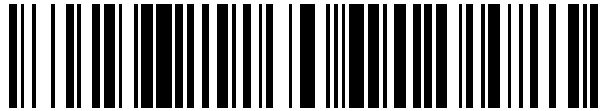


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 621**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2009 E 09011295 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2163622**

54 Título: **Procedimiento para obtener ARN corto así como kit para el mismo**

30 Prioridad:

04.09.2008 DE 102008045705

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

24.06.2014

73 Titular/es:

**MACHEREY, NAGEL GMBH & CO.
HANDELSGESELLSCHAFT (100.0%)
VALENCIENNER STRASSE 11
52355 DÜREN, DE**

72 Inventor/es:

**RADMACHER, EDMUND, DR.;
MÖLLER, KLAUS, DR.;
MEUSEL, MARKUS, DR. y
KRIEGER, ROBERT, DR.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 470 621 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para obtener ARN corto así como kit para el mismo

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de múltiples etapas para la obtención de al menos ARN corto con hasta 200 nucleótidos, así como un kit para el mismo.

10 En los últimos años se ha comprobado que en el caso de los ARNs cortos en células, no se trata de productos de degradación sin importancia de ARN largo, p. ej. de ARNr o ARNm, sino que éstos se sintetizan de un modo preestablecido. Juegan un papel esencial en la regulación génica, la síntesis de ARN, la modificación de ARN y el corte y empalme de ARN en casi todos los organismos vivos y continuamente se descubren nuevas funciones y, con ello, campos de aplicación. De manera correspondiente a su función, estructura, localización en la célula o participantes en la reacción, estos ARNs pequeños se subdividen en grupos tales como, p. ej., miARN, ARNsi, ARNsh, ARNsno, ARNscn, ARNpi, ARNtasi, ARNrasi, etc., cuyo número aumenta asimismo constantemente.

15 Los ARNs cortos se presentan la mayoría de las veces en forma de cadena sencilla y presentan típicamente longitudes en el intervalo de 17-35 nucleótidos. Sin embargo, también existen ARNs de doble cadena tal como, p. ej., ARNsi o ARNsh, los cuales, sin embargo, para el despliegue de su efecto, han de ser transformados en cadenas sencillas.

20 Mientras que para la mayoría de los ARNs cortos no se ha deducido todavía por completo la biosíntesis y el modo de funcionamiento, para algunas especies ya se pudieron desarrollar aplicaciones interesantes desde un punto de vista económico y científico. En este caso, son de particular interés miARN y ARNsi.

25 Los miARNs (micro ARNs) son codificados en el núcleo, se sintetizan en la célula y conducen a través de diversos mecanismos, por norma general, a la represión preestablecida de la expresión génica. Los genes afectados participan en este caso ante todo en el desarrollo, división y diferenciación de las células. Se pudo demostrar que el perfil de expresión de miARN de células sanas se diferencia claramente del que se encuentra en células con un desarrollo perturbado, p. ej. en el caso del cáncer. Con un "perfilado de miARN" basado en chips, es decir, con la
30 cuantificación de un conjunto de miARNs, se ha vuelto posible mientras tanto una identificación mucho más precisa de una enfermedad (cancerígena) que la que permitían los métodos actuales.

35 La formación de ARNsi de doble cadena (ARN de interferencia corto) se emplea en casi todas las células vegetales y animales para la defensa frente a patógenos. Después de que un patógeno se introduzca en el célula, se produce la mayoría de las veces una forma intermedia de ARNm de doble cadena que es cortado en pequeños ARNsi mediante complejos enzimáticos Dicer, propios de la célula. El propio ARNsi sirve entonces como sonda específica para la secuencia para el ARNm extraño de la célula que, con ello, es identificado, cortado y hecho de esta manera inocuo por complejos de nucleasa especiales (RISC). Esta represión en el plano del ARNm puede ser empleada entonces para reducir en su expresión a genes arbitrarios, por lo tanto también propios de la célula y, con ello,
40 entre otros, las proteínas correspondientes. Para ello, por ejemplo ARNsi sintetizado in vitro se introduce en las células, o se procura una síntesis intracelular de ARNsi a través de sistemas de vectores. Los ARNs cortos en las células determinan que los genes diana, que vienen predeterminados por la secuencia de los ARNs cortos, sean reprimidos por los mecanismos arriba descritos. Con ello, se abre una posibilidad muy elegante y sencilla de inactivar de manera predeterminada genes individuales, lo cual tiene un gran valor en el caso de la investigación
45 de la regulación génica y de la función de las proteínas. Con ello, este método es claramente superior a los procedimientos habituales tales como, por ejemplo, de la preparación de mutantes inactivados, en relación con los costes, complejidad y factibilidad general.

50 Para las aplicaciones mencionadas tales como transfección con ARNsi o "perfilado de miARN", pero también para la descodificación ulterior de la estructura y mecanismos funcionales, es necesario purificar a partir de los materiales de muestra las especies de ARN activas de la forma más cuantitativa posible. Adicionalmente, el ARN corto debe ser ampliamente liberado de un fondo muy grande de ARN largo y proteínas para la analítica consecutiva que cada vez es más sensible. Esto exige elevados requisitos al método de extracción, dado que los ARNs cortos se presentan la mayoría de las veces sólo en cantidades traza.

55 Según el estado actual de la técnica, casi cada una de las purificaciones de ARN pequeño se basa en el principio de separar del lisado de una muestra biológica primeramente las macromoléculas grandes tales como ADN, ARN largo y, en parte, también proteína. El ARN pequeño es precipitado a continuación por parte del alcohol y luego es

aislado, la mayoría de las veces a través de la unión a un soporte sólido. El punto crítico en el caso de este procedimiento es la separación lo más completa posible de la proteína antes de la precipitación de ARN pequeño, dado que de lo contrario, la proteína co-precipita y dificulta mucho una purificación ulterior del ARN pequeño.

5 El documento WO 2005/012523 A1 describe un procedimiento para la obtención de ARN corto con 100 nucleótidos o menos, en el que la separación de ADN y proteína se lleva a cabo a través de una extracción líquido-líquido con fenol/cloroformo. Todo el ARN se encuentra después de la extracción en la fase acuosa que debe a continuación ser separado de la mayor parte de la fase orgánica que contiene las proteínas y de la interfase que contiene el ADN. Después, mediante la adición de alcohol a la fase acuosa se crea una condición bajo la cual el ARN se une a
10 un soporte sólido.

En el caso de este procedimiento es desventajoso que el uso de fenol albergue un riesgo considerable para la salud del usuario, dado que el fenol es venenoso y cáustico. Además, se puede manifestar difícil retirar cuantitativamente la fase acuosa después de la extracción líquido-líquido sin arrastrar con ello trazas de la interfase con ADN o de la fase fenólica con proteína. Si la fase acuosa no se separa por completo de este fondo, deben asumirse pérdidas considerables en el rendimiento de ARN. Otro inconveniente de este procedimiento puede consistir en que la extracción líquido-líquido, y la separación de fases ligada con ello, no pueda ser automatizada sin más. Ante todo en relación con un posible diagnóstico rutinario futuro mediante “perfilado de miARN”, el proceso complejo y prolongado y la limitación del rendimiento de la muestra mediante tratamiento manual representa un inconveniente agravante.
15
20

Por lo tanto, otros procedimientos renuncian a la extracción con disolventes orgánicos. Así, en el documento WO 2005/012487 A2 se propone un procedimiento en el que ARN largo y ADN se separan mediante cromatografía en columna en presencia de pequeñas cantidades de alcohol. El ARN pequeño permanece en disolución y, después de aumentar el contenido en alcohol, es unido a un segundo soporte.
25

Desventajoso en este procedimiento es el hecho de que las proteínas, que se encuentran asimismo en disolución, no son separadas por completo mediante el procedimiento. En el caso de un aumento del contenido en alcohol para la separación del ARN pequeño, las proteínas, tal como se ha descrito antes, pueden co-precipitar y unirse con el ARN pequeño al soporte. Entonces, apenas es ya posible una extracción por lavado completa de la proteína. Otra desventaja resulta del hecho de que entre las proteínas celulares se encuentran a menudo también ARNasas que sin una purificación cuantitativa digieren los ARNs aislados y, con ello, reducen el rendimiento o bien contaminan mediante productos de degradación, en el peor de los casos lo hacen incluso inaprovechable.
30

Otro procedimiento para la purificación de especies de ARN pequeño se describe en el documento US 2007/0202511 A1. Mediante la mezclado simultánea o secuencial de una disolución con contenido en ARN con un reactivo caotrópico y sales de metales del I y II grupos principales del Sistema Periódico, se precipitan ARNs largos y ADN genómico, mientras que moléculas de ARN corto permanecen en disolución. A continuación, el sobrenadante que contiene el ARN corto se separa del precipitado, y los ARNs cortos se continúan purificando. Para ello, pasan a emplearse procedimientos de centrifugación o diferentes procedimientos cromatográficos.
35
40

Lo desventajoso en el caso de este procedimiento es que tampoco en este caso se garantiza la separación completa de proteínas. El procedimiento requiere una subsiguiente purificación cromatográfica del ARN pequeño, para la cual se propone de nuevo una precipitación alcohólica, cuyo problema ya se mencionó en presencia de proteína. No está prevista una separación individual de las proteínas.
45

Un procedimiento que conduce a una separación de la proteína, pero que se contenta sin una extracción líquido-líquido con fenol, se encuentra en el producto comercial “All Prep DNA/RNA/Protein” de la razón social Qiagen, Hilden (DE) para la purificación de ADN, ARN largo y proteína. En este caso, el ADN se une a una primera membrana de sílice en presencia de sal caotrópica. Después de la adición de alcohol puede unirse también el ARN largo a una segunda membrana de sílice. El lisado remanente se mezcla con una disolución con contenido en zinc para la obtención de la proteína. La proteína precipita en este caso y puede ser aislada mediante centrifugación.
50

Este procedimiento no está pensado ni es adecuado para la purificación de ARN corto, por que la química de unión utilizada en el kit propuesto, en interacción con membranas de sílice, conduce a un corte de aprox. 200 nucleótidos, de modo que el ARN corto se pierde en el transcurso de la purificación.
55

A partir de otro producto comercial “Rneasy® Plus Mini kit y Rneasy MinElute® Cleanup Kit” de la razón social

Qiagen, Hilden (DE) se conoce un procedimiento para la separación de ARN largo y corto. No obstante, este procedimiento no es adecuado para la obtención cuantitativa de ARN corto de elevada pureza en presencia de proteínas disueltas, dado que para estas últimas no está prevista separación alguna.

5 La presente invención tiene por misión crear un procedimiento que posibilite una obtención lo más cuantitativa posible de ARN corto a partir de una muestra y que en este caso se contenga simultáneamente de forma amplia sin productos químicos venenosos. Además, el procedimiento debería ser adecuado para poder llevarse a cabo en un procedimiento automatizado, es decir, sin la extracción líquido-líquido difícil de automatizar, p. ej. con fenol/cloroformo. En este caso, el ARN corto obtenido puede presentar también un elevado grado de pureza.
10 Además, el procedimiento debería crear la posibilidad de obtener los otros componentes de una muestra de este tipo, en particular ácidos nucleicos largos y proteínas de forma individualizada, debiendo obtenerse también éstos de forma lo más cuantitativa posible y con una elevada pureza. Otra misión consiste en habilitar un kit adecuado para llevar a cabo el procedimiento.

15 La primera parte del problema se resuelve, de acuerdo con la invención, mediante un procedimiento con las siguientes etapas:

- a) habilitar una disolución biológica que contiene al menos ARN corto así como proteínas y/o ácidos nucleicos largos (ARN largo y ADN);
- 20 b) separar las proteínas y los ácidos nucleicos largos de la disolución, precipitando al menos las proteínas y mezclando la disolución para la precipitación de las proteínas con iones de metales bivalentes, ajustándose la concentración de los iones de metales a 0,2 hasta 0,6 M;
- 25 c) adsorción del ARN corto a un (primer) soporte sólido después de la precipitación de las proteínas;
- d) obtención del ARN corto mediante desorción del soporte.

30 Sorprendentemente, se encontró que en el caso de un procedimiento en el que al menos se precipitan primero las proteínas a partir de la disolución con contenido en ARN y, a continuación, se adsorbe el ARN corto a un soporte del que se puede desorber de nuevo en otra etapa, el ARN corto contenido se obtiene con un elevado rendimiento con una pureza simultáneamente elevada.

35 Si en el momento de la adsorción del ARN corto al primer soporte estuvieran todavía presentes grandes cantidades de proteínas, entonces éstas precipitarían asimismo bajo las condiciones correspondientes y se unirían a la matriz de unión. En el peor de los casos se produciría una obstrucción de la matriz de unión y una considerable contaminación del ARN corto con proteína. Según el procedimiento de acuerdo con la invención está casi excluido un arrastre y/o precipitación de proteínas de este tipo mediante la precipitación previa de la proteína y las siguientes etapas de lavado pueden reducirse a un mínimo.
40

Otra ventaja del procedimiento de acuerdo con la invención consiste en la posibilidad de obtener proteínas en una forma que pueda ser utilizada directamente para otros fines. Este no es el caso en todos los restantes procedimientos para la obtención de ARNs cortos.
45

Por ARN corto se entiende en el marco de la presente invención moléculas de ARN que típicamente presentan hasta 200 nucleótidos, en particular hasta 150 nucleótidos o hasta 100 nucleótidos, o incluso sólo hasta 75 nucleótidos o solamente 40 nucleótidos. El ARN corto debe ser separado mediante el procedimiento de acuerdo con la invención, en particular de ARN largo, ADN y proteínas.
50

El ARN corto se diferencia en el marco de esta invención de los ARNs largos tales como, por ejemplo ARN ribosomal (ARNr) o ARN mensajero (ARNm). ARNs pequeños en el sentido de esta invención son, por ejemplo, ARNr 5.8S, ARNr 5S, ARNs de transferencia (ARNt), ARN nuclear pequeño (ARNsn), ARN nucleolar pequeño (ARNsno), micro ARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (ARNsi), ARNsi que actúa en trans (ARNtasi), ARNsi asociado a repeticiones (ARNrasi), ARN temporal pequeño (ARNst), ARN pequeño no codificante (ARNtnc),
55 ARN de pequeña exploración (ARNsc) y ARN modulador pequeño (ARNsm).

Como fuente para los ARNs cortos a extraer pueden servir materiales biológicos naturales tales como células,

tejido, órganos, organismos, líquidos corporales, etc., al igual que mezclas de reacción in vitro en las que se producen moléculas de ARN, se cortan o modifican tales como, por ejemplo, un ARNds largo de digestión in vitro mediante Dicer. Básicamente, el procedimiento de acuerdo con la invención es aplicable, en principio, a todas las muestras con contenido en ARN pequeño.

5 Para habilitar la disolución biológica, las muestras se someten primero a una lisis. Para ello se emplean habitualmente tampones de lisis con reactivos caotrópicos. Reactivos caotrópicos son conocidos por el experto en la materia. Éstos destruyen membranas, desnaturalizan proteínas, conducen a la lisis de la célula y liberan ácidos nucleicos. De acuerdo con su tendencia de debilitar interacciones hidrófobas, los iones se disponen en la así denominada serie de Hofmeister. Iones con un carácter caotrópico acusado son, p. ej., guanidinio, bario y calcio. Sales caotrópicas empleadas a menudo en la purificación de ácidos nucleicos son, entre otras, hidrocloreuro de guanidinio, tiocianato de guanidinio o perclorato de sodio. Las sales descritas conducen en la lisis a una disolución de las células o de las asociaciones celulares bajo inactivación simultánea de RNAsas. Además, la lisis puede ser sustentada mecánicamente según el estado conocido de la técnica. Para ello, el experto en la materia puede recurrir a una pluralidad de posibilidades tales como, por ejemplo, sistemas de rotor/estator, morteros, molinos de 10 bolas, etc. Después de la lisis, se unen habitualmente procedimientos en los que se separan componentes (celulares) insolubles, por ejemplo mediante filtración o centrifugación.

20 La precipitación de las proteínas a partir de la disolución tiene lugar antes de la adsorción del ARN corto al soporte sólido. En este caso, con la precipitación de las proteínas pueden separarse también los ácidos nucleicos largos. En particular, cuando los ácidos nucleicos largos deben obtenerse para otros fines, se aconseja, sin embargo, adsorber los ácidos nucleicos largos, preferiblemente antes de la precipitación de las proteínas, a un (segundo soporte) sólido. De este modo se posibilita una separación ampliamente completa de los ácidos nucleicos largos y, además de ello, existe la posibilidad de aportar éstos, separados de las proteínas, a un aprovechamiento posterior. Para ello, los ácidos nucleicos largos son desorbidos del (segundo) soporte sólido, en particular son eluidos, eventualmente después de al menos un proceso de lavado.

30 Mediante el procedimiento se posibilita, por vez primera, aislar proteína, ARN largo y ARN corto a partir de una muestra no dividida única con una elevada pureza y, ante todo, también de forma cuantitativa. Con ello, el procedimiento abre la posibilidad de una determinación cuantitativa fiable tanto de ARN corto como de ácidos nucleicos largos y proteínas. Esto es de un avance decisivo para el examen de la expresión génica, dado que la cantidad de muchos ARNs pequeños (p. ej. miARN) tiene una influencia reguladora sobre la cantidad de muchos ARNm (ARN largo) que, de nuevo, determinan conjuntamente la cantidad de la proteína en cada caso expresada. Sin embargo, no sólo en el caso del examen de procesos de regulación naturales es importante el conocimiento preciso de las cantidades existentes de los tres componentes. Por medio de ARNs pequeños (p. ej. ARNsi) que se introducen desde el exterior en la célula, se pueden regular el ARNm y el contenido en proteínas. Para el examen exacto de una relación dosis-efecto se requiere de nuevo el conocimiento de las cantidades de ARN pequeño, ARN 35 largo y proteína presentes en una muestra.

40 Al lisado se le debería añadir, en particular, disolvente orgánico miscible con agua en una cantidad que sea suficiente para unir ácidos nucleicos largos (ARN y ADN) al soporte. De manera preferida, la concentración de disolvente se ajusta a 15-40%, de manera particularmente preferida a 20-30%, todavía mejor a 25%, en cada caso referido a la disolución en conjunto. Estas concentraciones conducen a una buena adsorción de los ácidos nucleicos largos, pero dejan al ARN corto en la disolución. Disolventes orgánicos preferidos son uno o varios 45 alcoholes, en particular etanol y/o 2-propanol.

Otra ejecución del procedimiento de acuerdo con la invención prevé mezclar la disolución para la adsorción de los ácidos nucleicos largos con una sal de elevada concentración. Para ello se adecua particularmente una sal caotrópica o una mezcla de varias sales caotrópicas. En este caso, por la expresión "concentración elevada" se entienden concentraciones de sales mayores que/iguales a 1 M. Es particularmente ventajoso que la concentración de la sal en la disolución se ajuste a un intervalo de 1 a 10 M.

55 En la medida en que el ARN largo deba obtenerse de forma aislada, es conveniente separar el ADN de los ácidos nucleicos adsorbidos al segundo soporte. Esto puede tener lugar, por ejemplo, mediante digestión por DNasa. El ARN largo puede entonces eluirse del segundo soporte, eventualmente después de un proceso de lavado con tampones de lavado adecuados.

Para la separación de las proteínas, la disolución, que contiene las especies de ARN cortas, no ligadas, se mezcla

con un reactivo precipitador de proteínas. Preferiblemente, las proteínas se precipitan con una disolución que contiene iones de metales bivalentes. Para ello, se emplean sales de los correspondientes metales. Metales adecuados en este sentido son, p. ej., Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb y Ba, convenientemente en un intervalo de concentraciones (concentración final eficaz) de 0,01 a 1,5 M, mejor de 0,05 a 1 M, todavía mejor de 0,1 a 0,8 M, de manera particularmente preferida de 0,2 a 0,6 M y, óptimamente, de 0,30 a 0,40 M.

A continuación, la disolución se libera de la proteína precipitada mediante centrifugación o haciéndola pasar a través de un dispositivo de filtro adecuado. La fracción que ha pasado está entonces ampliamente exenta de proteínas. La proteína separada se encuentra directamente a disposición para análisis ulteriores. Así, p. ej. de manera conocida se puede disolver en tampón Laemmli, cuantificar y someter a una electroforesis en gel y emplear en transferencias Western. Sorprendentemente, se comprobó entonces que esta precipitación de proteínas, que también es adecuada para precipitar ARN largo o ADN y, por lo tanto, hasta ahora sólo se empleó después de la separación de ARN y ADN, no incluye las especies de ARN pequeñas.

La adsorción del ARN corto a un (primer) soporte sólido después de la precipitación de las proteínas se fomenta o bien alcanza debido a que a la disolución se le añaden otros disolventes orgánicos, miscibles con agua, hasta alcanzar una elevada concentración, de manera preferida hasta alcanzar una concentración final de 30 a 80% en vol., preferiblemente de 40 a 70% en vol., en particular de aproximadamente 50 a 60% en vol. en cada caso referido a la disolución total.

Disolventes particularmente adecuados son en este caso disolventes no alcohólicos. Representantes de este grupo son, por ejemplo, acetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano (THF), dioxano y dimetilformamida (DMF). Éstos pueden emplearse individualmente o también en forma de mezcla entre sí. Estos disolventes posibilitan una buena adsorción del ARN corto al soporte. Otra ventaja del uso de disolventes orgánicos no alcohólicos para la precipitación del ARN corto consiste en que de este modo se alcanza una reducción de la contaminación del ARN corto por parte de proteínas.

Para la obtención del ARN corto mediante desorción del soporte, éste se lava y las moléculas de ARN corto se eluyen a continuación en una forma altamente pura y concentrada.

Por soportes sólidos se entienden fases sólidas que son insolubles en agua y a las que se unen ácidos nucleicos en fase acuosa, preferiblemente con una elevada fuerza iónica. Ejemplos son partículas porosas o no porosas tales como sílice, vidrio, cuarzo, zeolitas o mezclas de los mismos. La expresión fase sólida puede designar, además, partículas magnéticas o no magnéticas, polímeros y materiales que están revestidos, por ejemplo, con sílice, vidrio, cuarzo o zeolitas. Además, el soporte sólido puede presentarse en forma de polvo o suspensiones, o bien puede estar configurado en forma de una membrana, una capa de filtro, una fritada, un monolito u otro cuerpo sólido de otro tipo. Los primero y segundo soportes sólidos pueden ser idénticos o diferentes en el procedimiento de acuerdo con la invención o en el kit de acuerdo con la invención.

Preferiblemente, como soportes sólidos se utilizan membranas de sílice o velos de fibras de vidrio. Si se utilizan soportes sólidos en forma de membranas o velos, el flujo a través de estas matrices de unión puede tener lugar mediante gravitación, centrifugación o mediante la aplicación de un vacío.

Una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención prevé fijar en una o varias capas la matriz de unión de ARN en cuerpos huecos con orificio de entrada y salida. Cuerpos huecos de este tipo son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo como cuerpos de centrifugas Minispin. Alternativamente, la matriz de unión puede presentarse también en forma de partículas magnéticas o no magnéticas. Mientras que en el caso de las columnas Minispin, las etapas de unión, lavado, separación y elución son inducidas por la fuerza centrífuga, en el caso de utilizar perlas magnéticas se puede recurrir a una separación magnética. Dispositivos correspondientes son conocidos por el experto en la materia. Si se utilizan perlas no magnéticas, entonces la separación puede tener lugar mediante sedimentación o centrifugación.

En el caso de soportes sólidos en partículas tiene lugar una incubación del lisado con la matriz de unión y, a continuación, la separación del soporte sólido. Esto puede tener lugar, tal como se ha descrito antes, por ejemplo mediante sedimentación, centrifugación o filtración. Esto se cumple tanto para los primeros como también para los segundos soportes sólidos en el marco del procedimiento de acuerdo con la invención.

Otro objeto de la presente invención es un kit para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención, que

contiene

- a) al menos un soporte sólido para la adsorción de ácidos nucleicos;
- 5 b) un reactivo precipitador de proteínas que contiene iones de metales bivalentes;
- c) al menos una sustancia de unión para la absorción selectiva de ARN corto a un soporte sólido, siendo la sustancia de unión un disolvente orgánico miscible con agua y no alcohólico;
- 10 d) instrucciones con la descripción de las etapas del procedimiento de acuerdo con la invención.

Con ayuda del kit de acuerdo con la invención se proporcionan al usuario, junto a una recopilación de todos los productos químicos y materiales necesarios para llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención, instrucciones que reducen el riesgo de errores de aplicación y, de este modo, pueden garantizar el éxito en la realización práctica del procedimiento de acuerdo con la invención. Las instrucciones de acuerdo con la característica e) puede presentarse, por ejemplo, en forma escrita o almacenadas en un CD o DVD.

Según una forma de realización, preferida, en el kit de acuerdo con la invención está presente al menos una sustancia de unión para el ajuste de las condiciones de unión para la adsorción selectiva de ácidos nucleicos largos a un soporte sólido. Como sustancia de unión entran en consideración para este fin los disolventes orgánicos descritos con mayor detalle, en particular un disolvente orgánico miscible con agua que comprende uno o varios alcoholes, ante todo etanol y/o propanol.

En el caso de otra forma de realización, en el kit de acuerdo con la invención está presente, como al menos una sustancia de unión, una sal a base de una o varias sales caotrópicas. El kit puede presentar, además, una DNasa para una digestión de ADN.

Según otra forma de realización preferida, el kit presenta, como reactivo precipitador de proteínas, al menos un compuesto con contenido en iones de metales. Estos son, por norma general, sales de metales. En este caso, el compuesto con contenido en iones de metales se elige preferiblemente de compuestos o bien sales que incluyen los elementos Fe, Ce, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb y/o Ba.

Otra disposición del kit de acuerdo con la invención se distingue por que está presente un disolvente orgánico como al menos una sustancia de unión para la adsorción de ARN corto. En este caso, se trata preferiblemente de un disolvente no alcohólico miscible con agua, en particular acetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano (THF), dioxano y dimetilformamida (DMF) o mezclas de estos.

Para el kit de acuerdo con la invención entran en consideración los soportes sólidos ya mencionados que son adecuados para la adsorción de los ácidos nucleicos.

El kit puede contener, además, al menos un tampón de lavado, así como al menos un reactivo de elución para la desorción de al menos el ARN corto del soporte.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Formas de realización preferida de la presente invención se describen en particular con ayuda de ejemplos de realización en relación con figuras correspondientes. En este caso muestran:

- 50 Figura 1 un electroferograma de una fracción de ARN largo de hígado de cerdo, purificada según el procedimiento de acuerdo con la invención a través de columnas de membrana de sílice;
- Figura 2 un electroferograma de una fracción de ARN corto de hígado de cerdo, purificada según el procedimiento de acuerdo con la invención a través de columnas de membrana de sílice;
- 55 Figura 3 una recopilación en forma de tabla de los rendimientos de ARN determinados a través de UV-VIS (A260, A280) y purezas, así como del valor Cp de una cuantificación miR-16 qRT-PCR del material diluido en la relación 1 : 10⁵. Las fracciones de ARN largo y corto procedentes de hígado

de cerdo se obtuvieron según el procedimiento de acuerdo con la invención a través de columnas de membrana de sílice;

- 5 Figura 4 una SDS-PAGE de las proteínas precipitadas a partir del lisado de hígado de cerdo según el procedimiento de acuerdo con la invención. Pista 1: marcador de bajo peso molecular, pistas 2, 3: 10 μ l de proteína (3 μ g/ μ l), pistas 4, 5: 5 μ l de proteína (3 μ g/ μ l);
- 10 Figura 5 un electroferograma de una fracción de ARN largo de células HeLa, purificado según el procedimiento de acuerdo con la invención a través de partículas de sílice;
- 10 Figura 6 un electroferograma de una fracción de ARN corto de células HeLa, purificado según el procedimiento de acuerdo con la invención a través de partículas de sílice;
- 15 Figura 7 una recopilación en forma de tabla de los rendimientos de ARN determinados a través de UV-VIS (A260, A280) y purezas, así como del valor Cp de una cuantificación miR-16 qRT-PCR del material diluido en la relación 1 : 10⁵. Las fracciones de ARN largo y corto procedentes de células HeLa se obtuvieron según el procedimiento de acuerdo con la invención a través de partículas de sílice;
- 20 Figura 8 una SDS-PAGE del lisado de células HeLa según el procedimiento de acuerdo con la invención. Pista 1: marcador de bajo peso molecular, pistas 2, 3: 10 μ l de proteína (0,5 μ g/ μ l);
- 25 Figura 9 un gel de TAE agarosa al 1% de una tanda de reacción DICER purificada in vitro. Pista 1: marcador de 100 pb, pistas 2, 3: 30 μ l de ARNds purificado no cortado, pista 4: 30 μ l de tanda reacción no purificada, pistas 5, 6: 30 μ l de ARNsi purificado;
- 30 Figura 10 el rendimiento del ARN a partir de 30 mg de hígado de cerdo sin y con precipitación previa de la proteína conforme al procedimiento de acuerdo con la invención;
- 30 Figura 11 un electroferograma de la fracción de ARN corto de hígado de cerdo, purificada según el procedimiento de acuerdo con la invención después de precipitación de proteínas con Zn 200 mM;
- 35 Figura 12 un electroferograma de la fracción de ARN corto de hígado de cerdo, purificada según el procedimiento de acuerdo con la invención después de precipitación de proteínas con Zn 400 mM;
- 40 Figura 13 un electroferograma de fracción de ARN corto de hígado de cerdo, purificada según el procedimiento de acuerdo con la invención después de precipitación de proteínas con Zn 600 mM;
- 45 Figura 14 una recopilación en forma de tabla de los rendimientos de ARN determinados a través de UV-VIS (A260, A280) y purezas, así como del valor Cp de una cuantificación miR-16 qRT-PCR del material diluido en la relación 1 : 10⁵. Las fracciones de ARN largo y corto procedentes de hígado de cerdo se obtuvieron según el procedimiento de acuerdo con la invención a través de columnas de membranas de sílice;
- 50 Figura 15 una representación de las cantidades de proteína a partir de 30 mg de hígado de cerdo cuantificadas en el lisado, después de precipitación del lisado conforme al procedimiento de acuerdo con la invención y, finalmente, en el material eluido de ARN después de la purificación;
- 55 Figura 16 un electroferograma de la fracción completa de ARN después de la purificación a partir de 30 mg de bazo de cerdo por medio de AllPrep DNA/RNA/Protein (Qiagen, N°. de Art. 80.004);
- 55 Figura 17 un electroferograma de las fracciones agrupadas de ARN largo y corto después de la purificación a partir de 30 mg de bazo de cerdo conforme al procedimiento de acuerdo con la invención.

Ejemplo 1:

Aislamiento de proteína, ARN largo y ARN corto a partir de tejidoLisis celular

- 5 30 mg de hígado de cerdo se mezclaron con 300 μ l de tampón de lisis (tiocianato de guanidinio 5 M, β -mercaptoetanol al 1%, citrato de sodio 30 mM pH 5) y se desmenuzaron mecánicamente mediante Micropistilo hasta que el tejido se había disuelto casi por completo. El lisado, así resultante, se separó a continuación, mediante filtración, de componentes sólidos no lisados. Para ello, el lisado, tal como se describe en el protocolo estándar de NucleoSpin[®] RNA II (kit para el aislamiento de ARN total, Macherey-Nagel, Art. No. 740955.50) se centrifugó a través de un filtro NucleoSpin[®].

Separación de los ácidos nucleicos largos

- 15 El filtrado transparente se ajustó con etanol (al 96-100%) a una concentración de etanol de 25% y se mezcló cuidadosamente con el fin de ajustar la condición de unión para ácidos nucleicos largos. Se llevaron a cabo las siguientes etapas conforme al protocolo NucleoSpin[®] RNA II (Rev. 08 / octubre 2007). Una columna NucleoSpin[®] RNA II se cargó con la muestra y los ácidos nucleicos largos se unieron mediante centrifugación. En este caso, se trata de un cuerpo hueco con orificio de entrada y salida en el que está incorporada como soporte sólido una membrana de sílice. A continuación, se produjo la digestión por DNasa del ADN unido en la columna, así como el lavado y la elución del ARN largo que queda en la columna conforme al protocolo.

Aislamiento de la proteína

- 25 La fracción que ha pasado después de la primera columna NucleoSpin[®] RNA II de aprox. 400 μ l se combinó con $\frac{3}{4}$ de volumen (aprox. 300 μ l) de un tampón de precipitación de proteínas (ZnCl₂ 900 mM, acetato de sodio 900 mM pH 5,0) y se mezcló bien. El precipitado de proteínas en forma de copos, blanco resultante, se aisló entonces mediante centrifugación (5 min, TA, 14000xg) y retirada del sobrenadante.

Aislamiento del ARN pequeño

- 30 El sobrenadante transparente de la muestra después de la separación de las proteínas se mezcló con tetrahidrofurano (THF), de modo que la proporción del THF ascendió a aprox. 55%. Una columna NucleoSpin[®] RNA II en un tubo de recogida (2 ml) se cargó entonces con la muestra y se centrifugó. En este caso, los ácidos nucleicos cortos se unen al soporte de sílice (1 min, TA, 11000xg). La columna se cargó con 600 μ l de un tampón de lavado de sal caotrópica (tiocianato de guanidinio 1,33 M, citrato de sodio 30 mM, pH 7, EtOH al 66%) y se centrifugó (1 min, 11000xg). Tuvo lugar una segunda etapa de lavado con 600 μ l de un tampón de lavado exento de sal caotrópica (Tris/HCl 2,5 mM pH 7,5, NaCl 20 mM, etanol al 80%). La columna se cargó entonces de nuevo con 200 μ l de este tampón y se secó mediante centrifugación (2 min, TA, 11000xg). El ARN corto se eluyó entonces con 50 μ l de agua exenta de RNasa.

Caracterizador del ARN aislado y de la proteína

- 45 En cada caso 1 μ l de los materiales eluidos de ARN largo y corto se sometió a una electroforesis con ayuda de un bioanalizador Agilent 2100 en un Agilent RNA 6000 Nano Kit con chip (No. de Art. 5067-1511).

- 50 Las fracciones aisladas del ARN pequeño y del ARN largo se cuantificaron mediante medición de la absorción a 260 nm ($A_{260} = 1$ corresponde a una concentración de aprox. 40 μ g/ml en una cubeta patrón de 1 cm). La pureza se determinó a través del cociente A_{260}/A_{280} .

- Representativo para todos los miARNs aislados en la fracción de ARN pequeño, miR-16 se determinó mediante RT-PCR cuantitativa según los datos del fabricante (Applied Biosystems Art. No. 4373121, 4324018 y 4366596) en un aparato LightCycler de Roche. Para la medición, la muestra se diluyó a aprox. 1:10⁵.

- 55 Las proteínas aisladas/precipitadas se lavaron y secaron según el protocolo estándar NucleoSpin[®] RNA/Protein (Macherey-Nagel, Art. No. 740933.50). Las proteínas se disolvieron en el tampón de carga de proteínas (PLB – siglas en inglés) del kit y se sometieron a una SDS-PAGE.

Resultados

La Figura 1 muestra un electroferograma típico de ARN animal con picos de ARN 18S y 28S claros. Los ARNs cortos que se presentan en grandes cantidades no se observan aquí. Por el contrario, se manifiestan claramente en el electroferograma de la fracción purificada de ARN corto en la Figura 2 en aproximadamente 25-30 s poco después del pico del marcador. No se observan restos de ARN largo, p. ej., los picos de ARNr que dominan en la Figura 1. Por consiguiente, las dos figuras muestran un fraccionamiento completo en ARN corto y largo.

Los rendimientos de ARN y las purezas de las dos fracciones están recopilados en la Figura 3. El valor Cp de 17,9 en la qRT-PCR para la fracción diluida en la relación 1:10⁵ del ARN corto muestra la elevada concentración de los miARNs aislados. El control negativo de este sistema PCR TaqMan[®] tampoco proporciona después de 50 ciclos producto alguno. La ausencia de inhibidores de la PCR se confirmó mediante series de dilución y determinación de la eficacia de amplificación (datos no mostrados).

La Figura 4 muestra en el SDS-PAGE que mediante la precipitación no precipitaron, por ejemplo, sólo proteínas pequeñas o sólo proteínas grandes, sino que es visible la totalidad de todas las proteínas celulares, independientemente de su tamaño. Esto es una premisa importante cuando las proteínas deban continuar analizándose subsiguientemente (p. ej. transferencia Western).

Ejemplo 2:Extracción y purificación de miARNs a partir de células con partículas de sílice

Para la representación de la aplicabilidad del procedimiento a otros materiales de muestra y matrices de unión se aislaron ARN corto y largo así como proteína a partir de 3 x 10⁶ células HeLa con ayuda de partículas de sílice. La lisis y la purificación tuvieron lugar tal como se describe en el Ejemplo de realización 1. En lugar de las columnas NucleoSpin[®] RNA II con membrana de sílice se utilizaron, sin embargo, partículas de sílice como matriz de unión.

Para la unión de los ácidos nucleicos y para las etapas de lavado y elución, las partículas de sílice se suspendieron en la muestra respectiva o bien el tampón respectivo. Para la unión y elución, se incubó durante 5 min, para las etapas de lavado sólo durante 1 min a temperatura ambiente. Después de una centrifugación para la sedimentación de las partículas, se retiró el sobrenadante y se transfirió eventualmente a un nuevo recipiente.

La caracterización tuvo lugar tal como se recoge en el Ejemplo 1.

Resultado

Análogamente al Ejemplo de realización 1, también se obtuvieron dos fracciones con partículas de sílice como fase sólida. El ARN largo está representado en la Figura 5, el corto en la Figura 6. Una recopilación en forma de tabla de los rendimientos e impurezas se encuentra en la Figura 7. La fracción de proteína separada mediante SDS-PAGE se muestra en la Figura 8.

Ejemplo 3:Purificación de ARNs a partir de una digestión *in vitro* con DICER

A partir de una tanda de reacción *in vitro*, en la que se cortó ARN largo de doble cadena (aprox. 400 pb) por parte de la enzima DICER para formar ARNs de doble cadena pequeño, debe purificarse por completo el ARN largo no cortado así como la enzima DICER. Mediante variación de las cantidades de etanol, tampón de lisis y tampón de precipitación de proteínas, el corte se desplaza hacia abajo, de modo que el ARNs pequeño puede ser aislado de forma limpia.

Separación del ARNs largo

150 µl de una tanda de reacción *in vitro* se mezclaron con 150 µl de tampón de lisis (véase el Ejemplo 1) y 200 µl de etanol (al 96-100%). Una columna NucleoSpin[®] RNA II se cargó con la muestra y el ARNs largo se unió mediante centrifugación. El ARNs largo se continuó purificando después de la unión como el ARN corto del Ejemplo de realización 1 (lavado y elución).

Purificación del ARNsi

5 La fracción que ha pasado se mezcla con 100 μ l de tampón de precipitación de proteínas, no obstante en este punto se renunció a la separación de proteínas, dado que la tanda de reacción contenía solo cantidades mínimas de proteína. La muestra se mezcló entonces con 800 μ l de dioxano y se cargó en una segunda columna NucleoSpin[®] RNA II. El ARNsi unido se continuó purificando tal como el ARN corto del Ejemplo de realización 1.

Caracterización del ARN aislado

10 Los dos materiales eluidos con ARNs y ARNsi largos separados se analizaron en un gel de agarosa TAE EtBr al 1% (1 h, 75 V).

Resultado

15 En la Figura 9 se puede ver el fraccionamiento con éxito de una tanda de reacción in vitro (pista 4). Las pistas 5 y 6 muestran fracciones limpias del producto de ARNsi corto de doble cadena de 21 pb, que está ahora totalmente exento del ARN de partida largo de 400 pb. Esto se representa sin restos del ARNsi corto en las pistas 2 y 3.

Ejemplo 4:Purificación de ARN largo antes y después de la precipitación de proteínas

25 Este ensayo demuestra que el ARN largo y el ADN en la precipitación de proteínas son precipitados por completo. De manera sorprendente, se encontró que el ARN corto permanece en este caso en disolución y, a continuación, puede ser purificado.

Aislamiento de ARN largo antes de la precipitación de proteínas

30 Al igual que en el Ejemplo de realización 1, se lisaron tres muestras, se lisaron con etanol y se cargaron en columnas NucleoSpin[®] RNA II. El ADN en las columnas se digirió tal como se describe, las columnas se lavaron y el ARN largo se eluyó. Se renuncia a la precipitación de la proteína y a la purificación del ARN corto del filtrado.

Aislamiento de ARN largo después de la precipitación de proteínas

35 Tres muestras adicionales se lisaron asimismo tal como se describe en el Ejemplo de realización 1 y se mezclaron con etanol. Sin embargo, se obvió la separación de los ácidos nucleicos largos a través de la columna NucleoSpin[®] RNA II, y se llevó a cabo directamente la precipitación de proteínas descrita. Después de la separación del precipitado de proteínas, el lisado transparente se ajustó a una concentración final de 55% de THF. Esta concentración en disolvente orgánico es suficiente, tal como lo demuestra el Ejemplo 1, como para unir incluso miARNs pequeñísimos, por consiguiente debe por lo tanto también conducir a la unión de ARN largo. La muestra se cargó en una columna NucleoSpin[®] RNA II y los ácidos nucleicos se unieron mediante centrifugación (1 min, TA, 11000xg). Al igual que las primeras tres muestras de este ejemplo de realización, los ácidos nucleicos unidos se sometieron a una digestión por DNasa y, a continuación, se lavaron y eluyeron.

Cuantificación del ARN largo

50 Los seis materiales eluidos se cuantificaron tal como se describe en el Ejemplo de realización 1, mediante medición de la absorción a 260 nm.

Resultado

55 Tal como muestra claramente la Figura 10, los ARNs largos se precipitaron conjuntamente de forma casi cuantitativa en el transcurso de la precipitación de proteínas. Por el contrario, los ARNs cortos permanecieron sorprendentemente en disolución y se pudieron purificar posteriormente tal como se muestra en el Ejemplo 1.

Ejemplo 5:

Extracción y purificación de ARNs después de precipitación de proteínas con concentración de Zn variable

5 El Ejemplo de realización 4 ha demostrado que el ARN largo es precipitado mediante zinc junto con la proteína, pero el ARN corto permanece en disolución. Este ejemplo demuestra ahora con mayor precisión la relación entre la concentración de zinc y las longitudes de ARN precipitadas con ello.

Purificación de ARN

10 Se repitió exactamente el Ejemplo de realización 1, pero ajustándose la cantidad de zinc en el tampón de precipitación de proteínas de modo que después de la adición al lisado resultaba una concentración final de 200, 400 ó 600 mM.

Caracterización del ARN aislado

15 Tal como se describe en el Ejemplo de realización 1, los materiales eluidos se analizaron con ayuda de un bioanalizador Agilent 2100 y se cuantificaron a través de UV-VIS y qRT-PCR.

Resultado:

20 Tal como muestran las Figuras 11, 12 y 13, el aislamiento de los ARNs cortos para la concentración de zinc sigue una curva óptima. Con un contenido creciente en zinc, precipitan conjuntamente en el transcurso de la precipitación de proteínas también de forma creciente fracciones de ácidos nucleicos más cortas. Así, en la Figura 11 se pueden observar, con zinc 200 mM, junto a los ARNs pequeños a aproximadamente 25 s, también además picos anchos para ADN genómico. El ADN genómico falta ya a 400 mM (Figura 12), un indicio de que los ácidos nucleicos largos precipitan bajo estas condiciones con la proteína. Si el zinc se aumenta hasta 600 mM (Figura 13), entonces también disminuye claramente el rendimiento en la fracción de los ARNs cortos. Están afectadas, en particular, especies de ARN tales como, por ejemplo, ARNt o ARNr 5.8S que todavía son visibles en el electroferograma en el caso de tiempos de retención cortos. Por el contrario, los miARNs no están afectados y no precipitan incluso a una concentración de zinc de 600 mM, tal como muestra la cuantificación por medio de qRT-PCR en la Figura 14. Independientemente de la concentración de zinc se determinaron concentraciones idénticas de miARN (visibles en el mismo valor Cp).

Ejemplo 6:

35 Balance de proteínas

Este ejemplo de realización confirma la separación ampliamente completa de las proteínas mediante la precipitación con zinc.

40 Aislamiento de la proteína y del ARN corto

60 mg de hígado de cerdo se lisaron en 600 μ l de tampón de lisis tal como se describe en el Ejemplo de realización 1 y se clarificaron. A partir de 300 μ l de lisado se obtuvieron, tal como se describe, la proteína y el ARN corto.

45 Determinación de proteínas

La proteína precipitada se disolvió de nuevo en 300 μ l de tampón de lisis y se sometió junto con el lisado no precipitado a una determinación de las proteínas. Para ello, las dos muestras se diluyeron en la relación 1:100 en tampón de lisis, y para el kit de reactivos de ensayo de proteínas Micro BCA utilizado (Pierce, N° de Art. 23235) se aplicó una recta de calibración en el tampón de lisis.

En la misma tanda, la proteína residual en la fracción del ARN corto se determinó frente a una recta de calibración en agua.

55 Resultado

Para 300 μ l de lisado de partida resultó una concentración de proteínas de 36,3 μ g/ μ l y, con ello, una cantidad total de proteínas de aprox. 10,9 mg a partir de 30 mg de tejido (Figura 15).

Para la proteína precipitada y disuelta de nuevo resultó una concentración de 35,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en 300 μl y, con ello, una cantidad total de proteínas de 10,6 mg.

- 5 El contenido en proteínas en la fracción de ARN corto ascendió entonces sólo a 0,033 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en 50 μl de material eluido y, con ello, a una cantidad total de proteínas de 1,65 μg .

10 La concentración se redujo, por lo tanto, en aprox. un factor de 1000, y la cantidad absoluta en aprox. un factor de 6600. Referido al lisado de partida se pudo separar, por lo tanto, mediante la precipitación, 97% de la proteína y se pudo hacer accesible a una lisis ulterior.

Ejemplo 7 (Ejemplo comparativo):

Empobrecimiento de ARN corto mediante el kit AllPrep DNA/RNA/Protein de Qiagen

15 Este ejemplo de realización muestra que en el caso de una purificación simultánea de ARN y proteína a partir de una muestra según el estado conocido de la técnica, se pierden los ARNs cortos con un corte de aprox. 200 bases.

Aislamiento del ARN

20 A partir de 30 mg de bazo de cerdo se obtuvo según el protocolo de preparación del kit AllPrep DNA/RNA/Protein (Qiagen, N° de Art. 80004) ARN y se eluyó en 100 μl de tampón.

25 Paralelamente a ello, a partir de 30 mg de bazo de cerdo se aisló, según el procedimiento de acuerdo con la invención y tal como se describe en el Ejemplo 1, una fracción de 50 μl con ARN largo y una fracción de 50 μl con ARN corto y, a continuación, se agruparon.

Caracterización del ARN

30 Las dos muestras se examinaron tal como se describe en el Ejemplo de realización 1 con ayuda de un bioanalizador Agilent.

Resultado

35 La Figura 16 muestra claramente que con el kit AllPrep DNA/RNA/Protein de Qiagen casi se pierde todo el ARN en el intervalo de hasta 200 bases (picos ausentes/pequeños a aprox. 25 s) mientras que el procedimiento de acuerdo con la invención purifica de forma casi cuantitativa ARNs cortos (pico grande de los ARNs cortos en aprox. 25 s, Figura 17).

REIVINDICACIONES

- 5
1. Procedimiento para la obtención de al menos ARN corto con hasta 200 nucleótidos, con al menos las siguientes etapas:
- 5
- a) habilitar una disolución biológica que contiene al menos ARN corto así como proteínas y/o ácidos nucleicos largos (ARN largo y ADN);
- 10
- b) separar las proteínas y los ácidos nucleicos largos de la disolución, precipitando al menos las proteínas y mezclando la disolución para la precipitación de las proteínas con iones de metales bivalentes, ajustándose la concentración de los iones de metales a 0,2 hasta 0,6 M;
- 15
- c) adsorción del ARN corto a un (primer) soporte sólido después de la precipitación de las proteínas;
- d) obtención del ARN corto mediante desorción del soporte.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por que** se separan uno de otro las proteínas y los ácidos nucleicos largos, y se obtiene u obtienen las proteínas y/o el ARN largo.
- 20
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado por que** los ácidos nucleicos largos se separan antes o con la precipitación de las proteínas de la disolución.
- 25
4. Procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, **caracterizado por que** los ácidos nucleicos largos se adsorben a un (segundo) soporte sólido.
- 30
5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado por que** la disolución para la adsorción de los ácidos nucleicos largos se mezcla con un disolvente orgánico, en particular miscible con agua, en una concentración tal que sólo los ácidos nucleicos largos se adsorben al segundo soporte, ajustándose la concentración del disolvente orgánico, en particular, a un intervalo de 15 a 40% en vol., preferiblemente de 20 a 30% en vol., de manera particularmente preferida a 25% en vol., en cada caso referida a la disolución mezclada con el o los disolventes.
- 35
6. Procedimiento según la reivindicación 4 ó 5, **caracterizado por que** la disolución para la adsorción de los ácidos nucleicos largos se mezcla con una sal de elevada fuerza iónica, en particular una sal caotrópica o varias sales caotrópicas, cuya concentración en la disolución se ajusta a un intervalo de 1 a 10 M.
- 40
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 a 6, **caracterizado por que** de los ácidos nucleicos adsorbidos al segundo soporte se separa ADN, en particular mediante digestión por DNasa, y se aísla el ARN largo remanente ante todo del segundo soporte, eventualmente después de un proceso de lavado.
- 45
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que** la disolución para la precipitación de las proteínas se mezcla con iones de metales que se eligen del grupo de los elementos Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb y Ba, y/o la concentración de los iones de metales se ajusta en particular a 0,3 hasta 0,4 M.
- 50
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** para la adsorción del ARN corto se utiliza una disolución que contiene un disolvente orgánico en elevada concentración, ajustándose la concentración, en particular, a un valor de 30 a 80% en vol., preferiblemente de 40 a 70% en vol., de manera particularmente preferida de 50 a 60% en vol., en cada caso referida a la disolución mezclada con el disolvente, y/o como disolvente orgánico se utiliza un disolvente no alcohólico, miscible con agua, el cual se elige, p. ej. del grupo al que pertenecen acetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano (THF), dioxano y dimetilformamida (DMF).
- 55
10. Kit para llevar a cabo el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, que contiene al menos
- a) al menos un soporte sólido para la adsorción de ácidos nucleicos;
- b) un reactivo precipitador de proteínas que contiene iones de metales bivalentes;
- c) al menos una sustancia de unión para la adsorción selectiva de ARN corto a un soporte sólido, siendo la

sustancia de unión un disolvente orgánico miscible con agua y no alcohólico;

d) instrucciones con la descripción de las etapas del procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9.

- 5 **11.** Kit según la reivindicación 10, **caracterizado por que** está presente al menos una sustancia de unión para el ajuste de las condiciones de unión para la adsorción selectiva de ácidos nucleicos largos a un soporte sólido, en particular un disolvente orgánico miscible con agua y/o una sal a base de una o más sales caotrópicas en cantidad de al menos una sustancia de unión y/o el kit presenta una DNasa para una digestión de ADN.
- 10 **12.** Kit según una de las reivindicaciones 10 u 11, **caracterizado por que** los iones de metales bivalentes se eligen del grupo de los elementos a los que pertenecen Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Pb y Ba.
- 15 **13.** Kit según una de las reivindicaciones 10 a 12, **caracterizado por que** el disolvente orgánico, miscible con agua y no alcohólico se elige del grupo al que pertenecen acetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano (THF), dioxano y dimetilformamida (DMF).
- 20 **14.** Kit según una de las reivindicaciones 10 a 13, **caracterizado por que** como soportes sólidos están presentes partículas, también en forma de polvo o suspensiones, polímeros, membranas, capas de filtro, fritas, velos o soportes en forma de un monolito y/o el material para el soporte sólido es sílice, vidrio, cuarzo, zeolitas o mezclas de los mismos, y/o partículas magnéticas, preferiblemente revestidas con sílice, vidrio, cuarzo o zeolitas.
- 15.** Kit según una de las reivindicaciones 10 a 14, **caracterizado por que** está presente al menos un reactivo de elución para la desorción de al menos el ARN corto del soporte y/o al menos un tampón de lavado.

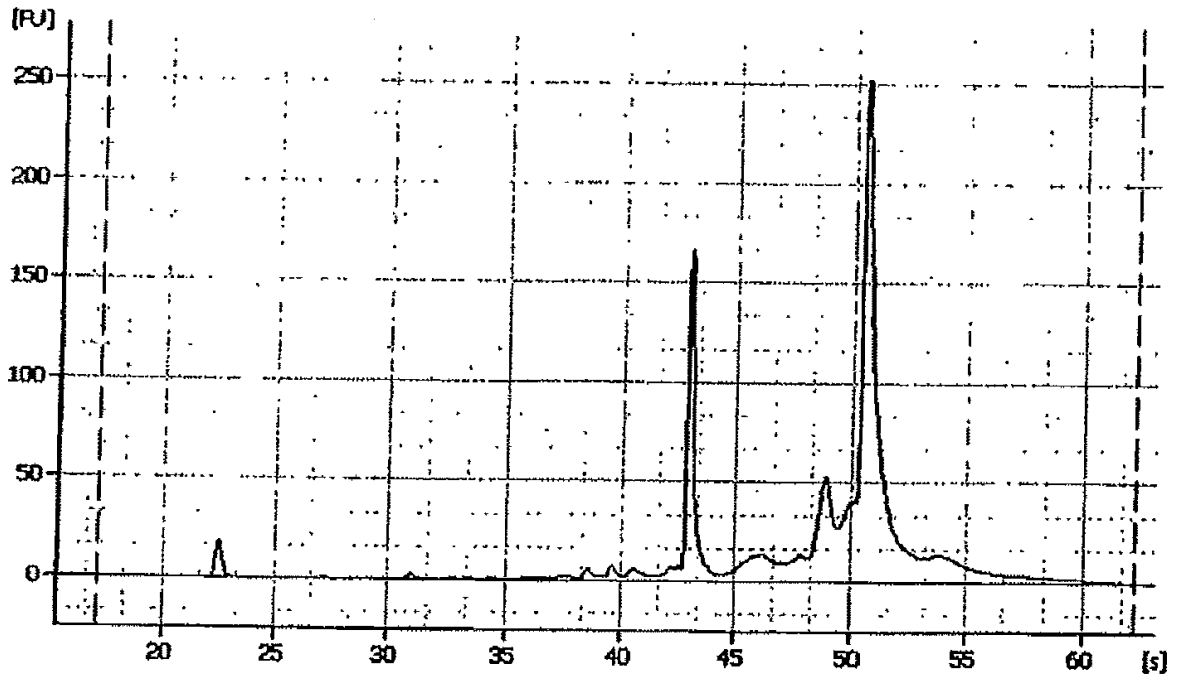


Figura 1

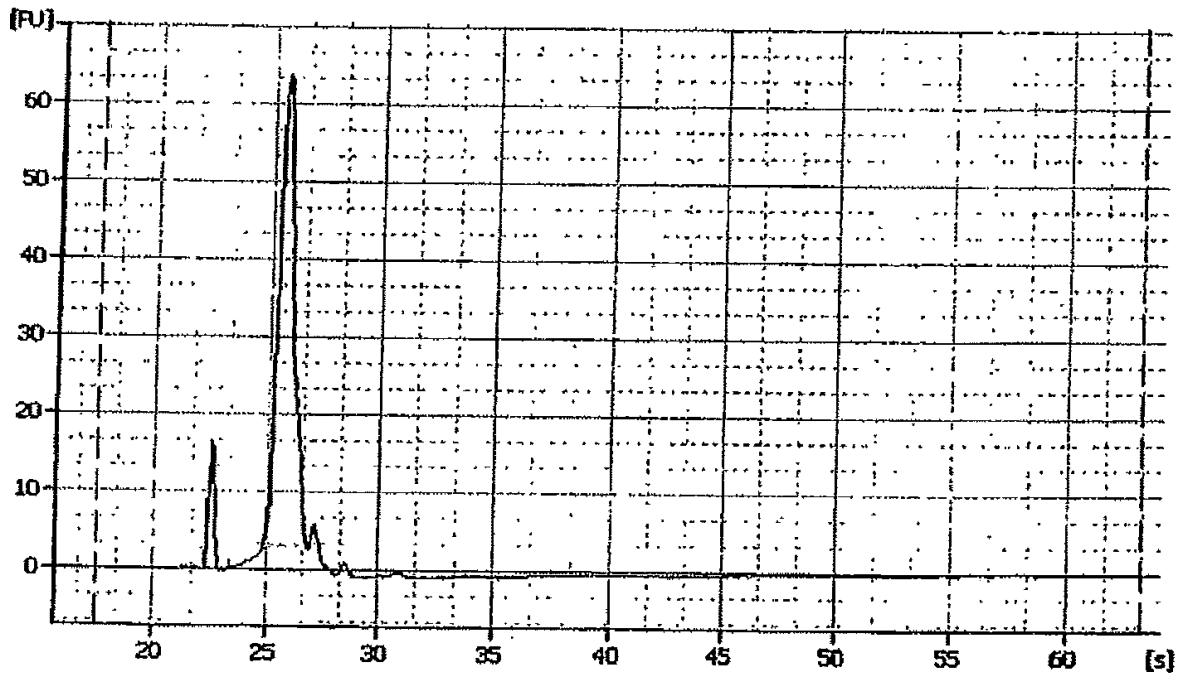


Figura 2

	ARN corto	ARN largo
Rendimiento de ARN	11,4 µg	65,0 µg
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1,860	2,156
qRT-PCR [Cp]	17,9	no determinado

Figura 3

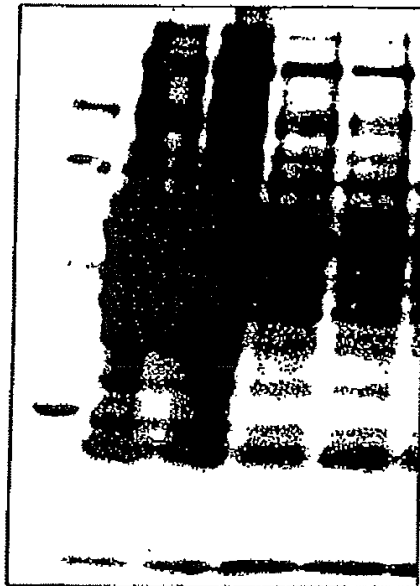


Figura 4

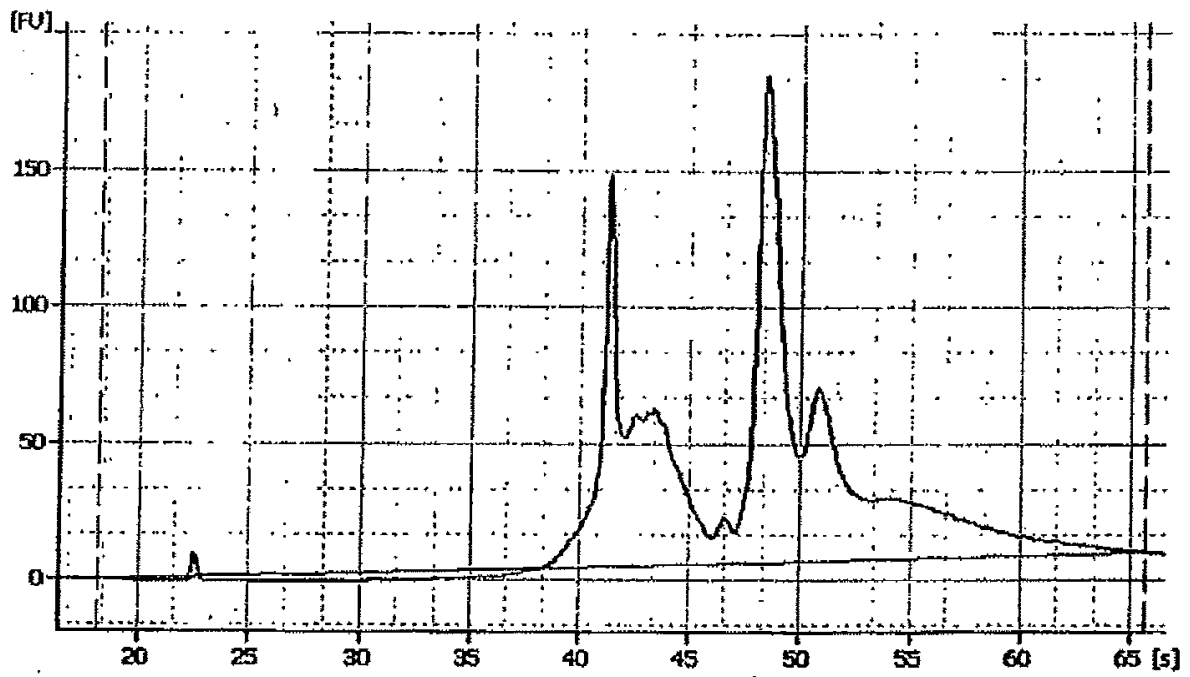


Figura 5

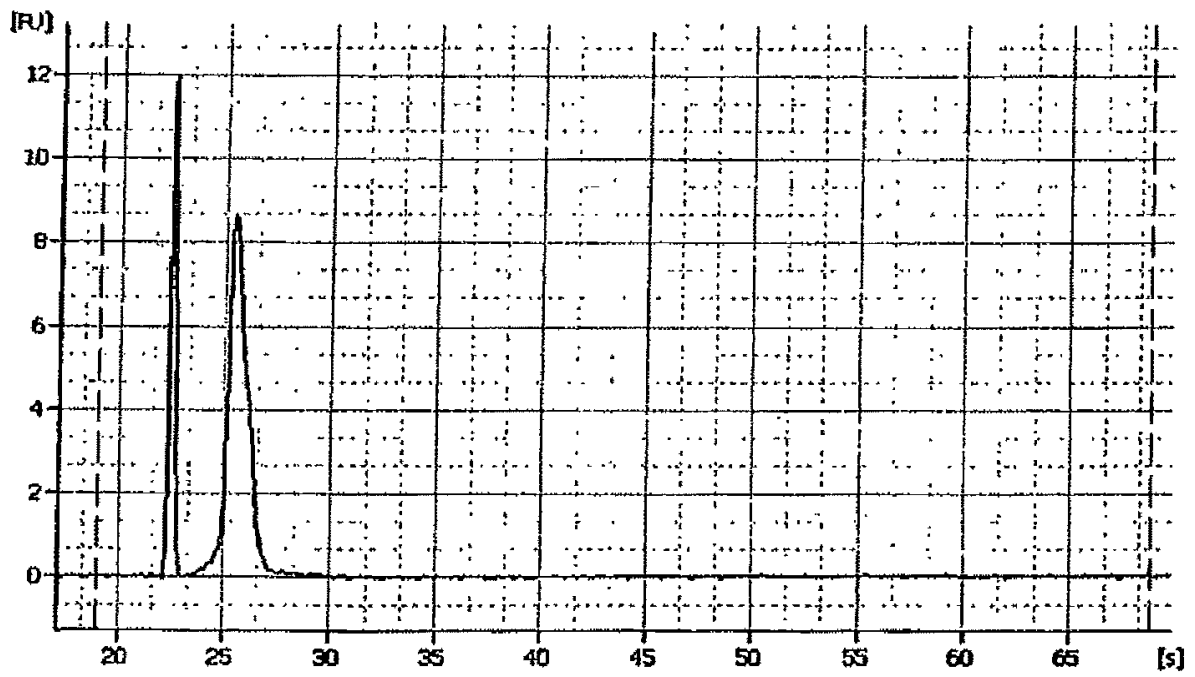


Figura 6

	ARN corto	ARN largo
Rendimiento de ARN	1,2 µg	49,0 µg
A_{260}/A_{280}	1,978	2,157
qRT-PCR [Cp]	17,7	no determinado

Figura 7

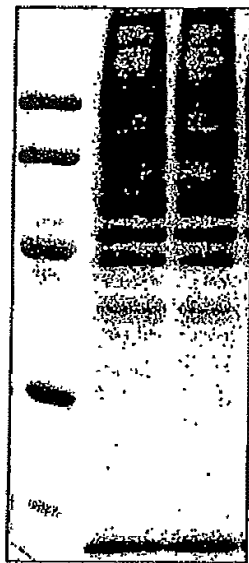


Figura 8

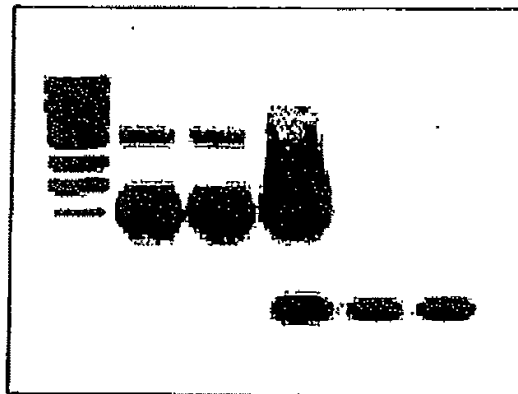


Figura 9

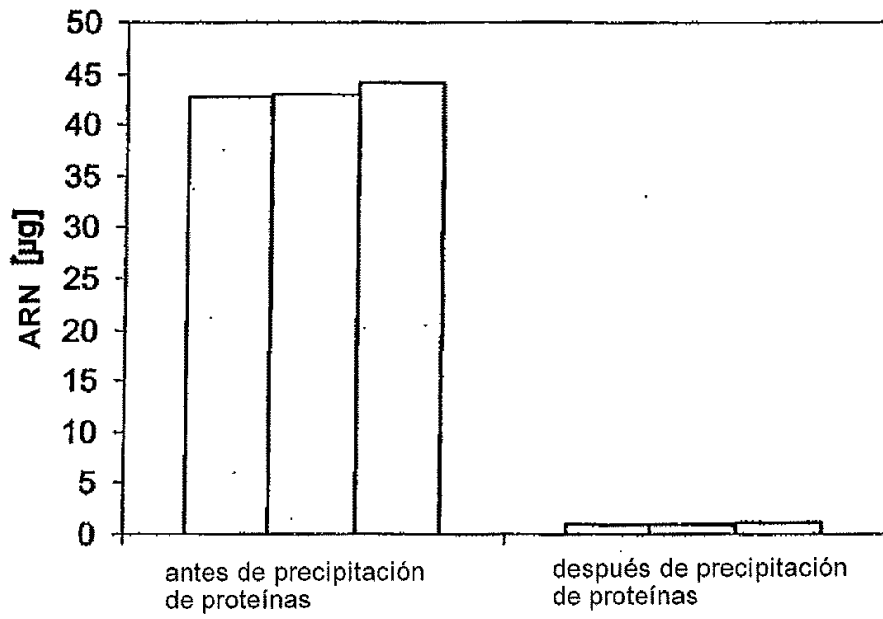


Figura 10

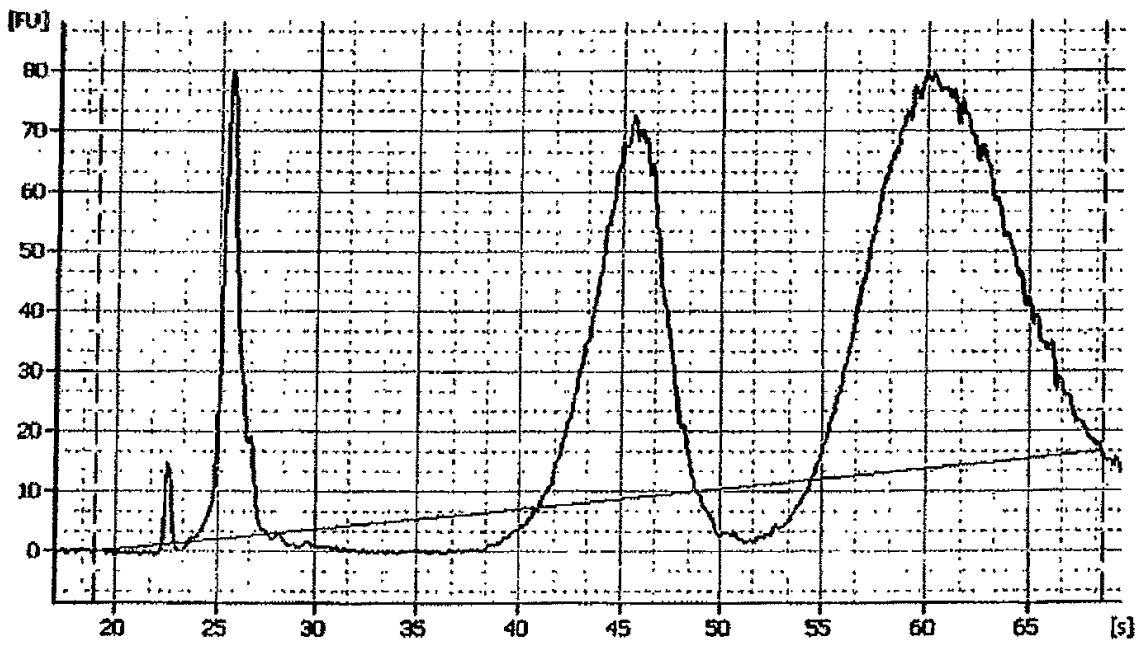


Figura 11

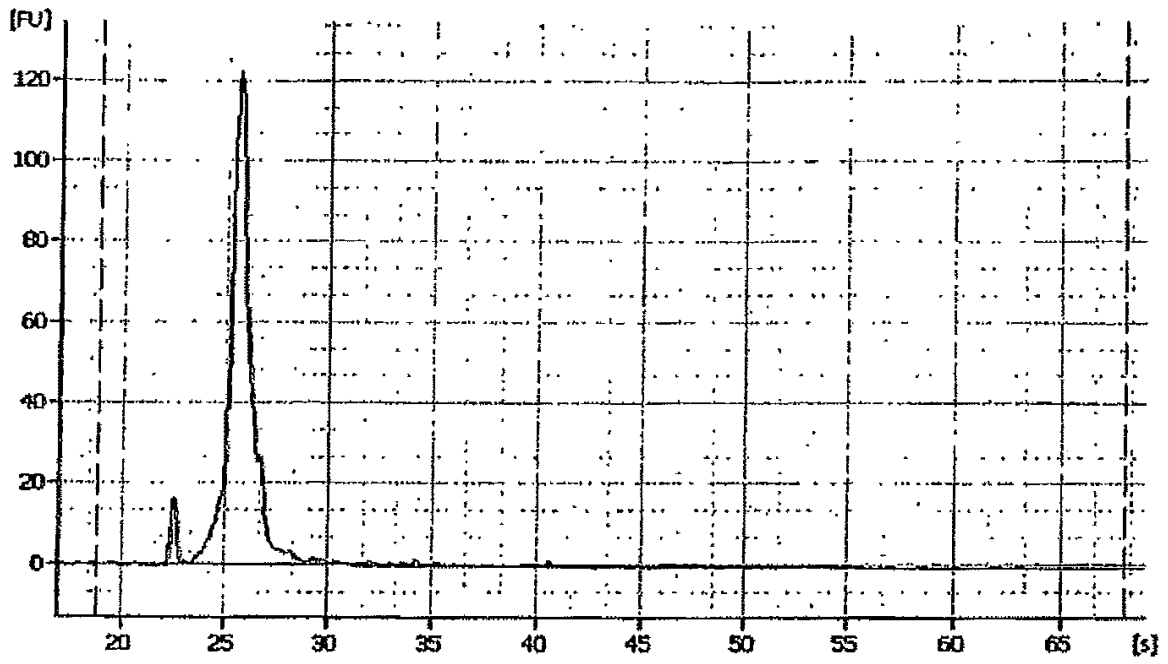


Figura 12

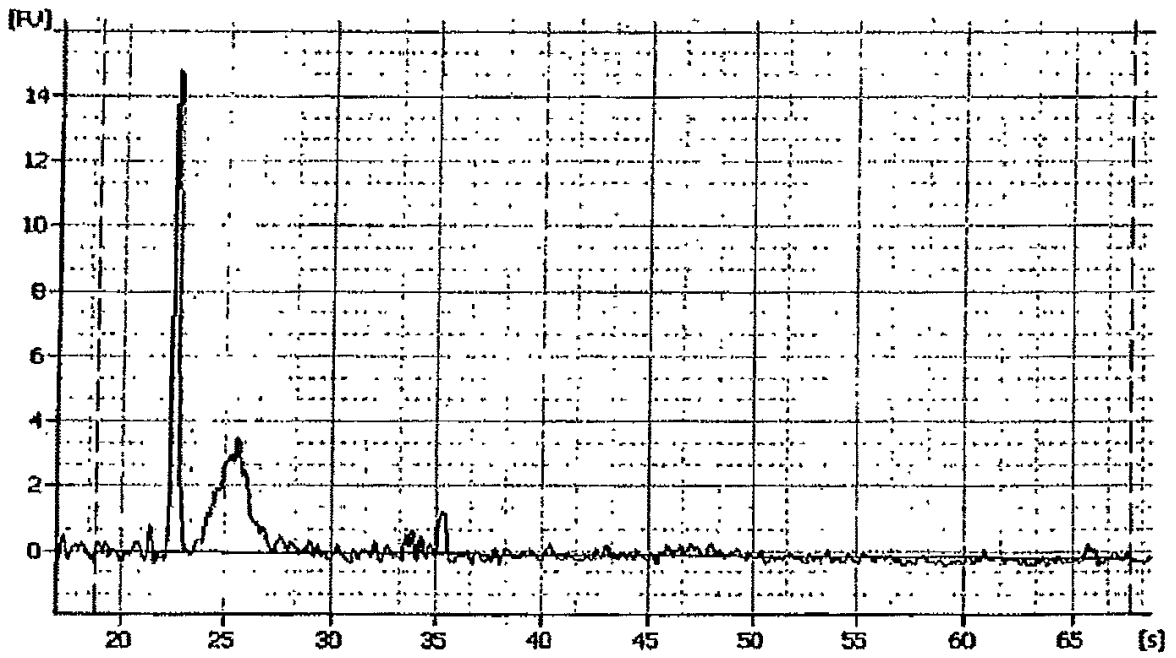


Figura 13

Concentración de Zn	200 mM	400 mM	600 mM
Rendimiento de ARN	14,3 µg	11,5 µg	1,0 µg
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1,989	2,043	no determinable
qRT-PCR [Cp]	17,9	17,9	17,9

Figura 14

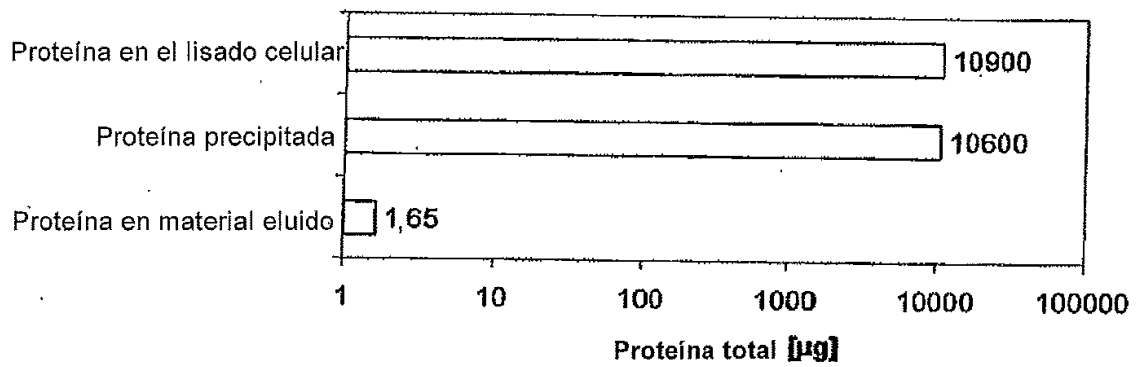


Figura 15

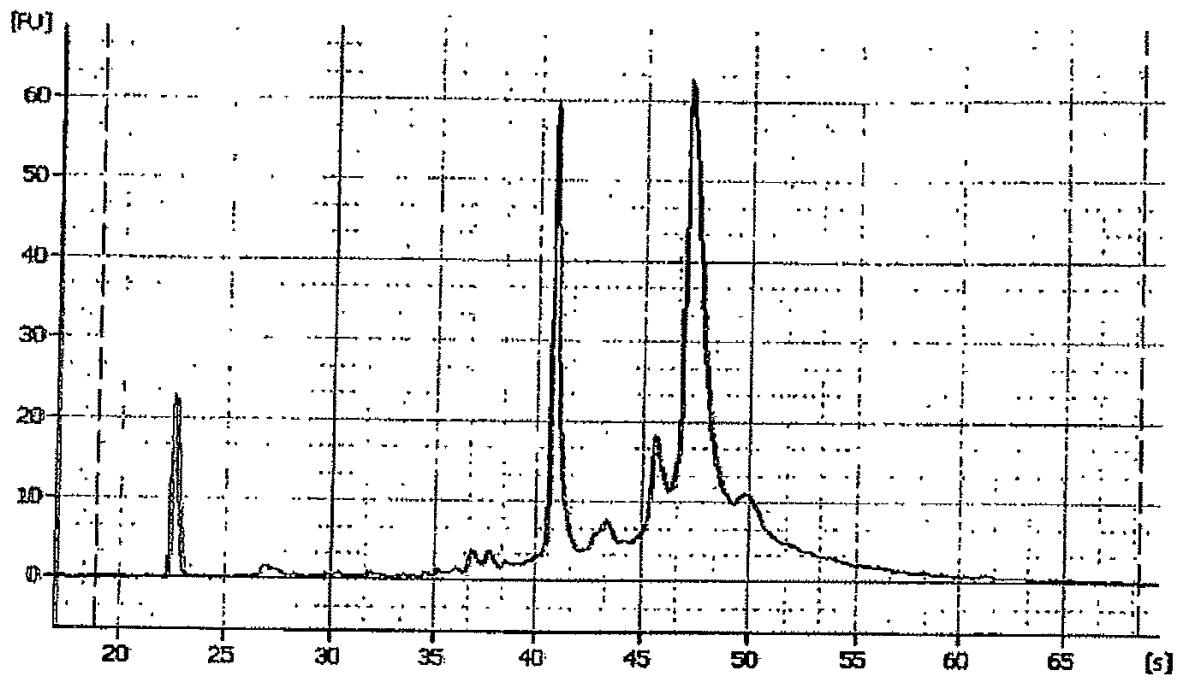


Figura 16

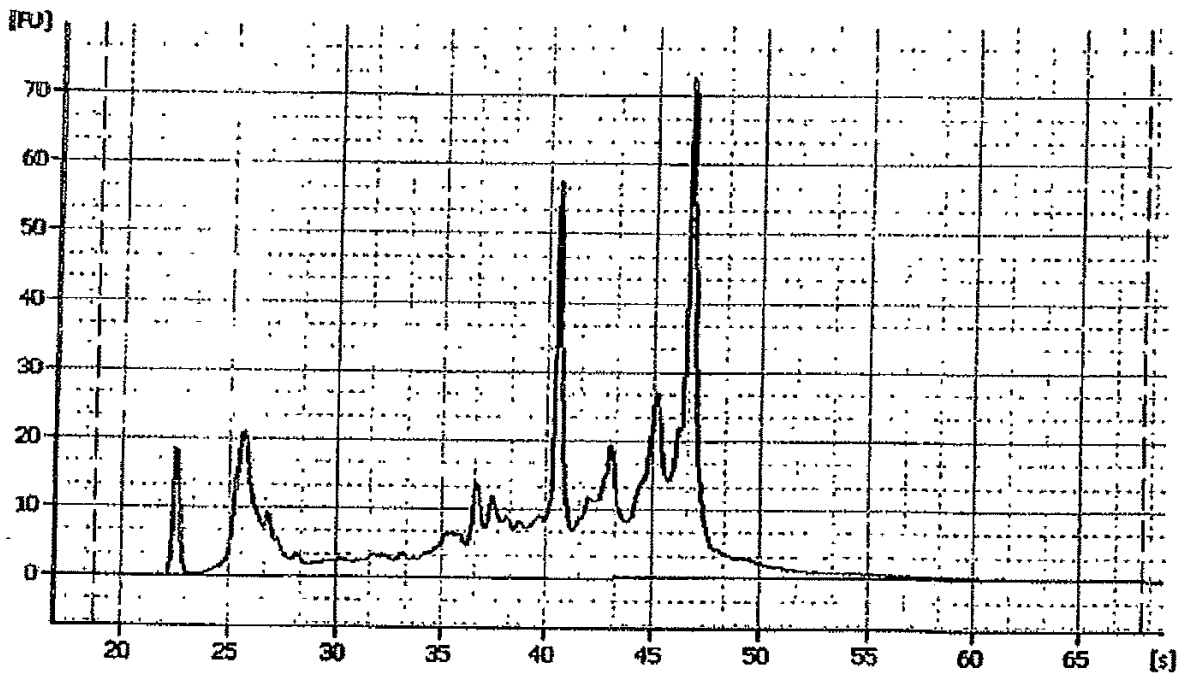


Figura 17