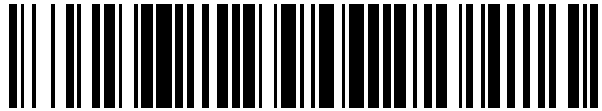


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 815**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2007 E 07856546 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **02.09.2009 EP 2094846**

54 Título: **Utilización de TDE para el aislamiento de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

13.12.2006 EP 06025779

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

05.02.2013

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DONNER, HORST;
BERGMANN, FRANK;
LASSONCZYK, NINA;
SCHMID, MARCUS y
WATZELE, MANFRED**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 394 815 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

Utilización de TDE para el aislamiento de ácidos nucleicos

- 5 La presente invención se refiere a la purificación de ácidos nucleicos. Particularmente, la invención se refiere a métodos de adsorción de ácidos nucleicos presentes en una solución acuosa de adsorción a un sustrato sólido.

Antecedentes de la invención

- 10 Desde que la estructura del ADN fue descifrada por Watson y Crick en 1953 (Watson J.D. y Crick F.H.C., Nature 171:737-738, 1953), la investigación y manipulación de los ácidos nucleicos se ha convertido en parte integral de la bioquímica y la biología molecular. A pesar de la disponibilidad de varios métodos de aislamiento y kits comerciales para llevar a cabo dichos métodos, los nuevos avances para el aislamiento o la purificación fácil y sencilla de ácidos nucleicos con alto rendimiento y pureza siguen siendo de gran importancia.

- 15 Los ácidos nucleicos son altamente susceptibles a la degradación enzimática. En 1968, Cox describió el agente caotrópico HCl de guanidina como inhibidor de la actividad enzimática de nucleasa (Cox R.A., Methods Enzymol. 12B:120-129, 1968). Además de un fuerte efecto desnaturante de las proteínas, las concentraciones elevadas de agentes caotrópicos median en la lisis celular. Por lo tanto, los agentes caotrópicos, particularmente el isotiocianato de guanidina, se utilizan ampliamente en el aislamiento de ácidos nucleicos.

- 20 Un primer principio del aislamiento de los ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica utiliza un solvente orgánico, particularmente fenol, para la separación de ácidos nucleicos de los componentes orgánicos restantes en la muestra. Tras la extracción con fenol se lleva a cabo una precipitación salina del ácido nucleico a partir de una fase acuosa (Stallcup M.R. y Washington L.D., J. Biol. Chem. 258:2802-2807, 1983, y Schmitt M.E. *et al.*, Nucl. Acids Res. 18:3091-3092, 1990). Aunque este método resulta en un elevado rendimiento y pureza de ácidos nucleicos, las desventajas principales son la utilización de reactivos tóxicos, y que el procedimiento resulta largo y laborioso. Debido a dichas desventajas, este método de aislamiento no puede automatizarse, o sólo en un grado muy limitado.

- 25 Otro método de aislamiento de ácidos nucleicos utiliza un material inorgánico sólido, particularmente sílice, al que se adsorben ácidos nucleicos de una fase líquida acuosa, tal como un lisado de una muestra biológica. En 1979, Vogelstein y Gillespie describieron un método para aislar ácidos nucleicos a partir de secciones de gel de agarosa mediante la unión de ácidos nucleicos a partículas de sílice en presencia de yoduro sódico altamente concentrado (Vogelstein B. y Gillespie D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:615-619, 1979).

- 30 Además, se ha encontrado que la unión de ácidos nucleicos a la fase sólida se incrementaba al añadir detergentes aniónicos, catiónicos o neutros, en particular Triton-X100, dodecilsulfato sódico, NP40 y Tween-20.

- 35 La adsorción de un ácido nucleico a la fase sólida habitualmente se lleva a cabo en presencia de un desnaturante potente, tal como un agente caotrópico (Boom R. *et al.*, J. Clin. Microbiol. 28:495-503, 1990; patente US nº 5.234.809). Para el procedimiento de aislamiento, el material biológico se mezcla con una solución que contiene el desnaturante. La mezcla resultante se pone en contacto con el material de fase sólida, de manera que las moléculas de ácidos nucleico se unen a la superficie de la fase sólida. A continuación, el material sólido se lava con soluciones que contienen concentraciones salinas caotrópicas decrecientes y concentraciones crecientes de alcohol, en particular de etanol, con el fin de purificar adicionalmente los ácidos nucleicos unidos respecto de otros materiales orgánicos y agentes contaminantes. En la última etapa, el material sólido se pone en contacto con una solución pobre en sales o agua bajo pH alcalino con el fin de separar el ácido nucleico unido de la fase sólida. El flujo de trabajo completo comprende una etapa de lisis de la muestra, una etapa de unión, una o más etapas de lavado y una etapa de elución (desorción).

- 40 La fase sólida puede disponerse en diferentes conformaciones. En un primer diseño, la fase sólida presenta forma de tejido y se encuentra incluida en un dispositivo de plástico. Un ejemplo de la misma es una columna MicroSpin (patente EP nº 0 738 733). Este diseño se utiliza preferentemente en flujos de trabajo ejecutados manualmente. En un segundo diseño, las partículas de sílice magnéticas se utilizan como fase sólida (Bartl K. *et al.*, Clin. Chem. Lab. Med. 36:557-559, 1998). Este diseño se utiliza preferentemente en flujos de trabajo automatizados.

- 45 Una mejora adicional de dicho método se ha observado al añadir alcohol alifático (es decir, etanol o isopropanol) o polietilenglicol a la solución en la etapa de unión (patente US nº 6.383.393).

- 50 La patente US nº 6.905.825 da a conocer la adición de solventes orgánicos al tampón de unión. Estos solventes orgánicos comprenden los éteres alifáticos siguientes: éter dimetilico de etilenglicol, éter dietílico de etilenglicol, éter dimetilico de propilenglicol, éter dietílico de propilenglicol, éter dimetilico de dietilenglicol, éter dietílico de dietilenglicol, tetrahidrofurano y 1,4-dioxano; los ésteres alifáticos siguientes: propilenglicol monometil-éter acetato y

lactato de etilo, y las cetonas alifáticas hidroxiacetona, acetona y metiletil-cetona.

La patente US nº 2005/0079535 da a conocer la utilización de acetona, acetilacetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dietilcetona, metiletilcetona, metilpropilcetona, isobutilmetilcetona, γ -butirolactona, γ -valerolactona, carbonato de propileno y N-metil-2-pirrolidona, así como la utilización del diéter cíclico dioxano en el tampón de unión, con el fin de adsorber un ácido nucleico a una fase sólida tal como sílice.

La patente US nº 2006/0166368 A1 da a conocer una solución líquida que comprende éter dimetílico de tetraetilenglicol (TED) en un tampón que contiene (1) un componente orgánico miscible en agua tal como metanol, etanol, 1-propanol ó 2-propanol, etilenglicol, propilenglicol, glicerol, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, formamida, dimetilformamida, diglima, triglima o tetraglima, a una concentración de hasta 50% (base volumen), (2) un componente ácido tal como ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, ácido propiónico, ácido fosfórico, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido cítrico, ácido oxálico o ácido hidrocórico, a una concentración de hasta 20% (base volumen), (3) un tampón tal como fosfato sódico, acetato sódico, formato sódico o citrato sódico, a un pH de entre 1 y 6, y a una concentración de entre 5 y 200 mM, y (4) un detergente tal como dodecilsulfato sódico, TRITON[®] X-100, SB3-10 y TWEEN[®]20) a una concentración de entre 0,005% y 1% (en una base de peso-volumen). La solución líquida se utiliza como solvente de determinados pigmentos que sirven como marcajes selectivos en la bioquímica de proteínas y particularmente para métodos de detección de proteínas.

Las propiedades químicas de los reactivos utilizados en el procedimiento de aislamiento/purificación de ácidos nucleicos determinan la calidad de los ácidos nucleicos (rendimiento, pureza y tamaño), así como su comportamiento en flujos de trabajo posteriores, incluyendo reacciones enzimáticas basadas en polimerasas o transcriptasas inversas (Mullis K. y Faloona F.A., *Methods Enzymol.* 155:335-350, 1987). Además, algunas propiedades adicionales de los reactivos, como la toxicidad, así como aspectos físicos químicos como el punto de ignición y la presión de vapor son de gran importancia.

Recientemente el análisis de las moléculas pequeñas de ARN, de 15 a 20 nucleótidos, ha despertado un fuerte interés. Se han investigado especialmente microARN (ARNmi) y ARN interfirientes pequeños (ARNip), los cuales presentan un efecto fuerte sobre la traducción de ARN mensajero específicos. Además, para otros tipos de ARN pequeño, tales como ARNt, ARNr 5S y 5.8S, así como ARN nuclear pequeño (ARNnp) y ARN nucleolar pequeño (ARNnop) implicado en el procesamiento del ARNm y el ARNr, resultan necesarios procedimientos de aislamiento selectivo.

Los métodos para aislar dichas moléculas de ARN pequeño de manera selectiva han sido descritos en la patente US nº 2005/0059024, de Conrad, y en la patente WO nº 2005/012487, de Madden *et al.* Con el fin de aislar moléculas de ARN pequeño en ambos métodos, resultan necesarias concentraciones elevadas de alcohol, del orden de 70%, para unir eficientemente el ARN pequeño a un soporte sólido. Lo anterior incrementa considerablemente el volumen de la muestra que debe analizarse. En el caso de que una muestra deba adsorberse sobre un soporte sólido, tal como una columna de centrifugación, disponible comúnmente, la cantidad de muestra que puede aplicarse en una operación de centrifugación se encuentra limitada a un volumen pequeño. Únicamente puede aplicarse una cantidad más alta de una muestra más diluida en dos etapas de centrifugación consecutivas en la misma columna, incrementando de esta manera el número de etapas de manipulación y el tiempo de procesamiento. Por lo tanto, existe otra necesidad, de mejorar la unión de moléculas pequeñas de ADN y ARN sin necesidad de diluir la muestra con grandes cantidades de alcohol.

En vista de las desventajas del estado de la técnica, es un objetivo de la presente invención proporcionar un compuesto orgánico alternativo que estimule la adsorción de un ácido nucleico a un sustrato sólido.

Los inventores han encontrado inesperadamente que la adsorción de un ácido nucleico a una fase sólida se lleva a cabo eficazmente en el caso de que se utilice éter dimetílico de tetraetilenglicol (=TDE) en la solución de adsorción.

Descripción resumida de la invención

Por lo tanto, un primer aspecto de la invención es una composición que comprende éter dimetílico de tetraetilenglicol (=TDE; C₁₀H₂₂O₅; PM: 178, CAS: 143-24-8), un tampón acuoso y un agente caotrópico. Otro aspecto de la invención es la utilización de TDE para adsorber un ácido nucleico sobre una fase sólida. Todavía un aspecto adicional de la invención es un método para adsorber un ácido nucleico de una muestra sobre una fase sólida que comprende las etapas de: (a) proporcionar el ácido nucleico en una muestra, en la que la muestra se disuelve en una composición líquida que comprende TDE, un tampón acuoso y un agente caotrópico, seguido de (b) proporcionar la fase sólida y poner en contacto la composición líquida de la etapa (a) con la fase sólida, adsorbiendo de esta manera el ácido nucleico sobre la fase sólida. Todavía un aspecto adicional de la invención es un método para la purificación de un ácido nucleico a partir de una muestra lisada, que comprende las etapas de: (a) proporcionar el ácido nucleico en una muestra, en la que la muestra se disuelve en una composición líquida que comprende TDE, un tampón acuoso y

un agente caotrópico, seguido de (b) proporcionar la fase sólida y poner en contacto la composición líquida de la etapa (a) con la fase sólida, adsorbiendo de esta manera el ácido nucleico sobre la fase sólida, seguido de (c) separar la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido de la fase líquida, (d) opcionalmente lavar con una solución de lavado la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido, seguido de (e) poner en contacto la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido con una solución de desorción que preferentemente contiene solutos en una concentración más baja que la composición de la etapa (a), desorbiendo de esta manera el ácido nucleico de la fase sólida y disolviendo el ácido nucleico en la solución, seguido de (f) separar la solución con el ácido nucleico, de la fase sólida, purificando de esta manera el ácido nucleico, y opcionalmente (g) precipitar el ácido nucleico de la solución de la etapa (f) y aislar el ácido nucleico precipitado, purificando adicionalmente de esta manera el ácido nucleico.

Todavía un aspecto adicional de la invención es una composición que comprende TDE y partículas magnéticas con una superficie de sílice. Todavía un aspecto adicional de la invención es un método para purificar un ácido nucleico de bajo peso molecular, que comprende las etapas de: (a) proporcionar el ácido nucleico en una muestra lisada, en la que la muestra se disuelve en una composición líquida que comprende un tampón acuoso, TDE a una concentración de entre 10% y 75%, medida como volumen por volumen, un detergente y un agente caotrópico, seguido de (b) proporcionar una fase sólida y poner en contacto la composición líquida de la etapa (a) con la fase sólida, seguido de (c) separar la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido de la fase líquida, (d) lavar con una solución de lavado la fase sólida de la etapa (c), en la que la solución de lavado comprende un solvente orgánico a una concentración de entre 40% y aproximadamente 100%, seguido de (e) poner en contacto la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido con una solución acuosa de desorción que contiene solutos a una concentración más baja que la composición de la etapa (a), desorbiendo de esta manera el ácido nucleico de la fase sólida y disolviendo el ácido nucleico en la solución, seguido de (E) la separación de la solución con el ácido nucleico respecto de la fase sólida, purificando de esta manera el ácido nucleico, y opcionalmente (g) precipitar el ácido nucleico de la solución de la etapa (f) y aislar el ácido nucleico precipitado, purificando adicionalmente de esta manera el ácido nucleico.

Todavía un aspecto adicional de la invención es un método que comprende las etapas de (a) proporcionar el ácido nucleico en una muestra lisada, en la que la muestra se disuelve en una composición líquida que comprende un tampón acuoso, TDE a una concentración de entre 5% y 30%, medido volumen por volumen, un detergente y un agente caotrópico, seguido de (b) proporcionar una primera fase sólida, poner en contacto la composición líquida de la etapa (a) con la primera fase sólida y separar la fase líquida de la primera fase sólida, seguido de (c) mezclar una cantidad adicional de TDE con la fase líquida de la etapa (b), ajustando de esta manera la concentración de TDE en la fase líquida de la etapa (b) hasta una proporción de entre 20% y 70%, medida volumen por volumen, en la que la concentración inicial de TDE en la fase líquida se incrementa en un factor de 1,3 ó más, seguido de (d) proporcionar una segunda fase sólida y poner en contacto la composición líquida de la etapa (a) con la segunda fase sólida, seguido de (e) lavar con una solución de lavado la segunda fase sólida de la etapa (d), en la que la solución de lavado comprende un solvente orgánico a una concentración de entre 50% y 100%, seguido de (f) poner en contacto la segunda fase sólida de la etapa (e) con una solución acuosa de desorción que contiene solutos a una concentración más baja que la composición de la etapa (a), desorbiendo de esta manera el ácido nucleico respecto de la fase sólida y disolviendo el ácido nucleico en la solución, seguido de (g) separar la solución con el ácido nucleico respecto de la fase sólida, purificando de esta manera el ácido nucleico, y opcionalmente (h) precipitar el ácido nucleico de la solución de la etapa (f) y aislar el ácido nucleico precipitado, purificando adicionalmente de esta manera el ácido nucleico.

Todavía un aspecto adicional de la invención es un kit de partes, que comprende material de empaquetamiento, recipientes, y (a) TDE, (b) una solución madre concentrada de una sal tampón y un agente caotrópico seleccionado de entre el grupo que consiste de hidrocloreuro de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina, urea, acetato sódico, perclorato de un álcali, halogenuro de un álcali y mezclas de los mismos, y (c) material cromatográfico y de filtración que comprende un material con una superficie capaz de interactuar con los residuos fosfato en el esqueleto de los ácidos nucleicos. Todavía un aspecto adicional de la invención es un kit de partes, que comprende material de empaquetamiento, recipientes, y (a) una suspensión de partículas magnéticas recubiertas de sílice en TDE, y (b) una solución madre concentrada de una sal tampón y un agente caotrópico seleccionado de entre el grupo que consiste de hidrocloreuro de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina, urea, acetato sódico, perclorato de un álcali y halogenuro de un álcali. Todavía un aspecto adicional de la invención es un método para determinar la presencia de un ácido nucleico en una muestra, que comprende las etapas de: (a) formar una composición que contiene (i) la muestra, (ii) un tampón acuoso, (iii) un agente caotrópico, (iv) TDE, en la que la muestra se disuelve en la composición líquida, (b) poner en contacto la composición de la etapa (a) con una fase sólida, adsorbiendo de esta manera el ácido nucleico sobre la fase sólida, (c) separar la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido de la fase líquida, (d) opcionalmente lavar con una solución de lavado la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido, seguido de (e) poner en contacto la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido con una solución acuosa de desorción que contiene solutos a una concentración más baja que la composición de la etapa (a), desorbiendo de esta manera el ácido nucleico de la fase sólida y disolviendo el ácido nucleico en la solución, seguido de (f) separar la solución con el ácido nucleico, de la fase sólida, purificando de esta manera el ácido nucleico, y (g) detectar en la solución de la etapa (f) la presencia del ácido nucleico, determinando de esta manera la presencia del ácido nucleico.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevas composiciones y métodos para la purificación de los ácidos nucleicos. Determinados términos y expresiones se utilizan con un significado particular, o se definen por primera vez, en la presente descripción de la presente invención. Para los fines de la presente invención, los términos y expresiones utilizados se encuentran definidos por las definiciones aceptadas de la técnica, en caso de que existan las mismas, excepto en los casos en que las definiciones entren en conflicto o parcialmente en conflicto con las definiciones proporcionadas posteriormente. En caso de conflicto en la definición, el significado de un término se definirá en primer lugar mediante cualquiera de las definiciones proporcionadas posteriormente.

La expresión "que comprende" se utiliza en la descripción de la invención y en las reivindicaciones como referida a "que incluye, aunque no se encuentra necesariamente limitada a".

Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o más de uno (es decir, por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, "un compuesto" se refiere a un compuesto o a más de un compuesto.

Al designar un intervalo de valores numéricos, tal como un intervalo de concentraciones, el intervalo se indica mediante la palabra "entre", seguido de un primer valor n_1 y un segundo valor n_2 . El límite inferior del intervalo designado se entiende que es el valor que es igual o superior al primer valor. El límite superior del intervalo designado se entiende que es el valor que es igual o inferior al segundo valor. De esta manera, para un valor x , el intervalo designado es $n_1 \leq x \leq n_2$.

Además, se entiende que el término "aproximadamente" en combinación con un valor numérico n indica un valor de x en el intervalo dado por el valor numérico $\pm 5\%$ del valor, es decir $n - 0,05 * n \leq x \leq n + 0,05 * n$. En el caso de que el término "aproximadamente" en combinación con un valor numérico n describa una realización preferente de la invención, el valor de n es el más preferente, a menos que se indique lo contrario.

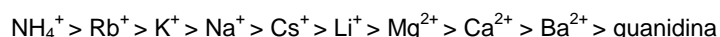
La expresión "miscible en agua" indica que, a temperatura ambiente y presión atmosférica normal, puede disolverse en agua un compuesto miscible en agua a una proporción igual o superior a 1% (por ciento) volumen por volumen, formando una fase líquida acuosa homogénea. Un compuesto miscible en agua ilimitado, en una mezcla con agua, forma una fase líquida homogénea a cualquier proporción de agua/compuesto. En el caso de que la solubilidad del compuesto miscible en agua se limite en agua, el compuesto puede formar una fase separada además de la fase acuosa. El compuesto puede formar además una emulsión, especialmente en presencia de un surfactante.

Un compuesto o una composición es un "líquido" en el caso de que a temperatura ambiente y presión atmosférica normal el compuesto se encuentre en el estado "líquido" y forme una fase líquida.

Los términos "acuoso", fase "acuosa" y solución "acuosa" describen una fase líquida en la que la parte solvente comprende agua. Sin embargo, otros solventes tales como solvente orgánico miscible en agua también pueden encontrarse presentes en la parte solvente. En vista de la presencia de otros solventes, una solución se considera "acuosa" en el caso de que entre 30% y 100%, medidos como volumen por volumen [v/v], de la parte solvente sea agua.

Un "agente caotrópico" es un compuesto que debilita las interacciones hidrofóbicas de los componentes en una solución acuosa. Determinados iones en agua tienden a incrementar las interacciones hidrofóbicas, mientras que otros iones tienden a reducirlas. Qué iones presentan qué tendencia se indica en la denominada serie de Hofmeister. La serie es la siguiente:

Cationes:



Aniones:



Los iones indicados a la izquierda se dice que son "cosmotrópicos", e incrementan la intensidad de las interacciones hidrofóbicas y de esta manera precipitan o "eliminan" las proteínas a concentraciones elevadas. Los iones indicados a la derecha son "caotrópicos" y tienden a debilitar las interacciones hidrofóbicas. La serie de Hofmeister explica por qué una sal guanidina es una proteína desnaturizante. Debilita las interacciones hidrofóbicas que causan que las proteínas se desnaturalicen. Además de los anteriormente indicado, existen también compuestos caotrópicos que son no iónicos. Un ejemplo de los mismos es la urea.

En el presente documento se entiende que la expresión "un ácido nucleico" se refiere a por lo menos un ácido nucleico. Además, la expresión "un ácido nucleico" también puede indicar una mezcla de ácidos nucleicos. La expresión "ácido nucleico" comprende ARN, ADN o ambos.

5 La expresión "fase sólida" al que se adsorbe un ácido nucleico se entiende como un sustrato que es insoluble en las composiciones según la invención. Una fase sólida preferente es un sustrato con una superficie capaz de interactuar con los grupos fosfato del esqueleto de los ácidos nucleicos. La fase sólida puede encontrarse en forma de partículas porosas o no porosas, partículas en polvo o fibras. También se encuentra comprendida una fase sólida que consiste de material fibroso que comprende una pluralidad de fibras no tejidas. Las fases sólidas preferentes consisten de vidrio. Las fases sólidas preferentes son sustratos minerales porosos o no porosos tales como sílice, cuarzo, celitas u otras materiales con superficies oxidantes (incluyendo, por ejemplo, el óxido de circonio, el óxido de aluminio y otros óxidos de metal) o mezclas de los mismos. Además, la expresión "fase sólida" comprende partículas magnéticamente atraíbles recubiertas con sílice, vidrio, cuarzo o celitas. Además, se entiende que un sustrato en forma de material "de polvos" o "pulverulento" se refiere a material finamente dividido que, dispersado en una composición líquida según la invención, produce una suspensión. La expresión "de polvos" o "pulverulento" referida a un material pretende incluir tabletas, en las que el material pulverulento ha sido agregado aunque todavía proporciona una suspensión al combinarlo con una fase líquida.

20 El término "sílice" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a materiales que están constituidos principalmente de silicio y oxígeno. Estos materiales comprenden sílice, dióxido de silicio, gel de sílice, gel de sílice pirógena, tierra diatomácea, celite, talco, cuarzo, vidrio, partículas de vidrio, incluyendo todas las diferentes formas de dichos materiales. Las partículas de vidrio, por ejemplo, pueden comprender partículas de sílice cristalino, vidrios sodocálcicos, vidrios borosilicatados y vidrio fibroso no tejido.

25 La expresión "partícula magnética" se refiere a una partícula con propiedades paramagnéticas o superparamagnéticas. Es decir, la partícula es desplazable magnética pero no retiene magnetización en ausencia de un campo magnético aplicado externamente.

30 El término "muestra" (o "material de muestra") tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra compleja, más preferentemente una muestra biológica. Una muestra compleja puede contener una pluralidad de compuestos orgánicos e inorgánicos que se desea separar del ácido nucleico. El término "muestra" comprende además una solución acuosa que contiene ácidos nucleicos derivados de otros orígenes, por ejemplo de mezclas de reacción química o enzimática, o de una purificación anteriores de material de muestra biológica. La expresión "muestra biológica", a partir de la que se purifican ácidos nucleicos, comprende muestras que comprenden virus o células bacterianas, así como células aisladas de organismos multicelulares tales como células humanas y animales, así como tejidos y cultivos celulares. Particularmente, la muestra puede contener leucocitos y otras células inmunológicamente activas y compuestos químicos con un peso molecular reducido y/o elevado tales como haptenos, antígeno, anticuerpos y ácidos nucleicos. La muestra puede ser de sangre completa, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, líquido cerebral, esputo, heces, especímenes de biopsia, médula ósea, enjuagues orales, tejidos, orina o mezclas de los mismos. La presente invención comprende además muestras biológicas tales como un líquido de un cuerpo humano o animal, preferentemente la muestra biológica es de sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina. El plasma sanguíneo preferentemente es EDTA, heparina o plasma sanguíneo citratado. En una realización de la invención, la muestra biológica comprende células bacterianas, células eucarióticas, virus o mezclas de los mismos. Una muestra biológica tal como se ha ejemplificado anteriormente, preferentemente en una forma procesada tal como un lisado, puede ser parte de la composición de la que el ácido nucleico (diana) se encuentra adsorbido al sustrato. También se encuentran comprendidas en la expresión "muestra biológica" las células vegetales y los hongos, así como los organismos unicelulares.

50 Una muestra preferente según la invención es un lisado. Un "lisado" o una "muestra lisada" puede obtenerse a partir de una muestra compleja y/o material de muestra biológica que comprende tejido, células, bacterias o virus, en el que se rompe la integridad estructural del material. Para liberar el contenido de las células, tejidos o, más generalmente, de las partículas que constituyen una muestra biológica, el material puede tratarse con enzimas o con compuestos químicos con el fin de disolver, degradar o desnaturalizar las paredes celulares y membranas celulares de dichos organismos. Este procedimiento se encuentra comprendido en el término "lisis". Es común utilizar agentes caotrópicos, tales como una sal de guanidina y/o detergente aniónico, catiónico, zwitteriónico o no iónico al liberar ácidos nucleicos en el procedimiento de lisis. También es una ventaja utilizar proteasas que degradan rápidamente los enzimas que presentan actividad nucleolítica y otras proteínas no deseadas. En el caso de que quede un particulado, es decir, materias no disueltas del material de muestra, tras el procedimiento de lisis, las materias particuladas habitualmente se separan del lisado, resultando en un lisado clarificado. Lo anterior puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante filtración o centrifugación. En dicho caso, el lisado clarificado se procesa adicionalmente, por ejemplo mediante un método según la invención. De esta manera, la expresión "muestra lisada" comprende un lisado clarificado.

Los ácidos nucleicos que se liberan, pueden purificarse mediante unión (adsorción) a una fase sólida, lavado de dicha fase sólida con los ácidos nucleicos unidos y liberación, es decir desorción de dichos ácidos nucleicos respecto de dicho soporte mineral.

5 Las sustancias peligrosas utilizadas como intensificadores de la unión con frecuencia comportan riesgos ambientales y provocan costes elevados de gestión de residuos. Su utilización puede restringirse basándose en las medidas de seguridad técnica y/o operacional que resulta necesario adoptar. El potencial de riesgo de los tampones utilizados en el aislamiento/purificación de los ácidos nucleicos se encuentra influido principalmente por la elección del compuesto orgánico que estimula la adsorción del ácido nucleico a la fase sólida. Con respecto a la carga ambiental, se desea reducir la utilización de agentes tóxicos o perjudiciales al máximo. Además, el punto de ignición de un compuesto orgánico inflamable, es decir, la temperatura más baja a la que puede formarse una mezcla inflamable con oxígeno, se desea que sea elevado. Este parámetro influye particularmente sobre los costes de producción de los kits para la purificación de ácidos nucleicos. Un compuesto orgánico con un punto de ignición inferior a la temperatura ambiente debe manipularse en instalaciones de producción especialmente equipadas que evitan el desarrollo de vapores explosivos. Además, el transporte de dichos compuestos orgánicos es objeto de restricciones. Un punto de ignición bajo habitualmente se correlaciona con una presión de vapor elevada. En consecuencia, determinados compuestos orgánicos, particularmente alcoholes inferiores, tienden a evaporarse de las soluciones y por lo tanto conducen a variaciones de la concentración con el tiempo. Este efecto influye también sobre la estabilidad durante el almacenamiento, así como durante la manipulación de los líquidos con una presión de vapor elevada en un instrumento de pipeteo automático. La prevención de sustancias con puntos de ignición bajos y una tendencia a evaporarse durante el procedimiento de aislamiento/purificación simplificaría y haría más económica la producción de soluciones para la purificación de ácidos nucleicos. Además, los compuestos con una presión de vapor baja resultan deseables porque incrementan la utilidad de los kits de aislamiento de ácidos nucleicos al eliminar una fuente importante de error de pipeteado, incrementando de esta manera la fiabilidad de estos kits.

25 Los inventores han encontrado inesperadamente que la adsorción de un ácido nucleico a una fase sólida se lleva a cabo eficazmente en el caso de que se utilice éter dimetílico de tetraetilenglicol (=TDE; C₁₀H₂₂O₅, PM: 178, CAS: 143-24-8) en la solución de adsorción. El TDE, al igual que la diglima de butilo, es un solvente muy seguro y efectivo para un amplio abanico de usos. El TDE hierve a 275°C y presenta un punto de ignición de 141°C. El TDE es completamente soluble en agua. La Tabla 1 proporciona una comparación de TDE con algunos compuestos orgánicos que también pueden utilizarse como aditivos para adsorber un ácido nucleico a una fase sólida.

Tabla 1:

	punto de ignición	presión de vapor	clasificación de riesgo
Éter alifático			
Éter dimetílico de etilenglicol	-2°C	48	F,T
Éter dietílico de etilenglicol	35°C	9,4	Xi
Éter dimetílico de propilenglicol	1°C	40	F
Éter dimetílico de dietilenglicol	56°C	3	T
Éter dietílico de dietilenglicol	82°C	0,5	Xi
Tetrahidrofurano	-24°C	143	F, Xi
1,4-Dioxano	12°C	27	F, Xn
Éter dimetílico de tetraetilenglicol (TDE)	141°C	<0,01	

	punto de ignición	presión de vapor	clasificación de riesgo
Éter alifático			
Poliéter alifático			
Polietilenglicol 1000	n/a	n/a	
Éster alifático			
Acetato del éter monometílico de propilenglicol	43°C	3,7	Xi
Lactato de etilo	52°C	2	Xi
Acetal			
Glicerolfomal	93°C	n/a	
1,3-Dioxolano	-3°C	70	F, Xi
1,3-Dioxano	5°C	n/a	F, Xn

Cetona alifática			
Acetona	-15°C	184	F,Xi
Metiletilcetona	-7°C	71	F,Xi
Hidroxiacetona	56°C	5,6	
Alcohol alifático			
Isopropanol	12°C	33	F,Xi
Etanol	13°C	44,6	F
La clasificación de los riesgos es conocida de manera general: "F" (=inflamable), T (=tóxico), Xi (=irritante)			

El punto de ignición, la presión de vapor, así como la información sobre la clasificación de riesgos, se obtuvo de los datos de seguridad disponibles en las páginas de internet de un proveedor (http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Europe_Home/Germany.html).

5 En virtud de su elevado punto de ignición, la utilización de TDE para adsorber un ácido nucleico a un soporte sólido reduce en gran medida el potencial de riesgo. Simultáneamente, se observó un rendimiento superior en el procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos en comparación con los aditivos conocidos actualmente. La presente invención incrementa la comodidad y reduce los costes del aislamiento/purificación de los ácidos nucleicos para el productor de los kits de aislamiento de ácidos nucleicos, así como para el usuario de dichos kits. La utilización reducida de sustancias tóxicas o perjudiciales reduce los riesgos ambientales. La reducción o incluso la sustitución de sustancias inflamables reduce los costes de producción y transporte. Se consigue una mayor comodidad porque al usuario final de un kit pueden proporcionarse kits listos para utilizar sin necesidad de añadir componentes (por ejemplo etanol) a un componente tampón del kit. Además, se observa una menor evaporación de los tampones que contienen TDE, haciendo de esta manera que la manipulación automática de líquidos resulte más fiable.

20 Según la invención, la unión de un ácido nucleico a una fase sólida puede llevarse a cabo con una composición que comprende éter dimetilico de tetraetilenglicol (=TDE), un tampón acuoso y un agente caotrópico, con la excepción de acetato a un pH de entre 1 y 6 y a una concentración de entre 5 y 200 mM.

25 Según la invención, la concentración preferente de TDE en la composición es de entre 10% y 75%, medida volumen por volumen, también denominado [v/v]. Todavía más preferentemente, la concentración de TDE es de entre 20% [v/v] y 55% [v/v]. Todavía más preferentemente, la concentración de TDE es de entre 30% [v/v] y 45% [v/v]. Todavía más preferentemente, la concentración de TDE en la composición es de aproximadamente 40% [v/v].

30 Según la invención, la adición de un solvente orgánico líquido miscible en agua adicional como aditivo ha demostrado ser ventajoso para el procedimiento de adsorción del ácido nucleico a la fase sólida. Un aditivo preferente es un alcohol alifático C₁-C₅. Un alcohol alifático muy preferente es el etanol o el isopropanol. Sin embargo, dichos compuestos son inflamables y se vaporizan con bastante facilidad. De esta manera, resulta más preferente un acetal o cetal líquido miscible en agua, que presentan una tendencia reducida a la evaporación. Dichos derivados carbonilo se caracterizan por su estabilidad y falta de reactividad en ambientes neutros a fuertemente básicos. Esto es particularmente el caso para los acetales o cetales cíclicos que se forman mediante reacción de los dioles con los aldehídos o cetonas, respectivamente. De esta manera, más preferente, la composición según la invención comprende además un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste de 35 1,3-dioxolán, 1,3-dioxano, 5-hidroxi-1,3-dioxano y 4-hidroximetil-1,3-dioxolano, y una mezcla de los mismos. Una mezcla de 5-hidroxi-1,3-dioxano y 4-hidroximetil-1,3-dioxolano también se conoce como "glicerol formal". Más preferentemente, la composición según la invención comprende además glicerol formal. Sin embargo, también puede utilizarse uno o más de los acetales anteriormente indicados como aditivo preferente en una composición que comprende partículas magnéticas o en un tampón de lavado (ver posteriormente).

45 El valor de pH preferente de la composición según la invención es de entre 4 y 7,5. Todavía más preferentemente, el valor de pH es de entre 5,5 y 7,5. Resultará evidente para el experto en la materia la producción de soluciones tamponadas acuosas adecuadas. Con el fin de estabilizar el valor del pH, se encuentra presente un tampón en la composición según la invención. Los sistemas tampón que resultan adecuados con fines de biología molecular pueden encontrarse en, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3a edición, CSHL Press, 2001. Las sustancias tampón preferentes son ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido N-(carbamoilmetil)-2-aminoetanosulfónico (ACES), ácido N-(2-acetamido)iminodiacético (ADA), ácido N,N-bis(2-hidroxi-2-aminoetanosulfónico (BES), ácido tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS), ácido 2-bis(2-hidroxi-2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (BIS-TRIS), ácido N-(2-hidroxi-2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol) (HEPES), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 3-(N-

morfolinil)-2-hidroxiopropanosulfónico (MOPSO), ácido piperazín-N,N'-bis(2-etanosulfónico) (PIPES), sales de los mismos, u otras sustancias adecuadas.

5 En detalle, el procedimiento para la unión de un ácido nucleico (también denominado ácido nucleico diana) a una fase sólida, tal como, por ejemplo, partículas de vidrio, puede describirse del modo siguiente. Preferentemente se lleva a cabo en presencia de un agente caotrópico a una concentración de entre 0,5 y 10 M, y preferentemente de entre 1 y 5 M. Más preferentemente, la concentración del agente caotrópico es de entre 2 y 4 M. Un agente caotrópico preferente se selecciona de entre el grupo que consiste de una sal de guanidina, tal como hidrocloreto de guanidina, tiocianato de guanidina e isotiocianato de guanidina, adicionalmente urea, una sal acetato de álcali, tal como acetato sódico y acetato potásico, adicionalmente un perclorato de álcali, tal como yoduro de álcali, cloruro de litio, cloruro de potasio y cloruro de sodio. Las mezclas que comprenden uno o más de los agentes listados también resultan posibles.

15 Al lisar una muestra biológica con el fin de liberar los ácidos nucleicos, o al unir los ácidos nucleicos a la fase sólida, resulta preferente adicionalmente la utilización de un detergente durante los procedimientos, es decir, un detergente aniónico, catiónico, zwitteriónico o no iónico. Dichos detergentes son bien conocidos por el experto en la materia. Generalmente, un "detergente" es un agente activo en superficie, también conocido como surfactante. Un detergente es capaz de reducir la tensión superficial del medio en el que se disuelve, y/o la tensión interfacial con otras fases y, por consiguiente, resulta positivamente adsorbido en la interfase líquido/vapor y/o en otras interfases. De esta manera, los detergentes son moléculas anfipáticas con dominios polares (solubles en agua) y no polar (hidrofóbicos). Son capaces de unirse a moléculas hidrofóbicas o a dominios moleculares para proporcionar solubilidad en agua. Dependiendo de sus características iónicas, un detergente puede clasificarse como detergente iónico, detergente no iónico y detergente zwitteriónico. Los detergentes iónicos pueden clasificarse adicionalmente en detergentes aniónicos tales como SDS (dodecilsulfato sódico), LiDS (dodecilsulfato de litio), lauroilsarcosina sódica, ácido 1-octanosulfónico, ácido cólico o ácido desoxicólico y detergentes catiónicos tales como bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), bromuro de trimetil(tetradecil)amonio, cloruro de lauriltrimetilamonio (LTAB), cloruro de lauriltrimetilamonio (LTAC) o cloruro de esteariltrimetilamonio (STAC). De esta manera, los anteriormente indicados habitualmente son altamente desnaturizantes de las proteínas. Los detergentes no iónicos, tales como Nonidex P40, Tween 20, Triton X-100, Brij[®] 35 P, saponina, N-óxido de N,N-dimetildodecilamina, N-óxido de N,N-dimetildodecilamina o éter monododecílico de nonaetilenglicol, habitualmente son menos desnaturizantes de proteínas. Lo anterior también resulta cierto para los detergentes zwitteriónicos tales como 3-(N,N-dimetilpalmitilamonio)-propanosulfonato, 3-[(3-colamidopropil)dimetil-amonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato (CHAPSO) o sulfobetaina 14. Los compuestos zwitteriónicos, también conocidos como zwitteriones, sales internas o iones dipolares son compuestos neutros que presentan cargas eléctricas unitarias formales de signo opuesto.

De esta manera, la composición según la invención puede comprender además un detergente. Resulta preferente que la composición comprenda un detergente aniónico, catiónico, zwitteriónico o no iónico. Resulta todavía más preferente que el detergente en la composición se seleccione de entre el grupo que consiste de dodecilsulfato sódico, dodecilsulfato de litio, bromuro de cetiltrimetilamonio, ácido desoxicólico, lauroilsarcosina sódica, Triton X-100, Tween-20, β-D-glucósido de octilo, Nonidet P40, Brij[®] 35 P o sulfobetaina 14. Sin embargo, resultan posibles otros detergentes.

Además, la composición puede contener una proteasa. Generalmente, al utilizar una combinación de un agente caotrópico, un detergente y una proteasa para lisar una muestra biológica, el experto en la materia selecciona un agente caotrópico y el detergente y sus concentraciones en la composición según la invención basándose en que conserva la actividad proteolítica en la composición.

La composición según la invención que contiene además un ácido nucleico se denomina también "solución de adsorción" debido a que la composición proporciona las condiciones necesarias para adsorber el ácido nucleico a una fase sólida. De esta manera, otro aspecto de la invención es la utilización de TDE para adsorber un ácido nucleico sobre una fase sólida. Todavía un aspecto adicional de la invención es un método para utilizar TDE y un ácido nucleico en una muestra, que comprende las etapas de:

55 (a) proporcionar el ácido nucleico en una muestra, de manera que la muestra se disuelve en una composición líquida que comprende TDE, un tampón acuoso y un agente caotrópico, seguido de (b) proporcionar la fase sólida y poner en contacto la composición líquida de la etapa (a) con la fase sólida, adsorbiendo de esta manera el ácido nucleico sobre la fase sólida. Preferentemente, la muestra ha sido tratada con el fin de obtener una muestra lisada.

60 Para poner en contacto la muestra con la fase sólida, es decir, el material con una afinidad para los ácidos nucleicos, la muestra se mezcla con el material y se incuba durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca la unión. A los expertos habitualmente estarán familiarizados con las duraciones de la etapa de incubación. Esta etapa puede optimizarse mediante la determinación de la cantidad de material biológico inmovilizado sobre la superficie en

diferentes puntos temporales. Los tiempos de incubación de entre 1 segundo (s) y 30 minutos (min) pueden resultar apropiados para los ácidos nucleicos. Tras la incubación, la fase sólida con el ácido o ácidos nucleicos adsorbidos se separa del líquido. Lo anterior puede conseguirse en general por gravedad en el caso de una suspensión de una fase sólida pulverizada, tal como polvo de vidrio. En el caso conveniente de ácidos nucleicos unidos a partículas de vidrio magnéticas, la separación puede conseguirse mediante inmovilización de las partículas magnéticas con un campo magnético y eliminación de la fase líquida. Por ejemplo, las partículas magnéticas pueden arrastrarse a la pared del recipiente en el que se lleva a cabo la incubación. El líquido que contiene la parte de la muestra que no se une a las partículas magnéticas seguidamente puede ser eliminada. El procedimiento de eliminación depende del tipo de recipiente en el que se lleva a cabo la incubación. Entre las etapas adecuadas se incluyen eliminar el líquido mediante pipeteado o aspiración. Otro ejemplo es la unión del ácido nucleico en la solución de adsorción a un tejido de vidrio. Los kits comerciales con frecuencia proporcionan dicho tejido en el fondo de una columna. La solución de adsorción que contiene el ácido nucleico se transfiere a la columna y se pasa a través del tejido mediante la aplicación de una fuerza. El término "fuerza" incluye la fuerza gravitacional y, preferentemente, fuerza centrífuga. Resulta muy preferente el procedimiento de "columna de centrifugación", en el que la solución de adsorción se pasa a través del filtro por la fuerza aplicada mediante centrifugación. Entre otros modos de pasar la solución de adsorción a través del tejido se incluyen la aplicación de presión o la succión.

Según la invención, una fase sólida preferente comprende un sustrato de sílice poroso o no poroso. Más preferentemente, la fase sólida comprende un sustrato seleccionado de entre el grupo que consiste de fibras de vidrio y fibras de cuarzo. También resulta muy preferente que la fase sólida comprenda partículas magnéticas con una superficie de sílice. Los adsorbentes particulados magnetizables son una fase sólida muy preferente debido a que resultan adecuados para la preparación automatizada de muestras. Con este fin se utilizan partículas ferrimagnéticas y ferromagnéticas, así como partículas superparamagnéticas. Las partículas vítreas magnéticas más preferentes son las indicadas en la patente WO nº 01/37291. Resulta muy conveniente proporcionar las partículas magnéticas en forma de suspensión en una solución acuosa de TDE. También resultan preferentes las partículas magnéticas proporcionadas en forma de suspensión en una solución que comprende un acetal miscible en agua y TDE. La solución adicionalmente puede comprender agua. Por lo tanto, otro aspecto de la invención es una composición que comprende TDE y partículas magnéticas con una superficie de sílice. Preferentemente las partículas se proporcionan en forma de material pulverulento. Las partículas vítreas magnéticas utilizadas en la presente invención pueden proporcionarse en formulaciones diferentes. Resulta posible proporcionarlas en forma de una tableta, de polvos o de suspensión, la cual resulta preferente. Preferentemente, dichas suspensiones contienen entre 5 y 60 mg/ml de partículas vítreas magnéticas. También resulta preferente que el material que contiene sílice se suspenda en una solución acuosa tamponada que opcionalmente puede contener un agente caotrópico a una concentración de entre 1 y 10 M, y preferentemente de entre 2 y 6 M.

Todavía un aspecto adicional de la invención es un método para la purificación de un ácido nucleico a partir de una muestra lisada, que comprende las etapas de: (a) proporcionar el ácido nucleico en una muestra, en la que la muestra se disuelve en una composición líquida que comprende TDE, un tampón acuoso y un agente caotrópico, seguido de (b) proporcionar la fase sólida y poner en contacto la composición líquida de la etapa (a) con la fase sólida, adsorbiendo de esta manera el ácido nucleico sobre la fase sólida, seguido de (c) separar la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido de la fase líquida, (d) opcionalmente lavar con una solución de lavado la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido, seguido de (e) poner en contacto la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido con una solución de desorción que preferentemente contiene solutos en una concentración más baja que la composición de la etapa (a), desorbiendo de esta manera el ácido nucleico de la fase sólida y disolviendo el ácido nucleico en la solución, seguido de (f) separar la solución con el ácido nucleico, de la fase sólida, purificando de esta manera el ácido nucleico, y opcionalmente (g) precipitar el ácido nucleico de la solución de la etapa (f) y aislar el ácido nucleico precipitado, purificando adicionalmente de esta manera el ácido nucleico. El efecto de purificación resulta del comportamiento del ADN o ARN de unión al material con una superficie de vidrio bajo las condiciones proporcionadas por la composición de la invención en la solución de adsorción que contiene el ácido nucleico que debe purificarse.

La etapa de lavado no resulta necesaria en todos los casos y por lo tanto representa una opción no obligatoria. El experto en la materia realiza la etapa de lavado según el material de la muestra a partir del que debe purificarse el ácido nucleico. El propósito de la etapa o etapas de lavado es eliminar contaminantes, es decir, componentes no deseados del material de muestra del ácido nucleico adsorbido. Se utiliza una solución de lavado que no provoca la liberación del ácido o ácidos nucleicos de la superficie de la fase sólida, sino que lava los contaminantes no deseados lo más completamente posible.

Preferentemente se lleva a cabo una etapa de lavado mediante incubación del material con el ácido o ácidos nucleicos adsorbidos con la solución de lavado. El material de la fase sólida preferentemente se resuspende durante dicha etapa. También resulta preferente, en el caso de que el material sea un tejido de vidrio o un relleno en una columna, que la etapa de lavado tenga lugar mediante enjuague de la columna con la solución de lavado. Preferentemente, la solución de lavado se pasa por la columna mediante la aplicación de presión, succión, fuerza

centrífuga o fuerza gravitacional. La solución de lavado contaminada preferentemente se elimina tal como en la etapa indicada anteriormente para la unión del ácido nucleico a la fase sólida. Tras la última etapa de lavado, el material puede secarse brevemente al vacío, o puede dejarse que el líquido se evapore. Previamente a la desorción, también puede llevarse a cabo una etapa de pretratamiento utilizando acetona.

5 Preferentemente, la solución de lavado contiene un compuesto orgánico seleccionado de entre el grupo que consiste de TDE, un alcohol alifático C₁-C₅ y un acetal cíclico miscible en agua líquido, además de un agente caotrópico a una concentración de entre 0,5 y 10 M, en la que el valor del pH de la solución de lavado es de entre 4 y 7,5. La concentración preferente del compuesto orgánico en la solución de lavado es de entre 10% y 90% [v/v]. Un alcohol alifático muy preferente es el etanol o el isopropanol.

10 Bajo las condiciones proporcionadas por la solución de lavado, preferentemente más de 40%, más preferentemente más de 50%, más preferentemente más de 70%, más preferentemente más de 80%, todavía más preferentemente más de 90%, todavía más preferentemente más de 95% y todavía más preferentemente más de 99% de los ácidos nucleicos siguen adsorbidos a la fase sólida.

15 Utilizando un intervalo de concentraciones estrecho para TDE, los inventores inesperadamente han encontrado cómo aislar ácidos nucleicos pequeños tales como ARNm, ARNp, etc. De esta manera, otro aspecto de la invención se refiere a un método de utilización de TDE y un ácido nucleico de bajo peso molecular en una muestra. La invención comprende un método para purificar un ácido nucleico de bajo peso molecular, que comprende las etapas de: (a) proporcionar el ácido nucleico en una muestra lisada, en la que la muestra se disuelve en una composición líquida que comprende un tampón acuoso, TDE a una concentración de entre 10% y 75%, medida como volumen por volumen, un detergente y un agente caotrópico, seguido de (b) proporcionar una fase sólida y poner en contacto la composición líquida de la etapa (a) con la fase sólida, seguido de (c) separar la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido de la fase líquida, (d) lavar con una solución de lavado la fase sólida de la etapa (c), en la que la solución de lavado comprende un solvente orgánico a una concentración de entre 40% y aproximadamente 100%, seguido de (e) poner en contacto la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido con una solución acuosa de desorción que contiene solutos a una concentración más baja que la composición de la etapa (a), desorbiendo de esta manera el ácido nucleico de la fase sólida y disolviendo el ácido nucleico en la solución, seguido de (f) la separación de la solución con el ácido nucleico respecto de la fase sólida, purificando de esta manera el ácido nucleico, y opcionalmente (g) precipitar el ácido nucleico de la solución de la etapa (f) y aislar el ácido nucleico precipitado, purificando o concentrando adicionalmente de esta manera el ácido nucleico.

20 25 30 La composición líquida de la etapa (a) adicionalmente puede comprender un detergente, preferentemente un detergente no iónico o lauroilsarcosina sódica. También resulta preferente que en la etapa (a) la concentración del TDE en la composición sea de entre 30% y 50%, y más preferentemente de aproximadamente 40%, medida en volumen por volumen.

35 40 Resulta muy preferente que el agente caotrópico en la composición de la etapa (a) se encuentra a una concentración de entre 0,5 y 10 M. También resulta preferente que el agente caotrópico comprenda isotiocianato de guanidina. Además, la composición de la etapa (a) que incluye la muestra preferentemente se tampona a un pH de entre 4,0 y 7,0, más preferentemente a un pH de entre 4,5 y 6,5, y también muy preferentemente a un pH de entre 5,5 y 7.

45 50 55 60 Alternativamente, puede purificarse un ácido nucleico de bajo peso molecular, según la invención mediante un método que comprende las etapas de (a) proporcionar el ácido nucleico en una muestra lisada, en la que la muestra se disuelve en una composición líquida que comprende un tampón acuoso, TDE a una concentración de entre 5% y 30%, medido en volumen por volumen, un detergente y un agente caotrópico, seguido de (b) proporcionar una primera fase sólida, poner en contacto la composición líquida de la etapa (a) con la primera fase sólida y separar la fase líquida de la primera fase sólida, seguido de (c) mezclar una cantidad adicional de TDE con la fase líquida de la etapa (b), ajustando de esta manera la concentración de TDE en la fase líquida de la etapa (b) hasta una proporción de entre 20% y 70%, medida en volumen por volumen, en la que la concentración inicial de TDE en la fase líquida se incrementa en un factor de 1,3 ó más, seguido de (d) proporcionar una segunda fase sólida y poner en contacto la composición líquida de la etapa (a) con la segunda fase sólida, seguido de (e) lavar con una solución de lavado la segunda fase sólida de la etapa (d), en la que la solución de lavado comprende un solvente orgánico a una concentración de entre 50% y 100%, seguido de (f) poner en contacto la segunda fase sólida de la etapa (e) con una solución acuosa de desorción que contiene solutos a una concentración más baja que la composición de la etapa (a), desorbiendo de esta manera el ácido nucleico respecto de la fase sólida y disolviendo el ácido nucleico en la solución, seguido de (g) separar la solución con el ácido nucleico respecto de la fase sólida, purificando de esta manera el ácido nucleico, y opcionalmente (h) precipitar el ácido nucleico de la solución de la etapa (f) y aislar el ácido nucleico precipitado, purificando o concentrando adicionalmente de esta manera el ácido nucleico.

En la etapa (a), resulta más preferente una concentración de TDE de aproximadamente 20% [v/v]. Básicamente, en

dicho método los ácidos nucleicos que no se desean debido a su mayor tamaño se adsorben sobre la primera fase sólida y se eliminan de la fase líquida. Sin embargo, las condiciones aplicadas todavía retienen ácidos nucleicos del tamaño deseado en solución. Los ácidos nucleicos del tamaño deseado se adsorben en la segunda fase sólida al mezclar un aditivo adicional en la solución. Preferentemente se añade TDE adicional. La concentración final de TDE en la solución de adsorción para la segunda fase sólida preferentemente se encuentra comprendida en el intervalo de entre 30% [v/v] y menos de 100% [v/v]. Un intervalo más preferente para la concentración final de TDE en dicha etapa es de entre 30% [v/v] y 80% [v/v], todavía más preferente de entre 30% [v/v] y 60% [v/v], de entre 30% [v/v] y 50% [v/v], todavía más preferentemente la concentración final de TDE en la etapa (c) es aproximadamente 40%, medida en volumen por volumen.

Según la invención, en la etapa (c), la concentración inicial de TDE [es decir, la concentración de TDE en la composición líquida de la etapa (a)] se incrementa en un factor de 1,3 ó más, resultando en una concentración final de TDE de uno de los intervalos de concentración preferentes anteriormente indicados. Por ejemplo, en el caso de que la concentración inicial de TDE sea de 20%, la concentración final de TDE en la composición líquida de la etapa (c) debe ser de $20\% [v/v] * 1,3 = 26\% [v/v]$ como mínimo. En el caso de que, a título de ejemplo adicional, la concentración inicial de TDE sea 5%, la concentración final de TDE en la composición líquida de la etapa (c) se calcula con un factor superior a 1,3, con el fin de alcanzar la concentración de TDE requerida como mínimo, de 20%. Por consiguiente, el factor no excede de 14 debido a que la concentración final máxima de TDE en la composición de la etapa (c) es de 70%. De esta manera, el valor del factor es de entre 1,3 y 1,4.

La solución de lavado puede comprender además un tampón acuoso que tampona el pH de la solución de lavado a un valor de entre 4,0 y 7,5.

En vista de la invención, un ácido nucleico de bajo peso molecular preferentemente se caracteriza porque: (a) el ácido nucleico es de cadena sencilla y el tamaño del ácido nucleico purificado es de entre 10 y 150 bases, o (b) el ácido nucleico es de doble cadena y el tamaño del ácido nucleico purificado es de entre 5 y 75 bases. Todavía más preferentemente, el ácido nucleico de bajo peso molecular es ADN o ARN. Todavía más preferentemente, el ácido nucleico de bajo peso molecular es ARN de cadena sencilla o de doble cadena.

El detergente que puede utilizarse en la solución de adsorción ayuda en el procedimiento de liberación de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, se lisan células y tejidos con detergentes que desintegran las membranas celulares. Además, los detergentes incrementan la disociación de los ácidos nucleicos de los constituyentes concomitantes de la muestra, tales como proteínas. Además, un detergente incrementa la unión de los ácidos nucleicos a las fases sólidas, y al utilizar una fase sólida porosa, el detergente facilita el acceso de la fase líquida a los comportamientos de poro de la fase sólida.

Las fases sólidas que pueden utilizarse preferentemente para la purificación de los ácidos nucleicos de bajo peso molecular generalmente son iguales a las del procedimiento general de purificación de ácidos nucleicos según la invención. Sin embargo, resulta más preferente una fase sólida con una superficie de sílice. Un intervalo de pH muy preferente de una solución de adsorción para un ácido nucleico de bajo peso molecular es de entre 4,0 y 7,5.

Con el fin de invertir las condiciones para la adsorción, la concentración del agente caotrópico y/o el TDE se reducen, resultando en la desorción del ácido o ácidos nucleicos unidos al material sólido. De esta manera, la invención comprende además el método que comprende la etapa de liberar el ácido nucleico adsorbido (=la desorción) respecto de la fase sólida. Preferentemente, el procedimiento de separación del sustrato, por ejemplo las partículas vítreas magnéticas, del resto de la muestra se lleva a cabo mediante peletización del material biológico inmovilizado, por ejemplo por la fuerza de la gravedad o mediante la utilización de un imán en el caso de partículas vítreas magnéticas y la eliminación del sobrenadante. A continuación, las partículas vítreas magnéticas con el material biológico inmovilizado se resuspenden en una solución acuosa con una cantidad baja o nula de agente caotrópico y/o TDE. Alternativamente, la suspensión puede diluirse con una solución con una cantidad baja o nula de agente caotrópico y/o TDE. Los tampones de esta naturaleza se conocen a partir de la patente DE nº 37 24 442 y Jakobi R. *et al.*, Anal. Biochem. 175:196-201, 1988. Un tampón de elución, es decir una solución de desorción, presenta un bajo contenido de sales y preferentemente un pH superior a 7,5, siendo más preferente un pH de aproximadamente 8. Preferentemente, la solución de desorción contiene solutos a una concentración menor que la de la solución de adsorción. Resulta particularmente preferente que los solutos sean una o más sales tamponadoras con un contenido inferior a 0,2 M de materias disueltas. De esta manera, la concentración preferente de solutos en la solución de desorción es de entre 0 y 0,2 M. Además, la solución de desorción preferente no contiene un agente caotrópico o un solvente orgánico tal como TDE. Preferentemente, el tampón de elución contiene la sustancia TRIS con fines de tamponado. También resulta muy preferente que el tampón de elución sea agua desmineralizada. La solución que contiene el ácido o ácidos nucleicos purificados seguidamente puede utilizarse para otras reacciones. Opcionalmente, el ácido o ácidos nucleicos pueden precipitarse de la solución utilizando, por ejemplo, etanol o isopropanol. El precipitado también puede someterse a etapas de lavado adicionales. Los métodos de este tipo son bien conocidos del experto en la materia y se describen en detalle en Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular

Cloning, A Laboratory Manual, 3a edición, CSHL Press, 2001.

5 Para la etapa de desorción, las condiciones son seleccionadas por el experto en la materia, bajo las cuales los ácidos nucleicos resultan liberados del soporte mineral. Preferentemente, se libera más de 40%, más preferentemente más de 50%, más preferentemente más de 70%, más preferentemente más de 80%, todavía más preferentemente más de 90%, todavía más preferentemente más de 95% y todavía más preferentemente más de 99% de los ácidos nucleicos respecto del soporte mineral.

10 La purificación de un ácido nucleico mediante adsorción del mismo a un sustrato tal como un sustrato mineral en presencia de una composición según la invención también puede aplicarse a otras mezclas complejas. Los ejemplos de las mismas son conocidos por el experto en las técnicas de la biología molecular y entre ellas se incluyen mezclas de reacción tras, por ejemplo, la síntesis *in vitro* de ácidos nucleicos, tal como la PCR, las digestiones con enzimas de restricción, las reacciones de ligación, etc. Otra aplicación para la purificación de un ácido nucleico mediante adsorción del mismo a una fase sólida en presencia de una composición según la invención es la
15 eliminación de contaminantes pirogénicos que pueden haber sido copurificados con el ácido nucleico.

Muy ventajosamente, el método según la presente invención resulta adecuado para la purificación de ácidos nucleicos, es decir, ARN o ADN, a partir de mezclas complejas con otras sustancias biológicas en las que están contenidos. De esta manera, también pueden purificarse mezclas de diferentes ácidos nucleicos, incluso mezclas que contienen un ácido nucleico de interés a baja abundancia. De esta manera, la presente invención comprende además la purificación de mezclas de ácidos nucleicos específicos en las que el ácido o ácidos nucleicos diana pueden ser un componente menor en términos de concentración (o pueden encontrarse presentes a baja abundancia).
20

25 El procedimiento descrito también puede utilizarse para aislar ácidos nucleicos nativos o modificados. Los ácidos nucleicos nativos se entiende que son ácidos nucleicos cuya estructura no ha sido modificada irreversiblemente en comparación con los ácidos nucleicos naturales. Lo anterior no implica, sin embargo, que no puedan modificarse otros componentes de la muestra. Entre los ácidos nucleicos modificados se incluyen los ácidos nucleicos de origen no natural, por ejemplo ácidos nucleicos que se han modificado mediante la unión a los mismos de grupos que son reactivos, detectables o capaces de ser inmovilizados. Un ejemplo de ellos son los ácidos nucleicos biotinilados.
30

La invención comprende además kits. Los kits conocidos de la técnica comprenden productos de plástico que resultan útiles en el procedimiento de preparación de la muestra. Son ejemplos de los mismos las placas de micropocillos en el formato de 96 ó 384 pocillos, o simplemente las probetas ordinarias fabricadas por, por ejemplo, Eppendorf, Hamburg, Alemania. Los kits de la invención comprende además algunos o todos los demás reactivos para llevar a cabo los métodos según la invención. Por lo tanto, un kit puede contener adicionalmente una fase sólida, es decir, un material con una afinidad para los ácidos nucleicos. Preferentemente, la fase sólida comprende un material con una superficie de sílice. Resulta muy preferente la fase sólida que comprende fibras de vidrio o cuarzo. También muy preferentemente, la fase sólida es una composición que comprende partículas vítreas magnéticas, es decir, partículas magnéticamente atraíbles recubiertas con vidrio. Otro material preferente con una afinidad para los ácidos nucleicos es el intercambiador de aniones. El kit puede comprender además o adicionalmente un tampón de lisis que contenga, por ejemplo, un agente caotrópico, un detergente o mezclas de los mismos. Estos componentes del kit según la invención pueden proporcionarse separadamente en tubos o recipientes de almacenamiento. Dependiendo de la naturaleza de los componentes, estos incluso pueden proporcionarse en un único tubo o recipiente de almacenamiento. El kit puede comprender además o adicionalmente una solución de lavado que resulte adecuada para la etapa de lavado de la fase sólida cuando el ADN o ARN se encuentra unido a la misma. Esta solución de lavado puede contener TDE según la invención y/o un agente caotrópico en una solución o soluciones tamponadas con un pH ácido sin TDE y/o un agente caotrópico tal como se ha indicado anteriormente. Con frecuencia, la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan en forma de soluciones madre que deben diluirse antes de ser utilizadas. El kit puede comprender además o adicionalmente una solución de desorción, es decir, un tampón de elución, es decir una solución para la desorción de los ácidos nucleicos respecto de la fase sólida. Una solución de desorción preferente puede ser un tampón (por ejemplo Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) o agua pura. Además, pueden encontrarse presentes reactivos o soluciones tamponadas adicionales, los cuales pueden utilizarse para el procedimiento de purificación de un ácido nucleico, es decir, ADN o ARN.
35
40
45
50
55

Un aspecto adicional de la invención es un kit de partes, que comprende material de empaquetamiento, recipientes, y (a) TDE, (b) una solución madre concentrada de una sal tampón y un agente caotrópico seleccionado de entre el grupo que consiste de hidrocloreuro de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina, urea, acetato sódico, perclorato de un álcali, halogenuro de un álcali y mezclas de los mismos, y (c) material cromatográfico y de filtración que comprende un material con una superficie capaz de interactuar con los residuos fosfato en el esqueleto de los ácidos nucleicos.
60

Una realización preferente de la presente invención es utilizar los métodos o los kits de la presente invención en métodos automatizables, tal como se describe en, por ejemplo, la patente WO n° 99/16781. La expresión "método automatizable" se refiere a que las etapas del método se llevan a cabo convenientemente con un aparato o máquina capaz de operar con poco o ningún control o influencia externa de un ser humano. La expresión "método automatizado" se refiere a que las etapas del método automatizable se llevan a cabo con un aparato o máquina capaz de operar con poco o ningún control o influencia externa de un ser humano. Únicamente las etapas de preparación para el método puede ser necesario realizarlas manualmente, por ejemplo los recipientes de almacenamiento deben rellenarse y colocarse, la elección de las muestras debe ser realizada por un ser humano y etapas adicionales que son conocidas por el experto en la materia, por ejemplo la operación del ordenador de control. El aparato o máquina puede, por ejemplo, añadir automáticamente líquidos, mezclar las muestras o llevar a cabo etapas de incubación a temperaturas específicas. Típicamente, dicha máquina o aparato es un robot controlado por un ordenador que ejecuta un programa en el que se especifican etapas y comandos individuales. Los métodos automatizados preferentes son aquellos que se llevan a cabo en un formato de alto rendimiento, lo que significa que los métodos y la máquina o aparato utilizado se optimizan para un rendimiento elevado de muestras en un tiempo corto. En otra realización de la invención, los métodos o los kits según la presente invención se utilizan en un procedimiento semiautomatizado, lo que significa que algunas etapas de reacción podrían resultar necesario que se llevaran a cabo manualmente. En una realización preferente de la invención, se obtiene una suspensión que contiene partículas vítreas magnéticas según la presente invención de un recipiente de almacenamiento y se añaden volúmenes parciales a diferentes recipientes de reacción. Los recipientes de reacción pueden ser tubos de reacción realizados en plástico, finalmente en un formato de placa de micropocillos que contiene 96 ó 384 ó más pocillos, en los que se lleva a cabo una reacción. Sin embargo, dichos recipientes pueden ser de otro material, por ejemplo de acero.

Un aspecto adicional de la invención es un kit de partes, que comprende material de empaquetamiento, recipientes, y (a) una suspensión de partículas magnéticas recubiertas de sílice en TDE, y (b) una solución madre concentrada de una sal tampón y un agente caotrópico seleccionado de entre el grupo que consiste de hidrocloreto de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina, urea, acetato sódico, perclorato de un álcali y halogenuro de un álcali.

Algunos de los compuestos orgánicos contemplados por la invención podrían ser capaces de disolver determinados materiales plásticos. De esta manera, al determinar la naturaleza de los recipientes de almacenamiento o de reacción adecuados, el experto en la materia determinará en un número limitado de experimentos obvios, el material que resultará más adecuado para ejecutar los métodos de la invención o para producir los kits según la invención.

En realizaciones preferentes de la invención, los kits según la invención se utilizan para la purificación de ácidos nucleicos en la investigación, los bioanálisis o el diagnóstico. En realizaciones preferentes según la invención, los kits según la invención o los métodos según la invención se utilizan en un formato de alto rendimiento, es decir, en un método automatizado que permite el análisis de un elevado número de muestras diferentes en un tiempo muy corto.

Los ácidos nucleicos aislados utilizando los métodos según la invención pueden utilizarse adicionalmente según resulte necesario. Por ejemplo, pueden utilizarse como sustrato para diversas reacciones enzimáticas. Los ácidos nucleicos pueden utilizarse para un gran número de propósitos, incluyendo la secuenciación, el marcaje radioactivo o no radioactivo, la amplificación de una o más de las secuencias que contienen, la transcripción, la hibridación con ácidos nucleicos sonda marcados, la traducción o la ligación.

Todavía un aspecto adicional de la invención es un método para determinar la presencia de un ácido nucleico en una muestra, que comprende las etapas de: (a) opcionalmente lisar la muestra, (b) formar una composición que contiene: (i) la muestra o a la muestra lisada de la etapa (a), (ii) un tampón acuosa, (iii) un agente caotrópico, y (iv) TDE, en la que la muestra se disuelve en la composición líquida, (c) poner en contacto la composición de la etapa (b) con una fase sólida, adsorbiendo de esta manera el ácido nucleico sobre la fase sólida, (d) separar la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido de la fase líquida, (e) opcionalmente lavar con una solución de lavado la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido, seguido de (f) poner en contacto la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido con una solución acuosa de adsorción que contiene solutos a una concentración más baja que la composición de la etapa (b), desorbiendo de esta manera el ácido nucleico de la fase sólida y disolviendo el ácido nucleico en la solución, seguido de (g) separar la solución con el ácido nucleico, de la fase sólida, purificando de esta manera el ácido nucleico, y (h) detectar en la solución de la etapa (g) la presencia del ácido nucleico, determinando de esta manera la presencia del ácido nucleico.

Resulta preferente que la muestra sea una muestra biológica. Preferentemente, el ácido nucleico se determina mediante amplificación del ácido nucleico mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores específicos, una sonda de detección específica, y una mezcla de amplificación, en la que se lleva a cabo un seguimiento de la amplificación en tiempo real. También resulta preferente determinar el ácido nucleico mediante

hibridación del mismo con una sonda de hibridación y detectar y/o cuantificar el híbrido. El experto en la materia conoce el hecho de que no sólo un ácido nucleico puede servir como sonda de hibridación, sino que también puede utilizarse un ácido nucleico que comprende uno o más análogos nucleósidos. Además, los análogos de ácidos nucleicos, tales como APN, es conocido de la técnica que son capaces de formar híbridos detectables con ácidos nucleicos. Se entiende que el ácido nucleico que debe determinarse es ADN o ARN. Resulta muy preferente que el método anteriormente descrito, en el que el ácido nucleico es ARN y la etapa (h) comprende (i) transcribir inversamente el ARN para formar un ADNc, (ii) amplificar seguidamente, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, el ADNc, (iii) detectar la presencia del ADNc, determinando de esta manera la presencia del ácido nucleico.

Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a comprender la presente invención.

Descripción de las figuras

- Figura 1 Ácidos nucleicos totales aislados a partir de sangre completa-EDTA con diferentes aditivos de unión (ver el Ejemplo 1) tras la electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio. Se aplicaron volúmenes similares de eluido. Cada carril individual se encuentra numerado. Los carriles 1 y 18 muestran el estándar de tamaño VI (nº de catálogo 10236250001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania); los carriles 2 y 19 muestran el estándar de tamaño II (nº de catálogo 10236250001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania); carril 3: éter dimetílico de tetraetilenglicol (TDE); carril 4: glicerol formal; carril 5: éter dimetílico de tetraetilenglicol (TDE); carril 6: metiletilcetona; carril 7: éter dimetílico de propilenglicol (dimetoxipropano); carril 8: éter dietílico de etilenglicol (dietoxietano); carril 9: éter monometílico de propilenglicol; carril 10: tetrahidrofurano; carril 11: polietilenglicol-1000; carril 12: 1,3-dioxolano; carril 13: hidroxiacetona; carril 14: etanol; carril 15: isopropanol; carril 16: etil-lactato; carril 17: acetona
- Figura 2 Efecto del uso combinado de TDE y glicerol formal para la purificación de ácidos nucleicos totales a partir de células K562 (Ejemplo 2).
- Figura 3 Ácidos nucleicos aislados/purificados con etanol y TDE como aditivos en el tampón de lavado. Tras la desorción, se sometieron volúmenes iguales de eluido a electroforesis en gel de agarosa al 1%. El gel se tiñó con bromuro de etidio. Para más detalles ver los Ejemplos 3 (referido a los carriles 1 a 6) y 4 (referido a los carriles 7 a 13). Carril VI: estándar de tamaño de ADN VI (nº de catálogo 10236250001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania)
carriles 1 a 3: preparación de ácidos nucleicos de células k562 utilizando etanol en tampones de lavado
carriles 4 a 6: preparación de ácidos nucleicos de células k562 utilizando TDE en tampones de lavado
carriles 7 a 9: fragmentos de ADN recuperados utilizando etanol en tampones de lavado
carriles 10 a 12: fragmentos de ADN recuperados utilizando TDE en tampones de lavado
carril 13: fragmentos de ADN, solución no tratada
- Figura 4 Una alícuota de eluido que contenía 500 ng de ácidos nucleicos aislados se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% que se tiñó posteriormente con bromuro de etidio.
carril 1: estándar de tamaño VI (nº de catálogo 11062590001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania)
carril 2: estándar de tamaño II (nº de catálogo 10236250001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania)
carriles 3 a 6: partículas magnéticas suministradas en forma de suspensión en TDE
carriles 7 a 10: partículas magnéticas suministradas en forma de suspensión en éter dietílico de dietilenglicol
carriles 11 a 14: partículas magnéticas suministradas en forma de suspensión de partículas magnéticas suministradas en forma de suspensión en isopropanol
carril 15: estándar de tamaño VI (nº de catálogo 11062590001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania)
carril 16: estándar de tamaño II (nº de catálogo 10236250001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania)
- Figura 5 Unión de moléculas de ácidos nucleicos de bajo peso molecular de diversos tamaños utilizando diferentes concentraciones de TDE en la etapa de unión.
carril 1: 100 ng de ARNmi16 prepurificado, sin tratar
carril 2: 50 ng de ARNmi16 prepurificado, sin tratar
carril 3: adsorción en TDE al 35% [v/v]
carril 4: adsorción en TDE al 40% [v/v]
carril 5: adsorción en TDE al 45% [v/v]

carril 6: adsorción en TDE al 50% [v/v]
 carril 7: adsorción en TDE al 55% [v/v]

5
 10
 15

Figura 6A Purificación de moléculas de ácidos nucleicos de bajo peso molecular utilizando dos separaciones consecutivas con columnas de centrifugación: se utilizaron diferentes concentraciones de TDE (tal como se indica posteriormente) para la adsorción a la primera columna. Los carriles 4 a 10 indican los ácidos nucleicos separados de la solución de adsorción con la primera columna y eluidos de la misma.

carril 1: 100 ng de ARNmi16 prepurificado, sin tratar
 carril 2: 50 ng de ARNmi16 prepurificado, sin tratar
 carril 3: 25 ng de ARNmi16 prepurificado, sin tratar
 carril 4: TDE al 0% [v/v]
 carril 5: TDE al 5% [v/v]
 carril 6: TDE al 10% [v/v]
 carril 7: TDE al 15% [v/v]
 carril 8: TDE al 20% [v/v]
 carril 9: TDE al 25% [v/v]
 carril 10: TDE al 30% [v/v]

20
 25
 30
 35
 40

Figura 6 B Se adsorbieron moléculas de ácido nucleico de bajo peso molecular a una segunda columna de centrifugación procedentes del eluido de la primera columna de centrifugación utilizando una concentración final de TDE de 40% [v/v] en cada caso. Los carriles 4- indican los ácidos nucleicos purificados de bajo peso molecular que se eluyeron de la segunda columna respectiva posteriormente a la separación con una concentración dada de TDE para la primera columna.

carril 1: 100 ng de ARNmi16
 carril 2: 50 ng de ARNmi16
 carril 3: 25 ng de ARNmi16
 carril 4: eluido de la segunda columna después de la adsorción con TDE al 0% [v/v] en la primera columna
 carril 5: eluido de la segunda columna después de la adsorción con TDE al 5% [v/v] en la primera columna
 carril 6: eluido de la segunda columna después de la adsorción con TDE al 10% [v/v] en la primera columna
 carril 7: eluido de la segunda columna después de la adsorción con TDE al 15% [v/v] en la primera columna
 carril 8: eluido de la segunda columna después de la adsorción con TDE al 20% [v/v] en la primera columna
 carril 9: eluido de la segunda columna después de la adsorción con TDE al 25% [v/v] en la primera columna
 carril 10: eluido de la segunda columna después de la adsorción con TDE al 30% [v/v] en la primera columna

45

Figura 7 Detección de mir17a en aislados procedentes de tejidos de ratón utilizando un ensayo específico de RT-PCR y amplificación Light Cycler. Se aislaron los ácidos nucleicos totales y moléculas de ácidos nucleicos pequeñas, de tamaño inferior a 150 nucleótidos (es decir, microARN) a partir de tejido hepático y renal con el protocolo de una columna o de dos columnas, respectivamente, y se detectaron utilizando una Q-RT-PCR (PCR cuantitativa tras la transcripción inversa). La tabla muestra en qué ciclo de amplificación se detectó el ARNmi 17a.

50
 55
 60

Figura 8 Optimización de la concentración de intensificador de unión en la columna 1 para la purificación de ARNmi procedente de tejido. Se utilizaron diferentes concentraciones de TDE (tal como se indica posteriormente) para la adsorción a la primera columna. Los carriles 8 a 11 indican los ácidos nucleicos separados de la solución de adsorción con la primera columna a las concentraciones de TDE indicadas y eluidos de la misma. Se adsorbieron moléculas pequeñas de ácido nucleico a una segunda columna de centrifugación procedentes del eluido de la primera columna de centrifugación utilizando una concentración final de TDE de 40% [v/v] en cada caso. Los carriles 4 a 7 indican los ácidos nucleicos purificados de bajo peso molecular que se eluyeron de la segunda columna respectiva posteriormente a la separación con una concentración dada de TDE para la primera columna. Carril 1: 100 ng de ARNmi16 sintético; carril 2: 50 ng de ARNmi16 sintético; carril 3: 25 ng de ARNmi16 sintético; carril 4: eluido de la segunda columna después de la adsorción con TDE al 10% [v/v] en la primera columna; carril 5: eluido de la segunda columna después de la adsorción con TDE al 15% [v/v] en la primera columna; carril 6: eluido de la segunda columna después de la adsorción con TDE al 20% [v/v] en la primera columna; carril 7: eluido de la segunda columna después de la adsorción con TDE al 25% [v/v] en la primera columna; carril 8: TDE al 10% [v/v] ; carril 9: TDE al 15% [v/v] ; carril 10: TDE al 20% [v/v] ;

ES 2 394 815 T3

carril 11: TDE al 25% [v/v] ; carril 12: 50 ng de ARNmi16 sintético

5 Todos los Ejemplos proporcionados a continuación se llevaron a cabo como variaciones del flujo de trabajo estándar del kit de preparación de moldes de PCR High Pure, manual del usuario versión Abril 2005, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n° de catálogo 11796828001. A menos que se indique lo contrario, todas las etapas de trabajo se llevaron a cabo tal como se indica en dicho manual del usuario.

Ejemplo 1

10 Purificación de ácidos nucleicos totales a partir de muestras de sangre

El flujo de trabajo para la purificación de los ácidos nucleicos (AN) incluía las etapas siguientes: lisis de la muestra con el fin de que los ácidos nucleicos fueran accesibles al procedimiento de purificación. Adsorción de los AN a la fase sólida, separación de la fase sólida de la fase líquida y lavado de la fase sólida con los AN unidos y desorción de los AN de la fase sólida.

15 Cada muestra consistía de un volumen de 200 µl de sangre completa-EDTA. La fase sólida utilizada era tejido de sílice presente en las columnas de centrifugación HIGH PURE (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Los compuestos sometidos a ensayo para el incremento de la unión al tejido de sílice se seleccionaron de la Tabla 1, excepto aquellos que mostraban propiedades tóxicas. Se excluyeron los compuestos tóxicos.

20 Se agrupó la sangre-EDTA y se sometieron alícuotas a aislamiento de ácidos nucleicos según el protocolo siguiente: se mezclaron 200 µl de sangre completa-EDTA con 200 µl de tampón de unión (HCl de guanidina 6 M, MES 100 mM, Triton X-100 al 18,5% [v/v], pH 5,7) y 40 µl de solución de proteinasa K (20 µg/µl disueltos en agua bidestilada).
 25 La mezcla se incubó durante 10 minutos a 70°C para llevar a cabo la lisis. A continuación, se añadieron 100 µl de una de las sustancias listadas en la Tabla 2 a una muestra lisada. La mezcla se aplicó a una columna de centrifugación (columna de centrifugación High Pure, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) para el procesamiento posterior. La manipulación de las columnas, así como el lavado y la elución, se llevaron a cabo según las instrucciones en el paquete del kit de preparación de moldes de PCR High Pure, versión Abril 2005 (n° de catálogo 11796828001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).
 30

Rendimiento y pureza de ácidos nucleicos obtenidos de 200 µl de sangre completa-EDTA.			
Sustancia	rendimiento (ng)	pureza	clasificación de riesgo
éter dimetílico de tetraetilenglicol (TDE)	3975,32	1,88	
glicerolformal	3856,59	1,84	
éter dietílico de dietilenglicol	3697,14	1,87	Xi
metiletilcetona	3606,98	1,87	F, Xi
éter dimetílico de propilenglicol (dimetoxipropano)	3590,64	1,87	F
éter dietílico de etilenglicol (dietoxietano)	3530,66	1,88	Xi
acetato del éter monometílico de propilenglicol	3526,20	1,85	Xi
tetrahidrofurano	3399,51	1,88	F, Xi
polietilenglicol 1000	3307,32	1,93	
1,3-dioxolano	2988,81	1,88	F, Xi
hidroxiacetona	2601,50	1,87	
etanol	2572,52	1,90	F
isopropanol	2561,75	1,90	F, Xi
lactato de etilo	2403,28	1,83	Xi
acetona	1884,73	1,89	F, Xi

35 Se determinó el rendimiento mediante la medición de la DO a 260 nm y multiplicando el valor de extinción por 50 (para ácidos nucleicos de doble cadena) o por 40 (para ácidos nucleicos de cadena sencilla).

Se evaluó la pureza mediante la medición de la extinción del eluido a 260 nm y a 280 nm, y calculando el cociente 260/280 nm.

40 La integridad de los ácidos nucleicos aislados mediante dicho método se muestra en la figura 1. En conclusión, la utilización de éter dimetílico de tetraetilenglicol (TDE), así como de glicerolformal, conduce a un rendimiento de ácidos nucleicos aislados a partir de 200 µl de sangre-EDTA completa superior al alcanzado con otras sustancias. Además, dichos dos compuestos resultan particularmente ventajosos debido a su toxicidad muy baja e incluso nula.

Ejemplo 2

Purificación de ácidos nucleicos totales a partir de muestras de cultivo de tejidos

- 5 El flujo de trabajo para la purificación de los ácidos nucleicos (AN) incluía las etapas siguientes: lisis de la muestra con el fin de que los ácidos nucleicos fueran accesibles al procedimiento de purificación. Adsorción de los AN a la fase sólida, separación de la fase sólida de la fase líquida y lavado de la fase sólida con los AN unidos y desorción de los AN de la fase sólida.
- 10 Se purificaron los ácidos nucleicos totales de 1×10^6 células K562. Se resuspendieron células sedimentadas en 200 μ l de tampón PBS. A continuación, se añadieron y se mezclaron 200 μ l de tampón de unión (HCl de guanidina 6 M, MES 100 mM, Triton X-100 al 18,5% [v/v], pH 5,7) y una cantidad medida de TDE (concentración final de TDE: 10%, 20% y 40% [v/v]). Se aplicó cada muestra a una columna de centrifugación (columna de centrifugación High Pure, [nº de catálogo] Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se procesó siguiendo el procedimiento estándar
- 15 (kit de preparación de muestras de PCR High Pure, manual del usuario versión abril 2005, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 11796828001). Para el uso combinado de TDE y glicerol formal se utilizó un flujo de trabajo experimental similar. Únicamente se cambió el tampón de unión a HCl de guanidina 6 M, MES 100 mM, glicerol formal al 10% [v/v], Triton X-100 al 18,5% [v/v], pH 5,7. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 2. Mediante la utilización de una combinación de TDE y glicerol formal en el procedimiento de
- 20 purificación, pudo incrementarse el rendimiento de ácidos nucleicos en comparación con la utilización de TDE solo.

Ejemplo 3

Purificación de ácidos nucleicos a partir de muestras de cultivo de tejidos

- 25 Se purificaron los ácidos nucleicos de 1×10^6 células K562. Se resuspendieron células sedimentadas en 200 μ l de tampón PBS. A continuación, se añadieron y se mezclaron 200 μ l de tampón de unión (HCl de guanidina 6 M, MES 100 mM, Triton X-100 al 18,5% [v/v], pH 5,7) y 100 μ l de TDE. Se aplicó cada muestra a una columna de centrifugación (columna de centrifugación High Pure, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se procesó
- 30 siguiendo el procedimiento estándar (kit de preparación de muestras de PCR High Pure, manual del usuario versión abril 2005, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 11796828001). Se utilizó un primer y un segundo tampón de lavado consecutivamente en cada procedimiento de aislamiento/purificación. Para preparar el primer tampón de lavado (tampón de eliminación de inhibidor), se añadió un volumen de 20 ml de TDE o etanol a un volumen de 33 ml de solución madre concentrada de tampón de lavado 1 para formar un tampón en el que la
- 35 concentración final de TDE o etanol es aproximadamente 39% [v/v], conjuntamente con los ingredientes restantes: HCl de guanidina 5 M, HCl de Tris 20 mM, pH 6,6 (25°C) (concentraciones finales después de la adición de TDE/etanol). Para preparar el segundo tampón de lavado (tampón de desalación), se añadió etanol o TDE a una solución madre de tampón de lavado 2 para formar un tampón en el que la concentración final de TDE o etanol
- 40 fuese aproximadamente del 80% [v/v], conjuntamente con los ingredientes restantes: HCl de guanidina 20 mM, HCl de Tris 20 mM, pH 7,5 (25°C) (concentraciones finales después de la adición de TDE/etanol). Se llevaron a cabo las comparaciones, en las que se aplicaron tres etapas de lavado a cada muestra, con tampones de lavado que contenían etanol o TDE. La primera etapa de lavado se llevó a cabo con el primer tampón de lavado, seguido de dos
- 45 etapas de lavado con el segundo tampón de lavado. A continuación, se desorbieron los ácidos nucleicos de la fase sólida. Excepto por los detalles proporcionados anteriormente, todas las etapas adicionales del flujo de trabajo se llevaron a cabo según el procedimiento estándar proporcionado por el fabricante (ver el manual para el kit de preparación de moldes de PCR High Pure, manual del usuario versión abril 2005, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

Tabla 3:

Comparación entre TDE y etanol como aditivos en los tampones de lavado	
muestra	rendimiento [μ g]
Ácidos nucleicos de células K562 utilizando etanol en los tampones de lavado	22,43
Ácidos nucleicos de células K562 utilizando TDE en los tampones de lavado	22,62

- 50 Se determinó el rendimiento tal como se indica en el Ejemplo 1.

La figura 3 ilustra un gel de agarosa que se utilizó con los ácidos nucleicos aislados con el fin de demostrar su integridad.

55

Ejemplo 4

Recuperación de ADNdc de entre 50 y 400 pb a partir de una fase acuosa

- 5 Con el fin de específicamente realizar un seguimiento de la recuperación de fragmentos de ADNdc de un tamaño entre 50 y 400 pb, se utilizó en el experimento una solución que contenía 1,5 µg de un fragmento de 50 pb y 1,5 µg de un fragmento de 400 pb. Se mezclaron 100 µl de la solución de ADN con 200 µl de tampón de unión (SCN de guanidina 3 M, dioxolano al 6,25% [v/v], BES 200 mM, Triton al 7,5% [v/v], pH 7,0) y 200 µl de TDE. Tras la unión, se llevó a cabo el procedimiento de lavado tal como se indica en el Ejemplo 3. Nuevamente se comparó el etanol con el TDE en los tampones de lavado. La Tabla 4 indica los resultados.

Tabla 4:

Aislamiento de moléculas pequeñas de ADN, comparación entre TDE y etanol como aditivos en los tampones de lavado		
muestra	rendimiento [µg]	recuperación [%]
fragmentos de ADN purificados utilizando etanol en los tampones de lavado	2,98	87,86
fragmentos de ADN purificados utilizando TDE en los tampones de lavado	3,13	92,27

- 15 Se determinó el rendimiento tal como se indica en el Ejemplo 1.

La integridad de los ácidos nucleicos aislados/purificados con el procedimiento anterior se muestra en la figura 3.

Ejemplo 5

- 20 Evaporación de aditivos de las composiciones líquidas

- 25 Se investigó el efecto de la evaporación de los solventes orgánicos como aditivos en las composiciones líquidas para el aislamiento/purificación de los ácidos nucleicos. Se sometieron a ensayo varias composiciones, en las que las composiciones incluían solventes orgánicos con diferencias de presión de vapor, las cuales indican diferentes tasas de evaporación. La evaporación afecta a la estabilidad de un reactivo, así como a la reproducibilidad del procedimiento en el que se utiliza el reactivo. Esto resulta especialmente cierto en el caso de sistemas automatizados de purificación de ácidos nucleicos.

- 30 Se determinó la tasa de evaporación de tampones de diferente composición. Se mezcló un volumen de 200 µl de agua con 200 µl de tampón de unión que contenía HCl de guanidina 6 M, urea 10 mM, HCl de tris 10 mM, Triton X-100 al 20% (v/v), pH 4,4 (25°C) y 100 µl de una sustancia listada posteriormente, en la Tabla 5. La incubación de las mezclas se llevó a cabo durante 30 minutos a 30°C en tubos Eppendorf de 1,5 ml estándar, dejando las tapas abiertas. Se evaporó la evaporación pesando cada tubo antes y después de la incubación y tabulando las pérdidas de peso.

Tabla 5:

Evaporación de diferentes sustancias tras 30 minutos a partir de soluciones al 20% [v/v]		
Sustancia	presión de vapor a 20°C [en mm Hg]	pérdida de peso [en µg]
Éter dimetílico de tetraetilenglicol (TDE)	<0,01	3,3
Éter dietílico de dietilenglicol	0,5	3,3
lactato de etilo	2	3,6
hidroxiacetona	5,6	4,7
Glicerolformal	n/a	5,2
Éter dimetílico de dietilenglicol	3	6,0
Polietilenglicol 1000	n/a	8,2
Acetato del éter monometílico de propilenglicol	3,7	8,3
Etanol	44,6	9,3
Isopropanol	33	14,0
Éter dietílico de etilenglicol	9,4	14,4
1,3-Dioxolano	70	21,1
Éter dimetílico de propilenglicol	40	21,5
Metiletilcetona	71	28,6
Acetona	184	32,3
Tetrahidrofurano	143	44,4

- 35

Al analizar las magnitudes de la pérdida de peso, debe apreciarse que la materia evaporado también puede comprender agua, aparte del solvente orgánico analizado. La pérdida más alta se observó para el tampón que contenía tetrahidrofurano. Se evaporaron aproximadamente 44,4 µg del volumen de 500 µl tras 30 minutos. Sin embargo, del tampón que contenía TDE sólo se evaporaron aproximadamente 3,3 µg. El presente ejemplo demuestra las superiores propiedades de las sustancias con baja presión de vapor, particularmente las de TDE, en comparación con sustancias que muestran una tasa de evaporación elevada (es decir, tetrahidrofurano, acetona, etc.).

Ejemplo 6

Flujo de trabajo automatizado de aislamiento/purificación de ácidos nucleicos

Para la demostración de un flujo de trabajo automatizado, para la evaluación se utilizó un instrumento de CL MagnaPure (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Se purificaron los ácidos nucleicos totales de 1×10^6 células K562 en cultivo. Para el procedimiento se utilizó el kit de aislamiento de ADN de CL MagNA Pure (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). El procedimiento estándar según las instrucciones del proveedor que utilizaba partículas magnéticamente atraíbles disueltas en isopropanol se comparó con un procedimiento con una cantidad similar de partículas magnéticas, aunque disueltas en TDE o en éter dietílico de dietilenglicol. Aparte de dicha variación, el flujo de trabajo se llevó a cabo exactamente según las instrucciones en el paquete del kit de aislamiento de grandes volúmenes de ADN de CL MagNA Pure (versión mayo 2006), nº de cat. 03310515001.5.

Tabla 6:

Rendimiento y pureza de ácidos nucleicos aislados de 10^6 células K562 utilizando el instrumento MagNA Pure y diversos aditivos en el medio de adsorción	
Partículas magnéticas disueltas en:	rendimiento (µg)
Éter dimetílico de tetraetilenglicol	18,4
Isopropanol	10,8
Éter dietílico de dietilenglicol	8,1

Se determinó el rendimiento tal como se indica en el Ejemplo 1.

La Tabla 5 muestra los valores promedio obtenidos en 4 análisis experimentales para cada valor. En el flujo de trabajo automatizado del instrumento MagNA Pure, el éter dimetílico de tetraetilenglicol mostró un mejor rendimiento que el isopropanol y el éter dietílico de dietilenglicol. Se sometió a ensayo la integridad de los ácidos nucleicos aislados mediante separación de tamaños utilizando electroforesis en gel de agarosa y tinción de bromuro de etidio (ver la figura 4).

Ejemplo 7

Unión de moléculas de ácidos nucleicos de diversos tamaños utilizando diferentes concentraciones de TDE en la etapa de unión.

Se mezclaron ácidos nucleicos de diversos tamaños procedentes de una muestra biológica con moléculas de ARN pequeñas (en este caso con microARN=ARNmi). Se diseñó el experimento para determinar bajo qué condiciones los ácidos nucleicos pequeños, de menos de 150 bases, podían aislarse conjuntamente con ácidos nucleicos de tamaño mayor. Se disolvieron muestras consistentes de: (i) 10^6 células K562, o (ii) 1 µg de ARNmi 16 prepurificado (suministrado por Metabion, Martinsried, Alemania) separadamente en 300 µl de tampón de unión "C45G45T" que contenía citrato sódico 200 mM, pH 4,5, SCN de guanidina 4,5 M y Triton X-100 al 2,5% [v/v]. A continuación, se mezclaron volúmenes iguales de las dos muestras. Se añadió TDE a la solución a una concentración final de entre 35% [v/v] y 55% [v/v] y se mezcló durante 10 s en un mezclador vórtex. A continuación, cada mezcla se aplicó a una columna High Pure del kit de purificación de productos de PCR High Pure (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº 11 732 668 001). Las columnas se centrifugaron durante 30 s a 13.100xg. Se descartaron los eluidos. A continuación, las columnas se lavaron con 500 µl del tampón de lavado reconstituido con etanol suministrado con el kit de purificación de productos de PCR High Pure. Tras la adición de etanol, el tampón de lavado reconstituido consistía de etanol al 80% [v/v], NaCl 20 mM, HCl de Tris 2 mM, pH 7,5. Se llevó a cabo la elución posteriormente, con 100 µl de tampón de desorción que contenía HCl de Tris 10 mM, pH 8,5. Se sometió a electroforesis una alícuota de 10 µl de cada fracción, en geles de acrilamida al 15% con tampón de análisis de TBE/urea (Invitrogen).

La figura 5 muestra que una concentración de 40% de TDE resultaba necesaria para la unión óptima del ARNmi, mientras que los ácidos nucleicos de peso molecular más alto se unían también a una concentración de TDE más baja.

Ejemplo 8

Purificación de moléculas de ácidos nucleicos de bajo peso molecular utilizando dos separaciones consecutivas con columnas de centrifugación

5 Se separaron ácidos nucleicos pequeños, de tamaños inferiores a 150 nucleótidos (es decir, microARN) a partir de una muestra biológica que contenía moléculas de ácidos nucleicos de diversos tamaños. Se disolvieron muestras consistentes de 10^6 células K562, ó 1 μg de ARNmi 16 sintetizado químicamente separadamente en 300 μl de tampón de unión "C45G45T" que contenía citrato sódico 200 mM, pH 4,5, SCN de guanidina 4,5 M y Triton X-100 al 2,5% [v/v]. A continuación, se mezclaron volúmenes iguales de las dos muestras. Se añadió TDE a la solución, resultando en una concentración final de entre 0% [v/v] y 30% [v/v] y mezcló durante 10 s. A continuación, se aplicó cada mezcla a una columna High Pure del kit de purificación de productos de PCR High Pure (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº 11 732 668 001). Las columnas se centrifugaron durante 30 s a 13.100xg. Se recogieron los eluidos y se añadió TDE a una concentración final del 40% de TDE en cada muestra. Tras mezclar con agitador vórtex durante 10 s, las mezclas se aplicaron a un segundo conjunto de columnas High Pure y se centrifugaron durante 30 s a 13.100xg. A continuación, se lavaron dos veces el primer y el segundo conjunto de columnas con 500 μl de tampón de lavado cada uno, consistiendo el tampón de etanol al 80% [v/v], NaCl 20 mM, HCl de Tris 2 mM, pH 7,5, del kit de purificación de productos de PCR High Pure.

20 Se llevó a cabo la elución posteriormente, con 100 μl de tampón de desorción que contenía HCl de Tris 10 mM, pH 8,5.

25 Se sometieron a electroforesis alícuotas de 10 μl de todas las fracciones (eluidos de la primera y segunda columnas) en geles de acrilamida al 15% con tampón de análisis de TBE/urea (Invitrogen).

30 La figura 6A muestra que en la primera columna el ARNmi no se había unido eficientemente a concentraciones inferiores a 30% de TDE, en contraste con los ácidos nucleicos de peso molecular más alto. Por lo tanto, el ARNmi no era detectable en los eluidos de la primera columna. Sin embargo, se unía a una concentración de 40% de TDE en la segunda columna. La figura 6B muestra los eluidos de ARNmi de la segunda columna. En particular puede observarse que en el carril 10 (30% de TDE en la primera columna), únicamente se eluía ARNmi de la segunda columna. Se purificó esencialmente el ARNmi respecto de las especies de ácidos nucleicos de mayor tamaño.

Ejemplo 9

35 Aislamiento de ácidos nucleicos y posterior detección

Se aislaron moléculas pequeñas de ácidos nucleicos, de tamaños inferiores a 150 nucleótidos (es decir, microARN) a partir de tejido hepático y renal, y se detectaron utilizando un protocolo de Q-RT-PCR (reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa-transcripción inversa).

40 Se congelaron en nitrógeno líquido muestras de trozos pequeños de tejido hepático o renal de ratón y se pulverizaron en un mortero bajo enfriamiento. A continuación, se disolvieron alícuotas de 10 mg de las muestras en 300 μl de tampón de unión "M55G45T" que contenía MES 500 mM, pH 5,5, SCN de guanidina 4,5 M y Triton X-100 al 2,5% [v/v].

45 A continuación, se aplicó un procedimiento de una columna para aislar los ácidos nucleicos totales o un procedimiento con dos columnas consecutivas, con el fin de purificar ARNmi a partir de los ácidos nucleicos totales.

Protocolo de una columna:

50 Se añadió a un volumen de 300 μl de cada muestra lisada (preparada tal como se ha indicado anteriormente), TDE hasta alcanzar una concentración final de 40% [v/v] y se mezcló durante 10 s. A continuación, las mezclas completas se aplicaron a columnas High Pure del kit de purificación de productos de PCR High Pure (Roche), nº 11 732 668 001 y se centrifugaron durante 30 s a 13.100xg. Se descartaron los eluidos. Las columnas se lavaron dos veces cada una con 500 μl de tampón de lavado que consistía de etanol al 80% [v/v], NaCl 20 mM, HCl de Tris 2 mM, pH 7,5, del kit de purificación de productos de PCR High Pure. Se llevó a cabo la elución posteriormente con 100 μl de tampón de desorción en cada columna, conteniendo el tampón HCl de Tris 10 mM, pH 8,5.

Procedimiento con dos columnas consecutivas:

60 Se añadió a un volumen de 300 μl de cada muestra lisada (preparada tal como se ha indicado anteriormente), TDE hasta alcanzar una concentración final de 20% [v/v] y se mezcló durante 10 s. A continuación, las mezclas completas se aplicaron a columnas High Pure del kit de purificación de productos de PCR High Pure (Roche), nº 11 732 668 001 y se centrifugaron durante 30 s a 13.100xg. Se descartaron los eluidos. Se añadió TDE a cada muestra eluida,

- 5 resultando en una concentración final de TDE de 40% (v/v) en cada muestra. Tras mezclar con agitador vórtex durante 10 s, se aplicó cada mezcla a una segunda columna High Pure. A continuación, se centrifugó cada columna durante 30 s a 13.100xg. Se lavó dos veces cada columna del primer y el segundo conjuntos, con un volumen de 500 µl de tampón de lavado que consistía de etanol al 80% [v/v], NaCl 20 mM, HCl de Tris 2 mM, pH 7,5, del kit de purificación de productos de PCR High Pure. Se llevó a cabo la elución posteriormente con 100 µl de tampón de desorción en cada columna, conteniendo el tampón HCl de Tris 10 mM, pH 8,5.
- 10 Diez ng de los ácidos nucleicos ARN totales purificados con el protocolo de una columna y la misma alícuota de la muestra original procedente de la fracción purificada de ácidos nucleicos pequeños (que contenía ARNmi) del protocolo de dos columnas (ver el Ejemplo 8) se transcribieron inversamente y se amplificaron por PCR en el LightCycler 480 de Roche utilizando el kit de ARNmi hsa-let-7a con el protocolo de ensayo de microARN TaqMan de Applied Biosystems. El cebador para la transcripción inversa y los cebadores de PCR se encontraban contenidos en el kit de Applied Biosystems.
- 15 En la fig. 7 se muestra el resultado de la amplificación por PCR en el LightCycler 480. Puede observarse que el protocolo de 1 columna, así como el protocolo de 2 columnas rinden señales en ciclos de amplificación similares (valores de CP): para el tejido hepático CP 21,89 (con el protocolo de una columna, ver el Ejemplo 7), comparado con CP 21,55 (con el protocolo de dos columnas). Con el tejido renal, el CP para la muestra purificada de ARNmi apareció antes: CP 20,89 (con el protocolo de dos columnas), comparado con las muestras con los ácidos nucleicos
- 20 totales: CP 21,72 (con el protocolo de una columna). Los controles negativos de ausencia de transcriptasa inversa y el control sin molde no rindieron señales para ninguna de las muestras de ARN aisladas, tal como se esperaba. Lo anterior demuestra que el protocolo de purificación es compatible con la transcripción inversa posterior y la detección en las etapas de amplificación por PCR.
- 25 **Ejemplo 10**
- Aislamiento de ácidos nucleicos pequeños de tejidos, incluyendo la digestión con proteinasa K
- 30 Se congelaron en nitrógeno líquido muestras de trozos pequeños de tejido hepático de ratón y se pulverizaron en un mortero bajo enfriamiento. A continuación, se disolvieron alícuotas de 10 mg de las muestras en 100 µl de tampón de lisis de tejidos [que consistía de urea 4 M, NaCl 100 mM, EDTA 260 mM, HCl de Tris 200 mM, pH 7,3-7,4] del kit High Pure para ARN incluido en parafina (Roche), nº de catálogo 03 270 289 001. A continuación, se añadieron a cada muestra 16 µl de SDS al 10% y 40 µl de solución de trabajo de proteinasa K del kit High Pure para ARN en parafina (Roche), nº de catálogo 03 270 289 001).
- 35 A continuación, las muestras se agitaron con vórtex tres veces, cada vez durante 5 s, y se incubaron durante 1 h a 55°C. Seguidamente se añadieron 325 µl de tampón de unión [que consistía de GuSCN 5 M, HCl de Tris 50 mM, Triton X-100 al 20% (p/v), DTT al 1% (p/v), pH 6,0] del kit High Pure para ARN en parafina (Roche), nº de catálogo 03 270 289 001 y se añadieron 325 µl de TDE y se agitaron con vórtex durante 3x5 s. El pH final de esta mezcla era de 7,3.
- 40 A continuación, las mezclas se aplicaron a columnas High Pure del kit de purificación de productos de PCR High Pure (Roche), nº de catálogo 11 732 668 001 y se centrifugaron durante 30 s a 13.100xg. Se recogieron los eluidos. Se añadió TDE a cada muestra eluida, resultando en una concentración final de TDE de 40% [v/v] en cada muestra.
- 45 Tras mezclar con agitador vórtex durante 10 s, se aplicó cada mezcla a una segunda columna High Pure. A continuación, se centrifugó cada columna durante 30 s a 13.100xg. Se lavó dos veces cada columna del primer y el segundo conjuntos, con un volumen de 500 µl de tampón de lavado [que consistía de etanol al 80% [v/v], NaCl 20 mM, HCl de Tris 2 mM, pH 7,5], del kit de purificación de productos de PCR High Pure. Se llevó a cabo la elución posteriormente con 100 µl de tampón de desorción en cada columna, conteniendo el tampón HCl de Tris 10 mM, pH
- 50 8,5.
- Se sometió a electroforesis una alícuota de 10 µl de cada fracción, en geles de acrilamida al 15% con tampón de análisis de TBE/urea (Invitrogen).
- 55 La figura 8 muestra que resultaba necesaria una concentración de TDE del 20% en la primera columna para unir todas las especies de mayor tamaño de ácidos nucleicos (carriles 6 y 10), mientras que a concentraciones más bajas de TDE, los ácidos nucleicos se copurificaban con el ARNmi (carriles 4 y 5). A una concentración de TDE del 25% en la primera columna se observó algo de ARNmi unido a la primera columna (carril 11).

Ejemplo 11

Recuperación de moléculas de ácidos nucleicos pequeños a partir de sílice tras la adsorción a diferentes valores de pH

5 Se prepararon muestras ajustadas a diferentes valores del pH. Cada muestra consistía de una solución de adsorción que contenía 2 µg de ADNdc con un tamaño de aproximadamente 400 pb y 2 µg de ADNdc con un tamaño de aproximadamente 50 pb (resultando en un total de 4 µg de moléculas de ácidos nucleicos en cada muestra), isotiocianato de guanidina 1,6 M, MES 20 mM y 40% [v/v] de TDE. Las muestras se prepararon idénticamente, con la excepción de que se ajustaron diferentes valores de pH. Se aplicaron soluciones de adsorción a columnas High Pure del kit de purificación de productos de PCR High Pure (Roche), nº de catálogo 11 732 668 001 y se centrifugaron durante 30 s a 13.100xg. Se lavó cada columna una vez con un volumen de 500 µl de tampón de lavado [que consistía de etanol al 80% [v/v], NaCl 20 mM, Tris-HCl 2 mM, pH 7,5] del kit de purificación de productos de PCR High Pure. Se llevó a cabo la elución posteriormente con 100 µl de tampón de desorción en cada columna, conteniendo el tampón HCl de Tris 10 mM, pH 8,5.

El rendimiento de ácidos nucleicos obtenido a diferentes valores de pH se proporciona en la Tabla 7. Tal como se muestra, se obtuvieron buenos rendimientos a todos los pH indicados.

20

Tabla 7:

Rendimiento de ADN en relación al pH en la solución de adsorción	
Valor del pH de la solución de adsorción	rendimiento [µg]
pH 4,5	3,52
pH 5,0	3,41
pH 5,5	3,13
pH 6,5	3,31
pH 7,0	3,68

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende éter dimetilico de tetraetilenglicol (=TDE), un tampón acuoso y un agente caotrópico.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada porque la concentración de TDE en la composición es de entre 10% y 75%, medida en volumen por volumen.
- 10 3. Composición según la reivindicación 2, caracterizada porque la concentración de TDE en la composición es de entre 30% y 45%, medida en volumen por volumen.
- 15 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la composición comprende además un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste de 1,3-dioxolán, 1,3-dioxano, 5-hidroxi-1,3-dioxano y 4-hidroximetil-1,3-dioxolano, y una mezcla de los mismos.
- 20 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque la composición contiene además un detergente.
6. Composición según la reivindicación 5, caracterizada porque el detergente se selecciona de entre el grupo que consiste de dodecilsulfato sódico, dodecilsulfato de litio, bromuro de cetiltrimetilamonio, ácido desoxicólico, lauroilsarcosina sódica, Triton X-100, Tween-20, β -D-glucósido de octilo, Nonidet P40, Brij[®] 35 P o sulfobetaina 14.
- 25 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque el pH de la composición es de entre 4 y 7,5.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque el agente caotrópico se selecciona de entre el grupo que consiste de hidrocloreuro de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina, urea, perclorato de álcali y mezclas de los mismos.
- 30 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque la concentración del agente caotrópico es de entre 0,5 M y 10 M.
10. Utilización de TDE para adsorber un ácido nucleico a una fase sólida.
- 35 11. Método de adsorción de un ácido nucleico de una muestra sobre una fase sólida, que comprende las etapas de:
(a) proporcionar el ácido nucleico en una muestra, en la que la muestra se disuelve en una composición líquida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, seguido de:
(b) proporcionar la fase sólida y poner en contacto la composición líquida de la etapa (a) con la fase sólida, adsorbiendo de esta manera el ácido nucleico a la fase sólida.
- 40 12. Método según la reivindicación 11, caracterizado porque la fase sólida comprende un sustrato de sílice poroso o no poroso.
- 45 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, caracterizado porque la fase sólida comprende un sustrato seleccionado de entre el grupo que consiste de fibras de vidrio y fibras de cuarzo.
- 50 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, caracterizado porque la fase sólida comprende partículas magnéticas con una superficie de sílice.
- 55 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que comprende las etapas adicionales de:
(c) separar la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido respecto de la fase líquida,
(d) opcionalmente lavar con una solución de lavado la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido, de manera que el ácido nucleico permanezca unido a la fase sólida, seguido de
(e) poner en contacto la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido, con una solución de desorción, de manera que se desorbe el ácido nucleico de la fase sólida y se disuelve el ácido nucleico en la solución, seguido de:
(f) separar la solución con el ácido nucleico respecto de la fase sólida, purificando de esta manera el ácido nucleico, y opcionalmente
(g) precipitar el ácido nucleico de la solución de la etapa (f) y aislar el ácido nucleico precipitado, purificando adicionalmente de esta manera el ácido nucleico.
- 60 16. Método según la reivindicación 15, caracterizado porque se lleva a cabo la etapa (d) y la solución de lavado comprende agua y TDE.

17. Método según la reivindicación 16, caracterizado porque la solución de lavado comprende además una sal.
18. Composición que comprende TDE y partículas magnéticas con una superficie de sílice.
- 5 19. Método para purificar un ácido nucleico de bajo peso molecular, que comprende las etapas de:
 (a) proporcionar el ácido nucleico en una muestra, en la que la muestra se disuelve en una composición líquida que comprende un tampón acuoso, TDE a una concentración de entre 10% y 75%, medida en volumen por volumen, y un agente caotrópico, seguido de:
 10 (b) proporcionar una fase sólida y poner en contacto la composición líquida de la etapa (a) con la fase sólida, seguido de:
 (c) separar la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido respecto de la fase líquida,
 (d) lavar con una solución de lavado la fase sólida de la etapa (c), en la que la solución de lavado comprende un solvente orgánico a una concentración de entre 40% y 100%, seguido de:
 15 (e) poner en contacto la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido, con una solución acuosa de desorción que contiene solutos a una concentración inferior a la composición de la etapa (a), desorbiendo de esta manera el ácido nucleico de la fase sólida y disolviendo el ácido nucleico en la solución, seguido de:
 (f) separar la solución con el ácido nucleico respecto de la fase sólida, purificando de esta manera el ácido nucleico, y opcionalmente
 20 (g) precipitar el ácido nucleico de la solución de la etapa (f) y aislar el ácido nucleico precipitado, purificando adicionalmente de esta manera el ácido nucleico.
20. Método según la reivindicación 19, caracterizado porque en la etapa (a) la concentración de TDE en la composición es de aproximadamente 40%, medida en volumen por volumen.
- 25 21. Método para purificar un ácido nucleico de bajo peso molecular, que comprende las etapas de:
 (a) proporcionar el ácido nucleico en una muestra, en la que la muestra se disuelve en una composición líquida que comprende un tampón acuoso, TDE a una concentración de entre 5% y 30%, medida en volumen por volumen, y un agente caotrópico, seguido de:
 30 (b) proporcionar una primera fase sólida y poner en contacto la composición líquida de la etapa (a) con la primera fase sólida, y separar la fase líquida de la primera fase sólida, seguido de:
 (c) mezclar una cantidad adicional de TDE con la fase líquida de la etapa (b), ajustando de esta manera la concentración de TDE en la fase líquida de la etapa (b) a entre 20% y 70%, medido en volumen por volumen, de manera que la concentración inicial de TDE en la fase líquida se incrementa en 1,3 veces o más, seguido de:
 35 (d) proporcionar una segunda fase sólida y poner en contacto la composición líquida de la etapa (a) con la segunda fase sólida, seguido de:
 (e) lavar con una solución de lavado la segunda fase sólida de la etapa (d), en la que la solución de lavado comprende un solvente orgánico a una concentración de entre 50% y 100%, seguido de:
 (f) poner en contacto la segunda fase sólida de la etapa (e) con una solución acuosa de desorción que contiene solutos a una concentración inferior a la composición de la etapa (a), desorbiendo de esta manera el ácido nucleico
 40 de la fase sólida y disolviendo el ácido nucleico en la solución, seguido de:
 (g) separar la solución con el ácido nucleico respecto de la fase sólida, purificando de esta manera el ácido nucleico, y opcionalmente
 (h) precipitar el ácido nucleico de la solución de la etapa (f) y aislar el ácido nucleico precipitado, purificando adicionalmente de esta manera el ácido nucleico.
- 45 22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 y 20 ó el método según la reivindicación 21, caracterizado porque:
 (a) el ácido nucleico es de cadena sencilla y el tamaño del ácido nucleico purificado es de entre 10 y 150 bases, o
 50 (b) el ácido nucleico es de doble cadena y el tamaño del ácido nucleico purificado es de entre 5 y 75 bases.
23. Método según la reivindicación 22, caracterizado porque el ácido nucleico es ARN.
24. Kit de partes, que comprende un manual de instrucciones, material de empaquetamiento, recipientes, y:
 55 (a) TDE,
 (b) una solución madre concentrada de una sal tampón y un agente caotrópico seleccionado de entre el grupo que consiste de hidrocloreuro de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina y perclorato de álcali, y yoduro de álcali, y
 (c) material cromatográfico y de filtración que comprende un material con una superficie capaz de interactuar con los residuos fosfato del esqueleto de los ácidos nucleicos.
- 60 25. Kit de partes, que comprende un manual de instrucciones, material de empaquetamiento, recipientes, y:
 (a) una suspensión en TDE de partículas magnéticas recubiertas de sílice, y
 (b) una solución madre concentrada de una sal tampón y un agente caotrópico seleccionado de entre el grupo que

consiste de hidrocloreto de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina y perclorato de álcali, y yoduro de álcali.

26. Método para determinar la presencia de un ácido nucleico en una muestra, que comprende las etapas de:
- 5 (a) formar una composición que contiene:
(i) la muestra,
(ii) un tampón acuoso,
(iii) un agente caotrópico,
(iv) TDE,
- 10 en la que la muestra se disuelve en la composición líquida,
(b) poner en contacto la composición de la etapa (a) con la fase sólida, adsorbiendo de esta manera el ácido nucleico a la fase sólida,
(c) separar la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido respecto de la fase líquida,
(d) opcionalmente lavar con una solución de lavado la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido, seguido de:
- 15 (e) poner en contacto la fase sólida con el ácido nucleico adsorbido, con una solución acuosa de desorción que contiene solutos a una concentración inferior a la composición de la etapa (a), desorbiendo de esta manera el ácido nucleico de la fase sólida y disolviendo el ácido nucleico en la solución, seguido de:
(f) separar la solución con el ácido nucleico respecto de la fase sólida, purificando de esta manera el ácido nucleico,
y
- 20 (g) detectar en la solución de la etapa (f) la presencia del ácido nucleico, determinando de esta manera la presencia del ácido nucleico.
27. Método según la reivindicación 26, caracterizado porque el ácido nucleico es ARN o ADN.
- 25 28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 26 y 27, caracterizado porque el ácido nucleico es ARN y la etapa (g) comprende (i) transcribir inversamente el ARN para formar un ADNc, (ii) amplificar seguidamente, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, el ADNc, (iii) detectar la presencia del ADNc, determinando de esta manera la presencia del ácido nucleico.

Fig. 1

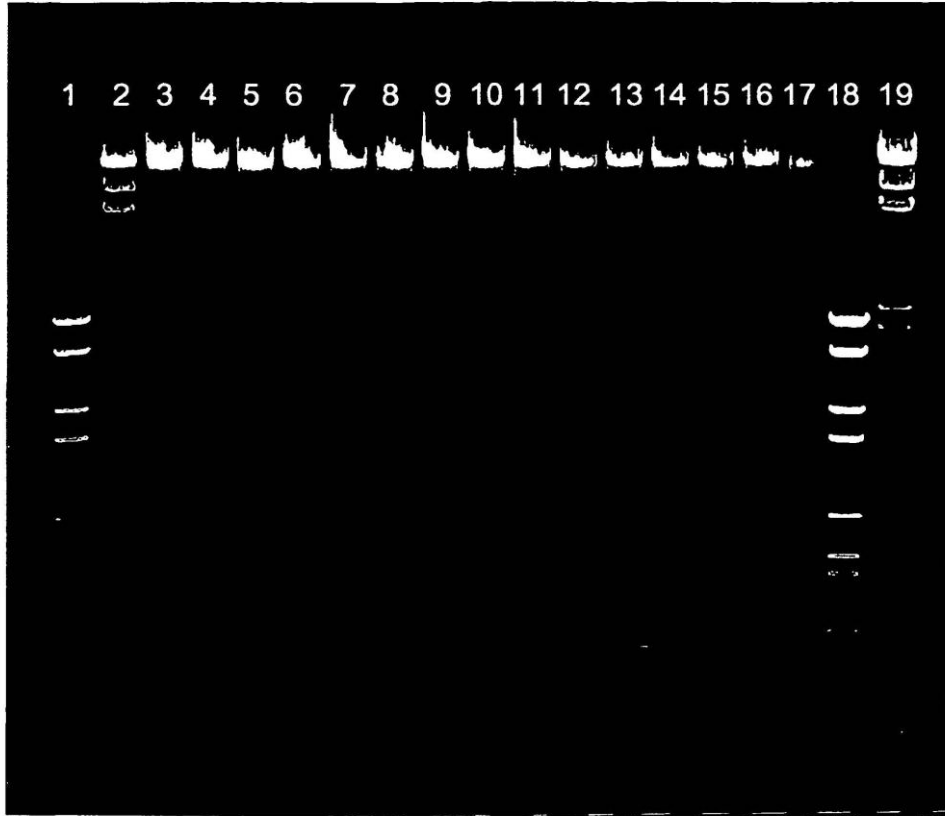


Fig. 2

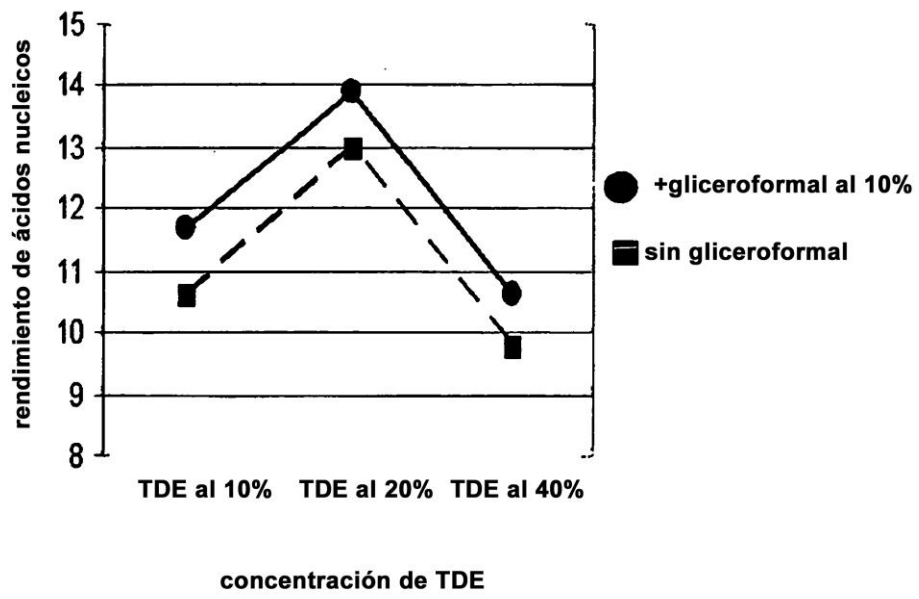


Fig. 3

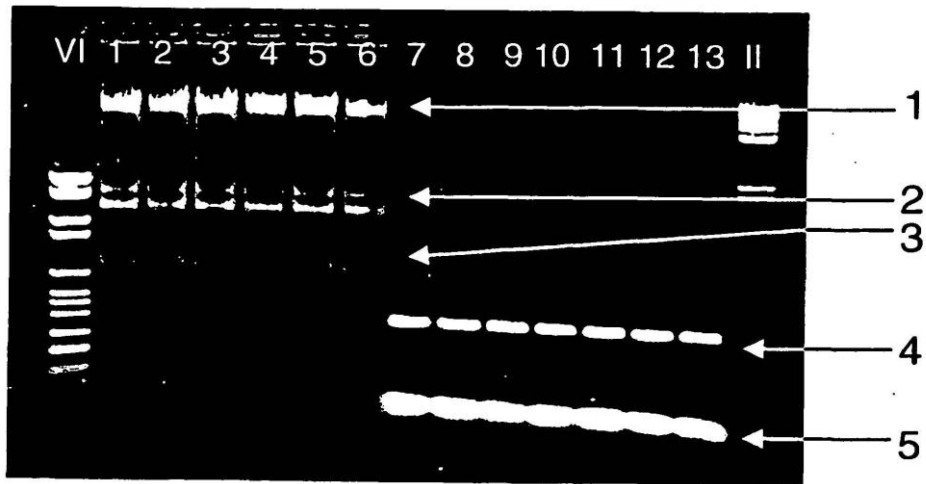


Fig. 4

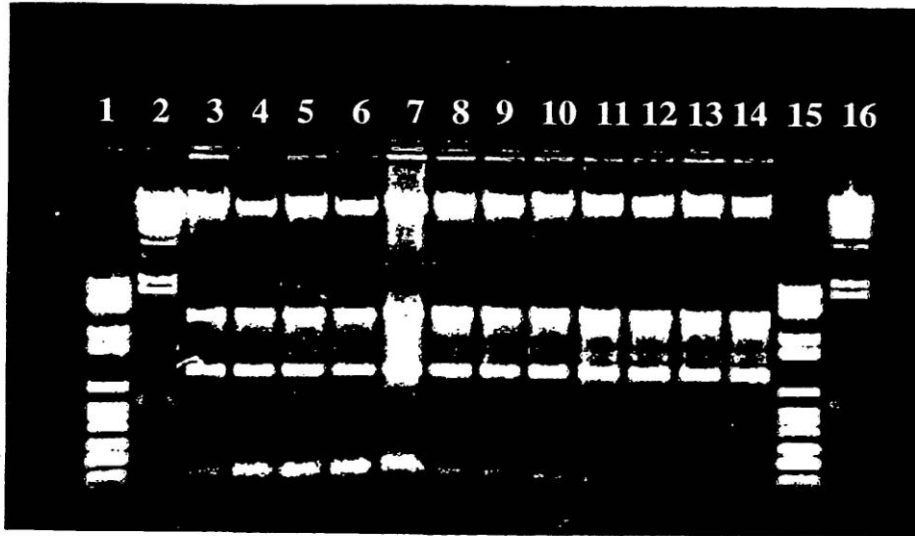


Fig. 5

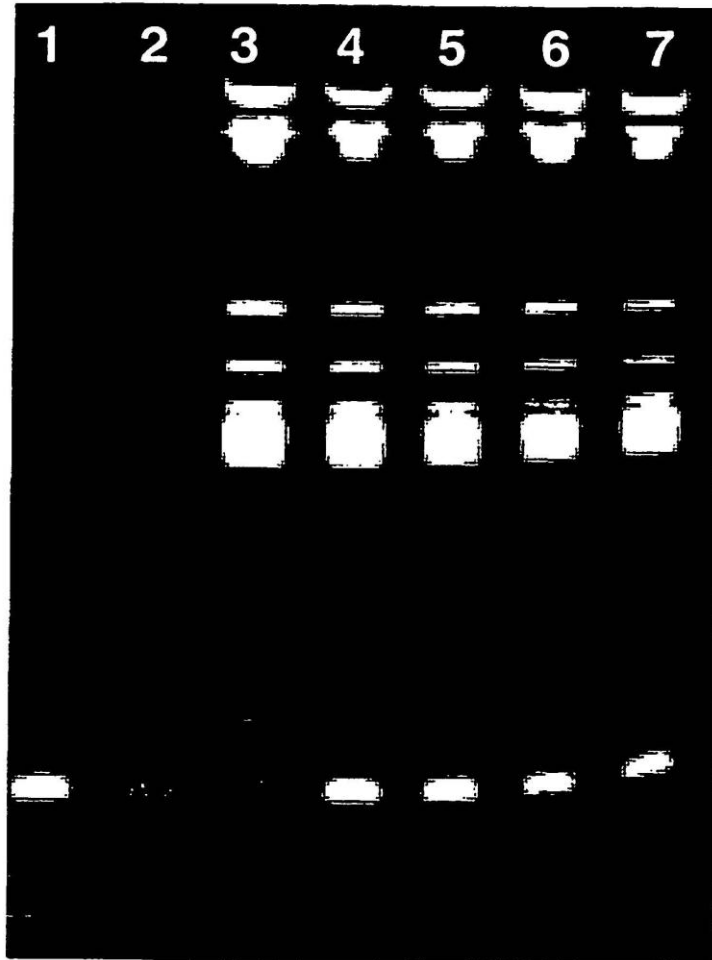


Fig. 6

A

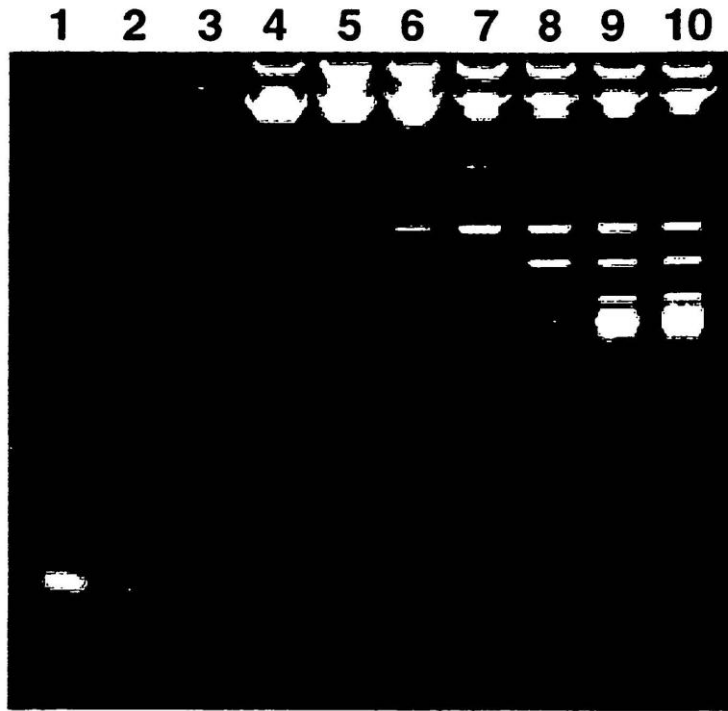


Fig. 6

B

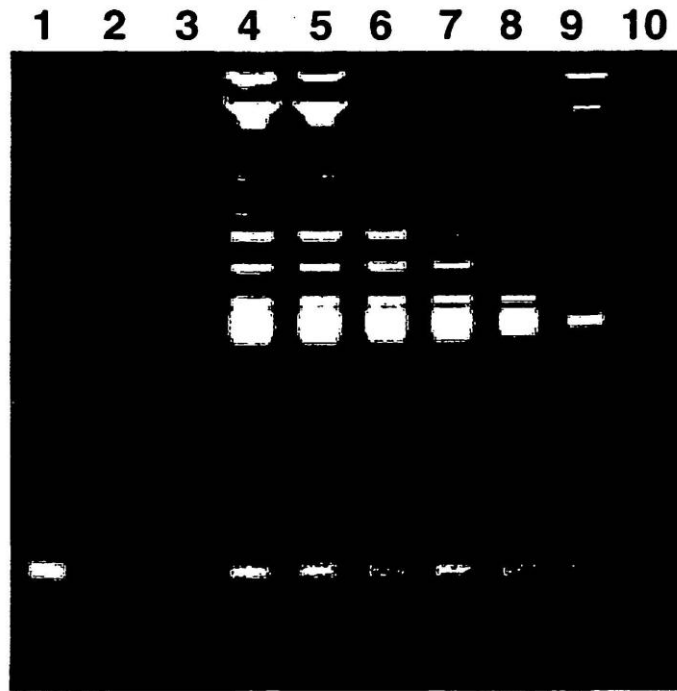


Fig. 7

Nombre de la muestra	Amplificación exitosa en el ciclo
1 columna hígado	21,89
1 columna hígado sin transcriptasa inversa	-
2 columnas hígado	21,55
2 columnas hígado sin transcriptasa inversa	
1 columna riñón	21,72
1 columna riñón sin transcriptasa inversa	-
2 columnas riñón	20,89
2 columnas riñón sin transcriptasa inversa	-
Sin molde en la transcripción inversa	-
Sin molde en la PCR	-

Fig. 8

