



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 971**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99945766 .6**
86 Fecha de presentación : **10.09.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1109899**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2001**

54 Título: **Producto y procedimiento de separación de una muestra que contiene múltiples fuentes de material genético usando un medio sólido.**

30 Prioridad: **10.09.1998 US 99715 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2007

73 Titular/es: **Whatman plc.**
27 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9BW, GB

72 Inventor/es: **Burgoyne, Leigh, Alexander**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 281 971 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

Producto y procedimiento de separación de una muestra que contiene múltiples fuentes de material genético usando un medio sólido.

Campo de la invención

La presente invención se dirige al almacenamiento, separación y análisis de material genético. La invención es particularmente adecuada para la separación de un material genético a partir de una muestra que contiene múltiples fuentes de un material genético que usa un medio sólido.

Antecedentes de la invención

La purificación de material genético a partir de una muestra bruta para posterior análisis puede ser laboriosa. El inadecuado aislamiento del material genético a partir de hemoglobina, proteínas u otra sustancia frecuentemente asociada con el material genético en una muestra bruta puede inhibir o interferir con algunos procedimientos analíticos tales como, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). Más aún, si la muestra bruta incluye material genético procedente de múltiples fuentes puede producir la confusión del material genético analizado.

Las muestras brutas que tienen múltiples fuentes de material genético incluyen, por ejemplo, sangre, heces, fluidos de tejidos, bacterias que contienen plásmidos, etc. El uso de bacterias para la propagación de plásmidos es común en el estudio de la genómica, biología molecular analítica, preparación de biología molecular, etc. Los procedimientos para la propagación de bacterias que contienen plásmidos son conocidos. Los procedimientos comunes para el almacenamiento de bacterias que contienen plásmidos antes del análisis del material genético del plásmido incluyen, por ejemplo, papel de filtro, plástico, material cerámico, semi-conductor, metal, etc.

Recientemente, se han convertido en comercialmente disponibles nuevos dispositivos y procedimientos para almacenamiento y purificación de material genético que están tratados para proteger el material genético de la degradación durante el almacenamiento y antes del análisis. Los ejemplos de dichos dispositivos incluyen productos bajo el nombre comercial FTA[®] disponible de Fitzco, Inc., Plymouth, MN. Otros ejemplos se encuentran descritos en las Patentes de EE.UU. Nos. 5.807.527; 5.756.126; y 5.496.562 y la Solicitud de Patente de EE.UU. en tramitación con la presente No. de Serie 08/574.888. Otro ejemplo de un producto relacionado es IsoCode[®] disponible de Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire.

La purificación y análisis de material genético que usa un medio sólido, tales como los descritos anteriormente, proporcionan muchas ventajas sobre los procedimientos de almacenamiento en húmedo. Sin embargo, si bien estos dispositivos son adecuados para almacenamiento y tratamiento de material genético, frecuentemente el material genético se almacena en la forma de una muestra bruta y puede incluir material genético derivado de dos o más fuentes diferentes. Por ejemplo, en el caso de una bacteria que contiene un plásmido, se encuentra presente material genético procedente tanto de la bacteria como del plásmido. De acuerdo con ello, si bien una muestra única puede incluir material genético procedente de múltiples fuentes, frecuentemente es ventajoso ser capaces de distinguir la fuente de cualquier pieza particular de

material genético cuando se analiza la muestra.

El Documento WO-A-96/18731 describe un procedimiento de aislamiento de ácido nucleico a partir de una muestra, comprendiendo dicho procedimiento la puesta en contacto de dicha muestra con un detergente y un soporte sólido, con lo cual el ácido nucleico soluble en dicha muestra se une al soporte, y la separación de dicho soporte con el material genético unido procedente de la muestra.

El Documento WO-A-96/39813 describe un procedimiento para la inmovilización de material genético sobre un medio sólido seguido de elución. La Patente de EE.UU. No. 3.872.082 describe de manera fortuita (Ejemplo 8) componentes que podrían usarse en los procedimientos de la presente solicitud.

De acuerdo con ello, existe una continua necesidad de productos y procedimientos que proporcionen la purificación o separación de un material genético particular a partir de una muestra bruta, incluyendo una muestra que contenga material genético procedente de múltiples fuentes.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la separación de un material genético seleccionado a partir de una muestra bruta que contiene material genético aplicado a un medio sólido, comprendiendo el procedimiento una etapa de:

- aplicación de una solución de limpieza que es una solución alcalina, parcialmente acuosa, la cual incluye un disolvente miscible en agua en combinación con una fuente de pH alto para proporcionar una solución de limpieza de pH 9,0 hasta 13 a la muestra de material genético sobre el medio sólido, destruyendo la solución el RNA en la muestra;

- aplicación de una solución de elución a la muestra de material genético sobre el medio sólido; y recolección del material genético en la solución de elución.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit para la realización del procedimiento establecido inmediatamente más arriba, para el almacenamiento de una muestra de material genético, comprendiendo el kit:

- un medio sólido;
- una solución de limpieza que es una solución alcalina, parcialmente acuosa, la cual incluye un disolvente miscible en agua que es un alcohol en combinación con una fuente de pH alto para proporcionar una solución de limpieza de pH 9,0 hasta 13, destruyendo la solución el RNA en la muestra; y
- una solución de elución.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para la separación de material genético de un plásmido a partir de material genético de una bacteria aplicado como una muestra a un medio sólido, comprendiendo el procedimiento:

- aplicación de una muestra que incluye la bacteria que contiene el plásmido a un medio sólido;

- aplicación de una solución de limpieza que es una solución alcalina, parcialmente acuosa, la cual incluye un disolvente miscible en agua en combinación con una fuente de pH alto para proporcionar una solución de limpieza de pH 9,0 hasta 13 a la muestra sobre el medio sólido, destruyendo la solución el RNA en la muestra;

- aplicación de una solución de lavado a la muestra sobre el medio sólido;

- aplicación de una solución de elución a la muestra de material genético sobre el medio sólido; y
 - recolección del material genético seleccionado de la bacteria y del plásmido en las soluciones de elución.

La presente invención se dirige a productos y procedimientos para la purificación o separación de un material genético a partir de una muestra bruta aplicada a un medio sólido. En algunas realizaciones, la invención proporciona la separación de un material genético seleccionado a partir de una muestra que contiene material genético procedente de múltiples fuentes.

A lo largo de la memoria descriptiva, se comprenderá que pueden proporcionarse guías a través de las listas de ejemplos. En cada caso, las listas referidas sirven únicamente como un grupo representativo. No obstante, esto no significa que las listas sean exclusivas.

De acuerdo con la invención, puede almacenarse una muestra de material genético sobre un medio sólido tal como se describe más adelante. Una vez aplicado al medio sólido, el material no genético típicamente asociado con una muestra bruta, por ejemplo, proteínas, grasas, etc., puede separarse del medio sólido seco usando una solución de limpieza. A continuación, el medio sólido seco puede lavarse usando una solución de lavado y la muestra genética analizarse *in situ*. Como alternativa, el material genético puede eluirse del medio sólido y analizarse por separado del medio sólido.

En algunas realizaciones, la invención proporciona además la purificación y separación de un material genético seleccionado a partir de una muestra que incluye material genético, opcionalmente incluyendo material genético procedente de más de una fuente. De acuerdo con esta realización, el material genético que permanece sobre el medio sólido puede analizarse además *in situ*, o, como alternativa, el material genético separado del medio sólido puede analizarse además por separado del medio sólido.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se dirige a productos y procedimientos que proporcionan la separación de material genético derivado a partir de una muestra bruta que puede contener material genético procedente de más de una fuente.

Tal como se usa aquí, el término “material genético” incluye una secuencia nucleótida que comprende dos o más bases nucleótidas incluyendo, por ejemplo, DNA, RNA, cDNA, oligonucleótidos, genes enteros, genes parciales, genomas enteros, etc. Una “muestra bruta” se refiere a una muestra de material genético que incluye componentes típicamente asociados con el material genético *in vivo* (por ejemplo, proteínas, grasas, etc.) e incluye, por ejemplo, un bastoncillo bucal, sangre, suero, semen, heces, orina, líquido cerebroespinal, líquido sinovial, líquido linfático, etc. Una “muestra bruta” incluye igualmente cultivos bacterianos, suspensiones virales, etc. Una “fuente” a partir de la cual deriva el material genético incluye, por ejemplo, cualquier tipo de célula eucariótica o procariótica, virus, plásmidos, fagos, arqueobacterias, pláستidas, cósmidos, viroides, líquidos de tejidos (sangre, líquido cerebroespinal, líquido linfático, saliva, orina, etc.), etc. En una realización, los procedimientos y productos de la invención son particularmente adecuados para la purificación de material genético plásmido y la separación de material genético de plásmidos procedentes de bacterias que contienen los plásmidos.

De acuerdo con la invención, una muestra que contiene material genético puede aplicarse y almacenarse sobre un medio que comprende una matriz soporte tal como papel (celulosa, nitrocelulosa, etc.), plástico, material cerámico, semi-conductor, metal, u otro material poroso o superficie micro-indentada o superficie equipada con microporos o microtrabéculas. Además, los procedimientos de la invención pueden usarse igualmente sobre muestras genéticas aplicadas y almacenadas sobre una matriz semi-sólida tal como gel de agar, gel de agarosa, gel de poliacrilamida, etc.

El medio de almacenamiento puede incluir igualmente uno o más componentes que protegen al material genético almacenado de daños o degradación, proteínas desnaturalizadas o que son útiles para el análisis del material genético almacenado. En las Patentes de EE.UU. Nos. 5.939,259; 5.807.527; 5.756.126; y 5.496.562, se describen ejemplos de algunas de dichas matrices.

Tal como se usa aquí, el “análisis” del material genético incluye procedimientos usados en la técnica para analizar DNA o RNA tales como secuenciación, amplificación, hibridación, sondado, restricción endonucleasa, clonación por ligamiento, preparación para espectroscopia de masa o irradiación, o cualquier otro procedimiento que se lleve a cabo para obtener información sobre el material genético. El material genético puede analizarse inmediatamente después de tomar la muestra o almacenarse para posterior análisis.

De acuerdo con la invención, parte o la totalidad del análisis a llevar a cabo sobre una fuente particular de material genético puede analizarse *in situ* (es decir, sobre el medio) en tanto que la fuente(s) que no han de ser analizadas se separan del medio antes del análisis. Como alternativa, el material genético a analizar puede separarse del medio, por ejemplo, las fuentes de material genético que no han de ser analizadas pueden permanecer sobre el medio y el material genético a analizar separarse del medio antes del análisis. De acuerdo con ello, para analizar una fuente particular de material genético a partir de una muestra de múltiple fuente, los procedimientos aquí descritos proporcionan la separación selectiva a partir del medio sólido de o bien el material genético a analizar o bien el material genético (y/o material no genético asociado) que no ha de ser analizado.

En una realización, una muestra de material genético puede incluir el material genético de una bacteria (por ejemplo, DNA y/o RNA) y el material genético de un plásmido (por ejemplo, DNA) que está contenido dentro de las bacterias. En un ejemplo de esta realización, puede aplicarse al medio una muestra húmeda de las bacterias que contienen el plásmido y dejarla secar. Después del secado, y típicamente antes del análisis del material genético, se separan el material genético de las bacterias y el plásmido.

Tanto el material genético bacteriano como el material genético del plásmido pueden separarse del medio y el material genético que permanece sobre el medio analizarse *in situ* y/o el material genético separado del medio analizarse por separado del medio. En un ejemplo, el material genético del plásmido puede separarse del medio y el material genético bacteriano

dejarse sobre el medio. Si se desea analizar el material genético del plásmido, el plásmido puede eluirse dentro de una solución de elución a partir de la cual puede llevarse a cabo el análisis posterior del material genético del plásmido. Como alternativa, si se desea analizar el material genético de las bacterias, una vez que el material genético del plásmido se ha separado del medio, el material genético bacteriano puede analizarse *in situ* sobre el medio.

De acuerdo con el ejemplo anterior, para separar el material genético del plásmido del material genético bacteriano, puede aplicarse una solución de limpieza para separar los componentes de la muestra bruta que están presentes sobre el medio y los cuales pueden interferir con, o no son necesarios para, el análisis del material genético. La solución de limpieza puede estar seguida por una solución de lavado. Posteriormente, puede aplicarse una solución de elución para separar el material genético de la fuente(s) seleccionada para ser separada sin separar substancialmente el material genético seleccionado para permanecer sobre el medio.

Tal como se usa aquí, una "solución de limpieza" proporciona la separación del material no genético. El material no genético incluye constituyentes de la muestra tales como proteínas, grasas, residuos celulares, ácidos teoicos bacterianos, taninos de plantas, otros productos de plantas secundarios o componentes del medio tales como agentes desnaturizantes de proteínas (por ejemplo, detergentes; urea; sales guanidino, tales como tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina, clorhidrato de guanidina; yoduro sódico; agentes quelantes tales como EDTA; trampas de radicales libres tales como ácido úrico o una sal de urato, tiocianato de guanidina, etc.; agentes protectores; etc. En algunas realizaciones, tal como durante la preparación de plásmidos, la solución de limpieza puede proporcionar igualmente la separación de RNA, por ejemplo, mediante la destrucción selectiva de RNA en solución alcalina.

En una realización, la solución de limpieza puede ser una "solución alcalina, parcialmente acuosa" (PAA). Tal como se usa aquí, una solución "PAA" incluye un disolvente miscible en agua (por ejemplo, alcohol, metanol, etanol, propanol, butanol, sus dioles o polioles isómeros, etc.; acetona, etc.) en combinación con una fuente de pH alto. Cuando el disolvente miscible en agua es alcohol etanol, las concentraciones de etanol pueden ser aproximadamente 30 hasta 90%, típicamente aproximadamente 45% hasta 70%. Generalmente, una fuente de "pH alto" proporciona un pH de solución PAA de aproximadamente 9,0 hasta 13, preferiblemente aproximadamente 11. Los ejemplos de fuentes de pH alto incluyen: NaOH, KOH, LiOH, hidróxido con base nitrógeno cuaternario, aminas terciaria, secundaria o primaria, etc. Una PAA preferida puede funcionar como un agente desnaturizante así como un disolvente para solubilización y separación de proteína del medio.

En un ejemplo de separación de DNA plásmido y mantenimiento de DNA bacteriano sobre el medio sólido, la reticulación complementaria y el tamaño relativo del DNA bacteriano facilita la retención al medio sólido. Sin embargo, es previsible que las secuencias de DNA o las secuencias NA péptidas (PNA) que unen covalentemente al medio pueden ser usadas para potenciar la unión diferencial de una fuente de material genético sobre otra. Igualmente, puede propor-

cionarse la unión potenciada de un tipo de material genético frente a otro mediante la incorporación de algunas características de fase inversa al medio. Dichas características de fase inversa pueden ser proporcionadas, por ejemplo, siliconizando ligeramente un medio hidrófobo o uniendo grupos bencilo, naftilo o similares.

Tal como se usa aquí, una "solución de lavado" proporciona la separación de material no genético que permanece después de la separación de la solución de limpieza así como la separación o neutralización de componentes de la solución de limpieza. Generalmente, una solución de lavado puede comprender el disolvente miscible en agua de la solución de limpieza. De acuerdo con ello, esta incluye alcoholes tales como metanol, etanol, propanol, butanol, sus dioles o polioles isómeros, etc; acetona, etc. La solución de lavado puede estar o bien sin tamponar o bien contener un tampón a pH neutro o ligeramente por debajo de pH 7,0. Cuando se encuentra presente, un tampón ayuda en la neutralización del álcali de la solución de limpieza. La composición del tampón se selecciona de manera que las trazas del tampón que son arrastradas a través del procedimiento de preparación sean compatibles con la posterior aplicación del material genético. Por ejemplo, los tampones Tris y EDTA son adecuados si el uso final del DNA es para estar en forma de una solución en tampones que contienen EDTA. Sin embargo, un tampón preferido para uso general es acetato amónico a concentraciones entre 5 mM y 100 mM, con o sin una pequeña cantidad de EDTA, por ejemplo, EDTA 0,1 mM.

Tal como se usa aquí, una "solución de elución" es una solución que separa selectivamente el material genético de una o más fuentes a partir del medio sin separar substancialmente otras fuentes. Tal como se usa aquí "substancialmente" significa que aunque la separación de la fuente(s) de material genético seleccionado a separar y la fuente(s) seleccionadas para permanecer pueda no ser perfecta, la separación es suficiente para proporcionar resultados analíticos fiables del material genético a analizar. En una realización típica, la solución de elución es una solución de elución salina. Los ejemplos de soluciones de elución salinas adecuadas incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), citrato sódico, acetato, tampón Tris EDTA (TE), acetato amónico (por ejemplo, concentración 10 mM), etc. El tampón Tris EDTA puede prepararse combinando base libre de Tris 10 mM y EDTA 1 mM, y ajustando a pH 8 con HCl.

En una realización, la solución de elución puede contener igualmente acetona etanólica, metanol, propanol, butanol, etc. y sus dioles y polioles isómeros. Los componentes anteriores pueden estar presentes en niveles más bajos que los contenidos en la solución de limpieza y/o lavado, por ejemplo, 0% hasta 55% v/v. La concentración preferida de estos componentes para extracción no selectiva es, sin embargo, de 0%.

Después de la aplicación de la solución de elución, el material genético a eluir a partir del medio, puede ser eluido usando procedimientos tales como centrifugación, vacío, difusión, electroforesis y electroósmosis.

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los Ejemplos siguientes. Debería darse por entendido que los Ejemplos no están destinados a limitar la invención, sino más bien únicamente a clarificar el procedimiento de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

El procedimiento de este Ejemplo es ventajoso para usar cuando son necesarios una pequeña cantidad de plásmidos a partir de grandes números de muestras tal como, por ejemplo, cuando la secuenciación de grandes números de plásmidos. De acuerdo con este Ejemplo, se minimiza la manipulación al mismo tiempo que puede incrementarse el tiempo consumido por el procedimiento. Todas las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (es decir, aproximadamente 20°C).

Se centrifugaron 1 ml de cultivos de cepa DH10B de *Escherichia coli* (*E. coli*) conteniendo plásmidos pBC-SR durante 5 minutos a 150.000 rpm. Cada gránulo centrifugado se recogió en 10:1 de agua con una traza de azul de bromocresol como indicador de la posición y, a continuación, se depositó sobre una pieza de papel FTA[®] (disponible de Fitzco, Inc., Plymouth, MN) en forma de una mancha azul, se dejó secar y se almacenó en seco.

Se sacaron recortes de 3 x 2 mm procedentes de las manchas de plásmidos coloreados sobre papel FTA[®] y se introdujeron en un tubo vacío. Sobre los discos se agregó 1 ml de una solución de limpieza de NaOH 0,1 M en etanol al 52,5% v/v y, a continuación, se agitó suavemente para lavar e hidrolizar durante 40 minutos.

La solución de limpieza se aspiró y se agregó una solución de lavado de 1,0 ml de etanol al 95% y se agitó suavemente a temperatura ambiente y, a continuación, se secó.

Se aplicó una solución de elución de 15:1 de tris EDTA 5 mM a pH 8,3 al disco y se dejó durante una noche a 4°C para permitir la elución del plásmido. La solución de elución y el eluyente se separaron del tubo. El producto se electroforesizó sobre gel de agarosa al 1% y se visualizó con bromuro de etidio mediante tecnología convencional. Se observaron bandas de plásmido débiles pero claras con la movilidad esperada y con un brillo indicativo de un rendimiento satisfactorio para la muy pequeña cantidad de material de partida.

Ejemplo 2

Este Ejemplo es ventajoso para usar cuando son necesarias mayores cantidades de plásmidos, como por ejemplo, cuando ha de llevarse a cabo el mapeo de restricción. Este Ejemplo usa la decantación por centrifugación para separar soluciones del papel en lugar de largos períodos de difusión. La decantación por centrifugación se realizó a 2.500 rpm y cada decantación consumió 5 minutos más para la centrifugación. Todas las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20°C).

Una mancha de *E. coli* conteniendo el plásmido, la cual se había mantenido durante 6 días sobre papel FTA[®] tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, se cortó en 4 secciones y una de las cuatro secciones, de 4 mm cuadrados aproximadamente, se colocó en un aparato adecuado para la decantación por centrifugación (por ejemplo, un tubo de ensayo con un agujero en el fondo, dentro de otro tubo que recoge el eluato) y se recolectaron los eluatos centrifugados. Otros sistemas adecuados para decantación resultarán obvios para los expertos en la técnica.

Se aplicó 4 veces solución de limpieza 150:1 durante aproximadamente 2,5 minutos cada vez. La solución de limpieza estaba formada por alcohol al 62%

y el resto agua con una composición total para el agua más el alcohol de NaOH 0,1 M. La sección se lavó dos veces durante aproximadamente 2 minutos cada vez usando 150:1 de alcohol al 95%/agua. El tiempo transcurrido de limpieza y lavado, incluyendo el tiempo de centrifugación, fue aproximadamente de 1 hora. Se aplicó una solución de elución 15:1 de tampón TE durante 1 minuto seguido de centrifugación.

El producto observado en el tampón TE se electroforesizó sobre gel de agarosa al 1% y se visualizó con bromuro de etidio mediante tecnología convencional. Se observaron bandas de las clases de tamaño esperadas con intensidades apropiadas para la cantidad de *E. coli* del que procedían.

Ejemplo 3

El presente Ejemplo describe la purificación de una muestra de DNA de sangre almacenado sobre un medio sólido y la posterior separación del DNA del medio sólido.

Un disco de 6 mm de sangre seca (aproximadamente 16 µl) se aplicó previamente a papel FTA[®] disponible de Fitzco, Inc., Plymouth, MN. La muestra se lavó dos veces con una solución de limpieza de 1,0 ml de NaCO₃ 0,3 M a temperatura ambiente. El primer lavado fue durante 30 minutos seguido de aspiración y el segundo lavado durante 20 minutos seguido de aspiración y centrifugación. A continuación, la muestra se lavó con ácido acético 50 mM durante aproximadamente 2 minutos seguido decantación por centrifugación y secado por calentamiento durante 10 minutos a 99°C. Posteriormente, se aplicaron a la muestra 20 µl de NaCO₃ 15 mM a 99°C durante 2-2,5 minutos y, a continuación, se eluyó con 2 partes alícuotas de 50 µl de agua. El eluyente se congeló en lotes de 10 µl y posteriormente se analizó con éxito mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Ejemplo 4

Se recortó un disco de 6 mm de una muestra de sangre almacenada sobre papel FTA[®]. El material no genético (en particular proteínas y componentes del papel FTA[®]) se limpió con agitación suave del disco con 2 lavados de 500 µl de NaCO₃ 0,3 M. El primer lavado fue de 25 minutos (suficientemente largo para embeber la sangre). El segundo lavado fue de 10 minutos y, posteriormente, la muestra se decantó por centrifugación.

La solución de limpieza se separó mediante lavado y decantación por centrifugación con 3 partes alícuotas de 200 µl cada una de agua. La muestra se expuso al agua durante 1 a 2 minutos entre cada lavado. Al llegar a este punto, el color de la sangre del disco se había perdido substancialmente.

Se aplicó ácido bórico 2 mM en una cantidad suficiente para mojar cada disco (aproximadamente 14 µl) y se introdujo en un autoclave de laboratorio a 121-124°C. El autoclave se fijó para ciclo húmedo a una presión aproximada de 140 kPa. Las muestras se trataron en el autoclave durante aproximadamente 5 a 10 minutos, típicamente durante aproximadamente 7 minutos. Una vez alcanzada en el autoclave la temperatura y presión ambiente, se aplicaron a cada disco 100 µl de agua y el DNA se eluyó con dos partes alícuotas de 100 µl de agua. Cada parte alícuota se separó de la muestra mediante decantación por centrifugación. Posteriormente, el DNA recolectado se analizó mediante PCR.

Durante el uso de este procedimiento, debería te-

nerse cuidado de no dañar el DNA por unos tiempos excesivos de tratamiento en autoclave. Una vez eluido el DNA, debería mantenerse enfriado, protegido

mediante la adición de TE o un tampón alcalino similar con una pequeña cantidad de EDTA, o bien usarse inmediatamente.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la separación de un material genético seleccionado a partir de una muestra bruta que contiene material genético aplicado a un medio sólido, comprendiendo el procedimiento una etapa de:

- aplicación de una solución de limpieza que es una solución alcalina, parcialmente acuosa, la cual incluye un disolvente miscible en agua en combinación con una fuente de pH alto para proporcionar una solución de limpieza de pH 9,0 hasta 13 a la muestra de material genético sobre el medio sólido, destruyendo la solución el RNA en la muestra;

- aplicación de una solución de elución a la muestra de material genético sobre el medio sólido; y
- recolección del material genético en la solución de elución.

2. Un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que la muestra bruta incluye material genético procedente de múltiples fuentes.

3. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que el material genético seleccionado además se analiza mediante reacción en cadena de la polimerasa.

4. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que el material genético seleccionado además se analiza mediante polimorfismo de tamaño de los fragmentos de restricción.

5. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que se analiza el material genético no separado del medio sólido.

6. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 5, en el que el material genético no separado del medio sólido se analiza mediante reacción en cadena de la polimerasa *in situ*.

7. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que el medio sólido comprende:

- una matriz sólida, y
- un agente desnaturizante de proteínas.

8. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 7 que comprende además una trampa de radicales libres.

9. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 8, en el que el agente desnaturizante de proteínas es un detergente y la trampa de radicales libres es ácido úrico o una sal de urato.

10. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 8, en el que el agente desnaturizante de proteínas y la trampa de radicales libres es tiocianato de guanidina.

11. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 8, en el que el agente desnaturizante de proteínas es clorhidrato de guanidina y la trampa de radicales libres es ácido úrico o una sal de urato.

12. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 7, en el que el agente desnaturizante de

proteínas es una sal de guanidinio.

13. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 8, en el que la trampa de radicales libres es tiocianato de guanidina.

14. El procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 8, en el que el agente desnaturizante de proteínas es urea y la trampa de radicales libres es ácido úrico o una sal de urato.

15. Un kit para la realización del procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, comprendiendo el kit:

- un medio sólido;

- una solución de limpieza que es una solución alcalina, parcialmente acuosa, la cual incluye un disolvente miscible en agua que es un alcohol en combinación con una fuente de pH alto para proporcionar una solución de limpieza de pH 9,0 hasta 13, destruyendo la solución el RNA en la muestra; y

- una solución de elución,

en el que el kit no comprende la combinación de un medio sólido que es una placa de capa espesa de gel de sílice, una solución de limpieza que es una mezcla de isopropanol/amoníaco/agua en una relación de 7:1:2, y una solución de elución que es agua.

16. El kit de acuerdo con la Reivindicación 15, en el que la solución de limpieza comprende etanol e hidróxido sódico.

17. El kit de acuerdo con la Reivindicación 15, en el que la solución de elución es una solución de elución salina.

18. El kit de acuerdo con la Reivindicación 17, en el que la solución salina comprende acetato amónico 10 mM.

19. El kit de acuerdo con la Reivindicación 17, en el que la solución salina comprende bicarbonato amónico 10 mM.

20. Un procedimiento para la separación de material genético de un plásmido a partir de material genético de una bacteria aplicado como una muestra a un medio sólido, comprendiendo el procedimiento:

- aplicación de una muestra que incluye la bacteria que contiene el plásmido a un medio sólido;

- aplicación de una solución de limpieza que es una solución alcalina, parcialmente acuosa, la cual incluye un disolvente miscible en agua en combinación con una fuente de pH alto para proporcionar una solución de limpieza de pH 9,0 hasta 13 a la muestra sobre el medio sólido, destruyendo la solución el RNA en la muestra;

- aplicación de una solución de lavado a la muestra sobre el medio sólido;

- aplicación de una solución de elución a la muestra de material genético sobre el medio sólido; y

- recolección del material genético seleccionado de la bacteria y del plásmido en las soluciones de elución.