

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 784**

51 Int. Cl.:
C07C 211/62 (2006.01)
C07C 211/63 (2006.01)
C07C 211/64 (2006.01)
C07F 9/54 (2006.01)
C11D 3/00 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07010591 .1**
96 Fecha de presentación: **22.05.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1820793**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.08.2007**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA ESTABILIZACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN MATERIALES BIOLÓGICOS.**

30 Prioridad:
27.06.2000 DE 10031236

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.02.2012

73 Titular/es:
**QIAGEN GMBH
QIAGEN STRASSE 1
40724 HILDEN, DE**

72 Inventor/es:
**Holländer, Vera;
Wyrich, Ralph y
Oelmüller, Uwe**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 373 784 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 para la estabilización de ácidos nucleicos en materiales biológicos

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la estabilización de ácidos nucleicos en materiales de origen biológico. Conforme al procedimiento según la invención, una muestra biológica con contenido en ácidos nucleicos se pone en contacto con una solución acuosa de estabilización que, como componente esencial, comprende un compuesto catiónico de la fórmula general



en la cual pueden significar

Y nitrógeno o fósforo

15 R_1 , R_2 , R_3 y R_4 , independientemente entre sí, un radical alquilo(C_1 - C_{20}) ramificado o no ramificado y/o un radical arilo(C_8 - C_{20}), así como un radical aralquilo(C_8 - C_{28}), y

X^- un anión de un ácido mono o polibásico, inorgánico u orgánico,

y con al menos un donante de protones como aditivo.

20 Se prefieren procedimientos en los que se emplean compuestos catiónicos que se componen de una sal de amonio, en la que R_1 significa un radical alquilo superior, preferentemente con 12, 14 ó 16 átomos de carbono, y R_2 , R_3 y R_4 , significan en cada caso un grupo metilo.

25 Se prefieren, además, procedimientos en los que se emplean compuestos catiónicos, en los cuales R_1 significa un grupo aralquilo - preferentemente un grupo bencilo -, R_2 un radical alquilo superior - preferentemente con 12, 14 ó 16 átomos de carbono - y R_3 y R_4 un grupo metilo.

Como aniones se prefieren bromuro, cloruro, fosfato, sulfato, formiato, acetato, propionato, oxalato o succinato.

30 Alquilo(C_1 - C_6) representa, en general, un radical hidrocarburo ramificado o no ramificado con 1 a 6 átomos de carbono, el cual puede estar sustituido eventualmente con uno a varios átomos de halógeno - preferentemente flúor -, los cuales pueden ser iguales o diferentes entre si. Como ejemplos se pueden citar los siguientes radicales de hidrocarburos:

35 Metilo, etilo, propilo, 1-metiletilo (iso-propilo), butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo, n-pentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, hexilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1-etil-1-metilpropilo y 1-etil-2-metilpropilo,

40 Radical alquilo superior representa un radical alquilo(C_7 - C_{20}), ramificado o no ramificado el cual puede estar eventualmente sustituido con uno o varios átomos de halógeno - preferentemente flúor -, los cuales pueden ser iguales o diferentes entre si. Como ejemplos se pueden citar los siguientes radicales hidrocarburo:

heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, dodecadecilo y elcosilo, ramificados o no ramificados.

45 Alqueno(C_3 - C_6) representa en general un radical hidrocarburo ramificado o no ramificado, con 3 a 6 átomos de carbono, con uno o eventualmente varios enlaces dobles, el cual eventualmente puede estar sustituido con uno o varios átomos de halógeno - preferentemente flúor -, los cuales pueden ser iguales o diferentes entre si. Como ejemplos se pueden citar los siguientes radicales hidrocarburo:

50 2-propenilo (alilo), 2-butenilo, 3-butenilo, 1-metil-2-propenilo, 2-metil-2-propenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo, 1-metil-2-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 3-metil-2-butenilo, 1-metil-3-butenilo, 2-metil-3-butenilo, 3-metil-3-butenilo, 1,1-dimetil-2-propenilo, 1,2-dimetil-2-propenilo, 1-etil-2-propenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo, 5-hexenilo, 1-metil-2-pentenilo, 2-metil-2-pentenilo, 3-metil-2-pentenilo, 4-metil-2-pentenilo, 1-metil-3-pentenilo, 2-metil-3-pentenilo, 3-metil-3-pentenilo, 4-metil-3-pentenilo, 1-metil-4-pentenilo, 3-metil-4-pentenilo, 4-metil-4-pentenilo, 1,1-dimetil-1-butenilo, 1,1-dimetil-2-butenilo, 1,1-dimetil-3-butenilo, 1,2-dimetil-2-butenilo, 1,2-dimetil-3-butenilo, 1,3-dimetil-2-butenilo, 1,3-dimetil-3-butenilo, 2,2-dimetil-3-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, 2,3-dimetil-3-butenilo, 1-etil-2-butenilo, 1-etil-3-butenilo, 2-etil-1-butenilo, 2-etil-2-butenilo, 2-etil-3-butenilo, 1,1,2-trimetil-2-propenilo, 1-etil-1-metil-2-propenilo y 1-etil-2-metil-2-propenilo.

60 Alquinilo(C_3 - C_6) representa en general un radical hidrocarburo ramificado o no ramificado, con 3 a 6 átomos de carbono, con uno o eventualmente varios enlaces triples, el cual eventualmente puede estar sustituido con uno o varios átomos de halógeno - preferentemente flúor -, los cuales pueden ser iguales o diferentes entre si. Como ejemplos se pueden citar los siguientes radicales de hidrocarburos:

65 2-propinilo (propargilo), 2-butinilo, 3-butinilo, 1-metil-2-propinilo, 2-metil-2-propinilo, 2-pentinilo, 3-pentinilo, 4-pentinilo, 1-metil-2-butinilo, 2-metil-2-butinilo, 3-metil-2-butinilo, 1-metil-3-butinilo, 2-metil-3-butinilo, 3-metil-3-butinilo, 1,1-dimetil-2-propinilo, 1,2-dimetil-2-propinilo, 1-etil-2-propinilo, 2-hexinilo, 3-hexinilo, 4-hexinilo, 5-hexinilo, 1-metil-2-pentinilo, 2-metil-2-pentinilo, 3-metil-2-pentinilo, 4-metil-2-pentinilo, 1-metil-3-

5 pentinilo, 2-metil-3-pentinilo, 3-metil-3-pentinilo, 4-metil-3-pentinilo, 1-metil-4-pentinilo, 3-metil-4-pentinilo, 4-metil-4-pentinilo, 1,1-dimetil-1-butinilo, 1,1-dimetil-2-butinilo, 1,1-dimetil-3-butinilo, 1,2-dimetil-2-butinilo, 1,2-dimetil-3-butinilo, 1,3-dimetil-2-butinilo, 1,3-dimetil-3-butinilo, 2,2-dimetil-3-butinilo, 2,3-dimetil-2-butinilo, 2,3-dimetil-3-butinilo, 1-etil-2-butinilo, 1-etil-3-butinilo, 2-etil-1-butinilo, 2-etil-2-butinilo, 2-etil-3-butinilo, 1,1,2-trimetil-2-propinilo, 1-etil-1-metil-2-propinilo y 1-etil-2-metil-2-propinilo.

10 Arilo representa - siempre que no se defina de otro modo - un radical aromático mono o polinuclear con 4 a 22 átomos de C, el cual puede contener eventualmente uno o dos heteroátomos. Como ejemplos se pueden citar: fenilo, naftilo, antracilo o, respectivamente, pirrol, furano, tiofeno, piridina, piridazina, pirimidina o pirazina, y el cual eventualmente, independientemente entre sí puede estar sustituido una o varias veces con halógeno (F, Cl, Br, I) - preferentemente flúor - o con un grupo alquilo.

15 Aralquilo significa un radical arilo mono o polinuclear en el sentido de la definición precedente, el cual a través de un puente de alquilenilo(C₁-C₆), alqueniлено(C₃-C₆) o alquinileno(C₃-C₆), para los cuales valen respectivamente las definiciones de los grupos alquilo(C₁-C₆), alqueniло(C₃-C₆) y alquinilo(C₃-C₆), está unido a la estructura parcial catiónica. En el sentido de la presente invención se prefiere el grupo bencilo.

20 Como iones conjugados X⁻ son adecuados preferentemente todos los aniones de los hidrácidos halogenados o los aniones de ácidos orgánicos mono o dibásicos tales como acetato u oxalato, malonato, succinato o citrato.

25 Como donantes de protones en el sentido de la presente invención son adecuados en primer lugar ácidos monocarboxílicos alifáticos saturados, ácidos alquenicarboxílicos insaturados, ácidos dicarboxílicos(C₂-C₆) alifáticos saturados y/o insaturados, ácidos cetocarboxílicos o ácidos cetodicarboxílicos alifáticos, así como aminoácidos, junto con ácidos minerales o sus sales, solos o en combinación. En este caso se pueden emplear todos los ácidos orgánicos citados en forma no sustituida o como derivados sustituidos, entre los cuales se prefieren - siempre que no se indique de otro modo - los no sustituidos o los derivados una o, respectivamente, varias veces sustituidos con grupos hidroxilo.

30 Como ácidos monocarboxílicos alifáticos, saturados, en el sentido de la presente invención, se entienden, junto al ácido fórmico, preferentemente ácidos alquil(C₁-C₆) carboxílicos, entre los cuales se prefieren el ácido acético, ácido propiónico, ácido n-butírico, ácido n-valérico, ácido isovalérico, ácido etil-metil-acético (ácido 2-metil-butírico), ácido 2,2-dimetilpropiónico (ácido pivalínico), ácido n-hexanoico, ácido n-octanoico, ácido n-decanoico, así como ácido n-dodecanoico (ácido láurico). Junto a ellos se pueden utilizar también los ácidos cetocarboxílicos que se derivan de los ácidos citados.

35 Como ácidos alquenicarboxílicos insaturados en el sentido de la invención se pueden citar, por ejemplo, ácido acrílico (ácido propenoico), ácido metacrílico, ácido crotónico, ácido iso-crotónico, así como ácido vinilacético.

40 Preferidos en el sentido de la presente invención son los ácidos dicarboxílicos(C₂-C₆) alifáticos, saturados, tales como, por ejemplo, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico o ácido adípico, entre los cuales se prefieren de modo particular el ácido oxálico y el ácido succínico.

45 De modo particularmente preferido, para la solución del problema conforme a la invención se emplean hidroxiaácidos di- y tri-carboxílicos alifáticos, entre los cuales se prefieren de modo particular el ácido tartrónico, ácido D-(+)-, L-(-)- o DL málico, ácido (2R, 3R)-(+)-tartárico, (2S, 3S)-(-)-tartárico, ácido meso-tartárico y ácido cítrico.

50 Junto con ello, para la solución de las presentes invenciones son además adecuados ácidos dicarboxílicos insaturados tales como ácido maleico o fumárico o ácidos tricarboxílicos insaturados tales como, por ejemplo, ácido aconítico

55 Sin embargo, en el sentido de la presente invención se pueden emplear también como aditivos ácidos cetodicarboxílicos alifáticos tales como, por ejemplo, ácido mesoxálico y ácido oxalacético, prefiriéndose de modo muy particular el ácido oxalacético.

Además, en el sentido de la presente invención se pueden emplear aminoácidos, entre los cuales se prefieren α-aminoácidos tales como, por ejemplo, ácido aminoacético (glicina), ácido aminopropiónico (alanina), ácido α-amino-iso-valérico (valina), ácido α-amino-isocaproico (leucina) y ácido α-amino-β-metilvalérico (isoleucina). En este caso, se utiliza glicina de modo particularmente preferido.

60 Los donantes de protones citados se pueden emplear como sustancias individuales o, respectivamente, en forma de los estereoisómeros puros así como también mezclados.

65 Como otros aditivos se pueden emplear igualmente en el sentido de la presente invención ácidos minerales y sus sales. Se emplean preferentemente en este caso sales de ácidos minerales - tales como ácido fosfórico y ácido sulfúrico - con metales alcalinos o sus sales de amonio. Se utilizan en este caso de modo particularmente preferido ácido fosfórico y sulfato de amonio.

Como ácidos nucleicos se entienden en el sentido de la presente invención ácidos nucleicos en el sentido más amplio, que abarcan, por ejemplo, ácidos ribonucleicos (ARN) así como también ácidos desoxirribonucleicos (ADN) en todas sus longitudes y configuraciones que abarcan ácidos nucleicos de doble hélice, monohélice, circulares y lineales, ramificados, etc., y todas los posibles subtipos tales como, por ejemplo, nucleótidos monómeros, oligómeros, plásmidos, ADN y ARN virales y bacterianos, así como ADN y ARN genómicos y no genómicos de células animales y vegetales o de otros eucariotas, mARN en forma procesada y no procesada, tARN, hn-ARN, rARN, cADN, así como todos los demás ácidos nucleicos posibles.

Como muestra biológica con ácidos nucleicos se puede utilizar material de muestra exento de células, plasma, líquidos corporales tales como, por ejemplo, sangre suero, células, fracciones de leucocitos, costra flogística, esputo, orina, esperma, heces, frotis, punciones, muestras de tejidos de cualquier tipo – tales como, por ejemplo, biopsias – partes de tejidos y órganos, muestras de alimentos que contienen ácidos nucleicos libres o ligados o células que contienen ácidos nucleicos, muestras del medio ambiente que contienen ácidos nucleicos libres o ligados o células que contienen ácidos nucleicos – tales como organismos (uni- o pluricelulares, insectos, etc), plantas y partes de plantas, bacterias, virus, levaduras y otros hongos, otros eucariotas y procariotas, etc. como los que se publican, por ejemplo, en la solicitud de patente europea nº 95909684.3, a la que se hace referencia aquí en su contenido, o también ácidos nucleicos libres.

Relativo al fondo tecnológico de la invención:

Del estado actual de la técnica se sabe desde hace tiempo que el origen genético y la actividad funcional de una célula se pueden determinar y examinar estudiando sus ácidos nucleicos. Los análisis de los ácidos nucleicos y de las proteínas posibilitan el acceso directo al origen de las actividades celulares. Por consiguiente, son potencialmente superiores a los métodos convencionales indirectos, como, por ejemplo, la detección de productos metabólicos. Así, se emplean ya análisis biológico-moleculares en muchos sectores, por ejemplo en el diagnóstico médico y clínico, en farmacia en el caso del desarrollo y evaluación de medicamentos, en la analítica de los productos alimentarios, así como en el control de la preparación de productos alimentarios, en la economía agraria en el caso del cultivo de plantas y animales útiles, así como en la analítica del medio ambiente y en muchos campos de investigación.

Por el análisis de los ARN, especialmente de los mARN en células, se pueden determinar directamente la actividad de genes. El análisis cuantitativo de modelos de transcriptasas (modelos de mARN) en células por modernos métodos de biología molecular como, por ejemplo, tiempo real de transcriptasa inversa PCR ("real time RT PCR") o análisis de chip de expresión génica posibilita, por ejemplo, el reconocimiento de genes expresados con defectos, por lo cual se pueden reconocer, por ejemplo enfermedades metabólicas, infecciones o la aparición de cáncer. El análisis de los ADN de células por métodos de la biología molecular tales como, por ejemplo, PCR, RFLP, AFLP, SNP o por secuenciación posibilita, por ejemplo, la detección de defectos genéticos o la determinación del tipo HLA, así como de otros marcadores genéticos.

El análisis de ADN y ARN genómicos se emplea también para la detección directa de patógenos infecciosos tales como virus y bacterias.

Premisa indispensable para la analítica de ácidos nucleicos es la inmediata estabilización de los ácidos nucleicos y de las proteínas después de la extracción de la muestra biológica a partir de su entorno natural. Esto vale para ADN y especialmente ARN, los cuales después de la extracción de la muestra biológica se pueden degradar muy rápidamente. Por otro lado, después de la extracción de la muestra biológica, por inducción por ejemplo de genes estresantes se puede llegar también a la síntesis de nuevas moléculas de mARN, por lo que la muestra de transcripción de las células se puede modificar. Debido a ello, los análisis posteriores se pueden falsear. Especialmente en el sector medicinal es necesaria la estabilización de los ácidos nucleicos, puesto que aquí – por ejemplo en un consultorio – se toman frecuentemente muestras que contienen ácidos nucleicos, las cuales después de un almacenamiento prolongado y de un transporte, se pueden seguir analizando en un laboratorio.

Entretanto, los ácidos nucleicos contenidos en las muestras se pueden modificar o incluso degradar totalmente. Naturalmente, esto influye masivamente sobre el resultado de los ensayos efectuados posteriormente, o hace que éstos sean totalmente imposibles. Para estos ensayos se emplean técnicas de biología molecular tales como análisis Northern-Blot, así como Southern-Blot, PCR, RT-PCR, SunRise, LCR, ADN ramificado (branched) (bADN), SDA, chips de ADN y ARN y arreglos (arrays) para la analítica de la expresión génica y mutacional, RFLP, AFLP, análisis SNP, síntesis de cADN, hibridación sustractiva o la tecnología Taqman y otros procedimientos de cuantificación en tiempo real. Por otro lado, la utilización de ácido nucleico – ADN o ARN – altamente puro, intacto, personifica un criterio de relevancia fundamental para la aplicación y realización de los ensayos anteriormente citados. Junto a ello, el aislamiento de las muestras que contienen ácidos nucleicos, así como los ensayos representan en cada caso una larga etapa de trabajo. Además, la contaminación de un laboratorio de investigación que trabaja en el sector de la biología molecular – como se puede presentar, por ejemplo, en el caso de una realización defectuosa del ensayo – puede conducir a falsos resultados de la investigación.

Relativo al estado actual de la técnica

Un gran número de publicaciones propone la utilización de mezclas a base de etanol y acetona como fijativos para el subsiguiente aislamiento del ácido nucleico de una correspondiente muestra – tal como, por ejemplo, tejido -. No obstante, después de estudiar esta bibliografía, parece claro que tales mezclas de etanol/acetona no pueden cumplir ni con mucho todas las exigencias que se imponen a una obtención segura de ARN. Así, estas mezclas no están en condiciones de proteger el ARN contra la degradación. Junto a ello, no se asegura la protección del ARN en muestras sólidas constituidas por asociaciones celulares de mayor amplitud. Junto a ello, las mezclas propuestas son fácilmente inflamables y expuestas a la explosión, lo que va ligado a un evento no carente de peligrosidad durante el trabajo en el laboratorio.

Junto a ello, un estado de la técnica periféricamente más importante se refiere a la obtención de ARN a partir de muestras de tejidos fijados o respectivamente conservados. Estos trabajos tienen esencialmente por objeto la aptitud de los preparados histológicos para maximizar la potencia de señal que se consigue en el caso de una hibridación *in situ*. Con otras palabras, estos experimentos sirven más bien para detectar ARN en lugar de conservarlos [patentes US- 5 196 182 y US-5 260 048]. Otros informes tienen por objeto la obtención de ARN o ADN fragmentados a partir de un tejido fijado, para poder someter los fragmentos así obtenidos a un análisis molecular – limitado – con ayuda de PCR. Para poder obtener un ADN o respectivamente, ARN fragmentado de este modo, las correspondientes muestras se tratan habitualmente con proteinasa K, para poder degradar los componentes tisulares que forman la estructura; sólo después se extrae el ARN con una solución que contiene una sal de guanidina. Sin embargo, el ARN obtenido de esta manera a partir de tejido fijado es de escasa calidad y presenta tan solo un tamaño de aproximadamente 200 bases. Esto, conforme al estado actual de la técnica, se puede atribuir a un cierto número de determinados factores, los cuales, entre otros, abarcan la influencia desventajosa de reacciones endógenas así como de reticulación del ADN y respectivamente ARN dentro de la matriz intracelular durante la fijación. En base a la circunstancia de que el ADN o, respectivamente, ARN en la predominante mayoría de las veces está al menos parcialmente degradado, un ADN o, respectivamente ARN así obtenido no se puede emplear ya con éxito en un análisis Northern. Un ARN aislado de esta manera a lo sumo se podría emplear con ciertas perspectivas de éxito en una reacción RT-PCR, pero allí sólo para la amplificación de fragmentos relativamente pequeños.

Además, del estado actual de la técnica se deduce la utilización de sulfato de amonio para la conservación de ARN a temperaturas superiores al punto de congelación [documento WO 00/06780]. Una composición de este tipo ha encontrado entrada en el estado actual de la técnica bajo la denominación ARN/ater. Sin embargo, tales soluciones acuosas de sulfato de amonio no son adecuadas para estabilizar ARN en sangre, plasma o suero. Debido a la circunstancia de que las citadas muestras presentan una elevada concentración de proteínas, al ponerse en contacto con este tipo de soluciones de sal de amonio se forma inmediatamente un precipitado difícilmente soluble [información del producto ARN/ater de la razón social Ambion, Austin, Texas (EE.UU)].

Además de esto, desde hace algún tiempo del estado de la técnica se conoce emplear compuestos denominados catiónicos para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas. Este tipo de aplicaciones se describen, entre otras, en las patentes US- 5,010,183 y US-5,300,635 así como en la memoria de patente europea EP 0442026. En los citados documentos la muestra biológica se incuba respectivamente con el compuesto catiónico sólo en el marco de los tiempos de incubación habituales para una preparación de muestras, es decir en el espacio de minutos; a continuación, el ácido nucleico se sigue purificando.

Una revisión de los compuestos conocidos en el estado actual de la técnica ha dado como resultado que los compuestos catiónicos citados en el estado de la técnica – especialmente el oxalato de tetradeciltrimetilamonio dado a conocer en las patentes de EE.UU.- no garantizan una suficiente estabilización del ARN celular – por ejemplo en el caso de un almacenamiento más prolongado de la sangre.

En el estado de la técnica se conocen ciertamente ensayos para estabilizar por ejemplo virus en sangre durante un espacio de tiempo de varios días, pero de estos hallazgos no se puede deducir ningún tipo de referencia sobre la integridad del ARN.

Así, Schmidt y MacFarlane [J. Medical Virology 47 (1995) 153] describen la estabilización de virus de hepatitis C en sangre mediante Catrimox-14™ durante siete días a la temperatura ambiente. La detección de los virus se efectuó en este caso mediante amplificación RT-PCR de un fragmento de 250 pB de longitud del genoma HCV. La detección allí publicada no ofrece, sin embargo, ningún criterio suficiente sobre la integridad del ARN, puesto que sólo se amplificó un fragmento corto. Además, el ensayo se llevó a cabo con una muestra con una carga de virus indeterminada, de modo que no se pudieron sacar conclusiones sobre una degradación de ARN viral durante el almacenamiento.

Junto a ello, en la solicitud de patente internacional WO 99/29904 se describe la estabilización de ADN en líquidos corporales utilizando EDTA, EGTA o BAPTA en combinación con hidrocloreto de guanidina, tiocianato de guanidina, cloruro de litio, cloruro de manganeso, sarcosil, SDS, perclorato de sodio, salicilato de sodio y tiocianato de sodio. Además, del estado actual de la técnica se deduce que los reactivos que contienen fenol tales como, por ejemplo, Trizol™ se pueden utilizar para la estabilización de ARN durante el almacenamiento. Sin embargo, todos estos reactivos son muy nocivos para la salud y, por ello, no son adecuados para aplicaciones rutinarias.

Por lo tanto, la presente invención se fundamenta en la misión de poner a disposición un procedimiento que permita la estabilización de ARN en presencia de tejidos o, respectivamente, sangre, plasma o suero.

5 Junto a ello, la presente invención se fundamenta en la misión de poner a disposición un procedimiento en el que se pueda emplear una solución acuosa estabilizante, cuyos componentes no sean nocivos para la salud, con lo que el procedimiento se pueda emplear también, por ejemplo, para una estabilización de material de ensayo biológico durante el transporte desde el lugar de la extracción hasta un laboratorio sin riesgos para la salud del personal encargado de la elaboración de las muestras.

10 Junto a ello, una misión más de la presente invención consiste en poner a disposición un procedimiento que trabaje con empleo de una composición en forma de una solución estabilizante, con la cual se cumpla la premisa de que también el reactivo de estabilización permanezca estable incluso en solución y no requiera de ningún tipo de tratamiento previo – como, por ejemplo, la disolución de precipitados difícilmente solubles – por el personal que lo aplica. Esta clase de tratamientos previos van siempre unidos con el riesgo de una variación en la eficacia de la estabilización.

15 Otra misión de la presente invención consiste en poner a disposición un procedimiento que pueda ser de múltiple uso, es decir: que se pueda aplicar en un amplio espectro de muestras biológicas con contenido en ácido nucleico.

20 Sorprendentemente se comprobó, ahora, que la estabilización de ácidos nucleicos se consigue durante un prolongado espacio de tiempo cuando los ácidos nucleicos de una muestra biológica se ponen en contacto con un compuesto catiónico tal como se da a conocer, entre otras, en las patentes de EE.UU. US-5 010 183 y 5 300 635 y, conforme a la invención, se hacen reaccionar con uno o varios de los aditivos descritos al comienzo. Los aditivos que son preferentemente adecuados para la solución de la misión conforme a la invención se exponen en la Tabla 1:

Tabla 1

Denominación	Fórmula
Ácido acético	CH ₃ -COOH
Ácido oxálico	HOOC-COOH
Ácido malónico	HOOC-CH ₂ -COOH
Ácido tartrónico	HOOC-CHOH-COOH
Ácido succínico	HOOC-CH ₂ -CH ₂ -COOH
Ácido málico	HOOC-CHOH-CH ₂ -COOH
Ácido tartárico	HOOC-CHOH-CHOH-COOH
Ácido glutárico	HOOC-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH
Ácido adípico	HOOC-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH
Ácido cítrico	HOOC-CH ₂ -COHCOOH-CH ₂ -COOH
Ácido maleico	HOOC-CH=CH-COOH
Ácido oxalacético	HOOC-CO-CH ₂ -COOH
Glicina	H ₂ N- CH ₂ -COOH
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ -SO ₄
Fosfato	sal de K y Na de H ₃ PO ₄

30 El aditivo se puede presentar en el reactivo de estabilización en diferentes concentraciones; por ejemplo, en mezclas de la solución estabilizante con sangre puede estar presente en una relación en volumen de 1:1, preferentemente 3:1 en una concentración 50 mM hasta la saturación, preferentemente 100 mM a 1 M y de modo particularmente preferido en una concentración de 200 – 500 mM. En este caso, en función de la naturaleza del aditivo pueden resultar ventajosos otros intervalos de concentración. Junto a ello también es posible el empleo de combinaciones de diferentes aditivos en el procedimiento de acuerdo con la invención.

35 El compuesto catiónico presenta en la solución acuosa una concentración en un intervalo de 0,01% en peso y saturación, preferentemente entre 0,1% en peso y saturación y, de modo particularmente preferido, entre 0,5% en peso y 15% en peso y, de modo muy preferido, entre 2% en peso y 10% en peso.

40 Naturalmente, en el caso de la adición de una solución de compuestos catiónicos y aditivo, las respectivas concentraciones óptimas se determinan por el volumen de la muestra biológica y la relación de volumen entre solución estabilizante y muestra biológica.

45 El valor del pH de la mezcla de compuesto catiónico y aditivo se puede variar en función de la muestra, en general en un amplio intervalo de pH (pH 2 a 12) y se sitúa preferentemente en un intervalo de pH 2 a pH 10 y, de modo particularmente preferido, en un intervalo de pH 3 a 8. En este caso, el intervalo de pH preferido depende de la muestra biológica empleada. Para sangre, plasma y suero se prefiere un valor del pH en un intervalo comprendido entre pH 2 y pH 6 y, particularmente, entre pH 3 y pH 4.

5 Para muestras biológicas como también para otros líquidos corporales celulares excepto sangre, plasma y suero o, por ejemplo, bacterias, punciones, células, tejidos y otras muestras biológicas – tales como las descritas anteriormente – el valor del pH en la solución estabilizante constituida por compuesto catiónico y aditivo se sitúa preferentemente en un intervalo de pH 3 a pH 10 y, de modo particularmente preferido, en un intervalo de pH 4 a pH 8.

10 Para la estabilización de ácidos nucleicos en muestras biológicas se puede mezclar la muestra con una solución que contenga el o los compuestos catiónicos y los aditivos. En este caso es posible un volumen añadido de 0,1 a 10.000 volúmenes de la muestra biológica; se prefiere un volumen añadido en un intervalo de 1 a 1000 y, de modo muy particularmente preferido, en un intervalo de 1 a 100 volúmenes. Sin embargo, en función de la clase de muestra – por ejemplo muestras de biopsias por agujas finas o de cultivos celulares bajos – se pueden considerar circunstancialmente volúmenes esencialmente más elevados.

15 Igualmente, los compuestos catiónicos y aditivos anteriormente citados se pueden añadir también como sustancia sólida cuando la propia muestra biológica contiene líquido para la disolución de la sustancia sólida (tal como, por ejemplo, líquidos corporales que contienen células, células en un medio, orina), o se añade un líquido como, por ejemplo, agua, para la solubilización de la sustancia sólida. La adición como sustancia sólida ofrece la ventaja de que las sustancias sólidas son generalmente más estables químicamente y su adición a la muestra es frecuentemente más fácil de llevar a cabo.

20 Además de esto, especialmente en muestras biológicas muy compactas, tales como por ejemplo tejidos, es posible una fragmentación o, respectivamente, homogeneización de la muestra en la solución estabilizante o, respectivamente, antes de la mezclado con la solución estabilizante para que, por ejemplo, por efectos mecánicos, químicos, físicos o enzimáticos sobre la muestra fomentar la liberación de los ácidos nucleicos o de células individuales o, respectivamente, asociaciones de células por destrucción de una muestra compacta. Un efecto mecánico puede tener lugar, por ejemplo, con un cuchillo mecánico, un molino de bolas o por prensado a través de una jeringuilla, mientras que se ofrecen enzimas adecuadas para actuar sobre la muestra – por ejemplo hidrolasas, proteasas o lipasas.

30 Además de esto, la muestra también se puede tratar previamente por vía puramente física, por ejemplo mediante ultrasonidos.

35 El tratamiento previo se puede efectuar, además, por vía química – bien sea sola o en combinación con métodos puramente físicos. Como agentes para apoyar la lisis se pueden utilizar, por ejemplo alcoholes alifáticos – especialmente isopropanol – o aldehídos o, respectivamente, dialdehídos – tales como, por ejemplo, glioxal – o también fenoles o derivados de fenoles – tales como, por ejemplo, 2-bifenilol o compuestos iónicos, híbridos o no iónicos – tales como, por ejemplo, sulfhidrilo – o reactivos reductores - tales como, por ejemplo, ditiotreitil y β -mercaptoetanol – o derivados del ácido fosfórico - tales como, por ejemplo, tributilfosfato – o también reactivos caotrópicos tales como, por ejemplo, urea, tiocianato de guanidina o hidrocloreuro de guanidina – o sales individualmente o en combinación.

40 Otras posibilidades en cuanto a la acción mecánica, química, física o enzimática sobre las muestras son conocidas por el experto en la materia y deben ser abarcadas aquí.

45 El almacenamiento del material de muestra, según las necesidades individuales, puede tener lugar durante espacios de tiempo más prolongados como, por ejemplo, de 1 a 14 días o más, a la temperatura ambiente, pero también a temperaturas superiores como, por ejemplo, 40°C o más y, también, a temperaturas más bajas, por ejemplo, 4°C o -20°C.

50 A continuación del almacenamiento de la muestra biológica en la solución de los compuestos anteriormente citados se pueden anexionar directamente o bien técnicas de análisis de ácidos nucleicos, o puede tener lugar una purificación de los ácidos nucleicos de la muestra.

55 Una detección/análisis directa de ácidos nucleicos se puede ver, por ejemplo, en Blotting-Techniken, métodos electroforéticos en gel para la separación de biomoléculas y por métodos cromatográficos.

60 Para la purificación de los ácidos nucleicos de la muestra biológica los ácidos nucleicos libres o las células o partículas que contienen ácidos nucleicos se separan, por ejemplo por centrifugación o filtración de la solución restante y se llevan a una purificación ulterior, la cual ventajosamente puede tener lugar en un volumen más reducido, tal como se describe en las patentes de EE.UU. US 5.010.183, US 5.300.635 y en la solicitud de patente europea con el número de solicitud 99103457.

65 La separación directa de los ácidos nucleicos o, respectivamente, de las células o partículas que contienen ácidos nucleicos en el recipiente de almacenamiento posibilita, en este caso, el ahorro de etapas adicionales para transvasar las muestras a otros recipientes para su purificación, y reduce, por consiguiente, tanto la pérdida de

muestra como también el riesgo de confusiones y de contaminación por arrastre de ácidos nucleicos de muestra a muestra. El procedimiento de acuerdo con la invención posibilita, bajo la aplicación de estos reactivos de estabilización, un procedimiento de 1 etapa para la estabilización y el aislamiento directo de ácidos nucleicos en muestras biológicas, pudiéndose aislar ARN y ADN alternativamente de la muestra biológica o paralelamente a partir de una muestra.

Por la estabilización de los ácidos nucleicos con ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención con empleo de una solución estabilizante que contiene uno o varios compuestos catiónicos y uno o varios aditivos se consigue que los ácidos nucleicos en una muestra no se modifiquen tampoco en el caso de un almacenamiento prolongado o durante un transporte. Con ello se incrementa claramente la exactitud de los ensayos efectuados posteriormente. En determinados casos – cuando por ejemplo el material de muestra tiene que ser transportado a largas distancias o tiene que ser almacenado durante tiempo prolongado – el procedimiento conforme a la invención hace realmente posible este ensayo después de tal espacio de tiempo.

Las ventajas de esta invención se encuentran especialmente tanto en el campo de la investigación, por ejemplo para el análisis de niveles de transcriptasa, que se tienen que fijar directamente después de la extracción, como también en el campo de los análisis clínicos – tales como, por ejemplo el diagnóstico molecular – en donde las muestras de pacientes después de la extracción se tienen que estabilizar igualmente durante el almacenamiento y transporte para el análisis. Especialmente, el aislamiento y estabilización de ácidos nucleicos encuentra aplicación en el diagnóstico de tumores, en el diagnóstico de enfermedades muy condicionadas, así como en el diagnóstico y en la monitorización de virus y en el diagnóstico y la monitorización de virus de otros patógenos infecciosos, así como en el análisis de modelos de la expresión génica.

Los campos de aplicación de la presente invención se extienden en este caso no sólo a campos de aplicación medicinales o zoológicos, sino abarcan también el análisis de sistemas botánicos, fúngicos y procarióticos. La estabilización y aislamiento de ácidos nucleicos a partir de plantas y partes de plantas, algas, hongos, así como bacterias a partir de cultivos y hábitats naturales encuentran aplicación en el sector de la investigación, por ejemplo para el análisis de niveles de transcriptasa y modelos de la expresión génica, así como para la identificación y cuantificación de especies en colonias complejas, por ejemplo de bacterias en una muestra de suelo.

Aparte de esto, el potencial de aplicación se extiende también a otros campos analíticos tales como, por ejemplo, la analítica de los productos alimentarios.

La presente invención se explica con ayuda de los siguientes ejemplos y de las figuras. En la descripción y en los ejemplos se utilizan las siguientes abreviaturas:

AFLP	polimorfismo longitudinal de fragmentos amplificados
A. dest.	agua destilada
BAPTA	ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético
EcoR1	enzima de restricción de Escherichia coli cepa R
E ₂₆₀ /E ₂₈₀	cociente de las extinciones a 260 y 280 nm
EDTA	ácido etilendiamin-N,N,N',N'-tetraacético
EGTA	ácido [etilenbis(oxietilennitrilo)tetraacético
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
Hind III	enzima de restricción de Haemophilus influenzae
hugl	homólogo humano de larvas gigantes
IFN-γ	gamma interferona
LM	marcador de longitud
MOPS	ácido 3-(N-morfolin)-2-hidroxiopropanosulfónico
nd	no determinado
Nonidet P40	Imbentin-N/52; octilfenilpolietilenglicol
OD	densidad óptica
PBS	fosfato salino tamponado
PCR	reacción en cadena de polimerasa
RFLP	polimorfismo de longitud del fragmento de restricción
rpm	revoluciones por minuto
mARN	ARN mensajero
rARN	ARN ribosomal
TA	temperatura ambiente
RT-PCR	transcriptasa inversa PCR
SDS	dodecilsulfato de sodio
SNP	polimorfismo de nucleótido individual
SSC	solución de sal común/citrato de sodio
TBE	tampón EDTA-tris-borato
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
U	unidades

Abreviaturas no reseñadas – tales como, por ejemplo h para horas – son habituales en su significado para el experto o, por su utilización en el estado actual de la técnica son suficientemente conocidas.

5 Explicaciones en relación a las figuras y a los experimentos en las que se fundamentan

Fig. 1 muestra la estabilización de ARN en sangre mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio (TTAOx) en diferentes tampones de ácido carboxílico con diferentes valores de pH.

10 **Fig. 2** muestra la estabilización de ARN en sangre entera mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, tamponado con ácido tartárico, pH 3 en diferentes concentraciones.

Fig. 3 muestra la estabilización de ARN en sangre entera mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, tamponado con ácido tartárico 250 mM. pH 3.

15 **Fig. 4** muestra la estabilización de ARN en sangre entera mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, tamponado con ácido tartárico pH 3,7 como resultado de una hibridación-Northern con una sonda marcada radioactivamente para el mRNA del gen GAPDH (A) y del gen IFN- γ (B). También después de un almacenamiento durante un espacio de tiempo de 72 h es detectable en este experimento el mRNA del GAPDH-gen y del IFN- γ -gen.

20 **Fig. 5** muestra la estabilización de ADN genómico en sangre mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, tamponado con ácido tartárico a pH 3,7. Junto al ARN celular, con el procedimiento aquí desarrollado se puede aislar también el ADN genómico de los leucocitos, estabilizado y a continuación aislado por unión a una membrana de sílice. Fig. 5 muestra que también después de un almacenamiento de 72 h se aísla ADN de alto peso molecular (longitud > 20 kB).

25 **Fig. 6** muestra los resultados de la utilización del ADN genómico en reacciones enzimáticas. El ADN aislado después de un almacenamiento de 24 o 72 horas (véase ejemplo 5) se emplea en diversas reacciones enzimáticas. A. En cada caso, 2 μ g del ADN se cortan con 6 U de las enzimas de restricción EcoRI (E) o, respectivamente, Hind III (H) durante 3 h a 37°C y, a continuación, se separan sobre un gel de agarosa/TBE al 0,8%. Como control se muestra en cada caso el ADN sin cortar. B. respectivamente 150 o 300 ng del ADN genómico se emplean en una reacción PCR (volumen total 50 μ l) en la cual se amplificó un fragmento de 1,1 kB de longitud del gen hugl (homólogo humano de larvas gigantes). Los productos de la PCR se separan en un gel de agarosa/TBE al 1,2%.

35 **Fig. 7** muestra la estabilización de ARN en plasma mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, mezclado con diferentes aditivos. En este caso, todas las muestras se disponen en forma de determinaciones dobles: respectivamente 30 μ l de los eluidos se separan en un gel de agarosa-formaldehído-MOPS al 1%. Las respectivas muestras se describen en la Tabla 2.

40 **Fig. 8** muestra la estabilización de ARN en plasma mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, mezclado con ácido tartárico o, respectivamente, ácido tartrónico durante diferentes espacios de tiempo. En este caso, todas las muestras se disponen en forma de determinaciones dobles: cada 30 μ l de los eluidos se separan en un gel de agarosa-formaldehído-MOPS al 1%. Las respectivas muestras se describen en la Tabla 3.

45 **Fig. 9** muestra la estabilización de ARN en 1 ml de plasma mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, mezclado con diferentes aditivos. En este caso, todas las muestras se disponen en forma de determinaciones dobles: cada 30 μ l de los eluidos se separan en un gel de agarosa-formaldehído-MOPS al 1%. Las respectivas muestras se describen en la Tabla 4.

50 **Fig. 10** muestra la estabilización de ARN en células Hela mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, mezclado con diferentes aditivos. En este caso, las muestras se disponen en forma de determinaciones dobles, las muestras 14, 40, 66 y 92 como determinaciones simples: cada 20 μ l de los eluidos se separan en un gel de agarosa-formaldehído-MOPS al 1%. Las respectivas muestras se describen en la Tabla 5.

55 **Fig. 11** muestra la estabilización de ARN en diferentes cantidades de células Hela. En este caso, todas las muestras se disponen en forma de determinaciones dobles: cada 20 μ l de los eluidos se separan en un gel de agarosa-formaldehído-MOPS al 1%. Las respectivas muestras se describen en la Tabla 7.

60 **Fig. 12** muestra la estabilización de ARN en macrófagos. En este caso, todas las muestras se disponen en forma de determinaciones dobles: cada 20 μ l de los eluidos se separan en un gel de agarosa-formaldehído-MOPS al 1%. Las respectivas muestras se describen en la Tabla 9.

65 **Fig. 13** muestra la estabilización de ARN en células Hela adherentes sin separación del medio. En este caso, cada 20 μ l de los eluidos se separan en un gel de agarosa-formaldehído-MOPS al 1%. Las respectivas muestras se

describen en el ejemplo 13.

Fig. 14 muestra la estabilización de ARN en tejido renal mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, mezclado con diferentes aditivos. En este caso, todas las muestras se disponen en forma de determinaciones dobles; cada 20 µl de los eluidos se separan en un gel de agarosa-formaldehído-MOPS al 1%. Las respectivas muestras se describen en la Tabla 12.

Fig. 15 muestra la estabilización y aislamiento de ADN paralelamente a la estabilización y aislamiento de ARN. En este caso, cada 40 µl de los eluidos se separan en un gel de agarosa-TBE al 0,8%. Las respectivas muestras se describen en el ejemplo 15.

Ejemplos

Ejemplo 1:

Estabilización de ARN en sangre mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio (TTAOx) en diferentes tampones de ácido carboxílico con diferentes valores de pH.

Como aditivos se eligen ácidos carboxílicos con diferente longitud de cadena. Además se ensayan ácidos mono-, di- y tri-carboxílicos, ácidos carboxílicos hidroxilados y no hidroxilados. Todas las sustancias se emplean para la estabilización en combinación con el compuesto catiónico oxalato de tetradeciltrimetilamonio. En este caso se varían tanto el valor del pH como también la concentración de las sustancias.

La Fig. 1 muestra los resultados de las pruebas. En todos los casos, se puede aislar ARN intacto también después de 24 o 48 h. Las cantidades de ARN, en parte bajas, dependen del bajo volumen de sangre que fue elaborado y del diferente contenido en ARN en diferentes muestras de sangre. En estos experimentos una parte del ADN genómico se obtuvo igualmente en las fracciones de ARN.

500 µl de sangre se almacenaron con 500 µl de un tampón constituido por 10% (p/v) de oxalato de tetradeciltrimetilamonio – tamponado con diferentes ácidos carboxílicos, en cada caso en una concentración 200 mM – así como con los respectivos valores diferentes de pH del correspondiente ácido carboxílico – durante 24 y 48 h a la TA. Para el aislamiento del ARN se separan por centrifugación los complejos, constituidos por compuesto catiónico y ácido nucleico; el aglomerado (pellet) se lava una vez con agua, de nuevo se separa por centrifugación y se recoge en 300 µl de un tampón de lisis habitual en el comercio – tal como, por ejemplo, tampón RLT de la razón social QIAGEN. La muestra se diluye con 360 µl de agua y se trata durante 10 minutos a 55°C con 40 µl de proteinasa K. A continuación, la muestra se centrifuga, el material sobrenadante se trata con etanol y se aplica sobre una columna Spin que contiene membrana de sílice. La muestra se pasa por la membrana mediante centrifugación. La columna Spin se lava dos veces con un tampón de lavado que contiene isotiocianato de guanidina, adquirible comercialmente – por ejemplo con el tampón RW1 de la razón social QIAGEN - y dos veces con un tampón de lavado que contiene alcohol, habitual en el comercio - por ejemplo tampón RPE de la razón social QIAGEN - y, a continuación, el ARN se eluye en 60 µl de agua exenta de RNasa, la cual se pasa de nuevo por centrifugación por la membrana. Cada 30 µl del eluido se separan sobre un gel de agarosa/formaldehído al 1,2%

Ejemplo 2:

Estabilización de ARN en sangre entera mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio y ácido tartárico (tamponado) a pH 3 en diferentes concentraciones.

500 µl de sangre se almacenan con 500 µl de un tampón constituido por 10% (p/v) de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y ácido tartárico 50-500 mM, pH 3 durante 2,5, 24 y 48 horas a la TA. El aislamiento del ARN tiene lugar tal como se describe en la Fig. 1, con la diferencia de que adicionalmente el ADN genómico se separa por un tratamiento de la muestra con DNasa con el "RNase.Free.DNase Set" de la razón social QIAGEN. El ARN se eluye con 80 µl de agua exenta de RNasa. Cada 30 µl de eluido se separan sobre un gel de agarosa/formaldehído al 1,2%.

Ejemplo 3:

Estabilización de ARN en sangre entera mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, tamponado con ácido tartárico 250 mM a pH 3.

Determinación de la integridad, rendimiento y pureza del ARN:

El ARN se estabiliza en sangre durante al menos 72 horas sin degradación o pérdida de rendimiento en una solución de oxalato de tetradeciltrimetilamonio, tamponado con un tampón de ácido carboxílico, por ejemplo ácido tartárico 250 mM, pH 3,0 (véase Fig. 3).

2 ml de sangre se mezclan con 2 ml de un tampón constituido por 10% (p/v) de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y

ácido tartárico 250 mM, pH 3 y se almacenan durante 24 - 72 horas a la TA. El aislamiento del ARN tiene lugar tal como se describe en el ejemplo 2, con la diferencia de que la muestra antes de la centrifugación de los complejos – constituidos por el compuesto catiónico y el ácido nucleico – se trata con un tampón de lisis de eritrocitos habitual en el comercio – tal como, por ejemplo, el tampón EL de la razón social Qiagen GmbH y, después, se incuba durante 10 minutos sobre hielo. El ARN se eluye con 80 µl de agua exenta de RNasa. Cada 30 µl de eluido se separan sobre un gel de agarosa/formaldehído al 1,2% o, respectivamente se miden en un fotómetro espectral. La cantidad de ARN total aislado se obtiene, después de diluir con agua, por medición fotométrica de la absorción de luz en una longitud de onda de 260 nm. La pureza del ARN así obtenido se calcula por determinación fotométrica de la relación de la absorción de la luz a 260 nm con respecto a la correspondiente a 280 nm.

Ejemplo 4:

Estabilización de ARN en sangre entera mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, de diferentes concentraciones tamponado con ácido tartárico a pH 4,0.

Análisis Northern-Blot

2,5 ml de sangre se mezclan con 6,9 ml de un tampón constituido por 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y ácido tartárico 200 mM, pH 3,7 y se almacenan durante 1 h, 24 h, 48 h y 72 h a la TA. Para el aislamiento del ARN se separan por centrifugación los complejos de compuesto catiónico y ácido nucleico. El aglomerado se lava una vez con agua y luego se recoge en 300 µl de tampón de lisis - por ejemplo, tampón RLT de la razón social QIAGEN -. La elaboración posterior de la muestra tiene lugar tal como se describe en la Fig. 2. Cada 2,5 µl del total de ARN se separan a continuación sobre un gel de agarosa/formaldehído al 1,2%. A continuación el ARN se transfiere a una membrana de nilón y durante un espacio de tiempo de aproximadamente 12 h se hibridiza en un tampón fosfato de sodio/SDS, a 68°C, con una sonda de ARN anti-sense marcada radioactivamente para el gen GAPDH (Fig. 4A) o, respectivamente el gen IFN-γ (Fig. 4B). La membrana se lava con tampones de lavado con concentración salina decreciente de 2xSSC/0,1%SDS hasta 0,1xSSC/0,1%SDS a una temperatura de 68°C. La membrana de nilón se expone a continuación sobre una película para rayos X. Tanto la señal de GAPDH-mARN como también la señal de IFN-γ-mARN permanecen constantes durante un tiempo de almacenamiento superior a 72 h. Este resultado confirma que no ha tenido lugar una degradación del m-ARN durante el citado espacio de tiempo.

Ejemplo 5:

Estabilización de ADN genómico en sangre mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio tamponado con ácido tartárico a pH 3,7.

Con el procedimiento aquí desarrollado, junto con el ARN celular, se puede aislar también el ADN genómico de sangre entera, estabilizado y aislado a continuación por unión a una membrana de sílice. Fig. 5 muestra que también después de un almacenamiento de 72 h a TA se aísla ADN de elevado peso molecular (longitud > 20 kB).

2,5 ml de sangre se mezclan con 6,9 ml de una solución constituida por oxalato de tetradeciltrimetilamonio al 4% (p/v) y ácido tartárico 200 mM a pH 3,7 y se almacenan durante 24 h, respectivamente, 72 h a la TA. Para el aislamiento del ADN se separan por centrifugación los complejos de compuesto catiónico y ADN. El aglomerado se recoge en 300 µl de un tampón que contiene cloruro de sodio y EDTA, después se añaden 360 µl de un tampón de hidrocloreuro de guanidina obtenible comercialmente – tal como por ejemplo tampón AL de la razón social QIAGEN -, así como 20 µl de proteinasa K. Las muestras se incuban durante 10 minutos a 65°C, después se añaden 420 µl de etanol y la muestra se aplica sobre una columna Spin que contiene una membrana de sílice. La muestra se pasa a través de la membrana mediante centrifugación. La membrana de sílice se lava en cada caso una vez con un tampón de hidrocloreuro de guanidina que contiene etanol, obtenible comercialmente – tal como, por ejemplo, el tampón AW1 de la razón social QIAGEN – y una vez con un tampón de lavado que contiene etanol – tal como, por ejemplo, el tampón AW2 de la razón social QIAGEN. El ADN se eluye con 300 µl de un tampón TRIS (pH 8). Respectivamente 5 µl de eluido se separan sobre un gel de agarosa/TBE al 8%.

Ejemplo 6

Utilización de ADN genómico en reacciones enzimáticas.

La Fig. 6 muestra que el ADN aislado de forma correspondiente al Ejemplo 5 se puede emplear en diferentes reacciones enzimáticas (restricción y amplificación por PCR).

El ADN aislado después de un almacenamiento de 24, respectivamente, 72 horas (véase el Ejemplo 5) se emplea en diferentes reacciones enzimáticas. Esto es una demostración de la elevada pureza y buena calidad del ADN aislado.

A) En cada caso, 2 µg del ADN se cortan con 6 U de las enzimas de restricción EcoRI (E), respectivamente Hind III (H) durante 3 h a 37°C y, a continuación, se separan sobre un gel de agarosa/TBE al 0,8%. Como

control se muestra en cada caso el ADN sin cortar.

- 5 B) respectivamente 150 ó 300 ng del ADN genómico se emplean en una reacción PCR (volumen total 50 µl) en la cual se amplificó un fragmento de 1,1 kB de longitud del gen *hugl*. Los productos del PCR se separan en un gel de agarosa/TBE al 1,2%.

Ejemplo 7:

10 Estabilización de ARN en plasma mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, mezclado con diferentes aditivos.

Estos experimentos demuestran que la adición de ácidos carboxílicos y otros aditivos al oxalato de tetradeciltrimetilamonio mejora claramente la estabilización de ARN libre en plasma, en comparación con la estabilización de ARN sólo con oxalato de tetradeciltrimetilamonio.

15 Para la preparación de las soluciones utilizadas en este experimento se mezcla una solución patrón de 30% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio, con respectivamente una solución patrón de 0,5 M de ácido tartárico, ácido cítrico, ácido tartrónico, ácido succínico, sulfato de amonio o ácido fosfórico para dar una concentración final de 2% o 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio, y 200 mM del aditivo. La solución patrón de los aditivos, antes de la
20 mezcladura con oxalato de tetradeciltrimetilamonio, se ajustan al valor de pH indicado mediante lejía de sodio. Como control se utiliza una solución de oxalato de tetradeciltrimetilamonio al 5% sin adición de aditivo.

Respectivamente 0,5 ml de cada una de las soluciones así preparadas se dispone previamente en un recipiente Eppendorf de 2 ml, 15 µl de ARN completo de células Hela, el cual se aísla antes, por ejemplo mediante un equipo para aislamiento de ARN obtenible comercialmente (por ejemplo equipo de aislamiento de ARN RNeasy® Maxi-Kits de la razón social QIAGEN), se pipetea por la tapadera del recipiente Eppendorf. Se añaden a la solución 0,5 ml de plasma sanguíneo humano, se cierra la tapadera del recipiente y se invierte cinco veces rápidamente el recipiente para su mezcladura. Las muestras se almacenan 1 día a la TA (aproximadamente 20 a 25°C). Todos los experimentos se llevaron a cabo en forma de determinaciones dobles.

30 Para el aislamiento del ARN se centrifugan las muestras durante un espacio de tiempo de 3 minutos a 25000xg. El líquido sobrenadante se retira y sobre el aglomerado se vierte 0,5 ml de un tampón calentado a 60°C, el cual contiene hidrocloreuro de guanidina y Nanidet P40 pH 7,0, así como proteinasa K. El aglomerado se disuelve por vibración en un vibrador Vortex y se incuba durante 15 minutos a 50°C. A continuación se añaden 0,5 ml de una solución de etanol-Nonidet P40 y la muestra se mezcla en el Vortex durante un espacio de tiempo de
35 aproximadamente 5 s. La muestra se aplica a continuación sobre una columna Spin que contiene una membrana de sílice – tal como, por ejemplo columnas QIAamp de la razón social QIAGEN – y por centrifugación (1 min a 10.000xg) se pasa a través de la membrana. El ARN se queda unido a la membrana y a continuación se lava dos veces con un tampón de lavado que contiene alcohol, por ejemplo tampón AW2 de la razón social QIAGEN. Los
40 tampones de lavado se llevan entonces a través de la membrana en cada caso por centrifugación (1 minuto a 10.000xg). A continuación del lavado con el tampón de lavado que contiene alcohol la membrana se seca, sin adición de tampón, por una centrifugación (3 minutos de máx. rpm, aquí 25.000xg. Para la elución se pipetea sobre la membrana 30 µl de agua exenta de RNasa para desprender de la membrana el ARN purificado. El eluido se pasa por la membrana por centrifugación (1 minuto a 10.000xg) y con el fin de una elución completa el proceso de elución se repite aún una vez.

45 El ARN aislado se analiza sobre geles de agarosa que fueron teñidos con bromuro de etidio. Para ello se preparan, por ejemplo, geles de MOPS-agarosa-formaldehído al 1,0%. Se emplean respectivamente 30 µl de eluido. El resultado se reproduce en la Fig. 7. La carga de las huellas de gel se recopila en la Tabla 2

Tabla 2: Recopilación de las muestras representadas en la Fig. 7.

Muestras nº 1	Concentración final de oxalato de tetradeciltrimetilamonio	Aditivo
1,2	4%	ácido cítrico pH 4
3,4	4%	ácido cítrico pH 5
5,6	4%	ácido cítrico pH 6
7,8	4%	ácido tartárico pH 3
9,10	4%	ácido tartárico pH 4
11,12	4%	ácido succínico pH 4
13,14	4%	ácido tartrónico pH 3
15,16	4%	ácido tartrónico pH 4
17,18	4%	ácido fosfórico pH 3
19,20	4%	ácido fosfórico pH 4
21,22	4%	ácido fosfórico pH 5
23,24	2%	ácido cítrico pH 3
25,26	2%	ácido cítrico pH 4
27,28	2%	ácido tartárico pH 3
29,30	2%	ácido tartárico pH 4
31,32	2%	ácido succínico pH 4
33,34	2%	ácido fosfórico pH 2
35,36	2%	ácido fosfórico pH 3
37,38	2%	ácido fosfórico pH 4
39,40	2%	ácido fosfórico pH 5
41,42	4%	sulfato de amonio pH 2
43,44	5%	-

5 La huella 45 contiene para la comparación de la calidad del ARN de las muestras individuales 3,75 µg del ARN completo de células Hela empleado para estos ensayos.

10 La separación por electroforesis en gel del ARN completo de Hela empleado para este experimento muestra después de la tinción con bromuro de etidio las bandas intactas 28S y 18S de rARN. La superior de las bandas de ARN visibles (28S rARN) es en este caso claramente más intensa y gruesa que la banda inferior de rARN (18S rARN), lo que representa una característica típica de ARN intacto, no degradado. La comparación del ARN completo de Hela, almacenado por un día en plasma mezclado con 5% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio sin aditivo, con el ARN que fue aislado después de un almacenamiento por un día a partir de plasma mezclado con oxalato de tetradeciltrimetilamonio y diferentes aditivos, muestra claramente que la adición de aditivos mejora la estabilización de ARN. Si se añade ARN sin la adición de un compuesto estabilizante al plasma, esto conduce en pocos minutos, de forma conocida, a una degradación total del ARN.

Ejemplo 8:

20 Estabilización de ARN en plasma mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, mezclado con ácido tartárico o, respectivamente, ácido tartrónico durante diferentes espacios de tiempo.

Estos experimentos muestran que el ARN por las mezclas en plasma de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y aditivo se estabiliza al menos durante 14 días.

25 Para la preparación de las soluciones utilizadas en este experimento se mezcla una solución patrón de 30% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio, con respectivamente una solución patrón de 0,5 M de ácido tartárico pH 3 o ácido tartrónico pH 3 para dar una concentración final de 6% o 8% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio, y 200 mM del aditivo.

30 Respectivamente 0,5 ml de cada una de las soluciones así obtenidas se dispone previamente en un recipiente Eppendorf de 2 ml. 15 µg de ARN completo de células Hela, el cual se aísla antes, por ejemplo mediante un equipo para aislamiento de ARN obtenible comercialmente –como por ejemplo el Maxi-Kit RNeasy® de la razón social QIAGEN), se pipetea en la tapadera del recipiente Eppendorf. Se añaden a la solución 0,5 ml de plasma sanguíneo humano, se cierra la tapadera del recipiente y se invierte cinco veces rápidamente el recipiente para su mezcla. 35 Las muestras se almacenan 3, 7, 10 y 14 días a la TA (aproximadamente 20 a 25°C). Todos los experimentos se llevaron a cabo en forma de determinaciones dobles.

El aislamiento del ARN se efectúa tal como se describe en el Ejemplo 7.

40 El ARN aislado se analiza sobre geles de agarosa que fueron teñidos con bromuro de etidio. Para ello se preparan, por ejemplo, geles de MOPS-agarosa-formaldehído al 1,0%. Se emplean respectivamente 30 µl del eluido. El resultado se reproduce en la Fig. 8. La carga de las huellas de gel se recopila en la Tabla 3.

Tabla 3: Recopilación de las muestras representadas en la Fig. 8.

Muestras nº	Concentración de oxalato de tetradeciltrimetilamonio en el tampón	Aditivo	Duración del almacenamiento
1,2	6%	ácido tartárico pH 3	3 días
3,4	8%	ácido tartárico pH 3	3 días
5,6	6%	ácido tartrónico pH 3	3 días
7,8	8%	ácido tartrónico pH 3	3 días
9,10	6%	ácido tartárico pH 3	7 días
11,12	8%	ácido tartárico pH 3	7 días
13,14	6%	ácido tartrónico pH 3	7 días
15,16	8%	ácido tartrónico pH 3	7 días
17,18	6%	ácido tartárico pH 3	10 días
19,20	8%	ácido tartárico pH 3	10 días
21,22	6%	ácido tartrónico pH 3	10 días
23,24	8%	ácido tartrónico pH 3	14 días
25,26	6%	ácido tartárico pH 3	14 días
27,28	8%	ácido tartárico pH 3	14 días
29,30	6%	ácido tartrónico pH 3	14 días
31,32	8%	ácido tartrónico pH 3	14 días

5 La huella “K” contiene para la comparación de la calidad del ARN de las muestras individuales 3,75 µg del ARN completo de células Hela empleado para estos ensayos.

10 La separación por electroforesis en gel del ARN completo de Hela empleado para este experimento muestra después de la tinción con bromuro de etidio las bandas intactas 28S y 18S del rARN, aún después de un almacenamiento de hasta 14 días del ARN completo de Hela en plasma, el cual fue mezclado con oxalato de tetradeciltrimetilamonio y ácido tartárico o, respectivamente, ácido tartrónico, pH 3.

Ejemplo 9:

15 Estabilización de ARN en 1 ml de plasma mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, mezclado con diferentes aditivos

Estos experimentos muestran que la estabilización de ARN por mezclas de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y aditivos es posible también en volúmenes de plasma más elevados.

20 Para la preparación de las soluciones utilizadas en este experimento se mezcla una solución patrón de 30% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio con respectivamente una solución patrón de 0,5 M de ácido tartárico a pH 3 o pH 4, ácido tartrónico a pH 3 o pH 4 o de ácido fosfórico a pH 3 o pH 4 para dar una concentración final de 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y 200 mM del aditivo.

25 Respectivamente 1 ml de cada una de las soluciones así obtenidas se dispone previamente en un recipiente Eppendorf de 2 ml. 15 µg de ARN completo de células Hela, el cual se aísla antes, por ejemplo mediante el equipo para el aislamiento de ARN Maxi-Kit RNeasy® de la razón social QIAGEN), se pipetea en la tapadera del recipiente Eppendorf. Se añaden a la solución 1 ml de plasma sanguíneo humano, se cierra la tapadera del recipiente y se invierte el recipiente cinco veces rápidamente para su mezclado. Las muestras se almacenan 3 días a la TA (aproximadamente 20 a 25°C). Todos los experimentos se llevaron a cabo en forma de determinaciones dobles.

30 El aislamiento del ARN se efectúa tal como se describe en el Ejemplo 7.

35 El ARN aislado se analiza sobre geles de agarosa que fueron teñidos con bromuro de etidio. Para ello se preparan, por ejemplo, geles de MOPS-agarosa-formaldehído al 1,0%. Se emplean respectivamente 30 µl del eluido. El resultado se reproduce en la Fig. 9. La carga de las huellas de gel se recopila en la Tabla 4.

Tabla 4: Recopilación de las muestras representadas en la Fig. 9

Muestras nº	Aditivo
1,2	ácido tartárico pH 3
3,4	ácido tartárico pH 4
5,6	ácido fosfórico pH 3
7,8	ácido fosfórico pH 4
9,10	ácido tartrónico pH 3
11,12	ácido tartrónico pH 4

La huella 13 contiene para la comparación de la calidad del ARN de las muestras individuales 3,75 µg del ARN completo de células Hela empleado para estos ensayos.

La separación por electroforesis en gel del ARN completo de Hela empleado para este experimento muestra después de la tinción con bromuro de etidio las bandas intactas 28S y 18S del rARN. Por consiguiente, el ARN se estabiliza también en mayores volúmenes de plasma por medio de la mezcla de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y aditivo.

Ejemplo 10:

Estabilización de ARN en células Hela mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio, mezclado con diferentes aditivos.

Estos experimentos muestran que mezclas de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y diferentes aditivos hacen posible la estabilización de ARN en células Hela durante un tiempo de almacenamiento de hasta 14 días a la TA.

Para la preparación de las soluciones utilizadas en este experimento se mezcla una solución patrón de 20% o 30% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio con respectivamente una solución patrón de 0,5 M de ácido tartárico, ácido cítrico, ácido tartrónico, sulfato de amonio o ácido fosfórico para dar una concentración final de 2% o 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y 200 mM del aditivo. Las soluciones patrón de los aditivos se ajustan al valor de pH indicado antes de la mezclado con oxalato de tetradeciltrimetilamonio mediante lejía de sodio o, respectivamente ácido sulfúrico.

Respectivamente 1×10^6 células Hela, que previamente se cosecharon directamente del cultivo celular y se lavaron con PBS, se aglomeran por centrifugación (1 minuto a 120xg) y el sobrenadante se retira. A las células se añaden respectivamente 300 µl de las soluciones citadas en la Tabla 4 y las muestras se mezclan mediante el Vortex, al tiempo que se las vuelve a suspender. Las muestras se almacenan 3, 7, 10 y 14 días a la TA (aproximadamente 20 a 25°C). Todos los experimentos se llevaron a cabo en forma de determinaciones dobles.

Para el aislamiento del ARN las células se aglomeran por centrifugación durante 3 minutos a 1200xg y el líquido sobrenadante se retira. El aglomerado se vuelve a suspender en 600 µl de un tampón de isotiocianato-guanidina habitual en el comercio – tal como, por ejemplo tampón RLT de la razón social QIAGEN – por múltiples succiones y expulsiones con la pipeta o por Vortex durante un espacio de tiempo de aproximadamente 10 s o más. A continuación se añade 1 volumen (600 µl) de etanol al 70% y se mezcla por múltiples succiones y expulsiones con pipeta o por Vortex durante un espacio de tiempo de aproximadamente 5 s. A continuación, el lisado se aplica sobre una columna Spin que contiene una membrana de sílice, habitual en el comercio – tal como, por ejemplo columnas RNeasy de la razón social QIAGEN – y por centrifugación (1 min a 10.000xg) se pasa a través de la membrana. El ARN se queda unido a la membrana y a continuación se lava con un primer tampón de lavado que contiene isotiocianato y guanidina habitual en el comercio, por ejemplo tampón RW1 de la razón social QIAGEN – y después con un segundo tampón que contiene alcohol – por ejemplo RPE de la razón social QIAGEN. En este caso los tampones de lavado se pasan a través de la membrana en cada caso por centrifugación (1 minuto a 10.000xg). El líquido de lavado con el segundo tampón de lavado que contiene alcohol se repite con un volumen más bajo, por lo que al mismo tiempo la membrana se seca por la centrifugación (2 minutos de máx. rpm, aquí 20.000xg). Para la elución se pipetea sobre la membrana 40 µl de agua exenta de RNasa, para desprender de la membrana el ARN purificado. El eluido se pasa por la membrana por centrifugación (1 minuto a 10.000xg) y con el fin de una elución completa se repite aún una vez el proceso de elución.

El ARN aislado se analiza sobre geles de agarosa que se han teñido con bromuro de etidio. Para ello se preparan, por ejemplo, geles de MOPS-agarosa-formaldehído al 1,0%. Se emplean respectivamente 20 µl del eluido. El resultado se reproduce en la Fig. 10. Las muestras se recopilan en la Tabla 5, habiéndose llevado a cabo y representado todas las pruebas 2 veces a excepción de las pruebas 14, 40, 66 y 92 que se efectuaron y representaron 1 vez.

Tabla 5: Recopilación de las muestras representadas en la Fig. 10

Muestras n°	Concentración final de oxalato de tetradeciltrimetilamonio	Aditivo	Valor final aprox.del valor del pH de la mezcla de oxalato de tetradeciltrimetilamonio	Duración del almacenamiento
1	4%	ácido tartárico pH 3	3,4	3 días
2	4%	ácido tartárico pH 4	4,3	3 días
3	4%	ácido tartárico pH 5	5,3	3 días
4	4%	ácido tartárico pH 6	6,0	3 días
5	4%	ácido tartárico pH 7	7,3	3 días
6	4%	ácido fosfórico pH 3	4,3	3 días
7	4%	ácido fosfórico pH 4	4,9	3 días
8	4%	ácido fosfórico pH 5	6,0	3 días
9	4%	ácido fosfórico pH 6	6,3	3 días
10	4%	ácido fosfórico pH 7	7,1	3 días
11	4%	sulfato de amonio pH 2	4,1	3 días
12	4%	sulfato de amonio pH 3	5,2	3 días
13	4%	sulfato de amonio pH 4	6,0	3 días
14	4%	sulfato de amonio pH 5	6,1	3 días
15	4%	ácido cítrico pH 3	3,3	3 días
16	4%	ácido cítrico pH 4	4,3	3 días
17	4%	ácido cítrico pH 5	5,4	3 días
18	4%	ácido cítrico pH 6	6,3	3 días
19	4%	ácido cítrico pH 7	7,5	3 días
20	4%	ácido tartrónico pH 3	3,6	3 días
21	4%	ácido tartrónico pH 4	4,4	3 días
22	4%	ácido tartrónico pH 5	5,3	3 días
23	4%	ácido tartrónico pH 6	5,9	3 días
24	4%	ácido tartrónico pH 7	7,3	3 días
25	2%	ácido tartárico pH 3	nd	3 días
26	2%	ácido tartárico pH 6	nd	3 días
27	4%	ácido tartárico pH 3	3,4	7 días
28	4%	ácido tartárico pH 4	4,3	7 días
29	4%	ácido tartárico pH 5	5,3	7 días
30	4%	ácido tartárico pH 6	6,0	7 días
31	4%	ácido tartárico pH 7	7,3	7 días

ES 2 373 784 T3

Muestras n°	Concentración final de oxalato de tetradeciltrimetilamonio	Aditivo	Valor final aprox. del valor de pH de la mezcla de oxalato de tetradeciltrimetilamonio	Duración del almacenamiento
32	4%	ácido fosfórico pH 3	4,3	7 días
33	4%	ácido fosfórico pH 4	4,9	7 días
34	4%	ácido fosfórico pH 5	6,0	7 días
35	4%	ácido fosfórico pH 6	6,3	7 días
36	4%	ácido fosfórico pH 7	7,1	7 días
37	4%	sulfato de amonio pH 2	4,1	7 días
38	4%	sulfato de amonio pH 3	5,2	7 días
39	4%	sulfato de amonio pH 4	6,0	7 días
40	4%	sulfato de amonio pH 5	6,1	7 días
41	4%	ácido cítrico pH 3	3,3	7 días
42	4%	ácido cítrico pH 4	4,3	7 días
43	4%	ácido cítrico pH 5	5,4	7 días
44	4%	ácido cítrico pH 6	6,3	7 días
45	4%	ácido cítrico pH 7	7,5	7 días
46	4%	ácido tartrónico pH 3	3,6	7 días
47	4%	ácido tartrónico pH 4	4,4	7 días
48	4%	ácido tartrónico pH 5	5,3	7 días
49	4%	ácido tartrónico pH 6	5,9	7 días
50	4%	ácido tartrónico pH 7	7,3	7 días
51	2%	ácido tartárico pH 3	nd	7 días
52	2%	ácido tartárico pH 6	nd	7 días
53	4%	ácido tartárico pH 3	3,4	10 días
54	4%	ácido tartárico pH 4	4,3	10 días
55	2%	ácido tartárico pH 5	5,3	10 días
56	2%	ácido tartárico pH 6	6,0	10 días
57	4%	ácido tartárico pH 7	7,3	10 días
58	4%	ácido fosfórico pH 3	4,3	10 días
59	4%	ácido fosfórico pH 4	4,9	10 días
60	4%	ácido fosfórico pH 5	6,0	10 días
61	4%	ácido fosfórico pH 6	6,3	10 días
62	4%	ácido fosfórico pH 7	7,1	10 días
63	4%	sulfato de amonio pH 2	4,1	10 días
64	4%	sulfato de amonio pH 3	5,2	10 días

ES 2 373 784 T3

Muestras n°	Concentración final de oxalato de tetradeciltrimetilamonio	Aditivo	Valor final aprox. del valor de pH de la mezcla de oxalato de tetradeciltrimetilamonio	Duración del almacenamiento
65	4%	Sulfato de amonio pH 4	6,0	10 días
66	4%	sulfato de amonio pH 5	6,1	10 días
67	4%	ácido cítrico pH 3	3,3	10 días
68	4%	ácido cítrico pH 4	4,3	10 días
69	4%	ácido cítrico pH 5	5,4	10 días
70	4%	ácido cítrico pH 6	6,3	10 días
71	4%	ácido cítrico pH 7	7,5	10 días
72	4%	ácido tartrónico pH 3	3,6	10 días
73	4%	ácido tartrónico pH 4	4,4	10 días
74	4%	ácido tartrónico pH 5	5,3	10 días
75	4%	ácido tartrónico pH 6	5,9	10 días
76	4%	ácido tartrónico pH 7	7,3	10 días
77	2%	ácido tartárico pH 3	nd	10 días
78	2%	ácido tartárico pH 6	nd	10 días
79	4%	ácido tartárico pH 3	3,4	14 días
80	4%	ácido tartárico pH 4	4,3	14 días
81	4%	ácido tartárico pH 5	5,3	14 días
82	4%	ácido tartárico pH 6	6,0	14 días
83	4%	ácido tartárico pH 7	7,3	14 días
84	4%	ácido fosfórico pH 3	4,3	14 días
85	4%	ácido fosfórico pH 4	4,9	14 días
86	4%	ácido fosfórico pH 5	6,0	14 días
87	4%	ácido fosfórico pH 6	6,3	14 días
88	4%	ácido fosfórico pH 7	7,1	14 días
89	4%	Sulfato de amonio pH 2	4,1	14 días
90	4%	Sulfato de amonio pH 3	5,2	14 días
91	4%	Sulfato de amonio pH 4	6,0	14 días
92	4%	Sulfato de amonio pH 5	6,1	14 días
93	4%	ácido cítrico pH 3	3,3	14 días
94	4%	ácido cítrico pH 4	4,3	14 días
95	4%	ácido cítrico pH 5	5,4	14 días
96	4%	ácido cítrico pH 6	6,3	14 días
97	4%	ácido cítrico pH 7	7,5	14 días

Muestras n°	Concentración final de oxalato de tetradeciltrimetilamonio	Aditivo	Valor final aprox. del valor de pH de la mezcla de oxalato de tetradeciltrimetilamonio	Duración del almacenamiento
98	4%	Ácido tartrónico pH 3	3,6	14 días
99	4%	ácido tartrónico pH 4	4,4	14 días
100	4%	Ácido tartrónico pH 5	5,3	14 días
101	4%	Ácido tartrónico pH 6	5,9	14 días
102	4%	Ácido tartrónico pH 7	7,3	14 días
103	2%	Ácido tartárico pH 3	nd	14 días
104	2%	Ácido tartárico pH 6	nd	14 días

5 Las muestras “K” indican un ARN completo, el cual se aísla sin almacenamiento previo con ayuda de un equipo de aislamiento – tal como, por ejemplo el Mini Kit RNeasy® de la razón social QIAGEN – a partir de respectivamente 1×10^6 células Hela (= control positivo). Las muestras “a”, “b”, “c” y “d” presentan un ARN completo, que se aísla después de 3, 7, 10, respectivamente 14 días de almacenamiento de respectivamente 1×10^6 células Hela en PBS – sin aditivos – tal como se describió anteriormente.

10 La cantidad de ARN completo se obtiene después de diluir con agua, por medición fotométrica de la absorción de luz en una longitud de onda de 260 nm. La pureza del ARN así obtenido se halla por determinación fotométrica de la relación de la absorción de la luz a 260 nm con respecto a la correspondiente a 280 nm. Los resultados de los aislamientos se representan en la siguiente Tabla 6. Se indican en cada caso los valores medios de la determinación doble.

Tabla 6: Rendimiento en ARN del ARN completo aislado a partir de células Hela según el Ejemplo 10, almacenadas en oxalato de tetradeciltrimetilamonio mezclado con diferentes aditivos

Aditivo	Duración del almacenamiento (días)	Rendimiento en ARN (μg)	E_{260} / E_{280}
ácido tartárico pH 5	3	28,7	1,84
ácido tartárico pH 5	7	30,7	1,86
ácido tartárico pH 5	10	33,4	1,90
ácido tartárico pH 5	14	56,4	1,94
ácido tartárico pH 6	3	38,4	1,92
ácido tartárico pH 6	7	55,5	2,0
ácido tartárico pH 6	10	36,1	1,93
ácido tartárico pH 6	14	36,9	1,94
ácido fosfórico pH 5	3	39,5	1,89
ácido fosfórico pH 5	7	27,1	1,91
ácido fosfórico pH 5	10	36,9	1,89
ácido fosfórico pH 5	14	40,2	1,85
ácido fosfórico pH 6	3	25,6	1,98
ácido fosfórico pH 6	7	29,2	1,89
ácido fosfórico pH 6	10	34,2	1,88
ácido fosfórico pH 6	14	40,9	1,95
ácido tartrónico pH 5	3	24,7	1,95
ácido tartrónico pH 5	7	30,8	1,91
ácido tartrónico pH 5	10	30,4	1,90
ácido tartrónico pH 5	14	30,8	1,95
ácido tartrónico pH 6	3	30,6	1,96
ácido tartrónico pH 6	7	31,0	1,90
ácido tartrónico pH 6	10	34,0	1,95
ácido tartrónico pH 6	14	32,0	1,92
sulfato de amonio pH 5	3	31,5	1,98
sulfato de amonio pH 5	7	27,1	1,88
sulfato de amonio pH 5	10	35,7	1,93
sulfato de amonio pH 5	14	35,5	1,92
ácido cítrico pH 6	3	24,4	1,91
ácido cítrico pH 6	7	31,5	1,94
ácido cítrico pH 6	10	32,5	1,94
ácido cítrico pH 6	14	39,2	1,94
Control positivo	0	33,2	1,90

5 La separación por electroforesis en gel muestra después de la tinción con bromuro de etidio las bandas intactas de 28S y 18S del rARN en los controles positivos. La superior de las bandas de ARN (28S rARN) es en este caso claramente más intensa y gruesa que la banda inferior de rARN (18S rARN), lo que representa una característica típica de ARN intacto, no degradado. Después de un almacenamiento durante 3 días de las células en PBS se ha degradado en parte el ARN, puesto que las dos bandas de rARN muestran la misma intensidad y el ARN es claramente menos visible. Después de un almacenamiento de 7 días o más ya no es visible más ARN. En contraposición con esto, ARN en células Hela por oxalato de tetradeciltrimetilamonio mezclado con diferentes aditivos se estabiliza hasta 14 días. Esto se confirma por el rendimiento y pureza del ARN determinado por medición de la DO. La estabilización se influye por el valor del pH. En este caso, se prefieren valores finales del pH en la mezcla superiores a 4, es decir después de la mezclado de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y aditivo con valor definido de pH.

15 Ejemplo 11

Estabilización de ARN en diferentes cantidades de células Hela.

20 Estos experimentos muestran que la estabilización de ARN en células Hela mediante mezclas de oxalato de tetradeciltrimetilamonio con aditivos tiene lugar independientemente del número de células empleado.

25 Para la preparación de la solución utilizada en este experimento se mezcla una solución patrón de 20% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio con una solución patrón de 0,5 M de ácido tartárico a pH 6 para dar una concentración final de 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y 200 mM del aditivo. La solución patrón del aditivo, antes de la mezclado con el oxalato de tetradeciltrimetilamonio, se ajusta mediante lejía de sodio al valor de pH indicado.

Respectivamente 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 y 5×10^6 células Hela, que directamente antes se cosecharon del cultivo celular y se lavaron con PBS, se aglomeran por centrifugación (1 minuto a 120xg) y el sobrenadante se retira. A las

células se añaden respectivamente 300 µl de solución con 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y 200 mM de ácido tartárico y las muestras se mezclan mediante el Vortex al tiempo que se vuelve a suspender las células. Las muestras se almacenan 15 minutos y, respectivamente 1 día a la TA (aproximadamente 20 a 25°C). Todos los experimentos se llevan a cabo en forma de determinaciones dobles.

5

El aislamiento del ARN se efectúa tal como se describe en el Ejemplo 10.

10

Como controles se emplean respectivamente 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 y 5×10^6 células Hela, sin tratamiento previo con 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio, 200 mM de ácido tartárico y sin almacenamiento, para el aislamiento de ARN tal como se describe anteriormente.

15

El ARN aislado se analiza sobre geles de agarosa que fueron teñidos con bromuro de etidio. Para ello se preparan, por ejemplo, geles de MOPS-agarosa-formaldehído al 1,0%. Se emplean respectivamente 20 µl del eluido. El resultado se reproduce en la Fig. 11. Las muestras se recopilan en la Tabla 7 habiéndose llevado a cabo y representado todas las pruebas respectivamente 2 veces.

Tabla 7: Recopilación de las muestras representadas en la Fig. 11

Muestras nº	Número de células	Almacenamiento
1,2	1×10^5	-
3,4	1×10^5	15 minutos
5,6	1×10^5	1 día
7,8	5×10^5	-
9,10	5×10^5	15 minutos
11,12	5×10^5	1 día
13,14	1×10^6	-
15,16	1×10^6	15 minutos
17,18	1×10^6	1 día
19,20	5×10^6	-
21,22	5×10^6	15 minutos
23,24	5×10^6	1 día

20

La cantidad de ARN completo aislado se obtiene después de diluir con agua, por medición fotométrica de la absorción de la luz en una longitud de onda de 260 nm. La pureza del ARN así obtenido se halla por la determinación fotométrica de la relación de la absorción de la luz a 260 nm con respecto a la correspondiente a 280 nm. Los resultados de los aislamientos se representan en la siguiente Tabla 8. Se indican en cada caso los valores medios de la determinación doble.

25

Tabla 8: Rendimiento en ARN del ARN completo aislado a partir de células Hela según el Ejemplo 11, almacenadas en 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio, 200 mM de ácido tartárico

Número de células	Almacenamiento	Rendimiento en ARN (µg)	E_{260} / E_{280}
1×10^5	-	3,0	2,04
1×10^5	15 minutos	3,1	1,92
1×10^5	1 día	3,5	1,97
5×10^5	-	16,2	1,83
5×10^5	15 minutos	15,2	1,85
5×10^5	1 día	16,0	1,86
1×10^6	-	28,2	1,75
1×10^6	15 minutos	26,2	1,73
1×10^6	1 día	34,4	1,77
5×10^6	-	107,3	1,64
5×10^6	15 minutos	91,3	1,61
5×10^6	1 día	122,6	1,61

30

La separación por electroforesis en gel muestra después de la tinción con bromuro de etidio las bandas intactas 28S y 18S del rARN en las muestras de control almacenadas como también en las no almacenadas. En este caso, no se reconoce diferencia alguna entre los controles no almacenados y las muestras almacenadas. Igualmente, el rendimiento y la pureza del ARN determinadas por medición de la DO confirma que la estabilización del ARN en diferentes cantidades de células tiene lugar en igual medida, sin reducción de los rendimientos en ARN o la pureza del ARN. Los cocientes E_{260} / E_{280} que disminuyen al aumentar el número de células se deben a que las mediciones se llevaron a cabo en agua y no en un sistema tamponado.

35

Ejemplo 12:

Estabilización de ARN en macrófagos

5 Estos experimentos demuestran que se puede emplear ARN en diferentes tipos de células. Los macrófagos empleados en este experimento contienen más RNAsas que las células Hela utilizadas anteriormente, por lo cual se fuerza la degradación de ARN en las células.

10 Para la preparación de las soluciones utilizadas en este experimento se mezcla una solución patrón de 20% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio con una solución patrón de 0,5 M de ácido tartárico a pH 5, 0,5 M de ácido tartrónico pH 5 o 0,5 M de ácido fosfórico pH 5 para dar una concentración final de 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio, 200 mM del aditivo. La solución patrón del aditivo, antes de la mezcladura con el oxalato de tetradeciltrimetilamonio se ajusta mediante lejía de sodio al valor de pH indicado.

15 Respectivamente 1×10^6 células Hela, que directamente antes se cosechan del cultivo celular y se lavan con PBS, se aglomeran por centrifugación (1 minuto a 120xg) y el sobrenadante se retira. A las células se añaden respectivamente 300 μ l de solución con 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y 200 mM de aditivo y las muestras se mezclan mediante el Vortex al tiempo que se vuelven a suspender las células. Las muestras se almacenan 2, días, 6 días, 9 días y, respectivamente, 14 días a la TA (aproximadamente 20 a 25°C). Todos los
20 experimentos se llevan a cabo en forma de determinaciones dobles. El aislamiento del ARN se efectúa tal como se describe en el Ejemplo 10.

25 El ARN aislado se analiza sobre geles de agarosa que fueron teñidos con bromuro de etidio. Para ello se preparan, por ejemplo, geles de MOPS-agarosa-formaldehído al 1,0%. Se emplean respectivamente 20 μ l del eluido. El resultado se reproduce en la Fig. 12. Las muestras se recopilan en la Tabla 9 habiéndose llevado a cabo y representado todas las pruebas respectivamente 2 veces.

Tabla 9: Recopilación de las muestras representadas en la Fig. 12

Muestras nº	Aditivo	Almacenamiento
1,2	ácido fosfórico 200 mM pH 5	2 días
3,4	ácido fosfórico 200 mM pH 5	6 días
5,6	ácido fosfórico 200 mM pH 5	9 días
7,8	ácido fosfórico 200 mM pH 5	14 días
9,10	ácido tartrónico 200 mM pH 5	2 días
11,12	ácido tartrónico 200 mM pH 5	6 días
13,14	ácido tartrónico 200 mM pH 5	9 días
15,16	ácido tartrónico 200 mM pH 5	14 días
17,18	ácido tartárico 200 mM pH 5	2 días
19,20	ácido tartárico 200 mM pH 5	6 días
21,22	ácido tartárico 200 mM pH 5	9 días
23,24	ácido tartárico 200 mM pH 5	14 días

30 Las huellas 25 y 26 muestran un ARN completo que se aísla sin previo almacenamiento de los macrófagos con ayuda de un equipo de aislamiento adquirible comercialmente – tal como, por ejemplo, Mini Kits RNeasy® de la razón social QIAGEN – a partir de respectivamente 1×10^6 macrófagos (= control positivo).

35 La cantidad de ARN completo aislado se obtiene, después de diluir con agua, por medición fotométrica de la absorción de la luz en una longitud de onda de 260 nm. La pureza del ARN así obtenido se halla por la determinación fotométrica de la relación de la absorción de la luz a 260 nm con respecto a la correspondiente a 280 nm. Los resultados de los aislamientos se representan en la siguiente Tabla 10. Se indican en cada caso los valores medios de la determinación doble.

Tabla 10: Rendimiento en ácido nucleico a partir de macrófagos según el Ejemplo 12, almacenados en 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio, 200 mM de aditivo

Aditivo	Almacenamiento	Rendimiento en ARN (μg)	E_{260} / E_{280}
ácido fosfórico 200 mM pH 5	2 días	24,2	1,91
ácido fosfórico 200 mM pH 5	6 días	25,7	1,86
ácido fosfórico 200 mM pH 5	9 días	21,6	1,83
ácido fosfórico 200 mM pH 5	14 días	23,5	1,83
ácido tartrónico 200 mM pH 5	2 días	24,1	1,86
ácido tartrónico 200 mM pH 5	6 días	23,2	1,85
ácido tartrónico 200 mM pH 5	9 días	20,2	1,86
ácido tartrónico 200 mM pH 5	14 días	27,8	1,81
ácido tartárico 200 mM pH 5	2 días	25,4	1,85
ácido tartárico 200 mM pH 5	6 días	30,9	1,84
ácido tartárico 200 mM pH 5	9 días	24,3	1,86
ácido tartárico 200 mM pH 5	14 días	25,1	1,86
control positivo	sin almacenamiento	16,3	1,88

La separación por electroforesis en gel muestra después de la tinción con bromuro de etidio las bandas intactas 28S y 18S del rARN en las muestras almacenadas, así como en las no almacenadas, no pudiéndose reconocer ni tampoco después de un almacenamiento de 14 días ninguna degradación del ARN. Del mismo modo, los rendimientos y la pureza del ARN determinados por medición fotométrica permanecen inalterados durante el almacenamiento.

Ejemplo 13:

Estabilización de ARN en células Hela adherentes sin separación del medio

Estos experimentos muestran que mediante mezclas de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y aditivo también se puede estabilizar ARN en células adherentes. En este caso, la estabilización tiene lugar también cuando el medio en el que se encuentran las células no se retira y la mezclas de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y aditivo se añade al medio. Las células en el medio se pueden considerar en este caso como modelo para células en líquidos corporales.

Para la preparación de las soluciones utilizadas en este experimento se pesan el oxalato de tetradeciltrimetilamonio y el respectivo aditivo ácido tartárico o, respectivamente, sulfato de amonio, y disuelven en agua para dar una concentración final de 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y 200 mM aditivo. El pH de la solución en el caso de 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y 200 mM de ácido tartárico se ajusta con lejía de sodio y, en el caso de 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y 200 mM de sulfato de amonio, con ácido sulfúrico, en ambos casos a pH 5. Las células Hela se cultivan en placas de 6 pocillos con respectivamente 2 ml de medio. Las células crecen de forma adherente, es decir se adhieren al fondo del pocillo. Para la estabilización del ARN en las células se añaden respectivamente a cada pocillo 10 ml de oxalato de tetradeciltrimetilamonio al 4% y ácido tartárico 200 mM o, respectivamente, oxalato de tetradeciltrimetilamonio al 4% y sulfato de amonio 200 mM pH 5, y las placas se almacenan durante 4 días a la TA. Como control negativo se almacena durante 4 días a la TA un pocillo con medio pero sin adición de una mezcla de oxalato de tetradeciltrimetilamonio al 4%, aditivo 200 mM.

Como control positivo, a partir de un pocillo se aísla el ARN de las células Hela sin previo almacenamiento, con ayuda de un equipo para aislamiento habitual en el comercio – tal como, por ejemplo, Mini Kits RNeasy® de la razón social QIAGEN -. Para ello, se retira totalmente el medio de las células y se mezcla con 350 μl de tampón de lisis RLT (componente del kit RNeasy). Las células se separan del fondo del pocillo con una rasqueta y el lisado se transvasan a un homogeneizador denominado "Shredder" – tal como, por ejemplo el QIAshredder de la razón social QIAGEN-. Por centrifugación durante 2 minutos a 14.000 rpm se pasa el lisado a través del Shredder homogeneizando así la muestra. El líquido pasado se mezcla con 70% de etanol y tal como se describe en el Ejemplo 10 se aísla el ARN.

Al cabo de 4 días de almacenamiento de las células en un medio mezclado con 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio, aditivo 200 mM se recogen totalmente las células, ahora desprendidas, junto con el sobrenadante y se centrifugan durante 5 minutos a 3.000xg. Los líquidos sobrenadantes se separan y el aglomerado de células se utiliza para el aislamiento de ARN, tal como se describe en el Ejemplo 10.

Al cabo de 4 días de almacenamiento de las células en un medio sin 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio, aditivo 200 mM (= control negativo) se aísla el ARN tal como se describe para el control positivo.

El ARN aislado se analiza sobre geles de agarosa que fueron teñidos con bromuro de etidio. Para ello se preparan, por ejemplo, geles de MOPS-agarosa-formaldehído al 1,0%. Se emplean respectivamente 20 μl del eluido. El resultado se reproduce en la Fig. 13. La huella 1 contiene ARN completo, el cual se aísla después de un

almacenamiento de las células en el medio mezclado con 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio, ácido tartárico 200 mM, pH 5. La huella 2 muestra ARN completo, el cual se aísla después de un almacenamiento de las células en el medio mezclado con 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio, fosfato de amonio 200 mM, pH 5. La huella 3 muestra un ARN completo, el cual se aísla después de un almacenamiento de las células sólo en el medio, y la huella 4 muestra un ARN completo, el cual se aísla como control positivo sin previo almacenamiento.

La cantidad de ARN completo aislado se obtiene, después de diluir con agua, por medición fotométrica de la absorción de la luz en una longitud de onda de 260 nm. La pureza del ARN así obtenido se halla por la determinación fotométrica de la relación de la absorción de la luz a 260 nm con respecto a la correspondiente a 280 nm. Los resultados de los aislamientos se representan en la siguiente Tabla 11.

Tabla 11: Rendimiento en ARN a partir de ARN completo aislado de células Hela adherentes según el Ejemplo 13.

Almacenamiento en el medio mezclado con	Rendimiento en ARN (µg)	E ₂₆₀ / E ₂₈₀
4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio, ácido tartárico 200 mM, pH 5	10,9	1,70
4%oxalato de tetradeciltrimetilamonio, sulfato de amonio 200 mM, pH 5	13,2	1,75
-	6,1	1,58
control positivo sin almacenamiento	12,5	1,75

La separación por electroforesis en gel muestra después de la tinción con bromuro de etidio las bandas intactas 28S y 18S del rARN en la muestra no almacenada, así como en las muestras almacenadas con mezclas de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y aditivo. Por el contrario, el ARN en las células que se almacenan en medio sin adición de oxalato de tetradeciltrimetilamonio ni aditivo está degradado casi totalmente. Del mismo modo, no existe diferencia alguna entre muestras no almacenadas y estabilizadas en cuanto al rendimiento y la pureza de ARN determinados por medición de la DO, mientras que el rendimiento y la pureza del ARN de las muestras almacenadas en el medio sin adición de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y aditivo son claramente más reducidos.

Ejemplo 14:

Estabilización de ARN en tejidos mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio mezclado con distintos aditivos

Estos experimentos muestran que oxalato de tetradeciltrimetilamonio mezclado con diferentes aditivos también es adecuado para estabilizar el ARN de tejidos.

Para la preparación de las soluciones utilizadas en este experimento se mezcla una solución patrón de 20% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio con respectivamente una solución patrón 0,5 M de ácido tartárico, ácido cítrico, ácido tartrónico, sulfato de amonio, fosfato de potasio, ácido oxálico o ácido fosfórico hasta una concentración final de 4% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y 200 mM de aditivo. Las soluciones patrón de los aditivos, antes de la mezclado con el oxalato de tetradeciltrimetilamonio se ajusta mediante lejía de sodio o ácido sulfúrico (o sulfato de amonio) o lejía de potasio o, respectivamente, ácido fosfórico (o fosfato de potasio) al valor de pH respectivamente indicado.

Para este experimento se utiliza tejido renal de ratón, el cual inmediatamente después de su extracción se congeló en nitrógeno líquido y, a continuación, se almacenó a -70°C. Aproximadamente 70 a 90 mg del tejido se mezclan respectivamente, congelados, con 500 µl por cada 10 mg de tejido con el tampón citado en la Tabla 12 e inmediatamente se homogeneizan mediante un homogeneizador rotor-estátor – tal como, por ejemplo el "Polytron" de la razón social Kinematica – durante 30 a 60 s. De este homogeneizado se toman partes alícuotas de respectivamente 500 µl de solución, que, por consiguiente, corresponden a 10 mg de tejido. Las muestras se almacenan durante un día a la TA.

A continuación del almacenamiento las muestras se centrifugan durante 3 minutos a 10.000xg y el sobrenadante se retira. El aglomerado se disuelve totalmente en 600 µl de un tampón de guanidina-isotiocianato habitual en el comercio – tal como, por ejemplo, tampón RLT de la razón social QIAGEN – mediante el Vortex. A continuación, se añade 1 volumen (600 µl) de etanol al 70% y se mezcla por varias succiones y expulsiones de la pipeta o por el Vortex durante un espacio de tiempo de casi 5 s. El lisado se aplica a continuación sobre una columna "spin" que contiene una membrana de sílice habitual en el comercio – tal como, por ejemplo, las columnas RNeasy de la razón social QIAGEN – y por centrifugación (1 min a 10.000xg) se pasa por la membrana. El ARN queda ligado a la membrana y, a continuación, se lava con un primer tampón de lavado que contiene guanidina-isotiocianato habitual en el comercio – por ejemplo con el tampón RW1 de la razón social QIAGEN – y después con un segundo tampón de lavado que contiene alcohol – por ejemplo con el tampón RPE de la razón social QIAGEN –. En este caso, los tampones de lavado pasan respectivamente por centrifugación (1 min a 10.000xg) a través de la membrana. El lavado con el segundo tampón de lavado que contiene alcohol se repite con un volumen más bajo, secándose al

mismo tiempo por la centrifugación la membrana (2 min a rpm máximo, aquí 20.000 rpm). Para la elución se pipetea sobre la membrana 40 µl de agua exenta de RNasa para separar por disolución el ARN purificado. Por centrifugación (1 min a 10.000xg) se pasa el eluido a través de la membrana y con el fin de una elución completa se vuelve a repetir otra vez la etapa de elución.

5 El ARN aislado se analiza sobre geles de agarosa que fueron teñidos con bromuro de etidio. Para ello se preparan, por ejemplo, geles de MOPS-agarosa-formaldehído al 1,0%. Se emplean respectivamente 20 µl del eluido. El resultado se reproduce en la Fig. 14. Las muestras se recopilan en la Tabla 12 habiéndose llevado a cabo y representado todas las pruebas respectivamente 2 veces.

10

Tabla 12: Recopilación de las muestras representadas en la Fig. 14

Muestras nº	Aditivo	valor del pH del aditivo	valor final del pH de la mezcla de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y aditivo
1	ácido tartárico	3	3,4
2	ácido tartárico	4	4,3
3	ácido tartárico	5	5,3
4	ácido tartárico	6	6,0
5	ácido tartárico	7	7,3
6	ácido cítrico	3	3,3
7	ácido cítrico	4	4,3
8	ácido cítrico	5	5,4
9	ácido cítrico	6	6,3
10	ácido cítrico	7	7,5
11	ácido oxálico	4	4,3
12	ácido oxálico	5	5,3
13	ácido oxálico	6,17	6,5
14	ácido oxálico	7	7,2
15	ácido fosfórico	3	4,3

Muestras nº	Aditivo	valor del pH del aditivo	valor final del pH de la mezcla de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y aditivo
16	ácido fosfórico	4	4,9
17	ácido fosfórico	5	6,0
18	ácido fosfórico	6	6,3
19	ácido fosfórico	7	7,1
20	fosfato de potasio	4,2	4,9
21	fosfato de potasio	5	5,3
22	fosfato de potasio	6	6,1
23	fosfato de potasio	7	6,9
24	fosfato de potasio	8	7,8
25	ácido tartrónico	3	3,6
26	ácido tartrónico	4	4,4
27	ácido tartrónico	5	5,3
28	ácido tartrónico	6	5,9
29	ácido tartrónico	7	7,3
30	sulfato de amonio	2	4,1
31	sulfato de amonio	3	5,2
32	sulfato de amonio	4	6,0
33	sulfato de amonio	5	6,1

15 Las muestras "K" presentan un ARN completo, el cual se aísla sin almacenamiento previo con ayuda de un equipo de aislamiento (RNeasy® de la razón social QIAGEN GmbH) a partir de 10 mg de tejido renal congelado (= control

positivo). Las huellas "N" muestran un ARN completo, el cual se aísla tras un almacenamiento de un día a partir de 10 mg de tejido renal seco, es decir sin adición de disolvente, con ayuda del Mini Kit RNeasy® de la razón social QIAGEN) (= control negativo).

- 5 La separación por electroforesis en gel muestra después de la tinción con bromuro de etidio las bandas intactas 28S y 18S del rARN en el control positivo. El control negativo, tejido renal almacenado sin solución estabilizante, muestra ARN totalmente degradado. En contraposición con esto, después del almacenamiento de las muestras en oxalato de tetradeciltrimetilamonio mezclado con diferentes aditivos como en el control positivo, se pueden ver las bandas intactas del rARN. La estabilización está influenciada en este caso por el valor del pH. En el caso de la estabilización de ARN en tejido se prefieren valores finales del pH de la solución estabilizante superiores a 4, después de la
10 mezcladura de oxalato de tetradeciltrimetilamonio y aditivo con valor pH definido.

Ejemplo 15:

- 15 Estabilización y aislamiento de ADN paralelamente a la estabilización y aislamiento de ARN

Estos experimentos demuestran que mediante oxalato de tetradeciltrimetilamonio mezclado con diferentes aditivos, junto a ARN también se puede estabilizar el ADN en tejidos. En este caso, a partir de una muestra se puede aislar paralelamente junto a ARN también ADN.

- 20 Para la preparación de las soluciones utilizadas en este experimento se mezcla una solución patrón de 20% de oxalato de tetradeciltrimetilamonio con una solución patrón de ácido cítrico 0,5 M, pH 5, ajustada con lejía de sodio hasta una concentración final de oxalato de 4% de tetradeciltrimetilamonio y 200 mM de aditivo.

- 25 Para este experimento se utiliza tejido renal de ratón, el cual inmediatamente después de su extracción se congeló en nitrógeno líquido y, a continuación, se almacenó a -70°C . Aproximadamente 80 mg de tejido se mezclan, congelados, con 4,2 ml de oxalato de tetradeciltrimetilamonio al 4% y 200 mM de ácido cítrico, pH 5 e inmediatamente se homogeneizan mediante un homogeneizador rotor-estátor – tal como, por ejemplo el "Polytron" de la razón social Kinematica – durante 30 a 60 s. De este homogeneizado se toman partes alícuotas de respectivamente 500 μl de solución, que, por consiguiente, corresponden a 10 mg de tejido. Las muestras se
30 almacenan durante un día a la TA.

- A continuación del almacenamiento las muestras se centrifugan durante 3 minutos a 10.000xg y el sobrenadante se retira. El aglomerado se disuelve totalmente en 600 μl de un tampón de guanidina-isotiocianato habitual en el comercio – tal como, por ejemplo, tampón RLT de la razón social QIAGEN – mediante el Vortex. A continuación, se añade 1 volumen (600 μl) de etanol al 70% y se mezcla por varias succiones y expulsiones de pipeta o por el Vortex durante un espacio de tiempo de casi 5 s. El lisado se aplica a continuación sobre una columna "spin" habitual en el comercio que contiene una membrana de sílice – tal como, por ejemplo, las columnas RNeasy de la razón social QIAGEN – y por centrifugación (1 min a 10.000xg) se pasa por la membrana. El ARN queda ligado a la membrana y,
40 a continuación, se puede aislar tal como se describe en el Ejemplo 14. El líquido pasado (aproximadamente 1200 μl) se recoge y se mezcla con 200 μl de etanol al 100% y se mezcla mediante Vortex. Estas muestras se aplican nuevamente sobre una columna "spin" habitual en el comercio que contiene una membrana de sílice – tal como, por ejemplo las columnas QIAamp de la razón social QIAGEN – y por centrifugación (1 min a 10.000xg) se pasa por la membrana. El ADN queda ligado a la membrana y, a continuación, se lava con un primer tampón de lavado de guanidina-isotiocianato habitual en el comercio – por ejemplo con el tampón RW1 de la razón social QIAGEN – y después con un segundo tampón de lavado que contiene alcohol – por ejemplo tampón RPE de la razón social QIAGEN –. En este caso, los tampones de lavado se llevan respectivamente por centrifugación (1 min a 10.000xg) a través de la membrana. El lavado con el segundo tampón de lavado que contiene alcohol se repite con un volumen más bajo, secándose al mismo tiempo por la centrifugación la membrana (2 min a rpm máximo, aquí 20.000 rpm).
50 Para la elución se pipetea sobre la membrana 200 μl de agua y se incuba durante 1 minuto a la TA, para separar por disolución el ADN purificado. Por centrifugación (1 min a 10.000xg) se pasa el eluido a través de la membrana y con el fin de una elución completa se vuelve a repetir la etapa de elución.

- 55 El ADN aislado se analiza sobre geles de agarosa que fueron teñidos con bromuro de etidio. Para ello se preparan, por ejemplo, geles de TBE-agarosa al 0,8%. Se emplean respectivamente 40 μl de las muestras 1 a 4 y 20 μl de las muestras 5 a 9. El resultado se reproduce en la Fig. 15.

- Las huellas 1 y 2 muestran el ADN completo aislado de forma correspondiente al Ejemplo 15. Las huellas 3 y 4 muestran como referencia 0,1 μg o, respectivamente, 0,5 μg de un ADN completo para la demostración del comportamiento de elución de un ADN genómico intacto en el gel de agarosa utilizado. La huella 5 muestra un ADN completo que sin almacenamiento previo se aisló con ayuda de un equipo de aislamiento obtenible comercialmente (Mini Kits QIAamp® de la razón social QIAGEN GmbH) a partir de 10 mg de tejido renal congelado de rata (= control positivo). Como control negativo servía ADN completo, el cual se aisló después de un almacenamiento de un día de 10 mg de tejido renal seco, es decir sin adición de disolvente, o en agua destilada, con ayuda del Mini Kit QIAamp® de la razón social QIAGEN. Este ADN se muestra en las huellas 6 y 7 (almacenamiento en seco) y en las huellas 8 y
65 9 (almacenamiento en agua destilada).

5 La separación por electroforesis en gel muestra ADN de elevado peso molecular, no degradado, tanto en las huellas que muestran el ADN de referencia, como también en las huellas que contienen el ADN del control positivo no almacenado. El almacenamiento del tejido seco o en agua conduce a una degradación total del ADN. Por el contrario, de las muestras tratadas de forma correspondiente al Ejemplo 15, permanece intacto y durante el almacenamiento no se degrada. Por consiguiente, las mezclas de oxalato de tetradeciltrimetil amonio con aditivos son también adecuadas para estabilizar ADN en muestras biológicas y permiten, además, un aislamiento paralelo de ARN y ADN a partir de una muestra.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la estabilización de ácidos nucleicos, **caracterizado porque** una muestra biológica con contenido en ácidos nucleicos se pone en contacto con una composición acuosa que comprende un compuesto catiónico de la fórmula general
- $$Y^+R_1R_2R_3R_4X^-$$
- 10 en la cual pueden significar
Y nitrógeno o fósforo
R₁, R₂, R₃ y R₄, independientemente entre sí, un radical alquilo(C₁-C₂₀) no ramificado o ramificado y/o un radical arilo(C₈-C₂₀), así como un radical aralquilo(C₈-C₂₈), y
X⁻ un anión de un ácido mono o polibásico, inorgánico u orgánico,
y con al menos un donante de protones como aditivo.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** R₁ significa un radical alquilo superior y R₂, R₃ y R₄ significan respectivamente un grupo metilo.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado porque** R₁ significa un radical alquilo con 12, 14 ó 16 átomos de carbono y R₂, R₃ y R₄ significan respectivamente un grupo metilo.
- 25 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el anión X⁻ se elige del grupo de los aniones de hidrácidos halogenados o de aniones de ácidos orgánicos monobásicos o dibásicos.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado porque** el anión X⁻ se elige de los aniones del grupo bromuro, cloruro, fosfato, sulfato, formiato, acetato, propionato, oxalato, malonato, succinato o citrato.
- 30 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el donante de protones se elige del grupo de los ácidos monocarboxílicos alifáticos saturados, de los ácidos alquencilcarboxílicos insaturados, de los ácidos dicarboxílicos(C₂-C₆) alifáticos saturados, de los ácidos hidroxidi- o tri-carboxílicos, de los ácidos tricarboxílicos insaturados, de los ácidos cetodicarboxílicos alifáticos, de los aminoácidos o del grupo de los ácidos minerales o de sus sales, solos o en combinación.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado porque** como ácido monocarboxílico alifático saturado se emplea un ácido alquil(C₁-C₆)carboxílico o mezclas de estos ácidos.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado porque** como ácidos monocarboxílicos alifáticos saturados se emplean ácido acético, ácido propiónico, ácido n-butírico, ácido n-valérico, ácido isovalérico, ácido etilmetil-acético (ácido 2-metil-butírico), ácido 2,2-dimetilpropiónico (ácido pivalínico), ácido n-hexanoico, ácido n-octanoico, ácido n-decanoico, respectivamente ácido n-dodecanoico (ácido láurico) o mezclas de los citados ácidos.
- 45 9. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado porque** como ácido alquencilcarboxílico alifático se emplean ácido acrílico (ácido propenoico), ácido metacrílico, ácido crotónico, ácido iso-crotónico o ácido vinilacético o mezclas de los citados ácidos.
- 50 10. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado porque** como ácido dicarboxílico(C₂-C₆) alifático saturado se emplea un ácido dicarboxílico del grupo ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico o, respectivamente, ácido adípico o mezclas de los citados ácidos.
- 55 11. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado porque** como ácidos hidroxidi- o tri-carboxílicos alifáticos se emplean ácido tartrónico, ácido D-(+)-, L-(-)- o DL-málico, ácido (2R, 3R)-(+)-tartárico, (2S, 3S)-(-)-tartárico, ácido meso-tartárico y ácido cítrico o mezclas de los citados ácidos.
12. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado porque** como ácidos dicarboxílicos se emplean ácido maleico y/o ácido fumárico o mezclas de los citados ácidos.
- 60 13. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado porque** como ácido tricarboxílico insaturado se emplea ácido aconítico.
14. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado porque** como ácidos cetocarboxílicos alifáticos se emplea ácido mesoxálico o ácido oxálico o mezclas de los citados ácidos.
- 65 15. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizada porque** como aminoácidos se emplean ácido aminoacético (glicina), ácido α-aminopropiónico (alanina), ácido α-amino-iso-valérico (valina), ácido α-amino-isocaproico (leucina) y ácido α-amino-β-metilvalérico (isoleucina) o mezclas de los citados ácidos.
16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado porque** el compuesto catiónico se

presenta en una concentración comprendida en un intervalo de 0,01% en peso hasta la saturación.

- 5 17. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** la mezcla a base de la muestra biológica con contenido en ácidos nucleicos y la composición presenta eventualmente otros coadyuvantes.
18. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** como ácidos nucleicos se estabilizan ácidos ribonucleicos (ARN) y ácidos desoxirribonucleicos (ADN).
- 10 19. Procedimiento según la reivindicación 17, **caracterizado porque** el valor del pH de la mezcla a base de la muestra biológica y la composición se sitúa en un intervalo de 2 a 12.
20. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** antes de la mezclado de la muestra biológica con a composición o en la solución de estabilización de la muestra biológica, la muestra biológica se somete a una acción mecánica, física, química o enzimática.
- 15 21. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el material de la muestra se almacena en la composición y, a continuación, se somete directamente a una analítica o detección de ácidos nucleicos.
- 20 22. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el material de la muestra se almacena en la composición y, a continuación, se purifican los ácidos nucleicos.
- 25 23. Procedimiento según la reivindicación 22, **caracterizado porque** los ácidos nucleicos o las células o partículas con contenido en ácidos nucleicos se separan por filtración o centrifugación de la solución restante, y los ácidos nucleicos o las células o partículas con contenido en ácidos nucleicos separados se someten a otra purificación.
- 30 24. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 23, **caracterizado porque** la muestra biológica en la muestra, que puede contener eventualmente virus o bacterias, es sangre, plasma o suero.
- 35 25. Procedimiento según la reivindicación 24, **caracterizado porque** el valor del pH de la mezcla se sitúa en un intervalo de 2 a 6.
26. Procedimiento según una de las reivindicaciones 24 a 25, **caracterizado porque** se aíslan los complejos a base de compuesto catiónico y ADN y/o ARN.
27. Procedimiento según la reivindicación 26, **caracterizado porque** el sedimento a base de ARN o ADN y compuesto catiónico, obtenido en el aislamiento, se recoge en un tampón.
- 40 28. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 23, **caracterizado porque** la muestra biológica que eventualmente puede contener virus o bacterias se materializa por una punción, por células, tejidos o bacterias.
- 45 29. Procedimiento según la reivindicación 28, **caracterizado porque** el valor del pH de la mezcla se sitúa en un intervalo de 3 a 10.

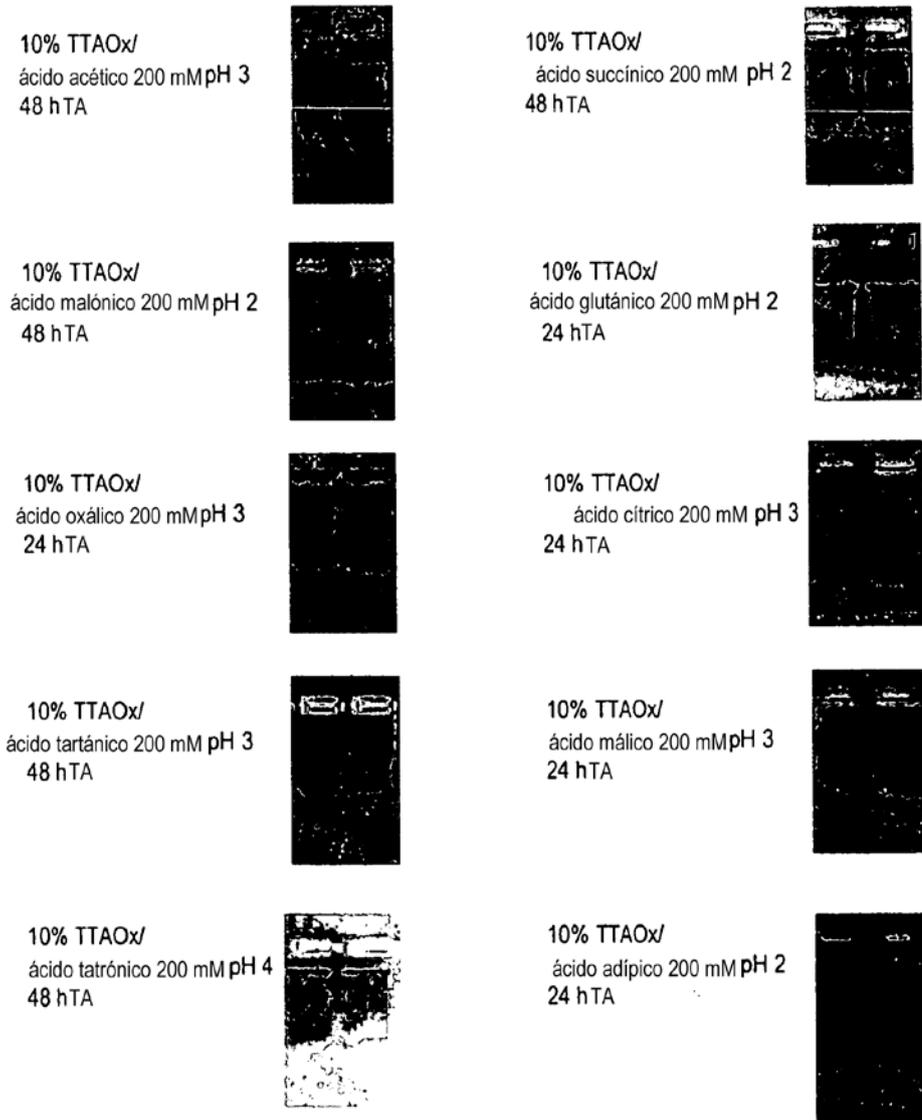


Fig. 1

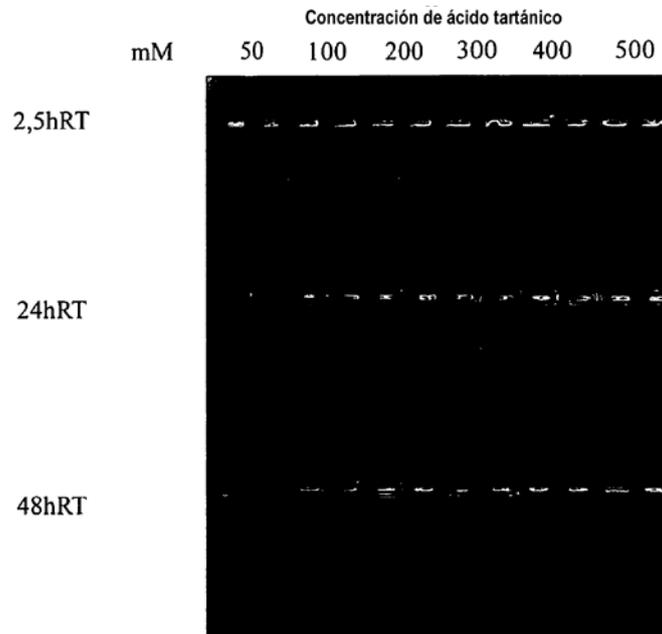


Fig. 2

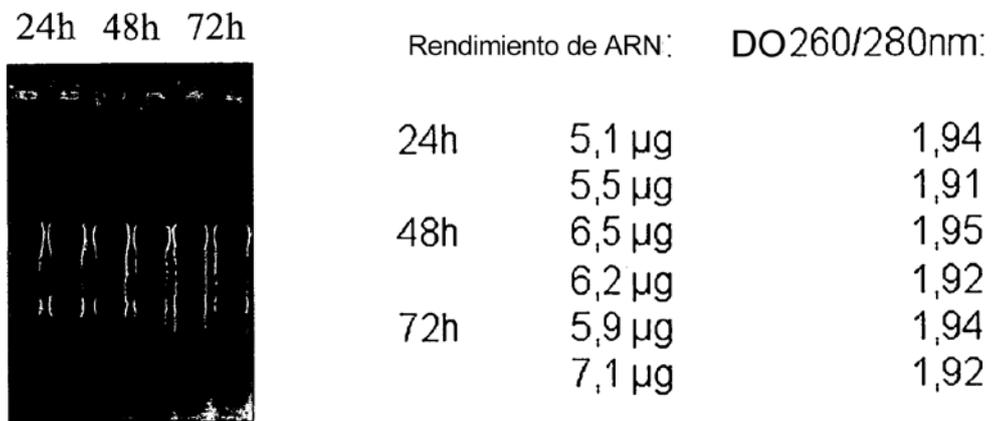


Fig. 3

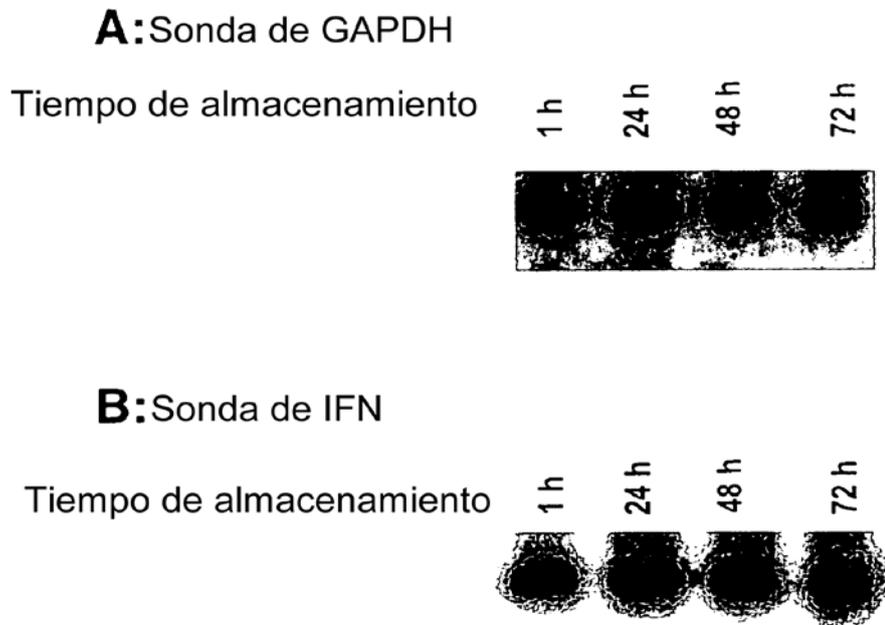
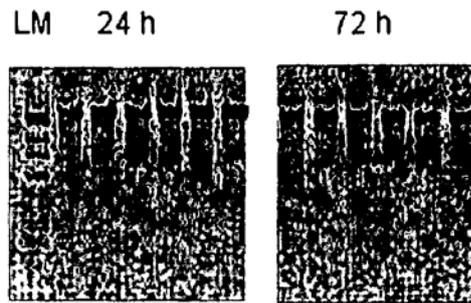


Fig. 4

EP 1 820 793 A1



LM=marcador de longitud (800 ng Lambda -ADN cortado con Hind III)

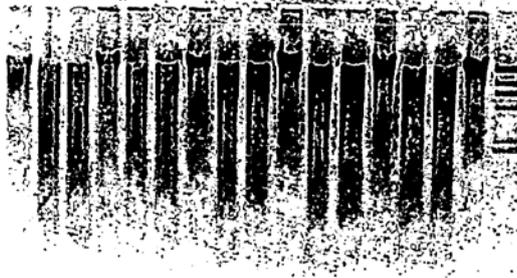
Rendimiento (determinado a través de DO260 nm):

	Media	Amplitud de oscilación
24h	50 µg	47 - 54 µg
72h	30 µg	26 - 34 µg

Fig. 5

A. Restricción enzimática del ADN

EH EH EH EH EH LM



B. Amplificación por PCR del gen

fila superior: 150 ng de ADN/50 μ l de reacción

fila inferior: 300 g de ADN/50 μ l de reacción



Fig. 6



Fig. 7

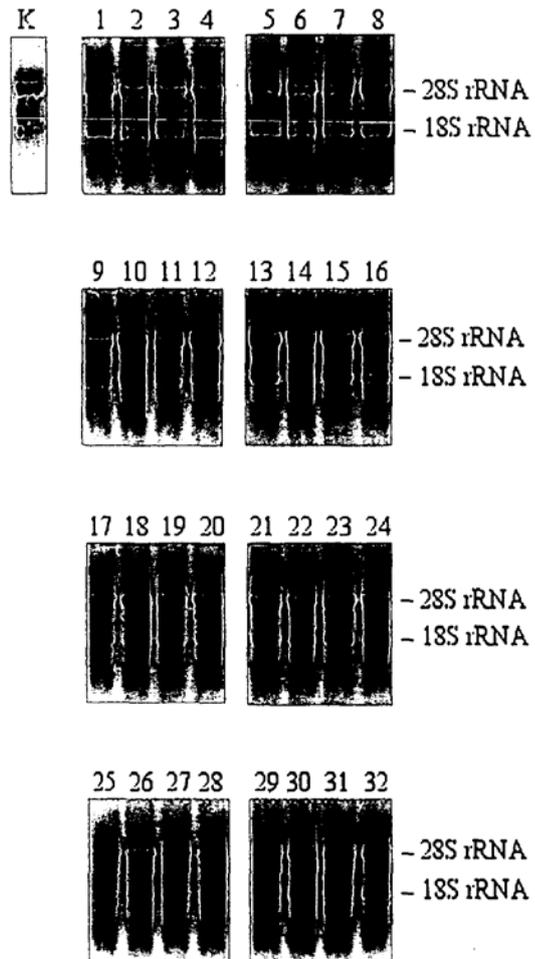


Fig. 8

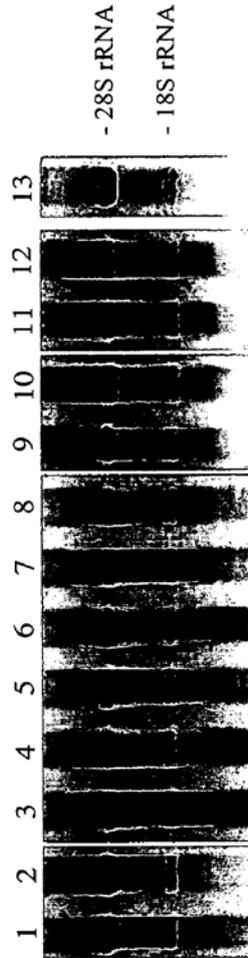


Fig. 9

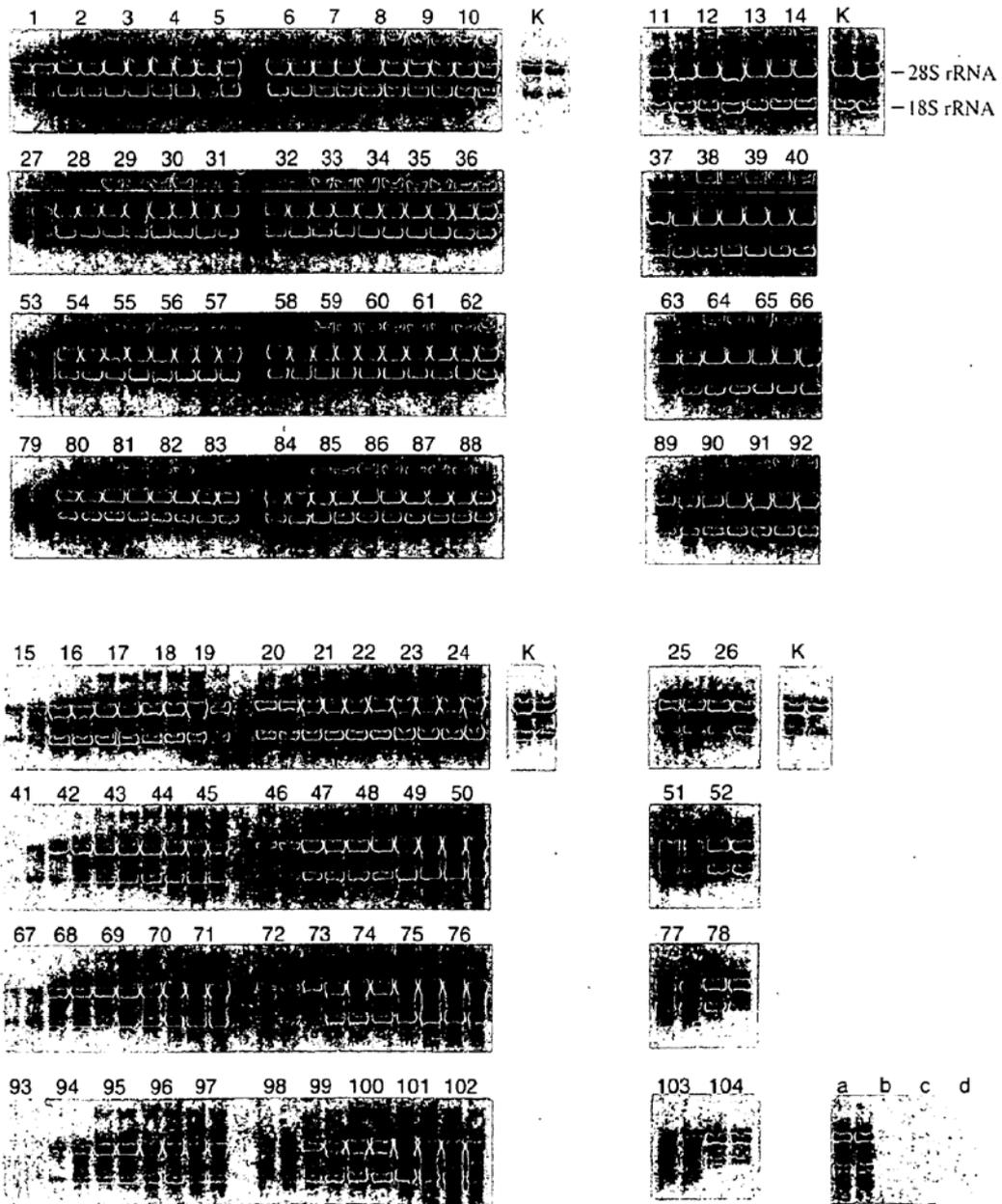


Fig 10



Fig. 11

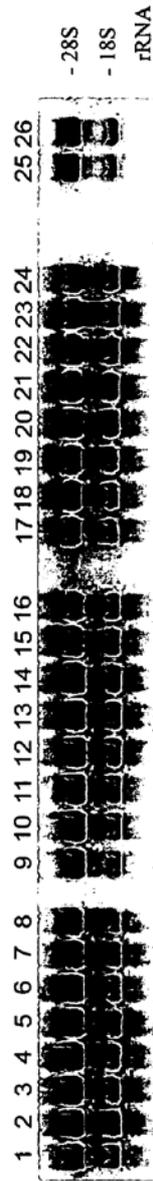


Fig. 12

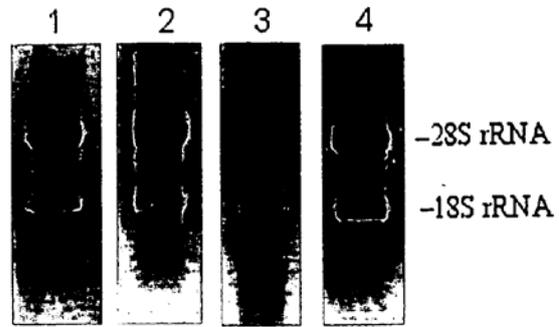


Fig. 13

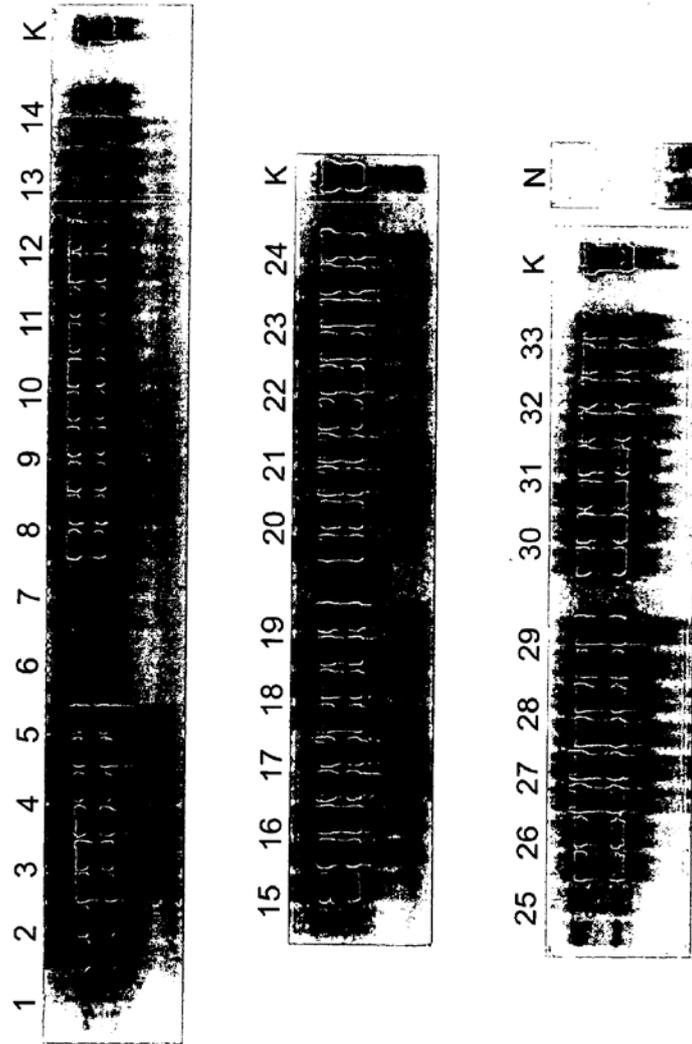


Fig. 14

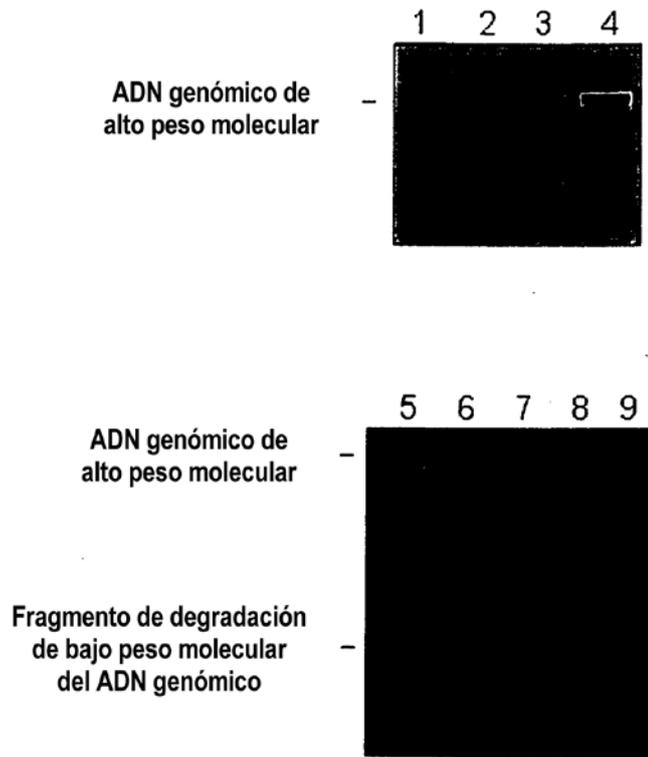


Fig. 15