamiento rápido de ácidos nucleicos por medio de superficies rugosas**

30 Prioridad:

**23.04.2015 DE 102015207481**  
**19.06.2015 DE 102015211393**  
**19.06.2015 DE 102015211394**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.11.2022**

73 Titular/es:

**IST INNUSCREEN GMBH (100.0%)**  
**Robert-Rössle-Str. 10**  
**13125 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**HILLEBRAND, TIMO y**  
**STROH, THORSTEN**

74 Agente/Representante:

**ÁLVAREZ LÓPEZ, Sonia**

ES 2 928 055 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento y kit de test para el aislamiento rápido de ácidos nucleicos por medio de superficies rugosas

- 5 El objeto de la invención es un procedimiento completamente novedoso, universal, muy simplificado y extremadamente rápido para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de diferentes materiales de partida que contienen ácidos nucleicos, lo cual garantiza tanto una calidad muy alta de los ácidos nucleicos que hay que aislar, como el aislamiento de rendimientos de ácidos nucleicos extremadamente altos. El procedimiento se puede llevar a cabo tanto manualmente en el laboratorio, en condiciones de campo, como también de forma completamente automatizada. Se  
10 basa en la unión de ácidos nucleicos a una superficie no lisa.

- En condiciones clásicas, el aislamiento del ADN a partir de células y tejidos se realiza porque los materiales de partida que contienen ácidos nucleicos se disuelven en condiciones altamente desnaturalizantes y reductoras, en parte también con el uso de enzimas degradantes de proteínas, las fracciones de ácido nucleico salientes se purifican a  
15 través de pasos de extracción fenol-cloroformo y se obtienen los ácidos nucleicos de la fase acuosa por medio de diálisis o precipitación de etanol (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., 1989, CSH, "Molecular Cloning").

- Estos "procedimientos clásicos" para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de células y, especialmente, a partir de tejidos consumen mucho tiempo (a veces más de 48 h), requieren un considerable esfuerzo de aparatos y, además,  
20 tampoco se pueden realizar en condiciones de campo. Además, debido a los productos químicos utilizados, como el fenol y el cloroformo, tales métodos son peligrosos para la salud en un grado no menor.

- La siguiente generación de procedimientos para el aislamiento de ácidos nucleicos se basa en un método desarrollado y descrito por primera vez por Vogelstein y Gillespie (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 615 - 619) para la  
25 purificación preparativa y analítica de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa. El método combina la disolución de la agarosa que contiene la banda de ADN que hay que aislar en una solución saturada de una sal caotrópica (NaJ) con una unión del ADN a partículas de vidrio. El ADN fijado a las partículas de vidrio se lava a continuación con una solución de lavado (20 mM Tris HCl [pH 7,2]; 200 mM NaCl; 2 mM EDTA; 50 % v/v etanol) y luego se separa de las partículas portadoras. Este método ha experimentado una serie de modificaciones hasta la fecha y se aplica  
30 actualmente para diferentes procedimientos de extracción y purificación de ácidos nucleicos de diferentes orígenes y, en última instancia, es la base de casi todos los kits disponibles comercialmente para el aislamiento manual y automatizado de ácidos nucleicos. Además, hay una pluralidad de patentes y publicaciones que se refieren al principio básico del aislamiento de los ácidos nucleicos, publicadas por primera vez por Vogelstein y Gillespie, que tienen otras ventajas. Estas variantes se refieren tanto al uso de diferentes materiales de soporte minerales, como también al tipo  
35 de tampones utilizados para la unión de los ácidos nucleicos. Son ejemplos, entre otros, la unión de ácidos nucleicos a soportes minerales en presencia de soluciones de diferentes sales caotrópicas, en las que se utilizan polvos de vidrio finamente molidos (BIO 101, La Jolla, CA), tierras de diatomas (Empresa Sigma) o también geles de sílice o suspensiones de sílice o filtros de fibra de vidrio o tierras minerales (DE 41 39 664 A1; US 5,234,809; WO-A 95/34569 DE 4321904; DE 20207793). Todos estos escritos se basan en la unión de ácidos nucleicos a un material de soporte  
40 mineral a base de vidrio o silicio en presencia de soluciones salinas caotrópicas. En los documentos de patente más recientes, se da a conocer que para la adsorción de ácidos nucleicos a los materiales minerales conocidos y utilizados por el experto también se pueden utilizar, de manera muy eficiente y con éxito, las denominadas sales anticaotrópicas como componente de sistemas tampón de lisis/unión (EP 1135479).

- 45 En resumen, se puede describir el estado de la técnica en el sentido de que los ácidos nucleicos se unen a materiales minerales en presencia de tampones que contienen sales caotrópicas o anticaotrópicas, o también en presencia de tampones que contienen mezclas de sales caotrópicas y anticaotrópicas y, de esta manera, también se pueden aislar. A este respecto, también existen variantes preferentes en las que se utilizan adicionalmente alcoholes alifáticos para la mediación del enlace. El experto también conoce que todos los productos comerciales comunes para el aislamiento  
50 y la purificación de ácidos nucleicos se fundamentan en esta base. Los soportes minerales utilizados se encuentran, a este respecto, en forma de productos a granel sueltos, membranas de filtro o también en forma de suspensiones. Las partículas paramagnéticas o magnéticas se utilizan, a menudo, para la realización de secuencias de extracción automatizadas. A este respecto, se trata, por ejemplo, de materiales silicatos que poseen un núcleo magnético o paramagnético, o también partículas de óxido de hierro, cuya superficie se modifica de modo que estas porten las  
55 funcionalidades necesarias para la unión de los ácidos nucleicos. En principio, las secuencias de extracción para el aislamiento de ácidos nucleicos también se basan, a este respecto, en los mismos esquemas: lisis de la muestra de partida para la liberación del ácido nucleico, unión del ácido nucleico al material de soporte mineral correspondiente, lavado del ácido nucleico unido, secado del material de soporte y elución final del ácido nucleico unido del material de soporte. Aunque estos procedimientos han demostrado su eficacia, también hay una serie de desventajas. Así, la  
60 capacidad de unión de los materiales utilizados es limitada, en particular en el uso de membranas de filtro de espín. Si la muestra inicial contiene demasiado ácido nucleico, a menudo las membranas también se obstruyen. Las

secuencias de proceso automatizadas mediante partículas magnéticas son relativamente complicadas y requieren un tiempo relativamente alto, dependiendo de la aplicación. La realización de un aislamiento de ácido nucleico en condiciones de campo no resulta sencilla.

## 5 Objeto de la invención

Por lo tanto, la invención se basó en el objetivo de eliminar las desventajas de las soluciones técnicas descritas en el estado de la técnica.

## 10 Solución del objeto

El objeto se soluciona según las características de las reivindicaciones. Según la reivindicación 1, se describe un procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras acuosas que contienen ácidos nucleicos, en el que una solución acuosa que contiene ácidos nucleicos libres o liberados por lisis se pone en contacto con una fase sólida que presenta una superficie rugosa antes o después de reducir la polaridad de la solución acuosa, y en el que los ácidos nucleicos se precipitan en la fase sólida y, por lo tanto, se unen a esta y, a continuación, se eliminan de esta solución acuosa con la fase sólida. El término "superficie rugosa" describe, en el sentido de la invención, que la rugosidad de la superficie se puede reconocer al tocar o ver la superficie. El término "antes o después de reducir la polaridad de la solución acuosa" describe la posibilidad de que la solución acuosa pueda entrar en contacto primero con la fase sólida y luego se reduzca la polaridad del agua, como también la posibilidad de que primero se reduzca la polaridad del agua y luego se realice el contacto con la fase sólida. En el caso de lo primero mencionado, la precipitación de los ácidos nucleicos a la fase sólida solo se realiza cuando se reduce la polaridad del agua, por lo general mediante la adición de un alcohol. En la otra variante, la precipitación de los ácidos nucleicos a la fase sólida se realiza inmediatamente con la puesta en contacto. Si se utilizan disolventes orgánicos insolubles en agua, entonces la mezcla se debe mover para que se produzca la precipitación de los ácidos nucleicos en la fase sólida. Esto se realiza preferentemente moviendo la fase sólida dentro de la mezcla.

Las reivindicaciones 2 a 8 muestran formas de realización preferidas de la invención reivindicada. El objeto de la invención es también un kit de test para llevar a cabo el procedimiento, así como equipos para ello.

Según la invención, se ha proporcionado un procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos que es significativamente más sencillo de llevar a cabo que los procedimientos conocidos, lo cual permite llevar a cabo un aislamiento de ácidos nucleicos incluso en condiciones de campo (y por no especialistas) que es extremadamente rápido de realizar, en particular en el contexto de una extracción automatizada, y que permite aislar rendimientos extremadamente altos de ácidos nucleicos con alta calidad.

La invención se basó en la siguiente observación: cuando se procesa una muestra que contiene ácidos nucleicos con reactivos de extracción de kits comercialmente disponibles (por ejemplo, innuPREP Blood DNA Kit/IPC16, Analytik Jena AG; DNeasy Blood & Tissue Kit de la empresa Qiagen) y, en lugar de un material de soporte mineral, se utiliza cualquier material plástico con una superficie rugosa (por ejemplo, polipropileno rugoso) y este se pone en contacto con la muestra situada en el procesamiento, el ácido nucleico se une al material plástico.

El término "superficie rugosa" se debe entender de modo que al tocar o ver la superficie se pueda reconocer que esta no es lisa. Pero, a este respecto, también se puede tratar de una superficie que presenta una estructura (por ejemplo, estrías). Gracias a esta estructura, se elimina la lisura de la superficie, incluso aunque la estructura —es decir, las estrías— sea lisa en sí misma. Si al tocar o ver la superficie no se puede reconocer si una superficie es lisa o rugosa, se puede llevar a cabo un test en la que se dirige un rayo láser hacia esa superficie. En una superficie lisa, el láser solo se refleja en la superficie en la dirección principal. En superficies rugosas se realiza una dispersión en todas las direcciones espaciales. Este test se ha descrito en la página web de la Universidad de Kiel (<http://www.tf.unikiel.de/matwis/amat/semitech/en/kap3/illustr/oberflaechenstruktur.pdf>), página 7.

Las siguientes etapas de lavado se pueden llevar a cabo con tampones de lavado conocidos que contienen alcohol o también solo con un alcohol, asimismo se pueden utilizar para la elución tampones hiposalinos conocidos o también agua. La única diferencia es que en lugar del material de soporte mineral, se utiliza un material plástico rugoso. Después de los primeros experimentos se mostró ya que todos los pasos del proceso se pueden implementar de manera mucho más fácil y rápida. También se muestra que este efecto se pudo observar con todos los materiales plásticos rugosos utilizados. Pero, la peculiaridad de todos los ensayos llevados a cabo inicialmente consistió en que los materiales plásticos rugosos utilizados se han fabricado en una impresora 3D. De este modo, la superficie no se vuelve lisa, sino estriada, es decir, rugosa, ya que se forma un cuerpo en forma de capa durante la impresión 3D. A este respecto, los primeros experimentos se han llevado utilizando una máquina automática de extracción (Thermo Electron), el llamado procesador de partículas magnéticas KingFisher ml. A este respecto, se trata de un equipo para

la extracción de ácidos nucleicos por medio de partículas magnéticas. El equipo utiliza a este respecto peines de plástico en los que se introducen las barras magnéticas, que luego mueven partículas magnéticas en un proceso de alejamiento y se sumergen en los tampones necesarios para una extracción estándar. Estos peines de plástico se han utilizado para fines extraños según la invención. Para ello, por medio de una impresora 3D se han imprimido casquillos de distintos materiales, que luego se han colocado en los peines de plástico. Como muestra se han utilizado aprox.  $1 \times 10^6$  células NIH 3T3. Los reactivos utilizados para el aislamiento de los ácidos nucleicos se han tomado a este respecto, por ejemplo, parcialmente del kit de extracción disponible comercialmente (innuPREP Blood DNA Mini Kit/IPC16; Analytik Jena AG). El proceso de extracción siguió el siguiente flujo de trabajo. Utilizando el tampón de lisis (Lysis Solution CBV) y la proteinasa K, las células se han lisado a 60 °C durante 15 min. Durante la lisis, el plástico de reacción del KingFisher ml se ha precargado con las siguientes soluciones:

- Cavidad 1: 400 ml de isopropanol
- Cavidad 2: 800 ml de Washing Solution LS (del kit de extracción)
- Cavidad 3: 800 ml de etanol 80 %
- 15 Cavidad 4: 800 ml de etanol 80 %
- Cavidad 5: 200 ml de tampón de elución (del kit de extracción)

Después de la lisis, el lisado (400 ml) se ha introducido en la cavidad 1 al isopropanol ya presente allí y se ha iniciado el proceso de extracción. En este proceso, los peines de plástico se mueven sucesivamente desde la cavidad 1 hasta la cavidad 5. A este respecto, en cada cavidad tiene lugar un movimiento vertical de los peines de plástico en la solución tampón presente en cada caso. A este respecto, el proceso de extracción se basa en los principios clásicos del aislamiento de ácidos nucleicos utilizando partículas magnéticas. Pero no se utilizan partículas. En la cavidad 1 se realiza la unión de los ácidos nucleicos al peine de plástico con los casquillos colocados. El ácido nucleico unido se mueve sucesivamente a través de las cavidades 2 - 4. Aquí se realizan los pasos de lavado. Luego sigue un breve paso de secado para la eliminación del etanol. Finalmente, el ácido nucleico en la cavidad 5 se separa de los peines de plástico con casquillos. El proceso se simplifica considerablemente a este respecto, ya que no se han procesado partículas magnéticas. La recogida necesaria de las partículas magnéticas se suprime como etapa, ya que no se han utilizado partículas para la extracción. De este modo, el procedimiento se completó en aprox. 15 minutos. Como ya se ha indicado, se mostró que con todos los materiales plásticos empleados se pueden aislar ácidos nucleicos a través de la unión al material plástico empleado, utilizando una química de extracción disponible comercialmente y aplicando un protocolo de extracción estándar. Estas observaciones han sido sorprendentes. Aunque se conocía que las biomoléculas adsorben de forma inespecífica en los materiales plásticos, pero esto de a partir de soluciones acuosas en las que estaban presentes y esto también solo en cantidades extremadamente pequeñas. También hay descripciones de la utilización de materiales plásticos para el aislamiento de ácidos nucleicos. Sin embargo, esto porque los materiales plásticos se modifican químicamente en sus superficies de tal manera que llevan los mismos grupos funcionales que los materiales silicatos (grupos OH) o también otros grupos funcionales se han sintetizado en superficies de plástico (grupos COOH). Esto se indica, por ejemplo, en el documento de patente EP 1135479. Pero, el experto en la materia también conoce que tales agentes para el aislamiento de ácidos nucleicos no han demostrado su eficacia en la práctica, ya que, en particular, la capacidad de unión es demasiado pequeña. Después de estos primeros experimentos se pudo demostrar que es posible aislar los ácidos nucleicos con los casquillos de plástico impresos. Sin embargo, no estaba claro por qué esto era posible. Sorprendentemente, la explicación se pudo encontrar con un experimento muy simple. De nuevo se ha utilizado el KingFisher ml. Sin embargo, no se han utilizado casquillos de plástico impresos en este ensayo. Se han utilizado los peines de plástico estándar que se utilizan para el procesamiento de partículas magnéticas. A este respecto, algunos peines de plástico se han utilizado tal como estaban y otros peines se hicieron rugosos en la superficie por medio de un dispositivo de grabado. Como ya se ha descrito, se ha llevado a cabo una extracción de células con los mismos reactivos descritos y el mismo proceso. Los resultados detallados se describen en el ejemplo de realización 1.

El experimento muestra de forma impresionante que no se une ácido nucleico a los peines no tratados. Por el contrario a ello, el ácido nucleico se une de manera muy eficiente a los peines rugosos. Para ello se pudo demostrar que solo se debe hacer rugosa la superficie de los materiales plásticos para aislar los ácidos nucleicos de forma altamente eficiente y utilizando reactivos de extracción estándar. Sin embargo, las observaciones experimentales también apuntan a otro hecho interesante. En los primeros ensayos se han utilizado reactivos de kits comerciales para el aislamiento de ácidos nucleicos, como ya se ha descrito. En lugar de la unión de los ácidos nucleicos a fases sólidas minerales (como, por ejemplo, membranas de filtro de centrifugación o partículas magnéticas), el aislamiento de los ácidos nucleicos se realizó por medio de las superficies rugosas según la invención utilizadas. A este respecto, los reactivos utilizados eran siempre tampones de lisis en combinación con un tampón de unión, que era un alcohol. Se conoce que los tampones de lisis son combinaciones de sales, de agentes humectantes y dispersantes, agentes complejantes, así como otros componentes. Estas composiciones tampón en combinación con alcoholes median la unión conocida de ácidos nucleicos a materiales minerales. También se conoce ya desde hace mucho tiempo que las altas concentraciones de sales caotrópicas median la unión de ácidos nucleicos a materiales minerales. Pero, se

mostró que en presencia de una solución acuosa de una alta concentración de una sal caotrópica, los ácidos nucleicos se unen a un material mineral, pero no a una superficie plástica rugosa. Esta observación sugirió la sospecha de que el mecanismo de aislamiento de los ácidos nucleicos por medio de superficies rugosas tenía que ser diferente de los mecanismos conocidos o sospechados de la unión de los ácidos nucleicos a los materiales minerales.

5

Como se conoce por el estado de la técnica ya expuesto, en condiciones clásicas se utilizó el

aislamiento del ADN de células y tejidos dado que los materiales de partida que contienen ácidos nucleicos se disuelven en condiciones altamente desnaturizantes y reductoras, en parte también utilizando enzimas degradantes de proteínas, se purifican las fracciones de ácido nucleico que salen a través de etapas de extracción fenol-cloroformo y se obtienen los ácidos nucleicos de la fase acuosa por medio de diálisis o precipitación de etanol. En este contexto, el experto en la materia conoce que a concentraciones muy altas de ADN de alto peso molecular después de la precipitación de etanol del ADN queda como "hilo" y se puede enrollar desde el recipiente de ensayo por medio de una varilla de vidrio. Pero, esto solo funciona a altas concentraciones de ADN y bajo la condición previa de que el ADN también sea una molécula de alto peso molecular. Por lo tanto, las precipitaciones de etanol se basan principalmente en que se centrifugue la muestra después de la adición de alcohol y se precipite el ADN como pellet. Si las concentraciones de ADN son bajas, entonces se debe incubar adicionalmente la muestra a -20 °C durante algunas horas antes de que se pueda centrifugar para precipitar los ácidos nucleicos. El tiempo de centrifugación se debe prolongar en estos casos luego también en gran medida y puede tomar algunas horas. Por lo tanto, el "enrollar" un ADN altamente concentrado y de alto peso molecular en una varilla de vidrio representa un caso especial. Aunque se conoce desde hace décadas, no es automatizable.

La precipitación basada en la centrifugación de ácidos nucleicos, por otro lado, consume mucho tiempo y también es difícil de automatizar. Por esta razón, el estado de la técnica también documenta de manera impresionante que el perfeccionamiento de tecnologías para el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos se realizó desde los procedimientos clásicos hacia la unión de ácidos nucleicos a materiales de soporte minerales. Estas tecnologías se implementan en la forma de que una muestra que contiene ácidos nucleicos se une a un material de filtro por medio de centrifugación o vacío, o que los ácidos nucleicos se unen a partículas magnéticas o paramagnéticas por medio de separación magnética. Con respecto al aislamiento de los ácidos nucleicos según la invención por medio de la "unión" a una superficie rugosa, esta parece basarse en que los ácidos nucleicos contenidos en la muestra precipitan tras la puesta en contacto de la muestra con una superficie rugosa en la superficie rugosa. Esto se realiza a este respecto porque mediante la adición, por ejemplo, de un alcohol, se reduce la polaridad del entorno y, por lo tanto, se reduce la solubilidad del ácido nucleico. Sorprendentemente, la "precipitación" del ácido nucleico a una superficie rugosa funciona de manera extremadamente eficiente y, por lo tanto, también permite aislar muestras con bajas concentraciones de ácidos nucleicos de manera fácil, rápida y automatizada. A este respecto, no se requieren etapas de centrifugación.

Por lo tanto, el núcleo de la invención consiste en que los ácidos nucleicos libres o liberados por lisis se encuentran en un entorno acuoso, cuya polaridad está ajustada por medio de sustancias orgánicas, de modo que se reduce la solubilidad del ácido nucleico y, a continuación, este entorno acuoso se pone en contacto con una superficie rugosa, de modo que luego el ácido nucleico se precipita en la superficie rugosa y, a continuación, el ADN precipitado se separa de nuevo de la superficie rugosa y está a disposición. Opcionalmente, el ácido nucleico precipitado en la superficie rugosa también se puede lavar y separar después de las etapas de lavado.

Por lo tanto, la presente invención posibilita de la manera más ideal la implementación del objetivo ya mencionado. Para la extracción solo se necesita un material cuya superficie se hace rugosa y un entorno acuoso en el que se encuentre el ácido nucleico a aislar, cuyas condiciones se ajusten por medio de una sustancia orgánica, de modo que se reduzca la solubilidad del ácido nucleico de modo que este se precipite en la superficie rugosa. Esta precipitación en la superficie rugosa se realiza mediante la puesta en contacto de la superficie rugosa con la muestra o mediante la puesta en contacto de la muestra con la superficie rugosa. Como reactivos de extracción se pueden utilizar, por ejemplo, reactivos de kit clásicos (por ejemplo, tampones de lisis) de diferentes tipos. Las condiciones necesarias para la precipitación del ácido nucleico en la superficie rugosa se ajustan mediante la adición de una sustancia orgánica. Asimismo el protocolo de extracción trabaja según el conocido esquema de lisis, unión, lavado y elución. Alternativamente a ello, las etapas de lavado también se pueden omitir. Pero, el procedimiento es ahora extremadamente simple y rápido de llevar a cabo. Se puede llevar a cabo en las siguientes etapas:

1. Lisar una muestra que contiene ácidos nucleicos (o proporcionar una muestra líquida que contiene ácidos nucleicos). Para la lisis de una muestra, la muestra se mezcla con un tampón de lisis clásico o un tampón, que hasta ahora se conoce por procedimientos para el aislamiento de ácidos nucleicos. Estos tampones pueden contener sales caotrópicas o sales no caotrópicas o mezclas de estos dos grupos. Además, estos tampones pueden contener otros componentes como agentes formadores quelantes, tampones de Tris, agentes de malla y

dispersantes, etc. Pero el procedimiento también funciona con tampones que no contienen sales y se componen, por ejemplo, solo de un detergente, Tris y EDTA. Además, también se pueden utilizar enzimas proteolíticas.

2. Adición de un tampón de unión que contiene un componente alcohólico y otros aditivos o adición de un alcohol solo o también adición de acetona o gasolina.

5 3. Puesta en contacto de esta mezcla con un material cuya superficie es rugosa, donde la rugosidad de la superficie se puede reconocer al tocar o ver la superficie.

4. Retirada del material rugoso o que presenta una estructura con el ácido nucleico unido de la mezcla o retirada de la mezcla del material.

5. Si es necesario, lavado del material.

10 6. Si es necesario, secado del material.

7. Separación del ácido nucleico del material con un tampón de elución (tampón hiposalino o agua).

El procedimiento se puede utilizar de forma universal y se puede llevar a cabo tanto de forma automatizada como también manual. Por lo tanto, también se puede utilizar de la manera más ideal para el uso de una extracción de ácido nucleico en condiciones de campo, ya que las etapas necesarias se pueden llevar a cabo fácilmente. Los materiales según la invención a utilizar tampoco son limitantes.

También se pueden utilizar los llamados materiales compuestos, que representan mezclas de polímeros y, por ejemplo, componentes orgánicos o componentes metálicos. Solo es esencial la provisión de una superficie rugosa. La arquitectura del material según la invención tampoco es limitante. También es ventajoso el uso de material magnético rugoso. Dicho material se conoce como granulado bajo la marca TE-CACOPM®. Por ejemplo, también una punta de pipeta estándar en su lado interior se puede hacer rugosa según la invención y se puede usar para la extracción de ácidos nucleicos de forma manual o automática. Para ello, conforme al flujo de trabajo de extracción descrito, el protocolo de extracción se procesa sucesivamente por medio de múltiples etapas de pipeteo. De este modo, el experto en la materia se da cuenta de lo extremadamente fácil que se puede llevar a cabo ahora una extracción de ácidos nucleicos por medio de la presente invención. La presente invención muestra otra enorme ventaja. Si una muestra biológica contiene grandes cantidades de ácidos nucleicos, entonces se puede extraer una cantidad extremadamente grande de ácidos nucleicos por medio del procedimiento según la invención y del plástico según la invención. Estos rendimientos superan a este respecto los rendimientos alcanzables con procedimientos de extracción conocidos usando materiales de soporte minerales muchas veces. Por lo tanto, el procedimiento también es ideal para el procesamiento de grandes volúmenes de muestras. También se muestra que tanto el ADN genómico, ARN y ADN plásmido se pueden aislar. El procedimiento según la invención, como proceso de extracción automatizado, puede procesar muestras múltiples de forma extremadamente rápida. A modo de ejemplo, por medio del procedimiento según la invención, bajo el uso para fines extraños del KingFisher ml, se pueden procesar simultáneamente 15 muestras en 15 minutos. Este procedimiento también se puede acortar aún más sin pérdida de cantidad y calidad del ácido nucleico a aislar. Esto también se puede transferir a otras estaciones de autómatas. Por ejemplo, la extracción también se puede implementar en puntas de pipeta rugosas con todas las máquinas automáticas de pipeta comunes. Con la invención está a disposición así una tecnología de plataforma completamente nueva para el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos, que muestra una pluralidad de ventajas muy claras en comparación con los procedimientos de extracción conocidos. Por lo tanto, el objeto de la invención es también un equipo para el aislamiento de ácidos nucleicos, que comprende puntas de pipeta rugosas.

La invención se debe explicar con más detalle a continuación mediante ejemplos de realización. A este respecto, los ejemplos de realización no representan una limitación de la invención.

## Ejemplos de realización

### Ejemplo 1. Detección de la unión de ácidos nucleicos en superficies rugosas utilizando una química de extracción disponible comercialmente

La detección de que los ácidos nucleicos se pueden unir a superficies rugosas y aislarse se ha llevado a cabo como sigue. A este respecto, la extracción se ha implementado de forma automatizada. Se utilizó un procesador de partículas magnéticas (KingFisher ml; Thermo Electron). El equipo utiliza peines de plástico en los que se introducen las barras magnéticas, que luego mueven partículas magnéticas en un proceso de alejamiento, que se utilizan para aislar los ácidos nucleicos. Estos peines de plástico se han utilizado para el procedimiento según la invención para fines extraños y debían servir para la unión y posterior extracción del ácido nucleico. El material plástico es polipropileno. Según la presente invención, los peines de plástico se han lijado por medio de un equipo de rectificado. También se han utilizado igualmente peines de plástico no tratados. Como muestra se han utilizado respectivamente aprox.  $1 \times 10^6$  células NIH 3T3. La química de extracción utilizada para el aislamiento de los ácidos nucleicos se ha tomado parcialmente del kit de extracción comercial innuPREP Blood DNA Kit/IPC16X (Analytik Jena AG). Por medio de un tampón de lisis (Lysis Solution CBV) y proteinasa K, las células se han lisado a 60 °C durante 15 min. Durante la lisis, el plástico de reacción

del KingFisher ml se ha llenado con las siguientes soluciones:

- 5 Cavidad 1: 400 ml de isopropanol  
Cavidad 2: 800 ml de Washing Solution LS (del kit de extracción)  
Cavidad 3: 800 ml de etanol 80 %  
Cavidad 4: 800 ml de etanol 80 %  
Cavidad 5: 200 ml de tampón de elución (del kit de extracción)

- Después de la lisis, el lisado (400 ml) se ha introducido en la cavidad 1 al isopropanol ya presente allí y se ha iniciado el proceso de extracción. En este proceso, los peines de plástico se mueven sucesivamente desde la cavidad 1 hasta la cavidad 5. A este respecto, en cada cavidad se realiza un movimiento vertical del peine de plástico dentro de la respectiva solución tampón presente. A este respecto, el proceso de extracción se basa en los principios clásicos del aislamiento de ácidos nucleicos utilizando partículas magnéticas. Pero no se utilizan partículas. En la cavidad 1 se realiza la unión de los ácidos nucleicos al cepillo de plástico. El ácido nucleico unido se mueve sucesivamente a través de las cavidades 2 - 4. Aquí se realizan los pasos de lavado. Luego sigue un breve paso de secado para la eliminación del etanol. Finalmente, el ácido nucleico en la cavidad 5 se separa de los peines de plástico. Como se mencionó anteriormente, a este respecto se han utilizado peines de plástico cuya superficie se ha hecho rugosa, así como los peines de plástico originales no tratados. La detección del ácido nucleico aislado se realizó por medio de medición espectrofotométrica y en un gel de agarosa. Además del rendimiento, también se ha determinado la pureza del ácido nucleico aislado.

Resultados de la medición espectrofotométrica:

Muestra	Concentración (ng/μl)	Rendimiento (μg)	Ratio A <sub>260</sub> :A <sub>280</sub>	Ratio A <sub>260</sub> :A <sub>230</sub>
Peine de plástico no tratado 1	0	no medible	no medible	no medible
Peine de plástico no tratado 2	0	no medible	no medible	no medible
Peine plástico rugoso 1	56	11,2	1,90	2,46
Peine plástico rugoso 2	60	12	1,86	2,30
Peine plástico rugoso 3	63	12,6	1,96	2,39

- 25 La figura 1 muestra la detección del ADN en un gel de agarosa. Se han utilizado 4 ml de ácido nucleico por traza del eluato total de 200 ml. Las trazas significan:

1. Conductor de ADN (Conductor 1b)  
2. Peine de plástico no tratado  
30 3. Peine de plástico no tratado  
4. Peine plástico rugoso 1  
5. Peine plástico rugoso 2  
6. Peine de plástico rugoso 3

- 35 Como muestran los resultados de manera impresionante, el ácido nucleico (tanto ADN como también ARN) no se une a los peines no tratados. Pero se une de forma muy eficiente a los peines rugosas y, a continuación, se puede lavar con tampones de lavado clásicos y finalmente separarse de los peines. Por lo tanto, el proceso corresponde exactamente a los desarrollos clásicos de aislamiento de ácidos nucleicos por medio de partículas magnéticas o por medio de materiales de soporte minerales conocidos por el experto en la materia. Pero, el proceso es mucho más rápido y fácil de llevar a cabo. Con este ejemplo, se ha mostrado que este material se puede utilizar para la extracción de ácidos nucleicos utilizando reactivos de extracción conocidos solo por el lijado de una superficie de plástico.

Ejemplo 2: Pruebas de diferentes materiales plásticos con superficies rugosas para la extracción de ácidos nucleicos utilizando una química de extracción disponible comercialmente

- 45 La detección de que los ácidos nucleicos se pueden unir y aislar en superficies rugosas de diferentes materiales plásticos se ha llevado a cabo como sigue. A este respecto, la extracción se ha implementado de forma automatizada. De nuevo se utilizó el procesador de partículas magnéticas KingFisher ml. Los peines de plástico se han utilizado de nuevo para el procedimiento según la invención para fines extraños. Como material para la unión del ácido nucleico sirvió, como en el ejemplo de realización 1, un peine de plástico rugoso. Como control se ha utilizado un peine no tratado. Para probar otros materiales, por medio de una impresora 3D se han fabricado anillos de plástico de diferentes

materiales, que a su vez se han colocado en los peines del equipo KingFisher ml. Estos anillos también se han lijado de nuevo con un equipo de rectificado. Los diferentes materiales eran peines rugosos de los plásticos de KingFisher ml (polipropileno), además del material Biofila Linen (empresa TwoBEars), un material compuesto que se compone de lignina y un polímero complejo de alcoholes aromáticos, el material de acrilonitrilo-butadieno-estireno (ABS), el material de polilactita (PLA), el material de policarbonato (PC), así como el material de poliestireno (PS). Los peines del KingFisher ml se han lijado de manera diferente (tipo A: aprox. 3 cm del peine, tipo B: aprox. 1 cm del peine; C. solo la punta del peine). Como muestra se han utilizado respectivamente aprox.  $1 \times 10^6$  células NIH 3T3. La química de extracción utilizada para el aislamiento de los ácidos nucleicos se ha tomado de nuevo parcialmente del kit de extracción comercial innuPREP Blood ENTONCES Kit/IPC16 (Analytik Jena AG). Utilizando un tampón de lisis (Lysis Solution CBV) y proteinasa K, las células se han lisado a 60 °C durante 15 min. Durante la lisis se ha llenado

el plástico de reacción de KingFisher ml con las siguientes soluciones:

- Cavidad 1: 400 ml de isopropanol
- 15 Cavidad 2: 800 ml de Washing Solution LS (del kit de extracción)
- Cavidad 3: 800 ml de etanol 80 %
- Cavidad 4: 800 ml de etanol 80 %
- Cavidad 5: 200 ml de tampón de elución (del kit de extracción)

- 20 Después de la lisis, el lisado (400 ml) se ha introducido en la cavidad 1 al isopropanol ya presente allí y se ha iniciado el proceso de extracción. El desarrollo de la extracción se realizó como se describe en el ejemplo de realización 1. Los peines de plástico (no tratados o rugosos), así como los peines de plástico con los anillos de plástico insertados, se han movido sucesivamente a través de las cavidades individuales con las soluciones tampón presentadas. Finalmente, el ácido nucleico en la cavidad 5 se ha separado de los peines de plástico. La detección del ácido nucleico aislado se realizó por medio de medición espectrofotométrica y en un gel de agarosa. Además de la concentración y el
- 25 rendimiento, también se ha determinado la pureza del ácido nucleico aislado.

Resultados de la medición espectrofotométrica:

Muestra	Concentración (ng/μl)	Rendimiento (μg)	Ratio A <sub>260</sub> :A <sub>280</sub>	Ratio A <sub>260</sub> :A <sub>230</sub>
Peine de plástico no tratado	ningún ácido nucleico medible	no determinable	no determinable	no determinable
Peine de plástico rugoso tipo A	84	16,8	1,91	1,98
Peine de plástico rugoso tipo B	95	19	1,92	2,01
Peine de plástico rugoso tipo C	75	15	1,90	2,11
Peine plástico con anillo rugoso de BioFila	178	35,6	1,95	2,22
Peine plástico con anillo Rugoso de ABS	179	35,8	2,03	2,30
Peine plástico con anillo rugoso de PLA	205	41	1,94	1,98
Peine plástico con anillo rugoso de PC	185	37	1,99	2,28
Peine plástico con anillo rugoso de PS	157	31,4	1,96	2,32

30

La figura 2 muestra la detección del ADN en un gel de agarosa. Se han utilizado 4 ml de ácido nucleico por traza del eluato total de 200 ml. Las trazas muestran:



1. Conductor de ADN (Conductor 1b)
2. Peine de plástico no tratado
3. peine plástico rugoso tipo A
4. peine plástico rugoso tipo B
- 5 5. Peine de plástico rugoso tipo C
6. Peine de plástico con anillo rugoso de BioFila
7. Peine de plástico con anillo rugoso de ABS
8. Peine de plástico con anillo rugoso de PLA
9. Peine de plástico con anillo rugoso de PC
- 10 10. Peine de plástico con anillo rugoso de PS

Como muestran los resultados, el ácido nucleico no se une a los peines no tratados. Pero, se une de forma muy eficiente a los peines rugosos y los anillos rugosos. Por lo tanto se muestra que la unión es independiente del tipo de material. Todos los materiales rugosos se unen de forma altamente eficiente a los ácidos nucleicos. Igualmente muestra que la superficie lijada (en el caso de los peines) debe ser incluso muy pequeña para unirse a los ácidos nucleicos. Pero, también se muestra que las superficies más grandes también se unen a cantidades aún mayores de ácidos nucleicos (las superficies en los anillos utilizados son más grandes que las superficies lijadas de los peines). La calidad de los ácidos nucleicos es excelente.

#### 20 Ejemplo 3: Comparación de un kit clásico para el aislamiento de ácidos nucleicos con el procedimiento según la invención

Con este ejemplo se debe llevar a cabo la comparación entre un kit clásico para el aislamiento de ácidos nucleicos con el procedimiento según la invención. Como kit de comparación se utilizó el kit DNeasy Blood&Tissue Kit de la empresa Qiagen. Esto se basa en la lisis de las células, la unión de los ácidos nucleicos a la superficie de una columna de filtro de espín con una membrana de sílice, el posterior lavado del ácido nucleico unido y la elución final del ácido nucleico de la membrana de sílice. Este kit es un kit estándar para la extracción de ácidos nucleicos y se utiliza en todo el mundo. Se ha trabajado según el presente manual.

- 30 Para el procedimiento según la invención se ha utilizado de nuevo el KingFisher ml. Como superficie rugosa se han utilizado un peine rugoso y un anillo de PLA rugoso colocado en el peine. El desarrollo de la extracción por medio del procedimiento según la invención se realizó como se indica en los dos ejemplos de realización 1 y 2. Como muestra se han utilizado respectivamente aprox.  $1 \times 10^6$  células NIH 3T3 o  $2 \times 10^6$  células NIH 3T3. La detección del ácido nucleico aislado se realizó por medio de medición espectrofotométrica y en un gel de agarosa. Además de la
- 35 concentración y el rendimiento, también se ha determinado la pureza del ácido nucleico aislado.

Resultados de la medición espectrofotométrica:

Muestra	Concentración (ng/μl)	Rendimiento (μg)	Ratio A <sub>260</sub> : A <sub>280</sub>	Ratio A <sub>260</sub> : A <sub>230</sub>
Qiagen Kit ( $1 \times 10^6$ células)	49	9,8	1,88	2,15
Qiagen Kit ( $2 \times 10^6$ células)	57	11,4	1,84	2,21
Peine de plástico rugoso ( $1 \times 10^6$ células)	101	20,2	1,87	2,04
Peine de plástico rugoso ( $2 \times 10^6$ células)	147	29,4	1,98	2,15
Peine de plástico con anillo rugoso de PLA ( $1 \times 10^6$ células)	240	48	1,96	2,20
Peine de plástico con anillo rugoso de PLA ( $2 \times 10^6$ células)	503	100,6	1,96	2,20

- 40 La figura 3 muestra la detección del ADN en un gel de agarosa. Se han utilizado 2 ml de ácido nucleico por traza del eluato total de 200 ml. Las trazas muestran:

1. Conductor de ADN (Conductor 1b)
2. Qiagen Kit (aprox.  $1 \times 10^6$  células)
- 45 3. Qiagen Kit (aprox.  $2 \times 10^6$  células)
4. Procedimiento según la invención; peine de plástico rugoso (aprox.  $1 \times 10^6$  células)
5. Procedimiento según la invención; peine de plástico rugoso (aprox.  $2 \times 10^6$  células)

6. Procedimiento según la invención; peine de plástico con anillo rugoso de PLA (aprox.  $1 \times 10^6$  células)  
 7. Procedimiento según la invención; peine de plástico con anillo rugoso de PLA (aprox.  $2 \times 10^6$  células)

Como muestran los resultados, con el procedimiento según la invención se puede unir y aislar una cantidad mucho mayor de ácidos nucleicos que con un kit clásico. Por lo tanto, las capacidades de unión son significativamente más altas que las capacidades de unión de un proceso de membrana de sílice disponible comercialmente. Esto subraya la enorme ventaja del procedimiento según la invención.

#### Ejemplo 4: Extracción de ácido nucleico de la sangre

Con este ejemplo se muestra que por medio del procedimiento según la invención también se puede aislar ADN a partir de muestras de sangre y que, a este respecto, los rendimientos son extremadamente altos. Se han utilizado 3 ml de muestras de sangre completa. Después de la lisis de los eritrocitos, las células que contienen el núcleo se han peletizado y, a su vez, después de la adición de un tampón de lisis (tampón de lisis CBV) del kit comercialmente disponible innuPREP Blood DNA Kit/IPC16 (Analytik Jena AG), así como con la adición de

proteínasa K lisada a 60°C durante 30 min. Se ha eluido en 300 ml de tampón de elución.

Para el procedimiento según la invención se ha utilizado de nuevo el KingFisher ml. Como superficies rugosas se ha utilizado un anillo de material lijado de BioFila y PLA colocado en el peine. El desarrollo de la extracción por medio del procedimiento según la invención se realizó como se indica en los ejemplos de realización 1 a 3.

La detección del ácido nucleico aislado se realizó por medio de medición espectrofotométrica.

Resultados de la medición espectrofotométrica:

Muestra	Concentración (ng/μl)	Rendimiento (μg)	Ratio $A_{260}$ : $A_{280}$	Ratio $A_{260}$ : $A_{230}$
Peine de plástico con anillo rugoso de Biofila	270	81	1,78	2,22
Peine de plástico con anillo rugoso de PLA	306	91,8	1,80	2,22

Como muestran los resultados, con el procedimiento según la invención es posible aislar ácidos nucleicos también a partir de muestras de sangre total, donde los rendimientos alcanzables son extremadamente altos.

#### Ejemplo 5: Extracción de ácido nucleico de células NIH 3T3 y de muestras de sangre total por medio del procedimiento según la invención utilizando una punta de pipeta modificada

Con este ejemplo se muestra que por medio del procedimiento según la invención se pueden aislar de forma extremadamente sencilla y rápida ácidos nucleicos por medio de una punta de pipeta modificada.

Como punta de pipeta se ha utilizado una punta de pipeta de 1 ml de la empresa Sarstedt. Esta punta de pipeta se ha acortado en aprox. 5 mm. Con forme el procedimiento según la invención, el lado interior de la punta de la pipeta se ha hecho rugoso por medio de un equipo de rectificado.

Se han utilizado  $1 \times 10^6$  células NIH 3T3 y 2 ml de sangre completa (los eritrocitos se han lisado y las células que contienen núcleos se han peletizado y luego se han utilizado estas células). Tanto las células como las células sanguíneas que contienen núcleo peletizadas se han tratado como en los ejemplos de realización anteriores y se han lisado con el tampón de lisis CBV. El lisado se ha transferido a un recipiente de reacción de 2 ml y se han añadido 400 ml de isopropanol. A continuación se ha utilizado la punta de pipeta rugosa y por medio de una pipeta se ha pipeteado la preparación 20 veces hacia arriba y hacia abajo. Luego se han llenado 3 recipientes de reacción adicionales de 2 ml con los tampones de lavado alcohólicos conocidos (LS, etanol al 80 %, etanol al 80 %). La punta de pipeta se ha sumergido sucesivamente en los respectivos tampones de lavado y se ha pipeteado 5 veces hacia arriba y hacia abajo. Después de la última etapa de lavado, la punta se ha secado y, por lo tanto, se ha retirado el etanol restante. La elución del ácido nucleico unido se realizó con 200ml de tampón de elución para las células NIH 3T3 y con 400ml para la muestra de sangre completa. De nuevo este se ha añadido en un recipiente de reacción de 2 ml. Se ha pipeteado 20 veces hacia arriba y hacia abajo. Después de retirar la punta de pipeta, el ácido nucleico aislado está presente en el recipiente de reacción. El procedimiento es extremadamente sencillo y rápido.

La detección del ácido nucleico aislado se realizó por medio de medición espectrofotométrica.

Resultados de la medición espectrofotométrica:

5

Muestra	Concentración (ng/μl)	Rendimiento (μg)	Ratio $A_{260}^{\circ}$ $A_{280}$	Ratio $A_{260}^{\circ}$ $A_{230}$
Aprox. $1 \times 10^6$ células NIH 3T3; punta de pipeta no tratada	ningún	no	no	no
	ácido nucleico	determinable	determinable	determinable
	medible			
aprox. $1 \times 10^6$ células NIH 3T3; punta de pipeta lijada	84	16,8	1,97	1,88
2 ml de sangre entera (pellet de linfocitos); punta de pipeta no tratada	ningún	no	no	no
	ácido nucleico	determinable	determinable	determinable
	medible			
2 ml de sangre entera (pellet de linfocitos); punta de pipeta lijada	235	94,0	1,79	2,17

Como muestran los resultados, con el procedimiento según la invención es posible unir y aislar ácido nucleico solo utilizando una punta de pipeta, cuyo lado interior se ha hecho rugoso según la invención. Aquí también se muestra que los rendimientos son extremadamente altos. Por medio de la punta de pipeta no tratada no se pueden aislar ácidos nucleicos.

10

Ejemplo 6: Ensayo de diferentes tampones de lisis en combinación con diferentes soluciones alcohólicas o no alcohólicas para la extracción de ácidos nucleicos por medio del procedimiento según la invención

15 De nuevo se ha utilizado el procesador de partículas magnéticas KingFisher ml. Como material para la unión del ácido nucleico se utilizó un anillo de material BioFila lijado con un equipo de rectificado, que se ha colocado en los peines de los plásticos del KingFisher ml. Como muestra se han utilizado respectivamente aprox.  $1 \times 10^6$  células NIH 3T3. La lisis de las células se ha llevado a cabo con tres tampones distintos:

- 20 1. Tampón A que contiene una sal caotrópica: Urea, SDS, Tris HCl, EDTA  
 2. Tampón B que no contiene sal: SDS; Tris HCl; EDTA  
 3. Tampón C que contiene una sal no caotrópica: Cloruro de sodio, CTAB; Tris HCl, EDTA

Las células se han resuspendido en 200 ml de H<sub>2</sub>O y se han mezclado con 200 ml del respectivo tampón de lisis y 20 m y se han lisado a 60 °C durante 15 min. Durante la lisis, el plástico de reacción del KingFisher ml se ha llenado con las siguientes soluciones:

- 30 Cavidad 1: 400 ml de isopropanol o etanol absoluto o acetona  
 Cavidad 2: 800 ml de Washing Solution LS (del kit de extracción innuPREP Blood DNA Kit/IPC16)  
 Cavidad 3: 800 ml de etanol 80 %  
 Cavidad 4: 800 ml de etanol 80 %  
 Cavidad 5: 200 ml de tampón de elución (del kit de extracción innuPREP Blood DNA Kit/IPC16)

Después de la lisis realizada, el lisado (400 ml) se ha añadido a la cavidad 1 a diferentes soluciones ya presentes allí (isopropanol; etanol absoluto o acetona) y se ha iniciado el proceso de extracción. El desarrollo de la extracción se realizó como se describe en el ejemplo de realización 1. La detección del ácido nucleico aislado se realizó por medio de medición espectrofotométrica y en un gel de agarosa. Además de la concentración y el rendimiento, también se ha determinado la pureza del ácido nucleico aislado.

35

Resultados de la medición espectrofotométrica:

Muestra	Concentración (ng/μl)	Rendimiento (μg)	Ratio A <sub>260</sub> :A <sub>280</sub>	Ratio A <sub>260</sub> :A <sub>230</sub>
Tampón de lisis A + isopropanol	174	34,8	1,90	2,10
Tampón de lisis A + etanol absoluto	213	42,6	1,89	2,11
Tampón de lisis A + acetona	220	44	1,92	2,17
Tampón de lisis B + isopropanol	150	30	1,90	2,11
Tampón de lisis B + etanol absoluto	106	21,2	1,80	1,99
Tampón de lisis B + acetona	128	25,6	1,87	1,97
Tampón de lisis C + isopropanol	112	22,4	1,85	1,97
Tampón de lisis C + etanol absoluto	98	19,6	1,86	2,00
Tampón de lisis C + acetona	89	17,8	1,87	1,99

La figura 4 muestra la detección del ADN en un gel de agarosa. Se han utilizado 4 ml de ácido nucleico por traza del eluato total de 200 ml. Las trazas muestran:

- 5 1. Conductor de ADN (Conductor 1b)
2. Tampón de lisis A + isopropanol
3. Tampón de lisis A + etanol absoluto
- 10 4. Tampón de lisis A + acetona
5. Tampón de lisis B + isopropanol
6. Tampón de lisis B + etanol absoluto
7. Tampón de lisis B + acetona
8. Tampón de lisis C + isopropanol
9. Tampón de lisis C + etanol absoluto
- 15 10. Tampón de lisis C + acetona

Como muestran los resultados, para el procedimiento según la invención se pueden utilizar tampones de lisis compuestos de manera diferente, así como también combinación de estos tampones de lisis con alcoholes o también con un no alcohol. A este respecto, en el tampón de lisis pueden estar contenidas sales caotrópicas, ninguna sal o sales no caotrópicas.

#### Ejemplo 7. Detección de recuperación de ADN genómico de una solución acuosa

Se ha preparado una solución acuosa que contenía ADN genómico que se ha aislado de la sangre. 300 ml de esta solución de ADN se ha mezclado con 30 ml de una solución de acetato de sodio 3 molar, así como con 300 ml de isopropanol.

La detección de que también los ácidos nucleicos ya aislados se pueden unir a superficies rugosas y aislarse se ha llevado a cabo como sigue. A este respecto, la extracción se ha implementado de forma automatizada. Para el procedimiento según la invención se ha utilizado de nuevo el KingFisher ml. Como superficie rugosa se ha utilizado un anillo de material Biofila colocado en el peine. Este anillo se ha fabricado por medio de la técnica de impresión 3D y contenía una estructura de estrías en la superficie.

El plástico de reacción del KingFisher ml se ha llenado con las siguientes soluciones:

- 35 Cavidad 1: Solución de ADN / acetato de sodio / isopropanol
- Cavidad 2: 800 ml de etanol 80 %
- Cavidad 3: vacía
- Cavidad 4: vacía
- 40 Cavidad 5: 150 ml de agua

El desarrollo de la extracción se realizó como se describe en el ejemplo de realización 1, donde esta vez solo se ha llevado a cabo una etapa de lavado. La detección del ácido nucleico aislado se realizó en un gel de agarosa.

La figura 5 muestra la detección del ADN en un gel de agarosa. Se han utilizado 10 ml de ácido nucleico por traza del eluato total de 150 ml. Las trazas significan:

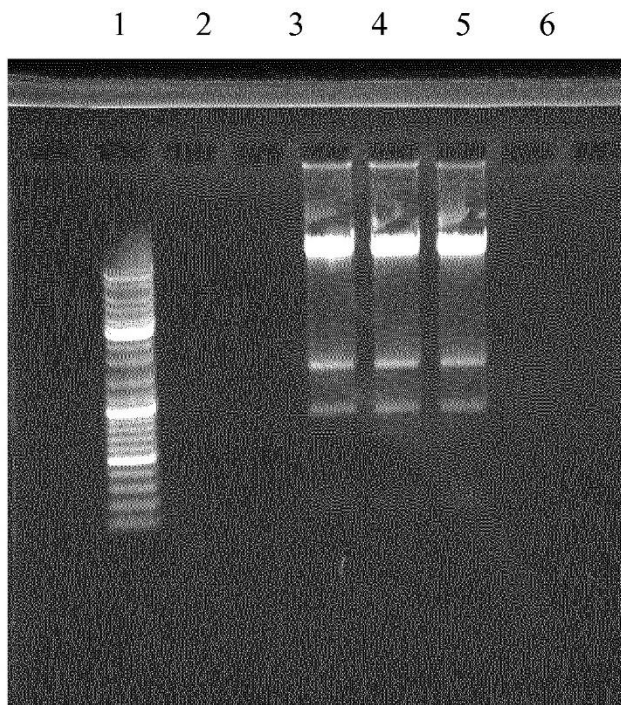
- 5      1. Conductor de ADN (Conductor 1b)
- 2. Vacio
- 3. Peine de plástico no tratado
- 4. Peine de plástico no tratado
- 5. Peine de plástico con anillo colocado de Biofila y estructura de estrías
- 10     6. Peine de plástico con anillo colocado de Biofila y estructura de estrías

Como muestran los resultados de manera impresionante, el ácido nucleico no se une a los peines no tratadas. Pero, se une a los anillos que poseen una estructura de estrías. Por lo tanto se ha demostrado que también se puede recuperar un ADN ya presente a partir de una solución acuosa. Durante la adición de isopropanol y acetato de sodio, 15 la solubilidad del ADN se ha reducido de modo que se pudiera unir a la superficie del material plástico.

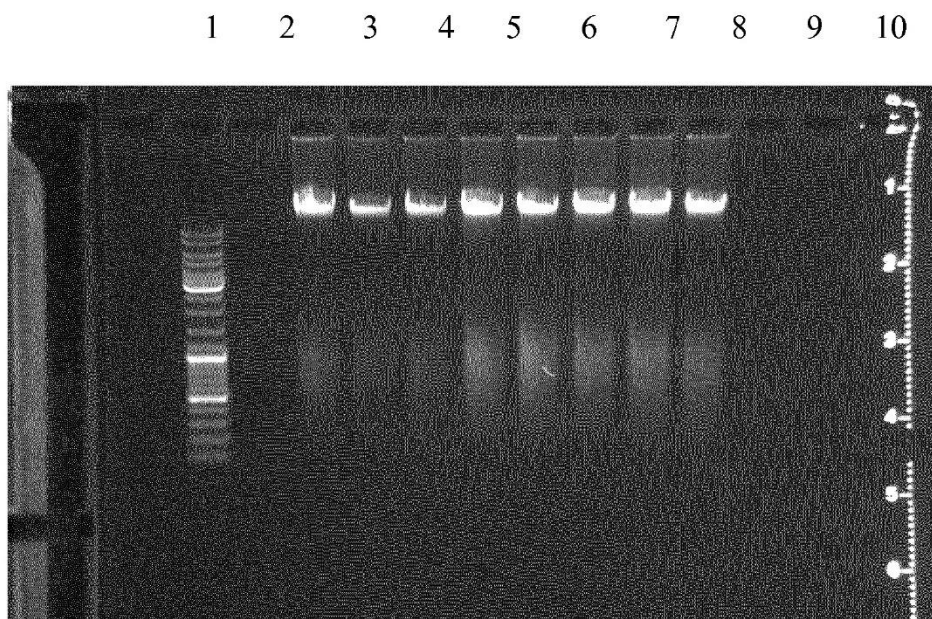
## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras acuosas que contienen ácidos nucleicos, **caracterizado porque** una solución acuosa que contiene ácidos nucleicos libres o liberados por lisis se pone en contacto con una fase sólida que presenta una superficie rugosa de plástico antes o después de reducir la polaridad de la solución acuosa, donde la rugosidad de la superficie se puede reconocer al tocar o ver la superficie y los ácidos nucleicos se precipitan en la fase sólida y, a continuación, se eliminan de esta solución acuosa con la fase sólida.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la superficie rugosa existe como:
  - a) materiales plásticos que se han generado en una impresora 3D; o
  - b) casquillos que se generan por medio de impresión 3D y se colocan sobre peines de plástico; o
  - c) peines se han hecho rugosos en la superficie.
- 15 .
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque**, para reducir la polaridad de la solución acuosa se utilizan disolventes orgánicos, preferentemente alcoholes.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado porque** los disolventes orgánicos se utilizan en una concentración entre 5 % en volumen y 90 % en volumen, preferentemente entre 30 % en volumen y 75 % en volumen.
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la solución acuosa contiene adicionalmente:
  - a) sales; y/o
  - b) al menos un detergente; y/o
  - c) aminoalcoholes o sustancias para ajustar el valor de pH, como TRIS.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado porque**:
  - a) las sales están presentes en una concentración comprendida entre 1 mM y 5 M, preferentemente de 5 mM a 2 M;
  - b) el detergente está presente en una concentración entre 0,1 % y 30 % en volumen, preferentemente 1 a 10 %;
  - c) TRIS está presente en una concentración entre 1 mM y 2 M, preferiblemente 10 mM a 1 M.
- 35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** están contenidos aditivos adicionales, preferentemente una proteinasa.
- 40 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** la fase sólida es móvil dentro de la solución acuosa.
- 45 9. Kit de test para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras acuosas que contienen ácidos nucleicos y que comprenden, al menos, una sustancia para reducir la polaridad de la solución acuosa, al menos una fase sólida en forma de:
  - a) casquillos que se generan por medio de impresión 3D y se colocan sobre peines de plástico; o
  - b) peines que se han hecho rugosos en la superficie;
- 50 para unir los ácidos nucleicos con superficie rugosa, donde la rugosidad de la superficie se puede reconocer al tocar o ver la superficie, así como tampones de elución.
- 55 10. Uso de materiales con superficie rugosa para el aislamiento de ácidos nucleicos de muestras que contienen ácidos nucleicos, donde la rugosidad de la superficie se puede reconocer al tocar o ver la superficie, para el aislamiento de ácidos nucleicos de muestras que contienen ácidos nucleicos.

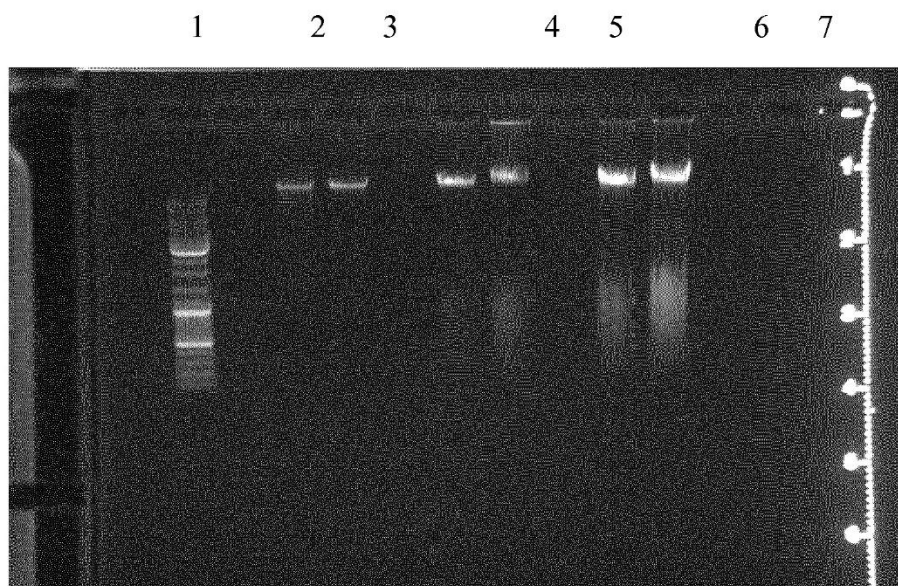
**Figura 1**



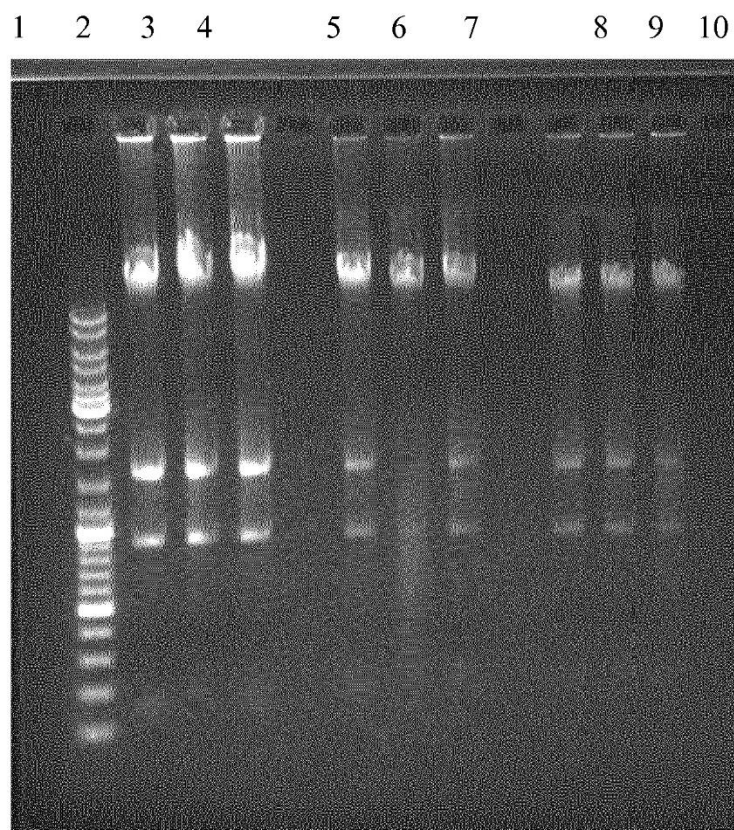
**Figura 2**



**Figura 3**

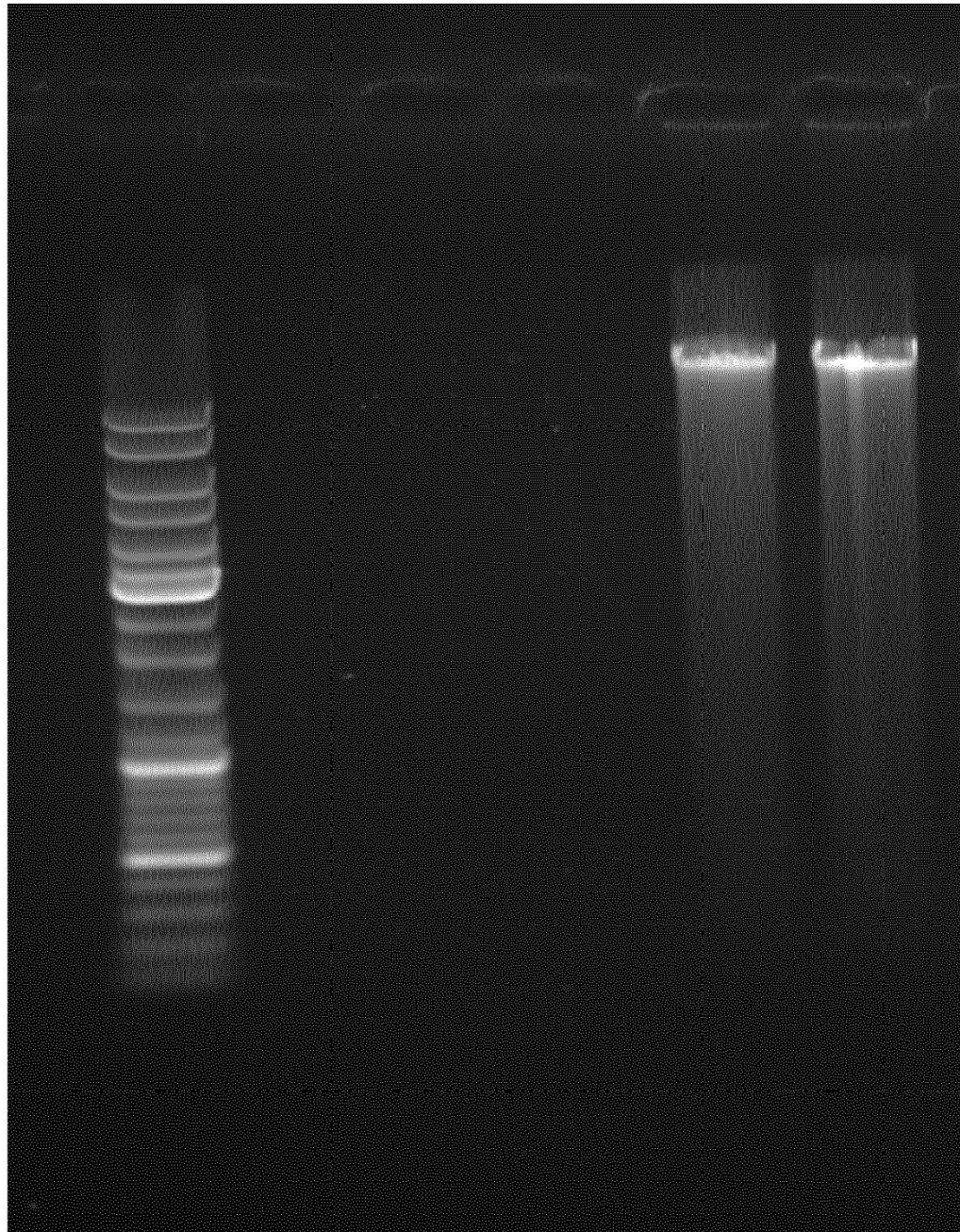


**Figura 4**





**Figura 5**



1 2 3 4 5 6