



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 166 296**

② Número de solicitud: 009902757

⑤ Int. Cl.⁷: C12Q 1/68

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **17.12.1999**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2002**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.04.2002

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Alcalá**
Plaza de San Diego s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES

⑦ Inventor/es: **Domingo Galán, Alberto y**
Carrasco Cuevas, Carolina

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento de extracción de ácidos nucleicos embebidos en gel de agarosa.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de extracción de ácidos nucleicos embebidos en gel de agarosa.

Procedimiento de extracción de ácidos nucleicos, DNA o RNA, o derivados de estos, embebidos en gel de agarosa o derivados basado en una fusión térmica del gel seguida de una gelificación con separación de fases o no homogénea de la agarosa ó derivados. Aplicación del polietilenglicol (PEG) y en general de cualquier otro compuesto con capacidad de producir separación de fases en mezclas acuosas de agarosa como componente fundamental de un procedimiento para la extracción de macromoléculas, especialmente de ácidos nucleicos DNA o RNA, o derivados de estos, embebidas en un gel de agarosa.

ES 2 166 296 A1

DESCRIPCION

Procedimiento de extracción de ácidos nucleicos embebidos en gel de agarosa.

Introducción

Se describe un procedimiento para la extracción de macromoléculas, especialmente de ácidos nucleicos, DNA o RNA, o derivados de estos, embebidas en un gel de agarosa o derivados. Así mismo se describe una nueva aplicación del polietilenglicol (PEG) y en general de cualquier otro compuesto con capacidad de producir separación de fases en mezclas acuosas de agarosa como componente fundamental de dicho procedimiento de extracción.

Campo de aplicación

Sector de la técnica al que se refiere la invención

Esta operación de extracción de macromoléculas, especialmente de ácidos nucleicos, DNA o RNA, o derivados de estos, embebidas en un gel de agarosa o derivados, es de especial interés y utilidad en el campo de la biología molecular, en trabajos de investigación, en determinados ensayos para diagnóstico clínico, y en procesos de producción industrial.

La utilidad industrial directa de la aplicación del polietilenglicol, y en general de cualquier otro compuesto con capacidad de producir separación de fases en mezclas acuosas de agarosa, que se describe en esta patente consiste en su inclusión como parte integrante de "kits" comerciales para la extracción de ácidos nucleicos embebidos en gel de agarosa, generalmente resultantes de la separación electroforética de dichos ácidos nucleicos en dicho gel de agarosa.

Se entiende por inclusión como parte integrante de dichos "kits" tanto la inclusión directa del compuesto (polietilenglicol o cualquier otro compuesto con capacidad de producir separación de fases en mezclas acuosas de agarosa), en cualquier forma de presentación, como la inclusión de información concerniente a su utilización para esta aplicación.

Estado de la técnica

En muchos tipos de aplicaciones y principalmente debido a su versatilidad y alto poder de resolución, la técnica de electroforesis en gel de agarosa es frecuentemente usada como una técnica preparativa en microescala para el aislamiento de segmentos de DNA. se han descrito centenares de técnicas para este propósito (algunas detalladas en apartado sobre Estado de la Técnica) y muchas están actualmente disponibles como "kits" comerciales. Muchas de ellas son, de hecho, ligeras o ingeniosas variantes sobre unos pocos principios básicos, como son la electroelución, difusión, extrusión física y disolución química o enzimática de la agarosa.

La razón para tal proliferación de técnicas es la amplia utilidad de este tipo de paso de aislamiento, para muchas aplicaciones diferentes en el campo amplio de la llamada biología molecular o genética molecular, y el hecho de que ninguna de dichas técnicas es completamente satisfactoria para todos los casos.

En esta patente se describe y reivindica otro procedimiento para la recuperación de DNA,

RNA o ácidos nucleicos y derivados en general, embebidos en bloques de gel de agarosa. Este procedimiento proporciona preparaciones limpias, adecuadas para la mayoría de las aplicaciones, incluyendo reacción en cadena de polimerasa (PCR) y secuenciación.

El procedimiento es totalmente original y se basa en el descubrimiento de un fenómeno de separación de fases inducido por la presencia de polietilenglicol (PEG) durante la gelificación de la agarosa. El resultado práctico de este fenómeno es que la agarosa gelifica de forma no homogénea, como grumos dispersos en la mezcla, mientras que una parte significativa del volumen de mezcla permanece en estado fluido. Como consecuencia de esta gelificación no homogénea, una parte importante de las moléculas que se pretenden aislar (DNA, RNA u otras) quedan excluidas de los grumos de agarosa, permaneciendo en la fase fluida, de donde pueden ser fácilmente recuperadas por precipitación etanólica convencional después de haber eliminado los grumos de agarosa por simple centrifugación.

No se ha encontrado ninguna descripción publicada o patentada de aplicación del polietilenglicol o cualquier otro compuesto con capacidad de producir separación de fases en mezclas acuosas de agarosa, para la extracción de ácidos nucleicos desde geles de agarosa.

Tampoco se ha encontrado ninguna descripción publicada o patentada de un procedimiento de extracción de ácidos nucleicos desde geles de agarosa basado en una fusión técnica del gel seguida de una gelificación con separación de fases o no homogénea.

Referencias bibliográficas relativas a o relacionadas con otros procedimientos con la misma finalidad

1. 1998. **Fransen, E., C.G. Van, and B. Winnepenninckx.** "Dependence of the ligation efficiency of large DNA fragments isolated from agarose gels on the purification method." *Prep Biochem Biotechnol* 28:235-41.
2. 1998. **Gubin, A.N., and R.L. Kincaid.** "A pressure-extrusion method for DNA extraction from agarose gels." *Anal Biochem* 258:150-2.
3. 1998. **Rodriguez, H., and S.A. Akman** "Large scale isolation of genes as DNA fragment lengths by continuous elution electrophoresis through an agarose matrix." *Electrophoresis* 19:646-52.
4. 1998. **Thomson, J.M., and M.M. Compton.** "Disposable device for the isolation of DNA from agarose gels." *Biotechniques* 24:942.
5. 1997. **Matitashvili, E., and B. Zavizion.** "One-tube extraction of DNA or RNA from agarose gel." *Anal Biochem* 246:260-2.
6. 1996. **Barbieri, R., G. Duro, A. Morgante, and V. Izzo.** "Rapid DNA elution procedure from agarose gels." *Anal Biochem* 235:106-7.

7. 1996. **Choe**, Y.K., Y.J. **Huh**, et al. "Improved isolation of genomic DNA from mycobacteria in agarose plugs by rapid lysis with a combination of N-acetylglucosaminidase and lysozyme." *Biotechniques* 20:547-52. 5
8. 1996. **Heyd**, M.L., and J.J. **Diehl**. "Recovering DNA from agarose gels with pumice." *Biotechniques* 20:394-6, 398. 10
9. 1996. **Joly**, E. "Purification of DNA fragments from agarose gels using glass beads." *Methods Mol Biol* 58:237-40. 15
10. 1996. **Wolff**, R.A., and R. **Hull**. "A rapid and easy method for DNA recovery from agarose gels using Wizard minicolumns." *Trends Genet* 12:339-40. 20
11. 1995. **Benore**, P.M., and L. **Anderson**. "Purification of DNA fragments from lyophilized agarose gels." *Nucleic Acids Res* 23:4926-7. 25
12. 1995. **Dean**, A.D., and J. E. **Greenwald**. "Use of filtered pipet tips to elute DNA from agarose gels." *Biotechniques* 18:980. 30
13. 1995. **Griffin**, H.G., and M. J. **Gasson**. "Purification and cloning of DNA fragments fractionated on agarose gels." *Mol Biotechnol* 3:135-8. 35
14. 1995. **Kang**, S.H., X. **Xu**, O. **Heidenreich**, S. **Gryaznov**, and M. bf **Nerenberg**. "A new affinity purification procedure for DNA-binding proteins using bromoacetyl agarose." *Nucleic Acids Res* 23:2344-5. 40
15. 1995. **Kulikov**, A.V. "[Use of a nylon membrane for purifying DNA fragments from agarose gels]." *Vopr Med Khim* 41:61-2. 45
16. 1995. **Wu**, W., and M.J. **Welsh**. "A method for purification of DNA species by high-speed centrifugation of agarose gel slices." *Anal Biochem* 229:350-2. 50
17. 1994. **Chuang**, S.E., and F.R. **Blattner**. "Ultrafast DNA recovery from agarose by centrifugation through a paper slurry." *Biotechniques* 17:634, 636. 55
18. 1994. **Glenn**, T.C., and S.J. **Glenn**. "Rapid elution of DNA from agarose gels using polyester plug spin inserts (PEPSIs)." *Trends Genet* 10:344. 60
19. 1994. **Hegen**, P.N. "Recovering DNA from agarose gels." *Trends Biochem Sci* 19:388-9. 65
20. 1994. **Lu**, Z., M. **Templer**, and B.L. **Nielsen**. "Rapid method for recovery of DNA from agarose gels." *Biotechniques* 16:400-2. 70
21. 1994. **Pramatarova**, A., J. **Yelle**, B. **D'Amours**, and C. **Hamelin**. "Efficient recovery of cloned human cytomegalovirus DNA fragments from agarose gels." *J Virol Methods* 46:1-10. 75
22. 1994. **Stabile**, J.E., and E.T. **Wurtzel**. "Simultaneous purification of multiple, large DNA fragments from agarose gels." *Biotechniques* 17:644, 648-9. 80
23. 1994. **Steck**, T.R. "Use of low-melt agarose for the efficient isolation of large DNA fragments." *Biotechniques* 17:676, 678. 85
24. 1994. **Wang**, Z., and T.G. **Rossman**. "Isolation of DNA fragments from agarose gel by centrifugation." *Nucleic Acids Res* 22:2862-3. 90
25. 1993. **Li**, Q., and C.L. **Ownby**. "A rapid method for extraction of DNA from agarose gels using a syringe." *Biotechniques* 15:976-8. 95
26. 1993. **Mather**, M.W., J.A. **Keightley**, and J.A. **Fee**. "Recovery and cloning of genomic DNA fragments from dried agarose gels." *Methods Enzymol* 218:695-704. 100
27. 1993. **Subota**, A.E., P.J. **Orlando**, and J.R. **Bernat**. "A one-step method for the recovery of unstained DNA from agarose gels." *Biotechniques* 14:742-4. 105
28. 1993. **Wing**, R.A., V.K. **Rastogi**, H.B. **Zhang**, A.H. **Paterson**, and S.D. **Tankley**. "An improved method of plant megabase DNA isolation in agarose microbeads suitable for physical mapping and YAC cloning." *Plant J* 4:893-8. 110
29. 1993. **Zhen**, L., and R.T. **Swank**. "A simple and high yield method for recovering DNA from agarose gels." *Biotechniques* 14:894-8. 115
30. 1992. **Favre**, D. "Improved phenol-based method for the isolation of DNA fragments from low melting temperature agarose gels." *Biotechniques* 13:22, 25-26. 120
31. 1992. **Flores**, N., F. **Valle**, F. **Bolivar**, and E. **Merino**. "Recovery of DNA from agarose gels stained with methylene blue." *Biotechniques* 13:203-5. 125
32. 1992. **Gold**, P. "Use of a novel agarose gel-digesting enzyme for easy and rapid purification of PCR-amplified DNA for sequencing." *Biotechniques* 13:132-4. 130
33. 1992. **Grey**, M., and M. **Brendel**. "Rapid and simple isolation of DNA from agarose gels." *Curr Genet* 22:83-4. 135
34. 1992. **Gu**, H., D. **Wilson**, and J. **Inselburg**. "Recovery of DNA from agarose gels using a modified Elutrap." *J Biochem Biophys Methods* 24:45-50. 140
35. 1992. **He**, M., H. **Liu**, Y. **Wang**, and B. **Austen**. "Optimized centrifugation for rapid elution of DNA from agarose gels." *Genet Anal Tech Appl* 9:31-3. 145

36. 1992. **Vaux**, D.L. "Rapid recovery of DNA from agarose gels." *Trends Genet* 8:81.
37. 1991. **Bewsey**, K.E., M.E. **Johnson**, and J.P. **Huff**. "Rapid isolation and purification of DNA from agarose gels: the phenol-freeze-fracture method." *Biotechniques* 10:724-5.
38. 1991. **Duro**, G., V. **Izzo**, R. **Barbieri**, M. **Cantone**, M.A. **Costa**, and G. **Giudice**. "A method for eluting DNA in a wide range of molecular weights from agarose gels." *Anal Biochem* 195:111-5.
39. 1991. **Fotadar**, U., L.E. **Shapiro**, and M.I. **Surks**. "Simultaneous use of standard and low-melting agarose for the separation and isolation of DNA by electrophoresis." *Biotechniques* 10:171-2.
40. 1991. **Mukhopadhyay**, T., and J.A. **Roth**. "A simple and efficient method for isolation of DNA fragments from agarose gel." *Nucleic Acids Res* 19:6656.
41. 1991. **Peloquin**, J.J., and E.G. **Platzer**. "A simple, inexpensive electroelution device for the recovery of nucleic acid fragments from agarose gels." *Biotechniques* 10:159-60.
42. 1991. **Qian**, L., and M. **Wilkinson**. "DNA fragment purification: removal of agarose 10 minutes after electrophoresis." *Biotechniques* 10:736, 738.
43. 1991. **Seelan**, R.S., and L.I. **Grossman**. "A rapid protocol to isolate DNA fragments from low melting temperature agarose." *Biotechniques* 10: 186, 188.
44. 1991. **Weichenban**, D. "Fast recovery of DNA from agarose gels by centrifugation through blotting paper." *Trends Genet* 7:109.
45. 1990. **Applegate**, M., G. **Juhn**, M. **Liechty**, M. **Moore**, and J. **Hozier**. "Use of DNA purified in situ from cells embedded in agarose plugs for the molecular analysis of tk^{-/-} mutants recovered in the L5178Y tk^{+/-} 3.7.2C mutagen assay system [published erratum appears in *Mutat Res* 1991 Jan;262(1):77]." *Mutat Res* 245:55-9.
46. 1990. **Ericson**, M.L. "Quick DNA recovery from agarose gels by ultracentrifuge run." *Trends Genet* 6:278.
47. 1990. **Errington**, J. "A rapid and reliable one-step method for isolating DNA fragments from agarose gels." *Nucleic Acids Res* 18:5324.
48. 1989. **Koenen**, M. "Recovery of DNA from agarose gels using liquid nitrogen." *Trends Genet* 5:137.
49. 1989. **Pollman**, M.J., and A.J. **Zuccarelli**. "Rapid isolation of high-molecular-weight DNA from agarose gels." *Anal Biochem* 181:12-7.
50. 1989. **Sandhu**, G.S., and B.C. **Kline**. "Inexpensive micro-electroelution apparatus for extracting DNA from acrylamide and agarose gels." *Biotechniques* 7:822, 824.
51. 1989. **Yanamandra**, G., and M.L. **Lee**. "Isolation and characterization of human DNA in agarose block." *Gene Anal Tech* 6:71-4.
52. 1988. **Georges**, F., S. **Girard**, R.N. **Chibbar**, and F. **Constabel**. "Enhancing the sensitivity of DNA detection and recovery from agarose gels." *Electrophoresis* 9:213-6.
53. 1988. **He**, M., R.B. **Beechey**, and M.A. **Kaderbhai**. "A procedure for electroelution of DNA from agarose gels." *Biotechniques* 6:728, 730.
54. 1988. **Zupancic**, T.J., D.A. **Hilt**, C.D. **Zarley**, and P.C. **Kimball**. "Analysis and purification of synthetic DNA fragments with NuSieve agarose minigels." *Biotechniques* 6:296, 298.
55. 1987. **Chang**, T., I.H. **Tsai**, and W.C. **Chang**. "Electroelution of DNA and protein from polyacrylamide and agarose gels." *Biochem Int* 15:687-91.
56. 1987. **Ogden**, R.C., and D.A. **Adams**. "Electrophoresis in agarose and acrylamide gels." *Methods Enzymol* 152:61-87.
57. 1987. **Vogelstein**, B. "Rapid purification of DNA from agarose gels by centrifugation through a disposable plastic column." *Anal Biochem* 160:115-8.
58. 1986. **Fremont**, P., F.T. **Dionne**, and P.A. **Rogers**. "Recovery of biologically functional messenger RNA from agarose gels by passive elution." *Anal Biochem* 156:508-14.
59. 1986. **McEnery**, M.W., C.W. **Angus**, and J. **Moss**. "Affinity chromatographic procedure for the quantitative recovery of DNA fragments from agarose gels." *Anal Biochem* 156:72-5.
60. 1985. **Libby**, L.S., J.H. **Fisher**, and C.H. **Scoggin**. "A method of isolating nick-translated DNA by subsequent separation low-melting -temperature agarose." *Anal Biochem* 146:23-7.
61. 1983. **Burns**, D.M., and I.R. **Beacham**. "A method for the ligation of DNA following isolation from low melting temperature agarose." *Anal Biochem* 135:48-51.
62. 1983. **Holland**, L.J., and L.J. **Wangh**. "Efficient recovery of functionally intact mRNA from agarose gels via transfer to an ion-exchange membrane." *Nucleic Acids Res* 11:3283-300.

63. 1983. **Schmitt**, J.J., and B.N. **Cohen**. "Quantitative isolation of DNA restriction fragments from low-melting agarose by Elutip-d affinity chromatography." *Anal Biochem* 133:462-4.
64. 1983. **Tautz**, D., and M. **Renz**. "An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels." *Anal Biochem* 132:14-9.
65. 1982. **Henrich**, B., W. **Lubitz**, and E. **Fuchs**. "Use of benzoylated-naphthoylated DEAE-cellulose to purify and concentrate DNA eluted from agarose gels." *J Biochem Biophys Methods* 6:149-57.
66. 1982. **Vacek**, A.T., D.P. **Bourque**, and N.G. **Hewlett**. "An ethidium-acrylamide affinity medium for recovery of nucleic acids from free solution and from polyacrylamide and Agarose gels." *Anal Biochem* 124:414-20.
67. 1981. **Dretzen**, G., M. **Bellard**, C.P. **Sassone**, and P. **Chambon**. "A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels." *Anal Biochem* 112:295-8.
68. 1981. **Kessler**, I.G., J. **Moreau**, and K. **Scherrer**. "Isolation of globin pre-messenger RNA on thiol-agarose by terminally mercurated complementary DNA." *Mol Biol Rep* 7:83-92.
69. 1980. **Chen**, C.W., and C.J. **Thomas**. "Recovery of DNA segments from agarose gels." *Anal Biochem* 101:339-41.
70. 1980. **Girvitz**, S.C., S. **Bacchetti**, A.J. **Rainbow**, and F.L. **Graham**. "A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels." *Anal Biochem* 106:492-6.
71. 1980. **Smith**, H.O. "Recovery of DNA from gels." *Methods Enzymol* 65:371-80.
72. 1980. **Winberg**, G., and M.L. **Hammarskjöld**. "Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper. Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA." *Nucleic Acids Res* 8:253-64.
73. 1979. **Vogelstein**, B., and D. **Gillespie**. "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." *Proc Natl Acad Sci USA* 76:615-9.
74. 1979. **Wieslander**, L. "A simple method to recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarose gels." *Anal Biochem* 98:305-9.
75. 1979. **Yang**, R., J. **Lis**, and R. **Wu**. "Elution of DNA from agarose gels after electrophoresis." *Methods Enzymol* 68:176-82.
76. 1978. **Finkelstein**, M., and T.H. **Rownd**. "A rapid method for extracting DNA from agarose gels." *Plasmid* 1:557-62.
77. 1978. **Koller**, B., H. **Delius**, H. **Bunemann**, and W. **Muller**. "The isolation of DNA from agarose gels by electrophoretic elution onto malachite green-polyacrylamide columns." *Gene* 4:227-39.
78. 1978. **Ledeboer**, A.M., J. **Hille**, and R.A. **Schilperoort**. "An easy and efficient procedure for the isolation of pure DNA restriction fragments from agarose gels." *Biochim Biophys Acta* 520:498-504.
79. 1978. **Tabak**, H.F., and R.A. **Flavell**. "A method for the recovery of DNA from agarose gels." *Nucleic Acids Res* 5:2321-32.
80. 1975. **Blin**, N., A.V. **Gabain**, and H. **Bujard**. "Isolation of large molecular weight DNA from agarose gels for further digestion by restriction enzymes." *Febs Lett* 53:84-6.
81. 1975. **Thuring**, R.W., J.P. **Sanders**, and P. **Borst**. "A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels." *Anal Biochem* 66:213-20.

Explicación de la invención

La invención consiste en un procedimiento para la extracción de macromoléculas, especialmente de ácidos nucleicos, DNA o RNA, o derivados de estos, embebidas en un gel de agarosa o derivados. Dicho procedimiento de extracción constituye y está basado en una nueva aplicación del compuesto polietilenglicol, y en general de cualquier otro compuesto con capacidad de producir separación de fases en mezclas acuosas de agarosa.

Esta aplicación se deriva de un fenómeno de separación de fases que ocurre en una mezcla acuosa de dichos dos polímeros hidrofílicos, agarosa (a temperaturas en que dicha agarosa se encuentra fundida) y polietilenglicol u otros compuestos poliméricos hidrofílicos.

Como resultado de esta separación de fases en medio acuoso, la agarosa queda confinada o enriquecida en una de las dos fases, de modo que al reducir la temperatura se obtiene una gelificación de este polímero en parte del volumen total de la mezcla, quedando el resto del volumen de la mezcla en estado fluido.

La molécula de interés que se pretende extracción por ejemplo un ácido desoxirribonucleico (DNA), se reparte entre ambas fases de modo que, al reducirse la temperatura y producirse la gelificación de la agarosa, una parte del total de moléculas de DNA quedan de nuevo atrapadas en el gel de agarosa pero otra parte permanecen solubles en la parte del volumen de la mezcla que permanece fluida.

El gel de agarosa o fase sólida puede ahora separarse de la fase fluida por simple centrifugación y el DNA puede recuperarse a partir de la fase fluida por precipitación con etanol según procedimientos convencionales.

En términos generales, el procedimiento consta de los siguientes pasos:

Material es y soluciones

1. 10 % PEG en agua ultrapura.
2. Baño a temperatura de ebullición, placa calefactora seca u horno de microondas.

Procedimiento

1. Calentar la solución de 10 % PEG en el baño a temperatura de ebullición (o equivalente).
2. Cortar el bloque de agarosa, introducirlo en un tubo y colocar este en el baño en ebullición hasta fundir totalmente.
3. Añadir 2 volúmenes (2 μ l por mg de gel de agarose) de la solución de PEG y mezclar.
4. Dejar enfriar a temperatura ambiente. La agarosa gelifica visiblemente como grumos dispersos en suspensión.
5. Centrifugar 5 minutos y decantar la fase fluida sobrenadante a un tubo limpio.
6. Añadir 2 volúmenes de 100 % etanol. Dejar precipitar durante 20 minutos a -20°C.
7. Centrifugar 10 minutos. Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 25 μ l de agua ultrapura.

Una breve incubación de unos 15 minutos a 37°C puede ser necesaria para resuspender trazas de PEG también presentes en el sedimento. La presencia de este contaminante no interfiere con reacciones de PCR o secuenciación.

Ventajas sobre la tecnología actual

Este método es especialmente eficiente para moléculas de DNA de pequeño o mediano tamaño, menor de 1000 pares de bases, que son generalmente recuperados con poca eficiencia por los procedimientos más frecuentemente usados basados en la unión de DNA a polvo de vidrio u otras resinas.

Como se puede ver en la figura 1, la recuperación es muy eficiente para segmentos de DNA pequeños, alrededor de 300 pares de bases y menores (no mostrado en dicha figura 1). El rendimiento (figura 2) disminuye progresivamente para segmentos de DNA mayores, pero hasta 1000 pares de bases la recuperación puede ser considerada satisfactoria para muchas aplicaciones.

Es importante mencionar que la recuperación calculada en la figura 2 se refiere a moléculas de DNA que han recuperado la estructura de doble cadena; el rendimiento en DNA total, esto es en forma de cadena doble más en forma de cadena sencilla es muy superior (no mostrado). Esto es especialmente útil cuando la siguiente aplicación del DNA recuperado no requiere o no saca ninguna ventaja particular de la conformación en cadena doble, como por ejemplo en reacciones de

PCR o secuenciación.

El procedimiento es igualmente adecuado para la recuperación de DNA de cadena doble y de cadena sencilla, y debe funcionar igualmente para RNA y derivados de todas estas moléculas.

La técnica ha sido comprobada con éxito con distintos tipos de agarosa incluyendo convencionales, de baja temperatura de fusión y de alta resolución.

Las principales ventajas de este método sobre otros procedimientos son el bajo coste y la reducida manipulación que requiere. Ambas características son especialmente valiosas cuando se requiere procesar un elevado número de muestras en paralelo, por ejemplo para posterior PCR o secuenciación.

Otra ventaja de este procedimiento es su reproducibilidad y alto rendimiento relativo para moléculas de DNA pequeñas. El principal inconveniente es que el DNA de doble cadena necesariamente sufre una "desnaturalización" o paso a conformación en cadena sencilla. Esto es únicamente problemático en moléculas de mayor tamaño e implica que hay que realizar un paso de reasociación de cadenas si la siguiente aplicación del DNA recuperado requiere una configuración en cadena doble.

Descripción de las figuras

Figura 1.- Fotografía de una electroforesis de muestras de DNA en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio que muestra la recuperación que se obtiene al aplicar el procedimiento descrito en esta patente a segmentos de DNA de diferentes tamaños embebidos en gel de agarosa. Muestras de cada segmento de DNA fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa convencional al 1 %. Los bloques de gel que contenían las bandas fueron cortados y el DNA fue recuperado aplicando el procedimiento basado en una fusión térmica del gel seguida de una gelificación con separación de fases o no homogénea de la agarosa descrito en esta patente. La totalidad del material recuperado fue sometida a electroforesis en un segundo gel de agarosa idéntico al anterior (carreras 2, 4, 6 y 8), cada una franqueada por sus correspondiente muestras originales (carreras 1, 3, 5 y 7), exactamente en la misma cantidad en que se aplicaron en la primera electroforesis. Una muestra idéntica a la aplicada en la carrera 8 fue sometida a digestión con el enzima PstI, que genera dos fragmentos de 1000 y 200 pares de bases respectivamente. La muestra digerida se aplicó en la carrera 9.

Figura 2.- Representación gráfica de la cuantificación de la recuperación de segmentos de DNA de diferentes tamaños. La fotografía presentada en la figura 1 fue digitalizada y sobre ella se realizó un análisis densitométrico. La intensidad de fluorescencia integrada (I) de cada banda (proporcional a la cantidad de DNA) fue usada para calcular el porcentaje de recuperación según la fórmula: $\text{recuperación \%} = 100 \times (I_{\text{recuperada}}/I_{\text{original}})$. El gráfico muestra el porcentaje de recuperación frente al tamaño del segmento de DNA en pares de bases.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de extracción de ácidos nucleicos, DNA o RNA, o derivados de estos, embebidos en gel de agarosa o derivados basado en una fusión térmica del gel seguida de una gelificación con separación de fases o no homogénea de la agarosa o derivados.

2. Procedimiento de extracción de ácidos nucleicos, DNA o RNA, según reivindicación 1 **caracterizado** porque el fenómeno de separación de fases se consigue con una mezcla acuosa de agarosa y otro compuesto polimérico hidrofílico con capacidad de producir una gelificación no homogénea de la agarosa en medio acuoso.

3. Procedimiento de extracción de ácidos nucleicos, DNA o RNA, según reivindicación 2 **caracterizado** porque el compuesto polimérico hidrofílico que provoca una gelificación no homogé-

nea de la agarosa en medio acuoso es polietilenglicol (PEG).

4. Procedimiento de extracción de ácidos nucleicos, DNA o RNA, según reivindicación 3 **caracterizado** porque la separación de fases se realiza añadiendo 2 μ l de una solución al 10% de PEG por mg de gel de agarosa.

5. Kit para la extracción de ácidos nucleicos, DNA o RNA, o derivados de estos, embebidos en un gel de agarosa o derivados, **caracterizado** por la aplicación de un compuesto con capacidad de producir separación de fases en mezclas acuosas de agarosa.

6. Kit para la extracción de ácidos nucleicos, DNA o RNA, o derivados de estos, embebidos en un gel de agarosa o derivados, según reivindicación 5 **caracterizado** porque el compuesto con capacidad de producir separación de fases en mezclas acuosas de agarosa es polietilenglicol (PEG).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

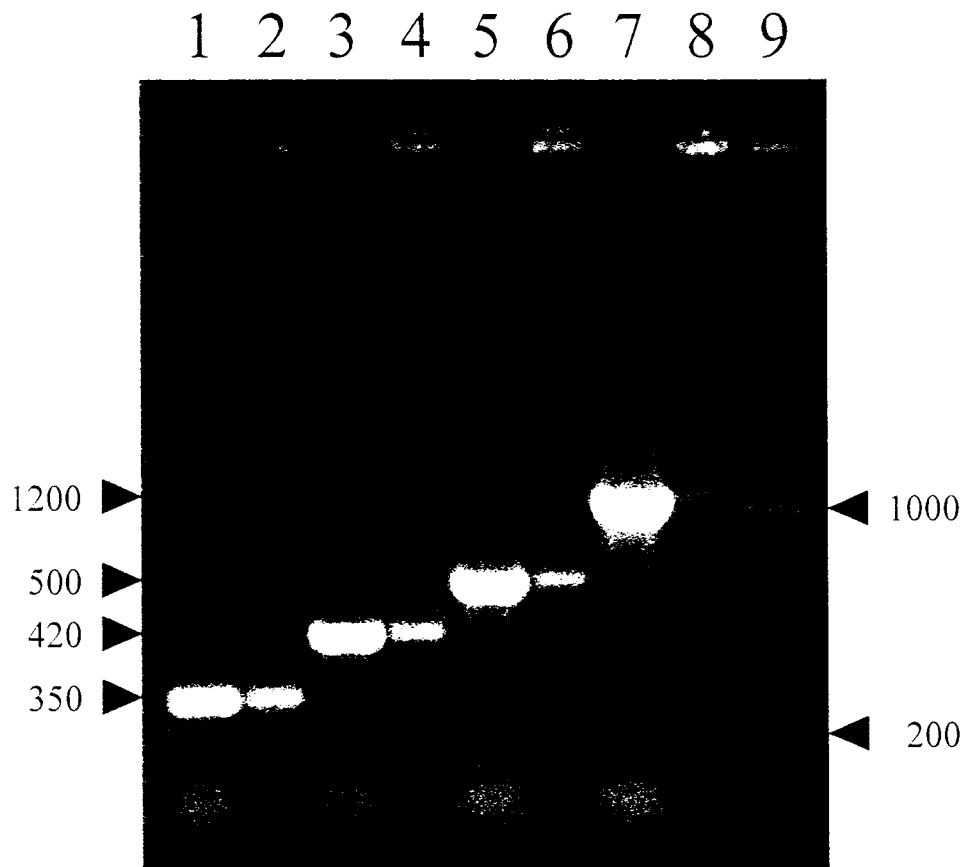


Figura 1

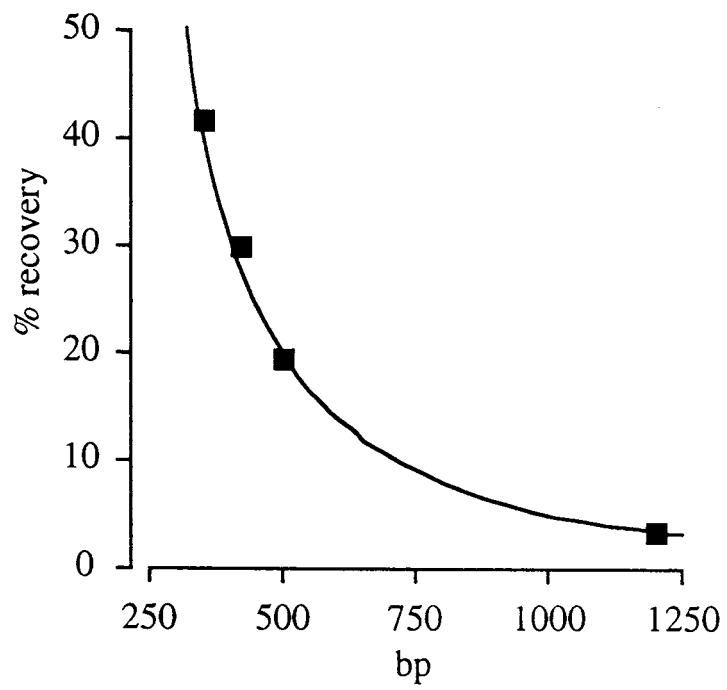


Figura 2



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12Q 1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	GB 1006259 A (SOUTH AFRICAN INVS. DEV. CORP.) 29.09.1965, todo el documento.	1-6
Y	PUN, K.K. et al. "Extraction of nucleic acids from agarose gel: A quantitative and qualitative comparison of four different methods", PREPARATIVE BIOCHEMISTRY, 1990, Vol. 20, N° 2, páginas 123-125. Todo el documento.	1-6
A	GB 1023179 A (SOUTH AFRICAN INVS. DEV. CORP.) 23.03.1966, todo el documento.	1-6
A	COLE, K.D. "Purification of plasmid and high molecular mass DNA using PEG-salt two phase extraction", BIOTECHNIQUES, 1991, Vol. 11, N° 1, páginas 18,20,22,24. Todo el documento.	1-6
A	LANGRIDGE, J. et al. "Extraction of nucleic acids from agarose gels", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1980, Vol. 103, N° 2, páginas 264-271. Todo el documento.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

04.03.2002

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1