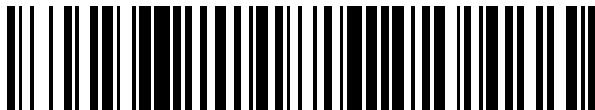




OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



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

⑮ Int. Cl.:  
**C12Q 1/6806** (2008.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑬ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2016 PCT/EP2016/054178**

⑭ Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16169677**

⑮ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2016 E 16711778 (7)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2022 EP 3286325**

---

⑭ Título: **Procedimiento y kit de test para el aislamiento rápido de ácidos nucleicos por medio de superficies rugosas**

⑬ Prioridad:

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

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.11.2022**

⑬ Titular/es:

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

⑭ Inventor/es:

**HILLEBRAND, TIMO y  
STROH, THORSTEN**

⑭ 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 diáfragma 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  
30 partículas portadoras. Este método ha experimentado una serie de modificaciones hasta la fecha y se aplica 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 suspensión 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 suspensión. 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 15 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 20 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 25 25 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.

30 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 35 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 40 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, 45 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 50 ([http://www.tf.unikiel.de/matlwis/amat/semitest\\_en/kap\\_3/illustr/oberflaechenstruktur.pdf](http://www.tf.unikiel.de/matlwis/amat/semitest_en/kap_3/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. 55 Despues 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 60 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 x 10<sup>6</sup> 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:

- 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 %
- 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 20 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 25 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 30 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 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 9999 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10

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 10 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 diálsis 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 15 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 20 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 25 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" 30 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 35 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 40 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.

45 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 50 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 55 extremadamente simple y rápido de llevar a cabo. Se puede llevar a cabo en las siguientes etapas:

1. Ligar 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 60 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.
- 10 5. Si es necesario, lavado del material.
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 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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 40 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.

#### 45 Ejemplos de realización

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

50 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 55 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 60 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:

- Cavidad 1: 400 ml de isopropanol  
 Cavidad 2: 800 ml de Washing Solution LS (del kit de extracción)  
 5 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 15 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 20 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
3. Peine de plástico no tratado
- 30 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 40 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 50 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 5 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 ENTANCES Kit/IPC16 (Analytik Jena AG). Utilizando un tampón de lisis (Lysis 10 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:

- 15 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)
- 20 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 25 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.

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. 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. 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 rugosas 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 25 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)
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

10 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 15 disponible innuPREP Blood DNA Kit/IPC16 (Analytik Jena AG), así como con la adición de

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

20 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.

25 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 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.

30 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 35 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. Conforme 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.

40 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.

45 La elución del ácido nucleico unido se realizó con 200 ml de tampón de elución para las células NIH 3T3 y con 400 ml 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 <sub>260</sub> : A <sub>280</sub>	Ratio A <sub>260</sub> : A <sub>230</sub>
Aprox. 1 x 10 <sup>6</sup> células NIH 3T3; punta de pipeta no tratada	ningún ácido nucleico medible	no determinable	no determinable	no determinable
aprox. 1 x 10 <sup>6</sup> 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 ácido nucleico medible	no determinable	no determinable	no determinable
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.

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 x 10<sup>6</sup> 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

25 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)

35 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.

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  
 4. Tampón de lisis A + acetona  
 10 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 20 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 25 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 30 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:

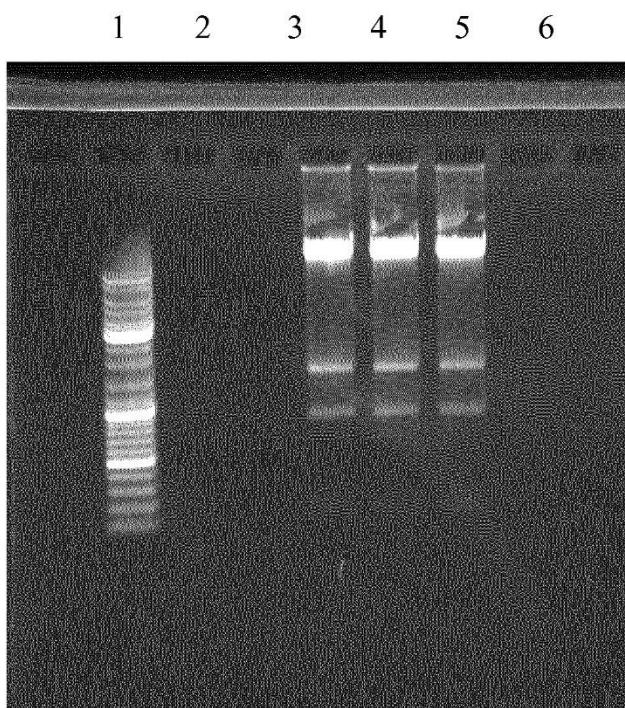
- 5      1. Conductor de ADN (Conductor 1b)
- 2. Vacío
- 3. Peine de plástico no tratado
- 4. Peine de plástico no tratado
- 5. Peine de plástico con anillo colocado de Biofila y estructura de estrías
- 10     6. Peine de plástico con anillo colocado de Biofila y estructura de estrías

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.

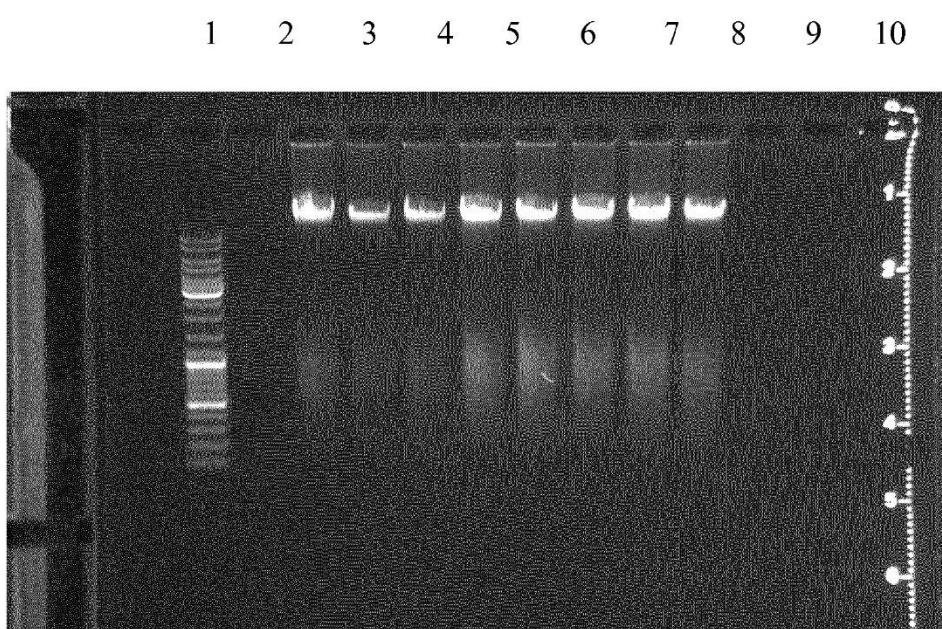
**REIVINDICACIONES**

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 5 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  
30 c) aminoalcoholes o sustancias para ajustar el valor de pH, como TRIS.
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 35 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.
- 40 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** están contenidos aditivos adicionales, preferentemente una proteinasa.
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:
- 50 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;
- 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.

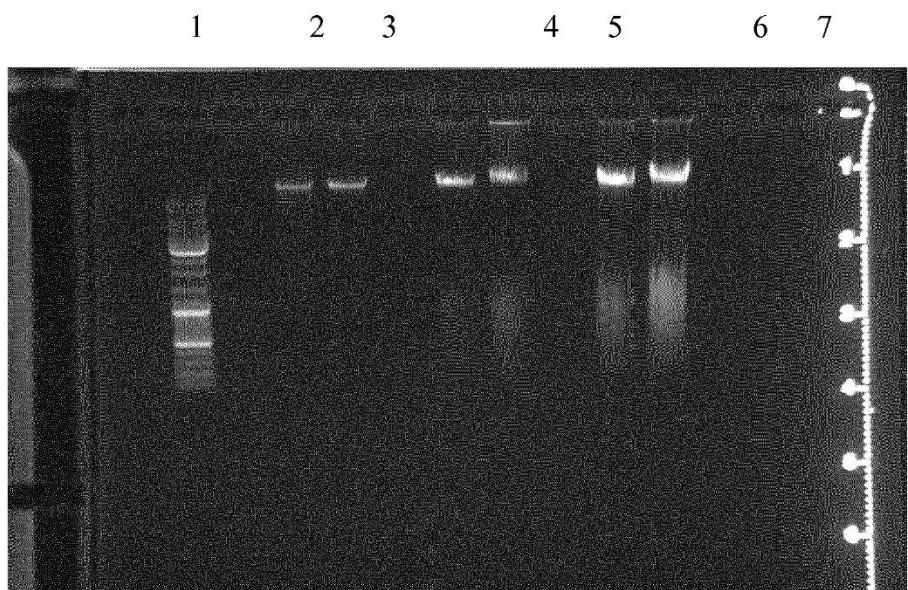
**Figura 1**



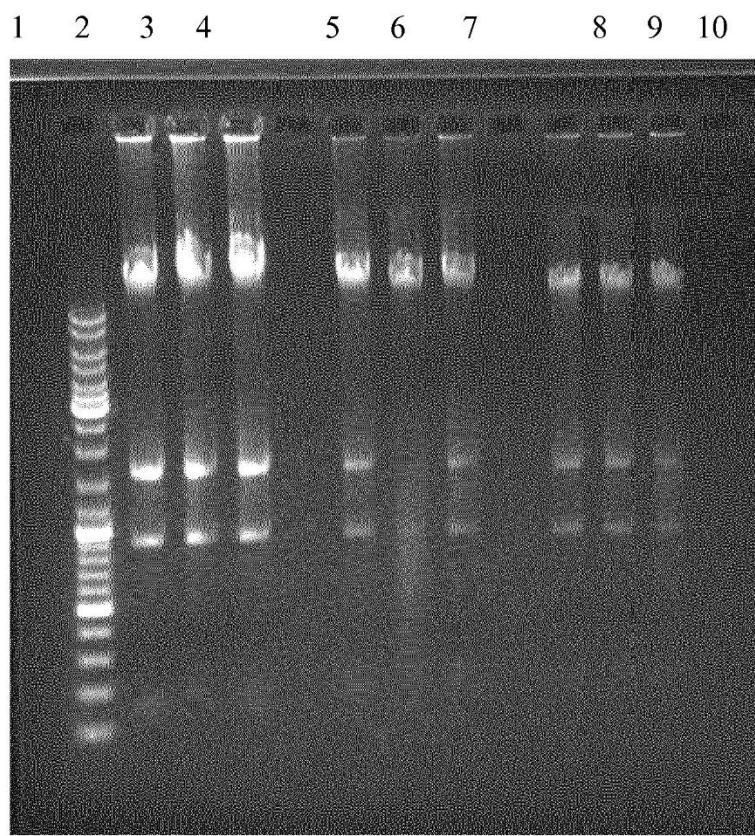
**Figura 2**



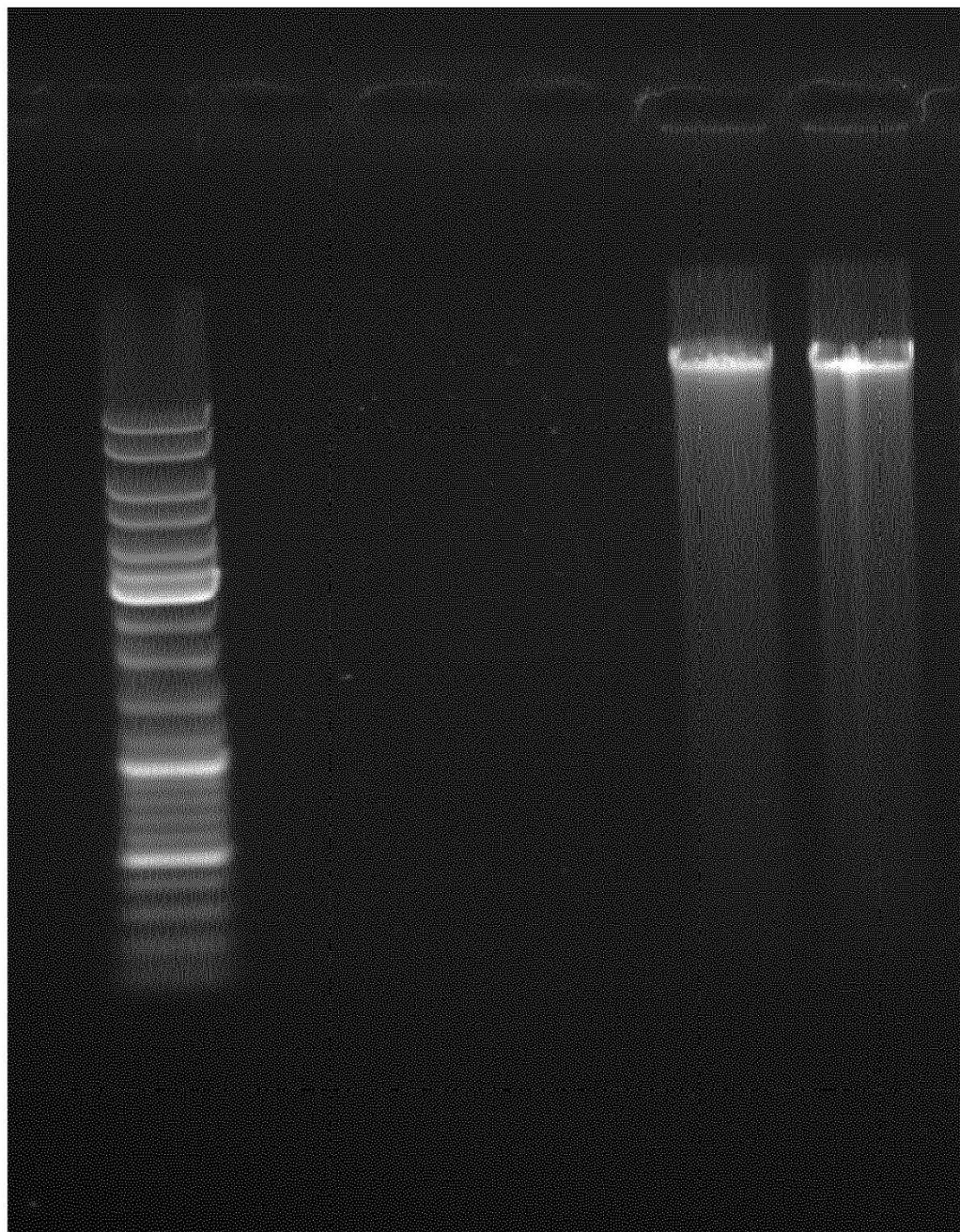
**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**



1      2      3      4      5      6