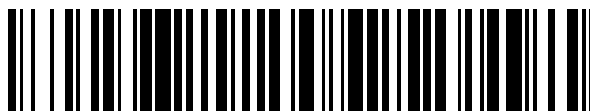


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 874**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2005** **E 11001814 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013** **EP 2322613**

54 Título: **Reactivos y métodos para el aislamiento de ARN purificado**

30 Prioridad:

16.04.2004 US 826113

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

03.04.2014

73 Titular/es:

CHOMCZYNSKI, PIOTR (100.0%)

14 Elmhurst Place

Cincinnati, Ohio 45208, US

72 Inventor/es:

CHOMCZYNSKI, PIOTR

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 452 874 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

Reactivos y métodos para el aislamiento de ARN purificado

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La invención se refiere a las composiciones y métodos que mejoran el aislamiento de ARN purificado a partir de muestras biológicas.

ANTECEDENTES

[0002] El aislamiento de ARN intacto puro es una etapa crítica para el análisis de la expresión genética en aplicaciones biotecnológicas, clínicas y de biología molecular. Los métodos de aislamiento de ARN se han desarrollado con vistas a lograr este objetivo. Los métodos utilizados con mayor frecuencia para el aislamiento de ARN se basan en la extracción de fenol, la precipitación a partir de soluciones de sales caotrópicas y la adsorción sobre sílice (Ausubel et al, 2002), analizados en mis patentes de EE. UU. núms. 4.843.155, 5.346.994 y 5.945.515. Se suele hacer referencia al método descrito en la patente '155 como el método de una sola etapa y éste extrae ARN con una solución de fenol-guanidina a pH 4. Su efectividad y simplicidad hacen del método de una sola etapa el método utilizado con más frecuencia para aislar ARN.

[0003] Una mejora del método de una sola etapa, descrita en mi siguiente patente '944, permitió el aislamiento simultáneo de ARN, ADN y proteínas de la misma muestra mediante la extracción de fenol-guanidina a pH 4 - 6. Una muestra biológica se homogeneiza y el homogeneizado se somete a separación de fases empleando un solvente orgánico hidrofóbico como el cloroformo o el bromocloropropano. Después de la centrifugación, la mezcla se separa entre la fase acuosa superior que contiene ARN, y la interfase y la fase orgánica que contienen ADN y proteínas. La fase acuosa se recoge y el ARN se precipita y lava con alcohol.

[0004] En el método de una sola etapa descrito en las patentes '155 y '994, una recogida cuidadosa de la fase acuosa separada es importante para la calidad del ARN aislado. Pequeñas cantidades de la interfase y de la fase orgánica pueden eliminarse fácilmente junto con la fase acuosa, lo que conlleva contaminación del ARN aislado con ADN y proteínas. Además, la recogida de la fase acuosa requiere una aproximación manual, que es un obstáculo para la adaptación del método de una sola etapa a la automatización.

[0005] Los reactivos y métodos descritos en las patentes '155 y '994 proporcionan ARN no degradado sustancialmente puro. No obstante, el ARN aislado según las patentes '155 y '994 contiene una cantidad residual de ADN genómico, que puede ser detectada mediante ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés). De este modo, el ARN aislado según las patentes '155 y '944 debe purificarse además para convertirlo en libre de ADN (Guan *et al*, 2003; Girotti y Zingg, 2003). El ADN genómico contaminante sirve como matriz para ADN polimerasa, produciendo productos de amplificación adicionales y distorsionando la RT-PCR dependiente de ARN. La contaminación de ADN en la RT-PCR sólo puede ser mitigada parcialmente empleando un set de cebadores que incluyen secuencias intrón-exón en el ADN genómico porque la presencia de pseudogenes, que no contienen intrones, hace este enfoque poco fiable (Mutimer 1998).

[0006] Las modificaciones en el método de una sola fase han mejorado la calidad del ARN aislado. En una modificación, se eliminaron los inhibidores de la RT-PCR añadiendo una etapa de precipitación de cloruro de litio (Puissant, 1990; Mathy, 1996). En otra modificación, la precipitación con alcohol de ARN en presencia de sal aumentó la pureza del ARN aislado (Chomczynski, 1995). No obstante, estas modificaciones no fueron eficaces para la eliminación de la contaminación de ADN.

[0007] Una práctica común para eliminar ADN contaminante es tratar una muestra que contiene ARN con deoxiribonucleasa (DNasa). Después del tratamiento con DNasa, la muestra que contiene ARN se extrae secuencialmente con fenol y cloroformo. En un esfuerzo por limitar la contaminación de ADN, se incluyó una etapa de precipitación de ADN adicional en el método de una sola fase. El ADN contaminante se precipitó a partir de la fase acuosa añadiendo un tercio del volumen de etanol al 95% p/p (Siebert, 1993). La concentración final de etanol fue aproximadamente al 24% p/p. El autor indicó que, a esta concentración baja de etanol, el ADN se precipitó mientras que el ARN se mantuvo en la solución. El ARN se precipitó a partir de la solución añadiendo alcohol adicional. No obstante, este protocolo produjo ARN que todavía estaba contaminado con ADN, prueba de ello era una banda visible después de analizar el ARN aislado sobre un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y mediante RT-PCR.

[0008] En otro esfuerzo por disminuir la contaminación de ADN y mejorar la calidad de ARN en el método de una sola etapa, Monstein (1995), en un procedimiento laborioso, aumentó el pH de la extracción con fenol a pH 4,1 - 4,7 y trató la muestra con proteinasa K, seguido de otra ronda de extracción con fenol, precipitación y lavado con

etanol. A pesar de este procedimiento prolongado, el tratamiento con DNasa era todavía necesario para obtener ARN libre de ADN preparado para usar en la RT-PCR.

[0009] También se logró separar ARN de ADN mediante extracción con fenol a pH 4 sin añadir sales de guanidina (Kedzierski, 1991). No obstante, la ausencia de sales de guanidina durante el procedimiento convirtió el ARN en susceptible a la ribonucleasa (RNasa), degradando de este modo el ARN. Una mejora posterior de este protocolo empleó tampón de extracción con fenol a pH 4,2 en presencia de dodecilsulfato sódico (Chattopadhyay *et al.*, 1993). El tratamiento con DNasa también era necesario en el método de aislamiento de ARN utilizando una combinación del método de una sola etapa seguido del proceso de columna de sílice (Bonham, 1996). El uso de este protocolo de purificación doble disminuyó la contaminación del ADN, pero el ARN aislado todavía contenía ADN genómico que fue detectado mediante RT-PCR. Otro método para aislar ARN utilizaba una solución acuosa monofásica que contenía fenol 10% p/p a 60% p/p (Publicación de solicitud de patente estadounidense 20030204077). En ausencia de caotropos, se utilizó poliol, diol o monoalcohol 15% p/p a 55% p/p para mantener fenol en una solución acuosa.

[0010] Por consiguiente, una cantidad residual de ADN presente en el ARN aislado con los métodos descritos en las patentes '155 y '994 hace necesario extender el procedimiento incluyendo el tratamiento con DNasa. Esto disminuyó la utilidad de los métodos al prolongar los procedimientos y exponer de modo innecesario el ARN a la posibilidad de degradación durante el tratamiento con DNasa y las etapas de purificación adicional. Sin embargo, la eliminación del ADN residual de la preparación de ARN es necesaria para la determinación de micromatriz basada en la RT-PCR de la expresión génica.

[0011] Los métodos anteriores para el aislamiento de ARN, como se describen en las patentes '155 y '994, se basaban en la extracción con fenol llevada a cabo a pH 4 o superior. Ninguna de las modificaciones previas del método de una sola etapa buscaba mejorar la calidad del ARN llevando a cabo extracción con fenol a un pH inferior a 4. Al contrario, el pH 4 como se utiliza en la primera patente '155 se aumentó en la siguiente patente '944 a un pH que oscilaba de 4 a 6. De modo similar, el protocolo descrito por Monstein (1995) aumentó el pH de la extracción con fenol a pH 4,7. Otro intento elaborado por mejora el método de una sola fase aumentó el pH del extracto de guanidina-fenol a pH 5,2 (Suzuki, 2003).

[0012] Una alternativa al método de una sola etapa de aislamiento de ARN se divulgó en la patente de EE. UU. núm. 5.973.137, utilizando sales ácidas no caotrópicas. Sin embargo, el método de extracción con fenol de una sola etapa es todavía el método más frecuentemente utilizado para el aislamiento de ARN. Una publicación que describe el método de una sola etapa (Chomczynski 1987) es el cuarto documento más citado en la base de datos de la American Chemical Society y del Institute for Scientific Information, y el documento más citado publicado en los últimos veinte años (CAS 2003, American Chemical Society).

[0013] Por tanto, nuevos métodos para mejorar la pureza del ARN aislado son convenientes.

[0014] Entre otras publicaciones se incluyen WO 01/46402, US 4843155, CN 1220995 y US 5346994. WO01/4640 expone el uso de la extracción con fenol/cloroformo a pH 4 para aislar ARN.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0015] Según la presente invención se proporciona:

- Una composición monofásica que contiene fenol para aislar ARN purificado de una muestra biológica,
- Un método de precipitación de ácido fenólico para aislar ARN purificado de una muestra biológica,
- Un método para aislar ARN purificado de una solución que contiene ARN y sal, y
- Un método para precipitar de modo selectivo ARN de peso molecular más elevado de una muestra biológica

como se define en las reivindicaciones independientes adjuntas. Las características más deseables se definen en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

[0016] La presente invención presenta reactivos y métodos capaces de aislar de una muestra biológica ARN que está sustancialmente libre de ADN y, por tanto, preparado para la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR). Este ARN se denomina ARN sustancialmente puro y se necesita para la diagnosis de la expresión génica en aplicaciones clínicas, de investigación y demás.

[0017] Un modo de realización es un método de separación de fases usando ácido fenólico, con el ARN separándose en la fase acuosa. Esto se basa en el descubrimiento inesperado de que el ARN sustancialmente puro puede aislarse mediante extracción con fenol llevada a cabo a un pH inferior a 4.

5 **[0018]** También se expone la precipitación con ácido fenólico de ADN y proteína, con el ARN permaneciendo en la fracción soluble. Esto se basa en el descubrimiento inesperado de que determinadas concentraciones de ácido fenólico precipitan selectivamente ADN, proteínas y otros componentes celulares, dejando el ARN en una forma soluble. El uso de ácido fenólico para precipitar de modo selectivo ADN y proteínas elimina la necesidad de una separación de fases y también elimina el uso de solventes de separación en fase tóxicos. Este enfoque simplifica significativamente el proceso de aislamiento de ARN.

10 **[0019]** Otro modo de realización es la precipitación selectiva de ARN a partir de soluciones que contienen fenol, un caotropeo y un volumen bajo de un solvente orgánico. Este modo de realización puede utilizarse para precipitar de modo selectivo moléculas de ARN de hasta aproximadamente 200 nucleótidos. Las moléculas de ARN más cortas (ARN de peso molecular más bajo) y/o el ADN también pueden ser recuperadas. El ADN también puede recuperarse a partir de la muestra aumentando la concentración de solvente orgánico a al menos
15 aproximadamente 50% p/p.

[0020] Otro modo de realización es la precipitación de ARN desde soluciones que contienen al menos una sal ajustando el pH de la solución a un pH máximo de 3,3.

20 **[0021]** El ARN aislado por las composiciones y métodos de la invención pueden utilizarse directamente para la RT-PCR porque tiene una pureza más elevada, es decir, existe menos contaminación del ARN por el ADN y/o proteína, en comparación con los métodos previos para el aislamiento de ARN como los métodos descritos en las patentes estadounidenses núms. 4.843.155, 5.346.994 y 5.945.515. El ARN que está aislado puede ser ARN monocatenario (ARNmc) o bicatenario (ARNbc), y puede aislarse de una variedad de agentes biológicos, incluyendo animales, plantas, levaduras, bacterias y virus. El ARN aislado con los métodos de la invención y utilizando las composiciones de la invención puede utilizarse en biología molecular, biotecnología o ciencias
25 clínicas. Además, los reactivos de la invención pueden utilizarse solos o en combinación con otros métodos para el aislamiento de ADN sustancialmente puro (ADN sustancialmente libre de ARN y proteína), y proteínas sustancialmente puras (proteínas sustancialmente libres de ARN y ADN).

[0022] Estas y otras ventajas resultarán evidentes a la luz de la descripción y los ejemplos detallados siguientes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

30 **[0023]** Se exponen métodos y composiciones para preparar ARN purificado a partir de muestras biológicas. Una muestra biológica es cualquier muestra de un agente biológico, ya sea *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. Las muestras pueden proceder de humanos, animales, plantas, bacterias, virus, hongos, parásitos, micoplasmas, etc. El ARN purificado es ARN que está sustancialmente no degradado y libre de contaminación de ADN cuando se ensaya por reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa reversa (RT-PCR).

35 Separación de fases

[0024] Un modo de realización de la invención proporciona métodos y reactivos para mejorar la pureza de ARN aislado llevando a cabo la extracción con fenol de una muestra que contiene ARN a un pH inferior a 4,0. En un modo de realización, el pH oscila de aproximadamente pH 3,9 a aproximadamente pH 3,6. La extracción con
40 fenol a un pH inferior a 4,0 separa de modo más eficaz el ARN del ADN que la extracción con fenol a pH 4,0 o superior.

[0025] El reactivo de aislamiento de ARN utilizado en el método de separación de fases de la invención comprende una solución acuosa de fenol y un tampón para mantener el pH en el intervalo de aproximadamente 3,6 a pH inferior a 4,0. En un modo de realización, el pH va de pH 3,6 a pH 3,9. La concentración efectiva de fenol en el reactivo de aislamiento de ARN oscila entre aproximadamente 10% p/p y aproximadamente 60% p/p.
45 En un modo de realización, la concentración de fenol oscila entre aproximadamente 25% p/p y aproximadamente 45% p/p.

[0026] La composición también puede incluir otros componentes, como los inhibidores de ribonucleasa (RNasa), sales, agentes quelantes, agentes solubilizantes, detergentes, caotropeos y derivados de fenol.

50 **[0027]** En algunos modos de realización, el ARN en muestras que tiene actividad de RNasa baja, como células cultivadas, puede extraerse con ácido fenólico a un pH entre aproximadamente 3,6 e inferior a pH 4,0, y esto puede proteger suficientemente contra la degradación del ARN. Sin embargo, el fenol puede no evitar de modo adecuado la degradación del ADN por las RNasas celulares derivadas de la muestra o de material de laboratorio contaminado. Por tanto, una cantidad efectiva de al menos un inhibidor de RNasa puede ser incluida en la

composición. El inhibidor de RNasa puede estar presente durante la homogeneización de la muestra y/o durante la extracción con ácido fenólico. Entre los inhibidores de RNasa se incluyen la proteinasa K, el inhibidor de la ribonucleasa de la placenta humana, el complejo de vanadil ribonucleósido y sales caotrópicas. Las sales caotrópicas incluyen tiocianato de guanidina, clorhidrato de guanidina y mezclas de los mismos. En un modo de realización, una concentración eficaz de sales caotrópicas oscila entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 6 M. En otro modo de realización, una concentración eficaz de sales caotrópicas oscila entre aproximadamente 2 M y aproximadamente 4 M.

[0028] El tampón puede ser sales de al menos uno de entre acetato, citrato, fosfato, ftalato, tartrato o lactato. La concentración del tampón debería ser suficiente para mantener la composición a un pH entre aproximadamente 3,6 e inferior a 4,0. En un modo de realización, el pH oscila entre aproximadamente 3,75 y aproximadamente 3,85. El tampón puede ser añadido antes o después de la homogeneización de la muestra, ya sea por separado o junto con el reactivo de separación de fases. Algunas muestras con una alta capacidad de tamponado, como sangre y tejidos de plantas, pueden necesitar una cantidad adicional de ácido para ajustar el pH en el intervalo deseado.

[0029] La composición de la invención también puede contener sales orgánicas e inorgánicas como el cloruro, fosfato, acetato y sales tiocianato de sodio, potasio, litio y amonio. La composición de la invención puede contener agentes quelantes como los citratos y las sales de tetraacetato de etilenodiamina. La composición de la invención puede contener detergentes como el polioxietileno sorbitán, dodecilsulfato sódico y sarcosina. Las sales, los agentes quelantes y los detergentes estimulan la solubilización del tejido y la precipitación de ARN sustancialmente puro. Para ayudar en la solubilización del fenol, la composición acuosa puede contener un solubilizante o mezcla de solubilizantes. Los solubilizantes incluyen polialcoholes como el glicerol a una concentración de aproximadamente 1% p/p hasta aproximadamente 10% p/p, el límite superior se elige de modo que no aumente la contaminación de ADN del ARN aislado. Los solubilizantes también incluyen sales de guanidina.

[0030] La composición de la invención puede contener el fenol aproximadamente 60% p/p, hasta aproximadamente 5% p/p de derivados de fenol que son menos tóxicos que el propio fenol. Estos derivados incluyen feniletanol, fenoxitol de propileno, timol o butilfenol. En un modo de realización, estos derivados están presentes en una cantidad que oscila entre aproximadamente 1% p/p y aproximadamente 5% p/p. La composición también puede contener compuestos orgánicos parcialmente hidrosolubles o insolubles, como el ciclohexanol, el bromuro de ciclohexilo y el ácido diclorobenzoico. Estos compuestos aumentan la densidad de la composición y sustituyen al fenol, minimizando de este modo la toxicidad de la composición.

[0031] En un modo de realización del método de la separación de fases, se prepara una muestra, normalmente mediante homogeneización o lisis, en la composición de la invención. La mayoría del ADN y de partículas pueden eliminarse mediante sedimentación o filtración a partir del homogeneizado o del lisado. El homogeneizado o lisado se separa en fase acuosa y orgánica mezclándolo con un solvente orgánico hidrofóbico o mezcla de solventes, como el cloroformo, tetracloruro de carbono, bromonaftaleno, bromoanisol o bromocloropropano. La mezcla puede ser sedimentada por centrifugación, por ejemplo, centrifugación a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 10 °C. La fase acuosa superior contiene ARN, y la interfase y la fase orgánica contienen ADN y proteínas.

[0032] El ARN se precipita desde la fase acuosa con un solvente orgánico hidrosoluble, como un alcohol inferior. El ARN precipitado se lava por sedimentación o filtración y se solubiliza en agua, formamida o un tampón. La preparación final de ARN es sustancialmente pura, es decir, no está degradada y está esencialmente libre de contaminación de ADN cuando se prueba con la RT-PCR.

[0033] Además, el método de separación de fases de la invención es compatible con el método para el aislamiento simultáneo de ARN, ADN y proteínas. El ADN y las proteínas aisladas en la interfase y en la fase orgánica podrían ser recuperadas, como se describe en Chomczynski, 1993; *TRI Reagent brochure*, 2003. Como alternativa, el ADN se precipita desde la fase orgánica y la interfase añadiendo 0,3 volúmenes de etanol, seguido de precipitación de proteínas con una cantidad más elevada de etanol. Por ejemplo, puede volver a extraerse ADN de la interfase y de la fase orgánica con una solución acuosa a pH 7,0 o superior. El ADN que se ha extraído de nuevo es precipitado desde la solución acuosa con etanol. Como se apreciará, la composición y el método de la invención pueden utilizarse para aislar ARN sustancialmente puro, ADN sustancialmente puro (es decir, ADN esencialmente libre de ARN) y proteínas de la misma muestra. El aislamiento de estos tres componentes permite la correlación de los patrones de expresión génica con cambios en la secuencia de ADN y el contenido proteínico en las muestras biológicas, también permite otras muchas aplicaciones.

[0034] En un modo de realización, a la composición utilizada para homogeneizar o lisar la muestra tal vez le falte uno o más componentes, que se añadirían después al homogeneizado o al lisado, ya sean solos o junto con el solvente de separación de fases (por ejemplo, cloroformo). En otro modo de realización, la lisis u homogeneización de muestra pueden llevarse a cabo a un pH superior a 4,0, en cuyo caso se añade un ácido o

un tampón a la muestra homogeneizada o lisada en una cantidad suficiente para llevar al pH del homogeneizado o lisado dentro del intervalo de 3,6 a inferior a pH 4,0. Esta cantidad de ácido o tampón puede añadirse directamente al homogeneizado o lisado, o puede disolverse en el solvente de separación de fases. Cuando se añade junto con el solvente de separación de fases, el ácido puede ser ácido fórmico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido aminocaproico, ácido láctico o ácido clorofenilacético. Para facilitar la solubilidad del ácido, el solvente de separación de fases puede contener solubilizantes como los glicoles.

[0035] En un modo de realización, la lisis o el homogeneización de la muestra se lleva a cabo en una solución libre de fenol que contiene un inhibidor de RNasa. Después de la homogeneización o lisis, se añade fenol para lograr una concentración final que va de aproximadamente 10% p/p a aproximadamente 60% p/p y la extracción se lleva a cabo a pH de aproximadamente 3,6 a inferior a 4,0. Este intervalo de pH durante la extracción se mantiene por un tampón que puede ser parte de la solución acuosa o añadirse a fenol o puede ser añadido por separado. Después de la separación de fases mediante centrifugación, el ARN es precipitado desde la fase acuosa con alcohol. El ARN precipitado se lava y puede disolverse en un solvente como agua, tampón o formamida.

15 Precipitación con ácido fenólico de ADN dejando ARN en sobrenadante

[0036] Un modo de realización de la invención aísla ARN sustancialmente puro usando una solución de ácido fenólico sin llevar a cabo la separación de fases. Determinadas concentraciones de ácido fenólico precipitan de modo selectivo ADN (tanto el ADN monocatenario (ADNmc) como el ADN bicatenario (ADNbc)), proteínas y otros componentes celulares, mientras que el ARN permanece en una forma soluble. Este fenómeno poco esperado se utilizó para elaborar reactivos y métodos para aislar ARN sin separar las fases acuosa y orgánica y la interfase.

[0037] El método de precipitación con ácido fenólico simplifica el proceso de aislamiento de ARN. También elimina solventes orgánicos tóxicos que pueden ser utilizados en el método de separación de fases. La composición impele ADN y proteínas para formar un pellet firme al final de un tubo, que mitiga el peligro de transferencia accidental de ADN y moléculas de proteína a la fracción sobrenadante que contiene ARN. El sobrenadante puede recogerse firmemente mediante pipeta, sifón, decantación o filtrado, cada uno de los cuales puede ser automatizado para su uso en un procedimiento automatizado para el aislamiento de ARN. Además, el método completo de precipitación con ácido fenólico puede ocurrir a temperatura ambiente, lo que elimina la necesidad de centrifugación refrigerada que puede utilizarse en el método de separación de fases.

[0038] La composición utilizada para la precipitación de ácido fenólico comprende una solución acuosa de fenol a una concentración que va de aproximadamente 3% p/p a menos de 30% p/p. En un modo de realización, la concentración de fenol oscila entre aproximadamente 3% p/p y aproximadamente 25% p/p. En otro modo de realización, la concentración de fenol está en el intervalo entre aproximadamente 8% p/p y aproximadamente 20% p/p. Las concentraciones de fenol en el modo de realización de la precipitación de ácido son inferiores a las concentraciones de fenol 30% p/p a fenol 60% p/p descritas en las patentes '155 y '994.

[0039] La composición de la invención se acidifica con un tampón o un ácido en una cantidad suficiente para mantener el pH en el intervalo de aproximadamente 3,6 a aproximadamente 5,5. En un modo de realización, el pH va de aproximadamente 3,9 a aproximadamente 4,5. El tampón puede seleccionarse de tampones orgánicos o inorgánicos entre los que se incluyen, sin carácter limitativo, acetato, citrato, fosfato, ftalato, tartrato y/o lactato.

[0040] Para mejorar la eficiencia del aislamiento de ARN, el ácido fenólico puede complementarse con inhibidores de RNasa, sales, agentes quelantes, agentes solubilizantes de fenol y/o detergentes. Los inhibidores de RNasa incluyen el complejo de vanadil ribonucleósido y protinasa K o combinaciones de estos inhibidores. Entre los inhibidores de RNasa también se incluyen agentes caotrópicos o caotropos como sales de guanidina a concentraciones que van de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 6 M. En un modo de realización, la concentración de los caotropos va de aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 2,5 M. Las sales caotrópicas pueden utilizarse como solubilizantes de fenol manteniendo el fenol en solución acuosa. La composición de ácido fenólico puede contener además sales orgánicas y/o inorgánicas como cloruro, fosfato, acetato, citrato y sales tiocianato de sodio, potasio, litio y amonio. La composición también puede contener agentes quelantes como citratos y sales de tetraacetato de etilenodiamina. La composición también puede contener detergentes que incluyen polioxietileno sorbitán, dodecilsulfato sódico y sarcosina. La composición también puede contener hasta 5% p/p de solventes y reactivos que son menos tóxicos que el fenol, como el timol, feniletanol, ciclohexanol, bromuro de ciclohexilo y ácido diclorobenzoico. Estos componentes adicionales facilitan la solubilización tisular y la precipitación de ARN puro.

[0041] El reactivo de precipitación de ácido fenólico puede contener un solubilizante adicional o mezcla de solubilizantes para ayudar a mantener el fenol en solución acuosa. Los agentes solubilizantes de fenol incluyen glicoles, polialcoholes y alcoholes inferiores. Estos pueden añadirse al reactivo de la precipitación con ácido

fenólico en cantidades desde aproximadamente 1% p/p a aproximadamente 10% p/p, el límite superior se elige para no aumentar la contaminación de ADN del ARN aislado.

[0042] En un modo de realización del método de precipitación de ácido fenólico, una muestra biológica es homogeneizada o lisada en el reactivo de la precipitación. El homogeneizado o lisado se centrifuga o filtra para eliminar los otros componentes celulares, proteínas y ADN precipitados. El ARN permanece en una forma soluble y es precipitado a continuación desde el sobrenadante con un solvente orgánico hidrosoluble, como alcoholes inferiores que incluyen metanol, etanol, propanol, isopropanol y butanol. El pellet de ARN se lava a continuación y puede disolverse en agua, tampón o formamida.

[0043] En el otro modo de realización del método de precipitación con ácido fenólico, una muestra biológica es homogeneizada en reactivo de precipitación de ácido fenólico concentrado de aproximadamente 3 veces (3X) a aproximadamente 1,5 veces (1,5X). El uso de un reactivo concentrado permite procesar tejidos sólidos así como muestras líquidas de alto volumen empleando un reactivo. Un alto volumen de una muestra líquida puede ser compensado añadiendo al reactivo concentrado una cantidad más pequeña de agua. El reactivo concentrado disuelve la mayoría de los componentes en una muestra biológica y libera de manera efectiva ARN a partir de estructuras celulares. Por ejemplo, una muestra puede ser homogeneizada en reactivo concentrado dos veces (2X). Después de la homogeneización, una cantidad igual de agua se mezcla con el homogeneizado. La adición de agua produce fenol, guanidina y otros ingredientes en la concentración deseada. Esto crea condiciones para la precipitación y eliminación de modo eficaz de ADN y proteínas a partir de una muestra que contiene ARN.

[0044] Después de la centrifugación o filtración del homogeneizado o lisado, el ARN permanece en el sobrenadante o filtrado, mientras que el ADN, proteína y otros componentes celulares forman un pellet firme al final de un tubo. El ARN es precipitado desde el sobrenadante o filtrado con un solvente orgánico hidrosoluble como se describe previamente. El precipitado de ARN se lava y puede disolverse en agua, tampón o formamida.

[0045] En un modo de realización de la invención, puede utilizarse un único reactivo en el método de separación de fases o el método de precipitación de ácido fenólico. Este reactivo de doble uso comprende componentes del reactivo utilizado en el método de separación de fases y una concentración 2X de reactivo utilizado en el método de precipitación de ácido fenólico. Como se describe anteriormente, el pH para el método de separación de fases puede estar entre aproximadamente pH 3,6 e inferior a pH 4,0, y el pH para el método de precipitación de ácido fenólico puede estar entre aproximadamente pH 3,6 y aproximadamente pH 5,5. En el modo de realización de doble uso, un ajuste del pH del reactivo es por lo tanto necesario antes de cambiar de un método al otro método. Por ejemplo, el reactivo 2X para el método de precipitación de ácido fenólico a pH 4,2 debe acidificarse además a un pH inferior a 4,0 antes de ser utilizado en el método de separación de fases.

[0046] El método de separación de fases de la invención puede utilizarse para especímenes que contienen altas cantidades de grasas como el tejido graso y determinados tejidos tumorales o neoplásicos. Las muestras con un alto nivel de contaminantes, como las plantas y los tejidos que contienen grasas, pueden ser procesadas con el procedimiento de doble uso, que combina el método de precipitación del ácido fenólico y el método de separación de fases. En un modo de realización, una muestra biológica se homogeneiza en reactivo de precipitación de ácido fenólico 2X. A continuación, el homogeneizado se diluye con agua para aproximar el intervalo de la concentración del reactivo de precipitación de ácido fenólico (es decir, de aproximadamente fenol 3% p/p a menos de fenol 30% p/p). Después de la dilución, el ADN, proteínas y otros componentes celulares precipitados se eliminan mediante sedimentación o filtración. El sobrenadante o filtrado resultante se recoge y se mezcla con un solvente de separación de fases. En un modo de realización, de 0,05 volúmenes a 0,01 volumen de un solvente de separación de fases se añade por un volumen del sobrenadante. El solvente de separación de fases o mezcla de solventes es al menos un solvente hidrofóbico que incluye, sin carácter limitativo, caprolactona, diacetato de etilenglicol, dibenzoato de polietilenglicol, así como solventes utilizados para el método de separación de fases. La mezcla se centrifuga para obtener una fase acuosa superior, una interfase y una fase orgánica. La fase acuosa que contiene ARN se recoge y mezcla con un volumen de un alcohol inferior para precipitar ARN. El ARN precipitado se lava y disuelve en agua, tampón o formamida.

[0047] Los métodos que ofrecen ARN purificado basados en soluciones de ácido fenólico de la invención son útiles para los perfiles de expresión génica con micromatrices basadas en la RT-PCR utilizadas en biotecnología, biología molecular y aplicaciones clínicas. Esto puede ejemplificarse mediante la detección de patrones de expresión génica específica en las células cancerosas y otros tipos de especímenes patológicos.

Precipitación selectiva de ARN usando solvente orgánico de bajo volumen

[0048] Como se ha descrito anteriormente, el ARN puede precipitarse desde la fase acuosa en el método de separación de fases de la invención, y desde la composición de ácido fenólico de la invención. En cada caso, se precipita ARN añadiendo aproximadamente un volumen de un solvente orgánico para aproximar una concentración de solvente orgánico final de aproximadamente 50% p/p. No obstante, en algunas preparaciones de muestras, un volumen de solvente orgánico coprecipita polisacáridos y proteínas, como proteoglicanos, junto

con ARN. Anteriormente, con el fin de evitar la coprecipitación de contaminantes, un método modificaba el método de purificación de ARN de una sola etapa empleando alcohol 25% p/p en presencia de iones de sodio 0,9 M para precipitar ARN (Chomczynski, 1995). Otro método trató una solución de caotrope libre de fenol con 13% p/p - 23% p/p de un solvente orgánico, con el pH de la solución permaneciendo en el intervalo de pH 6 a pH 7,5 para precipitar ARN.

[0049] En el método de la presente invención, ARN sustancialmente puro es precipitado desde soluciones de fenol-caotrope añadiendo un solvente orgánico o mezcla de solventes para lograr una concentración final de aproximadamente 10% p/p a aproximadamente 40% p/p de solvente orgánico. El solvente o solventes orgánicos pueden ser acetona, sulfona de tetrametileno, alcoholes inferiores, glicoles, polialcoholes, acetona, diacetato de etilenglicol y/o sulfóxido de metilo. Este método ofrece ARN sustancialmente puro cuando se precipita ARN desde la fase acuosa en el método de separación de fases o en el método de precipitación con ácido fenólico desde el sobrenadante libre de proteínas y ADN. El método no necesita añadir sales a la solución de fenol-caotrope.

[0050] No se esperaba que el ARN sustancialmente puro precipitado desde una solución fenol-caotrope a una concentración de aproximadamente 10% p/p a aproximadamente 40% p/p de un solvente orgánico sin añadir a la solución sal, como se sugirió con anterioridad (Chomczynski 1995). De hecho, añadir sal junto con el alcohol redujo la pureza del ARN aislado. El descubrimiento de que alcohol de 10% p/p a 40% p/p solo precipitaba ARN a partir de la solución de fenol-caotrope era también contrario a un informe en el que el ADN precipitaba y el ARN se mantenía en una forma soluble añadiendo 0,3 volúmenes de alcohol (concentración final 24% p/p) a la solución de fenol-caotrope (Siebert, 1993).

[0051] En un modo de realización, la concentración final de solvente o solventes orgánicos en la composición varía de aproximadamente 20% p/p a aproximadamente 25% p/p. En otro modo de realización, la concentración final de solvente(s) orgánico(s) en la composición es de aproximadamente 10% a aproximadamente 40%. El pH de la solución de fenol-caotrope puede oscilar entre aproximadamente pH 2,0 y aproximadamente 9,0. En un modo de realización, el pH de la solución de fenol-caotrope va de aproximadamente pH 3,5 a aproximadamente pH 5,0.

[0052] Los solventes orgánicos a concentraciones de aproximadamente 10% p/p a aproximadamente 40% p/p precipitan moléculas de ARN de más de aproximadamente 200 bases, considerado como ARN de peso molecular más elevado. Los fragmentos de ARN de menos de aproximadamente 200 bases, junto con polisacáridos y proteoglicanos, se mantienen en solución. Después de la precipitación del ARN de peso molecular más elevado, el ARN de peso molecular más pequeño se puede recuperar de la solución mediante precipitación con una cantidad adicional de solvente orgánico para aproximarse a una concentración final de aproximadamente 50% p/p o mayor, por ejemplo, a aproximadamente 90% p/p.

[0053] El método de la invención, mediante el cual el ARN se precipita usando de aproximadamente 10% p/p a aproximadamente 40% p/p de un solvente orgánico, puede utilizarse también para disminuir la cantidad de ADN contaminante en las preparaciones de ARN. Esta precipitación selectiva de ARN es eficaz sólo cuando está presente una cantidad pequeña de ADN contaminante en las soluciones, por ejemplo, menos de 10 ng de ADN por 1 µg de ARN. La precipitación de ARN usando de aproximadamente 10% p/p a aproximadamente 40% p/p de un solvente orgánico también mejora la calidad del ARN aislado, de modo que se obtiene una producción alta de ARN no degradado y sustancialmente puro, según el método descrito en mis patentes '155 y '994 anteriores.

Precipitación de ARN ácido a partir de soluciones que contienen sales

[0054] El ARN sustancialmente puro, junto con ADN, puede ser obtenido a partir de soluciones acuosas que contienen sales mediante precipitación dependiente de pH de ARN a un pH inferior a aproximadamente 3,3. La precipitación de ARN desde soluciones de sales a un pH ácido es contraria a la expuesta en la patente de EE. UU. núm. 5.973.137. La patente '137 expone que, en soluciones a un pH inferior a 6, las sales no caotrópicas precipitan ADN, mientras que el ARN permanece en una forma soluble.

[0055] En el método de la invención, un ácido de tampón se añade a la solución de ARN en una cantidad suficiente para obtener un pH de 3,3 o inferior. En un modo de realización, el pH resultante está en el intervalo de aproximadamente pH 3,0 a aproximadamente pH 2,7. El ácido puede ser un ácido orgánico o un ácido inorgánico. El ácido puede ser ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido acético y/o ácido láctico. En un modo de realización, las sales de la composición pueden ser sales de guanidina.

[0056] Este modo de realización puede ser incorporado en el método de separación de fases de la invención y/o en el método de precipitación de ácido fenólico de la invención. Para su uso en el método de precipitación de ácido fenólico, los ácidos o tampones pueden disolverse en agua o en solventes orgánicos. El ácido precipita de modo selectivo ARN, dejando los polisacáridos y proteína en una forma soluble. El volumen del ácido usado para precipitar ARN es pequeño, lo que permite un volumen de muestra bajo durante el aislamiento de ARN. En un

modo de realización, el volumen del ácido oscila entre aproximadamente 0,1% p/p y aproximadamente 25% p/p del volumen de la solución de ARN.

[0057] La precipitación de ARN con una cantidad baja de un solvente orgánico y con pH ácido, descrita en la presente invención, también puede utilizarse para mejorar la calidad del ARN empleando los métodos expuestos en las patentes '155 y '994 anteriores.

[0058] El tratamiento de una muestra que contiene ARN obtenida por precipitación de ARN con un volumen bajo de un solvente orgánico o precipitación ácida de ARN a partir de soluciones que contienen sales precipita ARN de peso molecular más alto. El ARN de peso molecular más elevado incluye ARN ribosómico (ARNr, por ejemplo ARN 18S y 28S) y ARN mensajero (ARNm). El ARN de peso molecular más bajo restante es de menos de aproximadamente 200 nucleótidos, e incluye ARN de transferencia (ARNt), ARN 5S, y ARN de interferencia pequeña (ARNip) que regula la expresión génica. El ARN de peso molecular más bajo se recupera de la solución descrita anteriormente mediante tratamiento con un volumen adicional de un solvente orgánico. En un modo de realización, la muestra se trata con un volumen de un alcohol inferior, por ejemplo, metanol, etanol, propanol, etc. para precipitar ARN de peso molecular bajo.

[0059] Las soluciones y métodos ilustrativos de la presente invención se describen en los siguientes **Ejemplos** prácticos.

Ejemplo 1

Aislamiento por separación de fases de ARN a partir de hígado de rata

[0060] En un modo de realización, la siguiente composición se utilizó para la separación de fases de ARN: tiocianato de guanidina 4 M, tiocianato de amonio 0,2 M, glicerol 5% p/p, fenol 40% p/p, sarcosina 0,1% p/p, citrato de sodio 10 mM y tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 3,8.

[0061] El hígado de rata (38 mg) se homogeneizó en 1,5 ml de la composición anterior. A continuación, se añadieron 0,15 ml de cloroformo al homogeneizado. La mezcla resultante se agitó y dejó sedimentar durante 15 minutos a 4 °C a 12.000 x g. Después de la sedimentación, se formó una fase acuosa, una interfase y una fase orgánica inferior. El ARN se aisló en la fase acuosa, mientras que el ADN y proteínas se aislaron en la interfase y fase orgánica.

[0062] El ARN se precipitó desde la fase acuosa añadiendo 0,75 ml de isopropanol. El precipitado de ARN se centrifugó durante cinco minutos a 10.000 x g. El pellet resultante se lavó con 0,75 ml de etanol 75% p/p y se centrifugó durante cinco minutos a 10.000 x g. El pellet de ARN final se disolvió en agua y la concentración de ARN se determina con un espectrofotómetro a $A_{260/280}$ mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

[0063] El rendimiento del ARN fue 0,22 mg. La proporción $A_{260/280}$ era 1,76, lo que indicó la falta de contaminación de proteínas. El ARN aislado se utilizó con éxito para la RT-PCR utilizando cebadores para gliceraldehídos 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), actina y genes c-fos. La transcripción reversa se llevó a cabo empleando transcriptasa SuperScript de Invitrogen (Carlsbad CA) y la PCR se hizo utilizando Taq ADN polimerasa de Sigma (San Luis MO). Los productos de la RT-PCR se analizaron sobre un gel de agarosa con bromuro de etidio 1%. No se detectó ADN en el ARN aislado en ausencia de transcripción reversa. El análisis de transferencia Northern del ARN aislado se llevó a cabo empleando geles de agarosa con formaldehído 1% y se transfirió a una membrana de nylon. La tinción con azul de metileno y bromuro de etidio mostró bandas ribosómicas no degradadas.

Hibridación con sondas marcadas con biotina mostró bandas no degradadas de ARNm para GAPDH, actina y c-fos.

Ejemplo 2

Aislamiento por separación de fases de ARN a partir de sangre humana

[0064] Sangre humana (0,5 ml) fue mezclada con 75 µl de ácido acético glacial y 5 ml de la composición descrita en el Ejemplo 1. A continuación, se añadieron 0,5 ml de bromocloropropano a la mezcla. La mezcla se agitó y se dejó sedimentar durante quince minutos a 4 °C a 12.000 x g. Después de la sedimentación, la mezcla formó una fase acuosa, una interfase y una fase orgánica inferior. El ARN se aisló en la fase acuosa, mientras las proteínas y el ADN se aislaron en la interfase y la fase orgánica.

[0065] El ARN se precipitó a partir de la fase acuosa añadiendo 1,25 ml de isopropanol. El precipitado de ARN se centrifugó durante cinco minutos a 12.000 x g. El pellet resultante se lavó con cinco ml de etanol 75% y se

centrifugó durante cinco minutos a 10.000 x g. El pellet de ARN final se disolvió en agua y la concentración de ARN se determinó con un espectrofotómetro a $A_{260/280}$ mediante métodos conocidos por un experto en la materia.

- 5 **[0066]** El rendimiento del ARN fue 18,9 µg. La proporción $A_{260/280}$ era 1,70, lo que indicó la escasez de contaminación de proteína. El ARN aislado se utilizó con éxito para la RT-PCR empleando cebadores para GAPDH. No se detectó contaminación de ADN mediante la PCR del ARN aislado sin transcripción reversa. El análisis de transferencia Northern del ARN aislado mostró bandas no degradadas de ARN ribosómico y una banda no degradada de ARNm para GAPDH.

Ejemplo 3

Aislamiento de ARN mediante separación de fases y bromocloropropano acidificado

- 10 **[0067]** Bazo de rata (21 mg) se homogeneizó en 1 ml de una solución acuosa que contiene tiocianato de guanidina 3,5 M, acetato de potasio 50 mM, fenol 43% p/p, Triton X-100 0,1%, pH 4,1. El homogeneizado se centrifugó a 12.000 x g durante diez minutos para eliminar la mayor parte del ADN y partículas. El homogeneizado puro se mezcló con 0,1 ml de bromocloropropano que contiene ácido acético 14% p/p. El pH resultante de la mezcla era pH 3,7. La mezcla se agitó y se dejó sedimentar durante 10 minutos a 4 °C a 12.000
- 15 x g. Después de la sedimentación, la mezcla formó una fase acuosa, una interfase y una fase orgánica inferior. El ARN se aisló en la fase acuosa, mientras que el ADN y las proteínas se aislaron en la interfase y en la fase orgánica.

- 20 **[0068]** El ARN se precipitó de modo selectivo a partir de la fase acuosa añadiendo etanol 0,5 ml. El ARN precipitado se hizo sedimentar durante 5 minutos a 10.000 x g, después se lavó con etanol 75% p/p y se dejó sedimentar durante cinco minutos a 10.000 x g. El pellet de ARN final se disolvió en agua y la concentración de ARN se determinó con un espectrofotómetro a $A_{260/280}$ mediante métodos conocidos para los expertos en la materia.

- 25 **[0069]** El rendimiento de ARN era 77 µl. La proporción $A_{260/280}$ era 1,74, lo que indicó la escasez de contaminación de proteínas. El ARN aislado se utilizó con éxito para la RT-PCR empleando cebadores para GAPDH y no se detectó contaminación de ADN. El análisis de transferencia Northern del ARN aislado mostró bandas no degradadas de ARN ribosómico y una banda no degradada de ARNm para GAPDH.

Ejemplo 4

Aislamiento de ARN mediante separación de fases y homogeneización en una solución de caotrope libre de fenol

- 30 **[0070]** Músculo esquelético de rata (29 mg) se homogeneizó en 0,5 ml de una solución acuosa de tiocianato de guanidina 3 M y acetato de sodio 5 mM. El homogeneizado se mezcló con 0,5 ml de fenol y tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 3,7. La mezcla resultante se agitó con 0,1 ml de bromocloropropano y se dejó sedimentar durante quince minutos a 4 °C a 12.000 x g. Después de la sedimentación, la mezcla formó una fase acuosa, una interfase y una fase orgánica inferior. El ARN se aisló en la fase acuosa, mientras que el ADN y las proteínas se aislaron en la interfase y fase orgánica.

- 35 **[0071]** El ARN se precipitó de modo selectivo a partir de la fase acuosa añadiendo 0,5 ml de una solución acuosa que contenía etanol 50% p/p. El precipitado de ARN se lavó, trató y ensayó como se describe en el Ejemplo 1.

- 40 **[0072]** El rendimiento de ARN era 16 µg. La proporción $A_{260/280}$ era 1,70, lo que indicó la escasez de contaminación de proteína. El ARN aislado se utilizó con éxito para la RT-PCR empleando cebadores para GAPDH y no se detectó contaminación de ADN. El análisis de transferencia Northern del ARN aislado mostró bandas no degradadas de ARN ribosómico y una banda no degradada de ARNm para GAPDH.

Ejemplo 5

Aislamiento de ARN mediante separación de fases con homogeneización en dodecilsulfato sódico 1% p/p

- 45 **[0073]** Un cultivo primario de células humanas de fibroblasto humano (Clonetics, San Diego CA) cultivado en una botella de plástico de 25 cm² se cubrió con 1,5 ml de una solución que contenía dodecilsulfato sódico 1% p/p y citrato de sodio 10 mM, pH 7,0, complementado con 50 µg/ml de proteinasa K. La solución de células resultante se incubó durante una hora a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), se transfirió a un tubo de centrífuga y se mezcló con 1,5 ml de ácido fenólico que contenía agua 12% p/p y acetato de sodio 100 mM, pH 3,7. Después de la centrifugación durante quince minutos a 4 °C, la mezcla formó una fase acuosa, una interfase y una fase orgánica. Después de la separación de fases, el ARN se aisló en la fase acuosa, mientras que el ADN y las proteínas se aislaron en la interfase y en la fase orgánica, respectivamente.
- 50

[0074] El ARN fue precipitado a partir de la fase acuosa añadiendo 0,75 ml de etanol y dejándolo sedimentar durante cinco minutos a 10.000 x g. El pellet de ARN se lavó con etanol 75%, se centrifugó durante cinco minutos a 10.000 x g y se disolvió en agua.

- 5 [0075] El rendimiento de ARN era 18 µg. La proporción $A_{260/280}$ era 1,71, lo que indicó la escasez de contaminación de proteína. El ARN aislado se utilizó con éxito para la RT-PCR empleando cebadores para GAPDH y no se detectó contaminación de ADN. El análisis de transferencia Northern del ARN aislado mostró bandas no degradadas de ARN ribosómico y una banda no degradada de ARNm para GAPDH.

Ejemplo 6

Aislamiento de ARN mediante precipitación de ácido fenólico

- 10 [0076] En un modo de realización, la siguiente composición se utilizó para la precipitación con ácido fenólico de ARN: fenol 20% p/p, tiocianato de guanidina 2 M, citrato de sodio 15 mM, cloruro de litio 0,1 M, sarcosina 0,05% p/p, glicerol 1,5% p/p y tampón de acetato de sodio, pH 4,2. Hígado de rata (52 mg) fue homogeneizado en 1 ml de esta composición. El homogeneizado se centrifugó a 10.000 x g durante cinco minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) para eliminar los componentes celulares, proteínas y ADN precipitados.

- 15 [0077] El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo limpio y se mezcló con 1 ml de etanol para precipitar ARN. El ARN precipitado se dejó sedimentar a 10.000 x g durante cinco minutos, se lavó con etanol 75% p/p y se disolvió en agua.

- 20 [0078] El rendimiento de ARN era 187 µg. La proporción $A_{260/280}$ era 1,74, lo que indicó la escasez de contaminación de proteína. El ARN aislado se utilizó con éxito para la RT-PCR empleando cebadores para GAPDH y no se detectó contaminación de ADN. El análisis de transferencia Northern del ARN aislado mostró bandas no degradadas de ARN ribosómico y una banda no degradada de ARNm para GAPDH.

Ejemplo 7

Aislamiento de ARN mediante precipitación con ácido fenólico usando reactivo concentrado dos veces

- 25 [0079] Hígado de rata (47 mg) se homogeneizó en 1 ml del reactivo descrito en el Ejemplo 6 en dos veces la concentración indicada en el Ejemplo 6. El reactivo concentrado contenía feniletanol 1% p/p de modo adicional. El homogeneizado se mezcló con 1 ml de agua para formar el reactivo precipitante.

- 30 [0080] El ADN, proteínas y otros componentes celulares precipitados se sedimentaron mediante centrifugación a 10.000 x g durante cinco minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C). El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo limpio y se mezcló con 1 ml de etanol para precipitar ARN. El ARN precipitado se dejó sedimentar a 10.000 x g durante 5 minutos, se lavó con etanol 75% p/p y se disolvió en agua.

- [0081] El rendimiento de ARN era 178 µg. La proporción $A_{260/280}$ era 1,77, lo que indicó la escasez de contaminación de proteína. El ARN aislado se utilizó con éxito para la RT-PCR empleando cebadores para GAPDH y no se detectó contaminación de ADN. El análisis de transferencia Northern del ARN aislado mostró bandas no degradadas de ARN ribosómico y una banda no degradada de ARNm para GAPDH.

35 Ejemplo 8

Aislamiento de ARN mediante el procedimiento de dos etapas de la invención

- 40 [0082] Cerebro de rata (61 mg) se homogeneizó en 1 ml del reactivo concentrado dos veces descrito en el Ejemplo 7. El homogeneizado se mezcló con 1 ml de agua y la mezcla resultante se centrifugó a 10.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) para eliminar el ADN, proteína y componentes celulares precipitados. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se mezcló con 0,05 ml de bromocloropropano. La mezcla se centrifugó y separó en una fase acuosa superior, una interfase y una fase orgánica.

- 45 [0083] La fase acuosa que contenía el ARN se transfirió a un tubo fresco y se acidificó a pH 2,9 con ácido láctico 5 M en isopropanol. El precipitado de ARN se hizo sedimentar a 10.000 x g durante cinco minutos, se lavó con etanol 75% p/p y se disolvió en agua.

[0084] El rendimiento de ARN era 33 µg. La proporción $A_{260/280}$ era 1,77, lo que indicó la escasez de contaminación de proteína. El ARN aislado se utilizó con éxito para la RT-PCR empleando cebadores para GAPDH y no se detectó contaminación de ADN. El análisis de transferencia Northern del ARN aislado mostró bandas no degradadas de ARN ribosómico y una banda no degradada de ARNm para GAPDH.

[0085] Para los especialistas en la técnica, resultarán aparentes otras variaciones o modos de realización de la invención a partir de la descripción y ejemplos anteriores sin desviarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

[0086] Otros aspectos de la invención incluyen lo siguiente:

- 5 Aspecto 1. Una composición que contiene fenol para aislar ARN purificado que comprende fenol a una concentración final que va de aproximadamente 3% p/p a aproximadamente 98% p/p y un tampón suficiente para mantener un pH de la composición final en el intervalo de pH 3,6 a pH inferior a 4,0.
- 10 Aspecto 2. Una composición que contiene fenol para aislar ARN purificado que comprende fenol a una concentración final que va de aproximadamente 3% p/p a aproximadamente 30% p/p y un tampón suficiente para mantener un pH de la composición final en el intervalo de pH 3,9 a pH inferior a 5,5.
- Aspecto 3. La composición según los aspectos 1 o 2, en la que el tampón se selecciona de al menos uno de entre acetato, citrato, fosfato, ftalato, tartrato, lactato o mezclas de los mismos.
- Aspecto 4. La composición según los aspectos 1 o 2, que además comprende al menos un inhibidor de ribonucleasa.
- 15 Aspecto 5. La composición según los aspectos 1 o 2 que además comprende derivados de fenol seleccionados de al menos uno de entre feniletanol, fenoxitol de propileno, timol, butilfenol o mezclas de los mismos a una concentración final de hasta 5% p/p.
- Aspecto 6. La composición según los aspectos 1 o 2, que además comprende solubilizantes de fenol seleccionados de al menos uno de entre polialcoholes, monoalcoholes y sales de guanidina.
- 20 Aspecto 7. La composición según el aspecto 1, que además comprende al menos un compuesto orgánico a una concentración que va de 1% p/p a 5% p/p suficiente para aumentar la densidad de la composición.
- Aspecto 8. Una composición acuosa libre de fenol para aislar ARN purificada, la composición libre de fenol que comprende al menos un inhibidor de ribonucleasa y un tampón seleccionado de al menos uno de entre acetato, citrato, fosfato, ftalato, tartrato, lactato o mezclas de los mismos, suficiente para mantener un pH de la composición en el intervalo entre pH 3,6 y pH inferior a 4,0.
- 25 Aspecto 9. La composición de cualquiera de los aspectos 1, 2 u 8, que además comprende un detergente.
- Aspecto 10. La composición de cualquiera de los aspectos 1, 2 u 8, que además comprende una sal orgánica o inorgánica y un agente quelante.
- 30 Aspecto 11. Una composición de separación de fases libre de fenol para su uso en el aislamiento de ARN purificado mediante separación de fases que comprende al menos un solvente orgánico hidrofóbico a una concentración final en el intervalo de 10% p/p a 40% p/p, y al menos un ácido suficiente para mantener un pH en el intervalo de pH 3,6 a un pH inferior a 4,0 durante la separación de fases, y un solubilizante de ácido opcional.
- 35 Aspecto 12. La composición del aspecto 11, en la que el solvente orgánico es al menos uno de entre cloroformo, tetracloruro de carbono, bromocloropropano, bromonaftaleno o bromoanisol.
- Aspecto 13. La composición del Aspecto 11 en el que el ácido es al menos uno de entre ácido fórmico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido aminocaproico, ácido láctico o ácido clorofenilacético.
- 40 Aspecto 14. Un método para aislar ARN purificado a partir de una muestra biológica que comprende
 - a) tratar la muestra con un reactivo que comprende fenol a una concentración final que va de 10% p/p a 60% p/p y al menos un inhibidor de ribonucleasa,
 - b) mezclar la muestra con al menos un solvente hidrofóbico mientras se mantiene un pH en el intervalo de pH 3,6 a pH inferior a 4,0,
 - 45 c) recuperar ARN purificado a partir de una fase acuosa a la que se añade un volumen igual de un solvente orgánico hidrosoluble para precipitar el ARN purificado, y

d) lavar y solubilizar el ARN precipitado.

Aspecto 15. El método del aspecto 14, en el que el reactivo en (a) comprende además comprende un tampón seleccionado de al menos uno entre acetato, citrato, fosfato, ftalato, tartrato, lactato o mezclas de los mismos.

5 Aspecto 16. El método del aspecto 14, en el que el reactivo de (a) comprende además al menos un inhibidor de ribonucleasa.

Aspecto 17. El método del aspecto 14, en el que el reactivo de (a) además comprende un detergente.

Aspecto 18. El método del aspecto 14, en el que el reactivo de (a) además comprende una sal orgánica o inorgánica y un agente quelante.

10 Aspecto 19. El método del aspecto 14, en el que el reactivo de (a) comprende además derivados de fenol seleccionados de al menos uno de entre feniletanol, fenoxitol de propileno, timol, butilfenol o mezclas de los mismos a una concentración final de hasta 5% p/p.

Aspecto 20. El método del aspecto 14, en el que el reactivo de (a) además comprende solubilizantes de fenol seleccionados de al menos uno de entre polialcoholes, monoalcoholes y sales de guanidina.

15 Aspecto 21. El método del aspecto 14, en el que el reactivo de (a) comprende además al menos un compuesto orgánico a una concentración que va de 1% p/p a 5% p/p suficiente para aumentar la densidad de la composición.

Aspecto 22. El método del aspecto 14, en el que la muestra se trata primero con la composición libre de fenol de cualquiera de los aspectos 8 u 11 antes de la etapa (a).

20 Aspecto 23. El método según los aspectos 14 o 20, en el que el reactivo de (a) es tamponado para mantener un pH en el intervalo de pH 3,6 a un pH inferior a 4,0.

Aspecto 24. El método según los aspectos 14 o 22 en el que la etapa (a) se lleva a cabo a un pH que va de pH 3,9 a pH 9,0, y la muestra se ajusta a continuación a un pH que va de pH 3,6 a un pH inferior a 4,0.

25 Aspecto 25. Un método para aislar ARN purificado a partir de una muestra biológica que comprende las etapas de

a) tratar la muestra con un reactivo que comprende fenol a una concentración final que va de 3% p/p a menos de 30% p/p y un tampón suficiente para mantener un pH de la composición en el intervalo de pH 3,6 a pH 5,5,

30 b) dejar sedimentar o filtrar la muestra para obtener una muestra purificada sustancialmente libre de ADN, proteínas y componentes celulares, añadir a la muestra purificada un volumen igual de un solvente orgánico hidrosoluble para precipitar el ARN purificado,

c) dejar sedimentar o filtrar el ARN precipitado, y

d) lavar y solubilizar el ARN precipitado.

35 Aspecto 26. Un método de dos etapas para aislar ARN purificado a partir de una muestra biológica que comprende

a) tratar la muestra con un reactivo que comprende fenol a una concentración final que oscila entre 3% p/p y menos de 30% p/p, al menos un caotropo y un tampón suficiente para mantener un pH de la composición en el intervalo de pH 3,6 a pH 5,5,

40 b) dejar sedimentar o filtrar la muestra para obtener una muestra purificada sustancialmente libre de ADN, proteínas y componentes celulares,

c) añadir a la muestra purificada al menos un solvente orgánico hidrofóbico y un tampón a una concentración suficiente para mantener un pH de la muestra purificada en el intervalo de pH 3,6 a un pH inferior a 4,0.

- d) recuperar ARN purificado a partir de una fase acuosa a la que se le añade un volumen igual de un solvente orgánico hidrosoluble para precipitar ARN purificado.
- e) dejar sedimentar o filtrar el ARN precipitado, y
- f) lavar y solubilizar el ARN precipitado.

5 Aspecto 27. El método del aspecto 26, en el que el solvente orgánico hidrofóbico es suficientemente denso para separar la fase orgánica durante la separación de fases.

10 Aspecto 28. El método según cualquiera de los aspectos 25 o 26, en el que el solvente orgánico hidrofóbico es seleccionado de al menos uno de entre caprolactona, diacetato de etilenglicol, dibenzoato de polietilenglicol, cloroformo, tetracloruro de carbono, bromocloropropano, bromonaftaleno, bromoanisol o mezclas de los mismos.

Aspecto 29. El método según cualquiera de los aspectos 25 o 26, en el que la muestra se trata con la composición de (a) a concentración de 1,5 X a 2,5X, y la muestra resultante se diluye para aproximarse a la solución no concentrada.

15 Aspecto 30. El método según cualquiera de los aspectos 14, 22, 25 o 26, en el que el solvente añadido para precipitar ARN es al menos uno de entre alcoholes inferiores, polialcoholes, acetona, diacetato de etilenglicol, sulfóxido de metilo o mezclas de los mismos.

Aspecto 31. Un método para aislar ARN purificado de una solución que contiene sales y ARN que comprende ajustar un pH de la solución con un tampón en una cantidad suficiente para lograr un pH máximo de 3,3, precipitando a continuación el ARN purificado.

20 Aspecto 32. El método del aspecto 31, en el que el pH va de pH 3,3 a pH 2,7.

Aspecto 33. El método del aspecto 31, en el que el tampón es al menos uno de un ácido orgánico o un ácido inorgánico.

Aspecto 34. El método del aspecto 31, en el que la sal se selecciona del grupo que consiste en sales de sodio, potasio, litio y guanidina.

25 Aspecto 35. El método del aspecto 31, en el que la solución contiene fenol a una concentración de 1% p/p a 6% p/p.

Aspecto 36. Un método para precipitar de modo selectivo ARN de peso molecular más elevado de una muestra biológica que comprende

30 tratar la muestra con una composición acuosa que comprende fenol a una concentración final que oscila de 1% p/p a 60% p/p, al menos un caotropeo, un tampón en una concentración suficiente para mantener un pH de la composición en el intervalo de pH 2,0 a pH 9,0, al menos un solvente orgánico hidrosoluble a una concentración de 10% p/p a 40% p/p para precipitar de modo selectivo ARN de peso molecular más elevado desde la muestra, y

precipitar ARN de peso molecular más elevado desde la muestra.

35 Aspecto 37. El método del aspecto 36 que además comprende la etapa de añadir a continuación solvente orgánico adicional suficiente para aumentar la concentración de solvente orgánico a al menos 50% p/p para precipitar ARN de peso molecular más bajo, y de precipitar ARN de peso molecular más bajo purificado a partir de la muestra.

40 Aspecto 38. El método del aspecto 36 que comprende la preparación de la muestra biológica según cualquiera de los aspectos 14, 22, 25 o 26 para obtener una solución acuosa de ARN, y precipitar ARN a partir de la solución acuosa.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición monofásica que contiene fenol para aislar el ARN purificado de una muestra biológica que comprende fenol y un tampón mezclados junto con la muestra biológica, estando el fenol a una concentración final que oscila de 3% p/p a menos de 30% p/p, y siendo el tampón suficiente para mantener un pH de la mezcla dentro del intervalo de pH 3,6 a pH 5,5.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que el tampón está seleccionado de al menos uno de entre acetato, citrato, fosfato, ftalato, tartrato, lactato o mezclas de los mismos.
3. Composición según la reivindicación 1, que además comprende al menos un inhibidor de la ribonucleasa.
- 10 4. Composición según la reivindicación 1, que además comprende derivados de fenol seleccionados de al menos uno de entre feniletanol, fenoxitol de propileno, timol, butilfenol o mezclas de los mismos a una concentración final de hasta 5% p/p.
5. Composición según la reivindicación 1, que además comprende solubilizantes de fenol seleccionados de al menos uno de entre polialcoholes, monoalcoholes y sales de guanidina.
- 15 6. Composición según la reivindicación 1, que además comprende un detergente.
7. Composición según la reivindicación 1, que además comprende una sal inorgánica u orgánica y un agente quelante.
8. Método de precipitación de ácido fenólico para aislar el ARN purificado de una muestra biológica que comprende las etapas de:
 - 20 (a) tratar la muestra biológica con un reactivo monofásico que comprende fenol a una concentración final que oscila de 3% p/p a menos de 30% p/p, y un tampón suficiente para mantener un pH de la composición en el intervalo de pH 3,6 a pH 5,5,
 - (b) dejar sedimentar o filtrar la mezcla resultante que contiene la muestra biológica para obtener una muestra biológica purificada sustancialmente libre de ADN, proteínas y componentes celulares,
 - 25 (c) añadir a la muestra biológica purificada un volumen igual de un solvente orgánico hidrosoluble para precipitar ARN purificado,
 - (d) dejar sedimentar o filtrar el ARN precipitado, y
 - (e) lavar y solubilizar el ARN precipitado.
- 30 9. Método según la reivindicación 8, en el que la muestra biológica se trata con la composición de la etapa (a) a una concentración de 1,5X a 2,5X, y la mezcla resultante que contiene la muestra biológica se diluye para aproximarse a la composición no concentrada de la etapa (a) de la reivindicación 8.
10. Método según la reivindicación 8, en el que el solvente añadido para precipitar el ARN es al menos uno de entre alcoholes inferiores, polialcoholes, acetona, diacetato de etilenglicol, sulfóxido de metilo o mezclas de los mismos.
- 35 11. Método para aislar ARN purificado de una solución que contiene ARN y sal que comprende la preparación de la muestra biológica según la reivindicación 8, que comprende además las etapas de: ajustar un pH de la solución con un tampón en una cantidad suficiente para obtener un pH máximo de 3,3 y precipitar a continuación el ARN purificado.
- 40 12. Método de la reivindicación 11, en el que el pH va de pH 3,0 a pH 2,7, y el tampón es al menos uno de un ácido orgánico o un ácido inorgánico.
13. Método de la reivindicación 11, en el que la sal esta seleccionada del grupo que consiste en sales de sodio, potasio, litio y guanidina.
- 45 14. Método de precipitación selectiva de ARN de peso molecular más elevado a partir de una muestra biológica que comprende:

preparar la muestra biológica según la reivindicación 8;

5

tratar la muestra biológica con una composición acuosa que comprende fenol a una concentración final que va de 1% p/p a 60% p/p, al menos un caotropeo, un tampón en una concentración suficiente para mantener un pH de la composición en el intervalo de pH 2,0 a pH 9,0, al menos un solvente orgánico hidrosoluble a una concentración de 10% p/p a 40% p/p para precipitar selectivamente ARN de peso molecular más elevado de la muestra biológica, y precipitar ARN de peso molecular más elevado purificado de la muestra biológica.

10

- 15.** Método según la reivindicación 14, que además comprende la etapa de añadir a continuación un solvente orgánico adicional en una cantidad suficiente para aumentar la concentración del solvente orgánico a al menos 50% p/p con el fin de precipitar ARN de peso molecular inferior, y precipitar ARN de peso molecular inferior purificado de la muestra biológica.