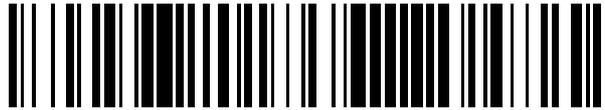


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 707**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2012 E 12171498 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2557161**

54 Título: **Procedimiento para el aislamiento de un ARN a partir de muestras de sangre entera**

30 Prioridad:

11.08.2011 DE 102011080853

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

03.07.2015

73 Titular/es:

**AXAGARIUS GMBH & CO. KG (100.0%)
Kapellenstrasse 26
52355 Düren, DE**

72 Inventor/es:

**KIRSCH, CHRISTOPH, DR.;
BAYARD, CLAUDIA;
MEUSEL, MARKUS, DR.;
ZINN, THOMAS, DR.;
WAGNER, CAROLIN y
MÖLLER, KLAUS, DR.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 539 707 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 el aislamiento de un ARN a partir de muestras de sangre entera

5 El presente invento se refiere a un procedimiento para el aislamiento de un ARN a partir de una muestra de sangre entera.

10 La sangre constituye una fuente accesible para un ARN de procedencia animal o humana. La sangre se compone de unos componentes celulares y del plasma, fluctuando la proporción de células según sea el sexo y la edad, pero usualmente ella está situada en promedio en un 44 %. Condicionado por esta alta proporción celular, la sangre es designada frecuentemente también como un "tejido líquido".

15 A pesar de esta alta proporción celular en la sangre, el número de células metabólicamente activas es extremadamente pequeño. Así, los leucocitos que son portadores de los ADN y ARN constituyen de manera aproximada sólo de un 0,1 a 0,2 % de la fracción celular, estando constituida la población de células, que es con mucho la más grande, por unos eritrocitos maduros. Sin embargo, éstos están exentos de núcleos, es decir que por regla general no llevan ningún ARN, pero a cambio mucha más cantidad de hemoglobina para el transporte del oxígeno en la sangre.

20 Debido al ADN que, en comparación con el ARN, está más fuertemente representado en la sangre, el aislamiento de un ADN genómico a partir de la sangre es relativamente sencillo de realizar. La alta estabilidad del ADN es, en el presente caso, asimismo ventajosa. En comparación con esto, el aislamiento de un ARN intacto es extremadamente complicado, en particular cuando el ARN debe de ser aislado del modo más completo que sea posible a partir de la muestra de sangre. Tal como ya se ha indicado precedentemente, esto está condicionado, por una parte, por la
25 pequeña proporción de células, que son portadoras de ARN.

Otro factor de dificultad lo constituye la alta concentración de ARNasas en la sangre, que se presentan tanto intracelular como también extracelularmente. Si las ARNasas no son desactivadas del modo más rápido y completo que sea posible, ellas conducen a una degradación del ARN y por lo tanto a otra reducción más amplia de la
30 concentración de ARN.

Otro problema lo constituye la separación, que se hace necesaria, de la hemoglobina, puesto que el hemo, que es portador de hierro, constituye un agente inhibidor extremadamente potente de la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés "polymerase chain reaction", PCR).
35

Dejando a un lado las dificultades bioquímicas precedentemente mencionadas, que se establecen en el caso de la extracción de un ARN a partir de unas muestras de sangre, la viscosidad de la sangre, que ocasionalmente es muy alta, resulta problemática. Sobre todo en el caso de una alta proporción celular (un hematocrito), que se puede presentar por ejemplo debido a una enfermedad, la sangre entera es especialmente viscosa y por lo tanto difícil de procesar.
40

La mayoría de los procedimientos, que se están empleando hoy en día para el aislamiento de un ARN a partir de una sangre entera, se basan en la separación de los leucocitos que contienen el ARN con respecto del resto de la sangre con sus componentes celulares y exentos de células.
45

El método más original de obtener una fracción pura de leucocitos es la centrifugación con un gradiente de densidades (Böyum, 1968; Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood [Aislamiento de células mononucleares y granulocitos a partir de una sangre humana]. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suplemento 97):77-89). Constituyen una alternativa los denominados tubos CPT (de Becton, Dickinson and Company, BD Vacutainer CPT Cell Preparation Tube = "Tubo para la preparación de sangre"), los cuales contienen un gel polimérico y, después de haber añadido sangre y de haber centrifugado, permiten la retirada de la fracción de leucocitos. No obstante, estos costosos métodos no son apropiados, o lo son solamente de modo muy restringido, para el aislamiento y el análisis de un ARN, puesto que el perfil celular de un ARN no queda estabilizado ni "congelado". En el transcurso del procesamiento se llega inevitablemente a unas modificaciones en la expresión
50 génica, de tal manera que se dificulta o se hace imposible la realización de un análisis de unos patrones de expresión. Con el fin de analizar el ARN de las muestras, es necesario, por lo tanto, controlar muy estrictamente a aquellos factores que influyen sobre la expresión génica. Si se crean - aunque sea solo por poco tiempo - unas condiciones no fisiológicas (p.ej. por una centrifugación, una recogida de células, una dilución, etc.), entonces no se puede excluir un perjuicio para la expresión génica.
55

Un método habitual para enriquecer a los leucocitos es la lisis selectiva de los eritrocitos (Karaviti y colaboradores, 2005, Molecular staging using qualitative RT-PCR analysis detecting thyroglobulin mRNA in the peripheral Blood of patients with differentiated thyroid cancer after therapy [Puesta en escena molecular usando un análisis cualitativo de RT-PCR detectando el ARNm de la tireoglobulina en la sangre periférica de unos pacientes que padecen de un cáncer de tiroides diferenciado después de la terapia]. Anticancer Research 25: 3135-3142). Este método se ha descrito además en el documento de patente europea EP 0 875 271 y en el documento de patente de los EE.UU.
60
65

US 5.702.884. Expresado de un modo sencillo, los eritrocitos son lisados mediante la adición de algunos volúmenes de una solución de cloruro de amonio o de otras formulaciones que actúan selectivamente, mientras que los leucocitos permanecen intactos en las condiciones escogidas. Después de haber efectuado una centrifugación, el sedimento de leucocitos se lava, se vuelve a suspender y el ARN se aísla a partir de las células. Una gran desventaja es el aumento inmanejable del volumen de la muestra, que va acompañado por una dilución adicional de la muestra, puesto que, por regla general, se tienen que ajustar unas condiciones hipotónicas mediante la adición de varios volúmenes de la solución de lisis. También las repetidas etapas de centrifugación requieren mucho tiempo y no pueden ser automáticas, lo que constituye una grave desventaja. Mediante las condiciones no fisiológicas que se presentan durante la dilución se puede llegar además a una modificación de los perfiles de expresión génica, que hace difícil realizar un análisis posterior. La alta necesidad de tiempo de este método favorece todavía más este efecto. Puesto que las ARNasas tampoco son reprimidas durante la lisis selectiva, y además la calidad y la cantidad de los ARN aislados son generalmente bajas.

Otra posibilidad, de separar a los leucocitos con respecto de los demás componentes restantes de la sangre, es el aislamiento de un denominado "buffy-coat" (un revestimiento leucocitario anteaado). En el presente caso, una sangre anticoagulada se centrifuga con una baja aceleración (de aproximadamente 2.000 x g). El revestimiento leucocitario anteaado, que contiene predominantemente las células sanguíneas blancas (los leucocitos), se puede retirar en forma de una capa entre el plasma y los eritrocitos empaquetados. En este caso resulta ventajoso el hecho de que los leucocitos son recolectados en unas condiciones casi fisiológicas, y en este caso faltan completamente unas diluciones. No obstante, el procesamiento requiere mucho tiempo y trabajo, necesita mucha experiencia práctica y habilidad, y no se pueden excluir unas modificaciones de los modelos de expresión génica causadas por la centrifugación y el procesamiento. A esto se agrega también el riesgo de un material de muestra infeccioso en el caso de la manipulación, al igual que la ausencia de una posibilidad de automatizar este proceso.

Otra posibilidad, de enriquecer leucocitos, se ha descrito en el documento de solicitud de patente de los EE.UU. US 2005/0208501 A1. En el presente caso, se emplea una membrana, que fija selectivamente a los leucocitos a partir de una sangre entera. Originalmente, tales membranas se emplearon en el caso de transfusiones de sangre, con el fin de excluir unas enfermedades del tipo de "injerto frente al anfitrión" (en inglés "graft vs. host", en el caso de los individuos receptores de sangre. Para la extracción de un ARN a partir de una sangre entera, ésta es conducida a través de la membrana (y centrifugada). Los leucocitos se fijan y pueden ser lisados seguidamente. En comparación con la centrifugación en un gradiente de densidades o con la obtención de un revestimiento leucocitario anteaado, este método es desigualmente más sencillo pero, a pesar de todo, en este caso tampoco se puede excluir una modificación de los perfiles de expresión génica, puesto que las muestras son centrifugadas de un modo "no fisiológico" y las células son fijadas a una membrana.

Unas desventajas de todos los procedimientos, que se apoyan en la separación de leucocitos y de los componentes restantes de la sangre, son el largo y trabajoso tratamiento, que está vinculado con unos altos costes. En el caso de algunos métodos se agrega todavía el hecho de que ciertos agentes patógenos potencialmente peligrosos (p.ej. los virus) en la sangre no son desactivados y siguen siendo potencialmente infecciosos para los usuarios. Asimismo, la modificación de los perfiles de expresión génica es indeseada y no puede ser excluida totalmente. En el presente caso sería útil una lisis rápida e inmediata, así como que las ARNasas sean desactivadas eficazmente y que por lo tanto se excluya una modificación en el patrón de un ARN. A fin de cuentas se ha de resaltar todavía la ausencia de la posibilidad de efectuar una automatización, puesto que, por ejemplo, unas etapas de centrifugación no se pueden realizar, o solamente pueden serlo como un gasto considerable, en los equipos habituales de laboratorio.

Como una alternativa al precedente proceso de separación y aislamiento de los leucocitos también se puede lisar directamente una muestra de sangre entera. Frecuentemente, para la lisis de una sangre entera y para el aislamiento de un ARN se emplea un tampón de lisis que contiene tiocianato de guanidinio (GuSCN) (Tan y Yiap, "DNA, RNA and Protein Extraction; The Past and The Present" [Extracción de ADN, ARN y proteínas; pasado y presente], Journal of Biomedicine and Biotechnology, tomo 2009, Artículo ID 574398). La sal caotrópica conduce a una lisis directa de las células, y al mismo tiempo, las ARNasas son desactivadas directamente. El GuSCN conduce también a la desactivación de unos agentes patógenos, que están presentes en la sangre como potenciales contaminaciones, lo cual aumenta la seguridad para el usuario.

El documento de solicitud de patente europea EP 0 818 542 A1 describe, por ejemplo, una lisis de la sangre que ha sido provocada por el GuSCN, que se emplea en forma pulverulenta. Éste se disuelve entonces mediante el contacto con la sangre. Mediante la disolución desfasada cronológicamente y la concentración inicialmente baja en la muestra de sangre, no se puede excluir el hecho de que ya se degrade una parte del ARN liberado, antes de que sea suficientemente alta la concentración eficaz del GuSCN, que se ha llevado al estado de disolución.

En el documento de solicitud de patente internacional WO 00/09746 se describe un recipiente destinado a la extracción de sangre, en el que se presenta una solución acuosa que está constituida a base de una sal de guanidinio, una sustancia tamponadora, un agente de reducción y/o un detergente. Si se carga sangre dentro de este recipiente, entonces las células son lisadas y el ARN es estabilizado. Después de un almacenamiento de las muestras de sangre, el ARN se puede obtener con unos métodos habituales para el aislamiento de ácidos nucleicos.

Otros métodos se basan en la utilización de unos detergentes catiónicos (Macfarlane, documentos US 5.010.183, así como US 5.728.822) o de una mezcla de cloruro de litio y de urea.

5 Unos productos comerciales, que aprovechan la lisis directa para el aislamiento de un ARN a partir de una sangre entera, comprenden por ejemplo los tubos denominados PAXgene Tubes de la entidad Preanalytix (véase el documento WO 02/056030). En el presente caso, la lisis de la sangre se efectúa con los detergentes catiónicos que se han mencionado precedentemente. Estos tubos son apropiados predominantemente para la estabilización de un ARN en muestras de sangre. Así, los ARNs son protegidos, e incluso, en el caso de un almacenamiento durante varios días a la temperatura ambiente (por ejemplo durante un envío por correo), los perfiles de expresión permanecen inalterados. Si, después de un almacenamiento, los ácidos nucleicos (ARN) deben de ser aislados con respecto de los tubos, entonces en primer lugar se efectúa una sedimentación por centrifugación. El sedimento, que contiene los ácidos nucleicos insolubles, se lava entonces, se vuelve a suspender y a continuación se aísla con unos métodos clásicos (por ejemplo mediante fijación a unas membranas de sílice en unas condiciones de alto contenido de sales).

15 Otros tubos comerciales para la estabilización de un ARN son los denominados Tempus Blood RNA-Tubes de Applied Biosystems. En el presente caso, se emplean unas soluciones, que contienen el hidrocloreto de guanidinio (GuHCl), el MOPS (= ácido (3-morfolino)-propano sulfónico) y el NaCl.

20 Aparte de para la estabilización del ARN, la lisis directa se emplea solamente en unos pocos casos. En el estuche RiboPure Kit 8 (de Ambion, Life Technologies) una muestra de sangre entera es lisada con ayuda de una mezcla de fenol y cloroformo. En el caso de este método, la muestra es tratada apoyándose en el método de Chomczynski y Sacchi (1987, Single step method of ARN isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [Método de una sola etapa para el aislamiento de un ARN mediante extracción con una mezcla de tiocianato de guanidinio, fenol y cloroformo en condiciones ácidas]. Anal. Biochem, 162(1)), y ciertamente con una mezcla de GuSCN, fenol y cloroformo, a un bajo valor del pH. En las condiciones ácidas, el ARN permanece en la fase acuosa superior, mientras que el ADN y las proteínas desnaturalizadas permanecen en la interfase o respectivamente en la fase orgánica inferior. Usualmente, el ARN es desalinizado entonces mediante una precipitación con isopropanol y purificado. Si bien con este enfoque se pueden evitar algunas desventajas del estado de la técnica (p.ej. una lisis inmediata y completa), una desventaja muy decisiva de este muy costoso método es la toxicidad del fenol, de tal manera que, desde el punto de vista de los usuarios, se tiene que prescindir de estos métodos siempre que sea posible. Además, el tratamiento del sistema de 2 fases no puede ser automatizado prácticamente, de tal manera que el caudal de paso sigue siendo pequeño.

35 Otro procedimiento se basa en el estuche "Total RNA" Kit (de Applied Biosystems) para el ABI Prism 6100 Nucleic Acid Prestation (véase el documento WO 2005/003346 A1). Unas muestras de sangre entera son diluidas en una primera etapa en la relación de 1:1 con una PBS (acrónimo de "phosphate buffered saline" = una solución salina tamponada con fosfato). Estas muestras, que han sido procesadas previamente de esta manera, son lisadas seguidamente con un tampón de lisis, que contiene GuHCl, y el ARN es fijado bajo un vacío a una membrana. La dilución con una PBS conduce, por una parte, a un aumento difícil de manipular del volumen y, como todos los métodos, en los que la muestra de sangre es acondicionada y modificada antes de la lisis, conlleva el peligro de que la expresión génica sea modificada debido a las condiciones no fisiológicas. La dilución resulta presuntamente a partir de la necesidad de controlar la muestra también en cuanto a su viscosidad. Condicionado por el procesamiento bajo un vacío, existiría en caso contrario el peligro de que las membranas se obstruyesen.

45 La lisis directa de la sangre se ha descrito también en el documento US 7.927.798. En el presente caso, la lisis se tiene que llevar a cabo de tal manera que se evite una inhibición de la amplificación de un ARN. De un modo distinto al de los procedimientos habituales que están basados en una PCR, el ARN es amplificado mediante la denominada tecnología del ADNb (ADN ramificado, en inglés "branched RNA"). En este caso, el ARN es inmovilizado junto a una fase sólida mediante unas sondas y es amplificado con otras sondas mediante una hibridación secuencial, repetitiva. La detección se efectúa finalmente a través de una quimioluminiscencia. La cantidad de sangre empleada está limitada debido a la detección inmediata sin ninguna purificación. Ésta fluctúa entre 1 y 30 µl en el caso de un volumen final de 150 µl. La muestra es diluida, por lo tanto, en un factor de 5-150.

55 Condicionado por la subsiguiente hibridación de un ARN, se prohíben unas soluciones de lisis de alta molaridad u otras formulaciones, que perturban a la fijación y a la hibridación. En este caso, constituyen una desventaja, además de esto, la limitación del material de muestra, puesto que solamente se emplean unas cantidades mínimas de la muestra, así como la escasa sensibilidad que está vinculada con ello y el peligro de la inhibición de la analítica consecutiva, puesto que sin la purificación usual de los ácidos nucleicos no se puede asegurar que se hayan eliminado cualesquiera eventuales inhibidores.

60 En el documento WO 2011/083429 A1 se divulga un procedimiento para realizar el aislamiento de un ARN a partir de una muestra de sangre entera, en cuyo caso se utiliza un tampón de lisis, que contiene una sustancia para lisis, la proteína K y un detergente. En el presente caso se utiliza también el cloruro de magnesio para la desactivación de las ARNasas. También en este caso, es muy alta la relación entre el volumen global y la muestra, lo que está vinculado con las desventajas arriba descritas de una dilución tan grande.

El presente invento se basa en la misión de poner a disposición un procedimiento para el aislamiento de un ARN a partir de unas muestras de sangre entera, que permita el procesamiento directo de las muestras y en particular se pueda llevar a cabo sin ninguna estabilización previa de los ácidos nucleicos, y que en este caso haga posible un aislamiento lo más completo que sea posible del ARN que está contenido en el material de la muestra. El procedimiento debe de ofrecer además la posibilidad de realizar una elaboración automática de las muestras.

El problema planteado por esta misión se resuelve mediante un procedimiento para el aislamiento de un ARN a partir de una muestra de sangre entera, que comprende las etapas de

- a) poner en contacto la muestra con una solución acuosa de lisis, que contiene por lo menos una sustancia para lisis en una concentración de 1,5 mol/l a 7 mol/l, por lo menos un detergente y unos iones de magnesio,
- b) añadir simultánea o subsiguientemente una proteinasa, en particular la proteinasa K,
- c) después de esto, incubar la solución, que se había obtenido de acuerdo con la etapa b), para realizar una digestión enzimática y una lisis por lo menos parciales de la muestra, obteniéndose un material lisado y
- d) aislar el ARN a partir del material lisado,

siendo la muestra puesta en contacto directamente en la etapa a) con la solución de lisis y no siendo diluida mediante la adición de más cantidad de disolvente hasta la finalización de la etapa c), no añadiéndose ningún agente estabilizador y/o no centrifugándose, realizándose que el volumen total, que está constituido por la muestra, la solución acuosa de lisis y la proteinasa, sobrepasa al volumen de partida de la muestra hasta la finalización de la etapa c) en no más que el factor de 2,5, de manera preferida en no más que el factor de 1,5.

De manera sorprendente se ha puesto de manifiesto que, mediante el empleo combinado de una sustancia para lisis, que contiene por lo menos un detergente y unos iones de magnesio, se puede conseguir, en los mencionados intervalos de concentraciones, así como mediante la simultánea o subsiguiente adición de una proteinasa, una lisis completa de las muestras de sangre entera, no influyendo esencialmente sobre la actividad de la proteinasa las concentraciones conformes al invento de la sustancia para lisis, de tal manera que se pueden procesar de manera automática también unas muestras de sangre entera altamente viscosas. Con ayuda de las medidas técnicas que se han mencionado en último lugar, se puede restringir la complejidad del procedimiento conforme al invento, lo que reduce su susceptibilidad a errores y mejora aún más la robustez del método y la posibilidad de la automatización.

Al mismo tiempo, la concentración de la sustancia para lisis es lo suficientemente alta como para desactivar, en un período de tiempo brevísimo, a las ARNasas que están presentes en la muestra. Por lo demás, el material lisado que se ha obtenido mediante el procedimiento conforme al invento hace posible una fijación del ARN a una fase sólida en unas condiciones usuales, tal como por ejemplo mediante una adición de etanol.

Mediante el empleo limitado conforme al invento de unos agentes químicos líquidos, además de esto, en el caso de la elaboración de la muestra, el volumen total de la muestra no es aumentado en una extensión tan grande como ocurre en parte en los casos de los procedimientos que son conocidos a partir del estado de la técnica, que frecuentemente prevén incluso una dilución de la muestra antes de su procesamiento propiamente dicho. De esta manera, el procedimiento conforme al invento se puede llevar a cabo en unos recipientes de reacción relativamente pequeños, lo que simplifica considerablemente la elaboración automática de las muestras.

Por el concepto de "aislamiento de un ARN" se entiende en el presente contexto que el ARN es liberado amplísimamente de los demás componentes usuales de la muestra, en particular de proteínas, fragmentos de células y similares. La eliminación de otros ácidos nucleicos tales como un ADN es, por el contrario, opcional y se orienta a si éstos perturban al realizar la elaboración ulterior o el análisis del ARN.

Por lo general, el procedimiento conforme al invento se puede llevar a cabo de un modo sencillo y, tal como ya se ha debatido precedentemente, es automatizable sin problemas. Así, el procedimiento conforme al invento hace posible la lisis de una sangre entera mediando supresión de todas las etapas de centrifugación, como las que en parte se prevén en el caso de los procedimientos conocidos hasta ahora. Por lo demás, el procedimiento conforme al invento no necesita ningún tratamiento previo ni ningún acondicionamiento de las muestras, lo cual disminuye no solamente el gasto para la elaboración, sino también el peligro de una posible impurificación. De manera preferida, por lo tanto, la muestra no es sometida a ninguna etapa previa de procesamiento antes de su puesta en contacto con la solución acuosa de lisis.

Otra ventaja más del presente invento consiste en que el procedimiento se puede llevar a cabo sin el empleo de unas formulaciones tóxicas tales como las de una mezcla de fenol y cloroformo. El procedimiento conforme al invento es, además de esto, relativamente insensible frente a unas fluctuaciones en el hematocrito, de tal manera que la extracción de un ARN se puede procesar con unos métodos usuales mediando utilización de unas membranas que son apropiadas para el aislamiento de un ARN, sin que exista el peligro de obstrucciones. El

procedimiento conforme al invento hace posible además de esto la extracción de un ARN a partir de una sangre entera, en una alta calidad y un alto rendimiento.

5 El ARN, que se puede aislar con ayuda del procedimiento conforme al invento, comprende en principio todos los tipos de ARN que se presentan en la sangre entera, tales como por ejemplo los ARNm (mensajeros), los ARNr (ribosómicos) así como (micro) miARN, por citar sólo a algunos de ellos.

10 Como unas proteinasas que se emplean conforme al invento entran en consideración, por ejemplo, la proteinasa K, u otras proteinasas con un amplio espectro de sustratos (de manera preferida que tienen una actividad de endo- y/o exopeptidasa, así como unas mezclas de éstas, siendo preferida especialmente la proteinasa K, puesto que con ella se puede reducir de una manera especialmente eficiente la viscosidad de la muestra de sangre entera. Las cantidades de la proteinasa añadida pueden estar situadas, por ejemplo, en 0,1 - 5 mg/ml de una sangre entera, de manera preferida en 0,5 a 1 mg/ml.

15 De acuerdo con una forma de realización preferida del procedimiento conforme al invento, las ARNasas son desactivadas en la etapa c) de un modo amplísimamente completo. Esto se realiza con ayuda de las concentraciones de la sustancia para lisis que se han previsto conforme al invento.

20 Como una medida de la desactivación de las ARNasas se pueden aprovechar la integridad y la estabilidad del ARN aislado. Solamente cuando las ARNasas hayan sido desactivadas de un modo eficaz y amplísimo durante la lisis y la disgregación de la muestra, en el caso de un análisis mediante una electroforesis en gel desnaturalizante o mediante un ensayo de ARN en el Agilent Bioanalyzer, el ARN aislado mostrará unas bandas de ARNr diferenciadas con un tamaño conocido. En el caso de unas muestras de sangre humana, el ARN (los ARNr 18 y 28S) se presenta en forma de dos bandas diferenciadas, de las cuales el ARNr 28S está pronunciado de manera manifiestamente más fuerte. Puesto que el ARN es muy sensible frente a las ARNasas ubicuarias, se recomienda congelar el ARN aislado o por lo menos almacenarlo a 4°C. Si el ARN aislado (lo que se puede reconocer en unas nítidas bandas de ARNr 18 y 28S) es almacenado p.ej. durante un día a la temperatura ambiente, y es analizado de nuevo mediante un gel para ARN o un Bioanalyzer (analizador biológico), entonces en el caso de la presencia de las dos bandas diferenciadas se puede sacar una conclusión acerca de la ausencia amplísimamente completa de ARNasas. Si el ARN estuviese contaminado con unas ARNasas, entonces el ARN sería degradado por medio de la incubación a la temperatura ambiente; las diferencias en el gel serían evidentes.

35 De un modo más preferido, la solución acuosa de lisis contiene la sustancia para lisis en una concentración de 2 mol/l a 6 mol/l, en particular de 2,5 mol/l a 5 mol/l, de manera preferida de 3 mol/l a 4 mol/l. Estas concentraciones son especialmente ventajosas, puesto que ellas, por una parte, son suficientemente altas como para desactivar rápida y completamente a las ARNasas que están presentes, antes de que éstas degraden al ARN presente. Por otra parte, estas concentraciones se escogen de tal manera que no se llegue a una inhibición más fuerte de la proteinasa, de modo que la viscosidad de la muestra sea reducida durante la incubación en una medida suficiente, y de tal modo que siga subsistiendo la posibilidad de realizar una elaboración automática de la muestra.

40 La sangre entera que es aportada al procedimiento conforme al invento puede ser de origen humano o puede proceder de otra especie, tal como, por ejemplo de ciertos animales. La sangre puede haber sido ser extraída recientemente o presentarse en una forma congelada, y proceder de unos sistemas de extracción usuales en el comercio que contienen unas usuales sustancias anticoagulantes (el EDTA, un citrato, la heparina).

45 De un modo más preferido, la solución acuosa de lisis se mezcla con la muestra en una relación volumétrica de 1,8 : 1 a 1 : 1,8, en particular de 1,5 : 1 a 1 : 1,5, de manera preferida de 1,2 : 1 a 1 : 1,2. De manera especialmente preferida, la relación de mezclado precedentemente mencionada está situada en aproximadamente 1:1. Las relaciones de mezclado que precedentemente se han mencionado son especialmente ventajosas, puesto que por medio de ellas se puede evitar un aumento innecesario del volumen de las muestras mediante las soluciones empleadas.

50 De acuerdo con otra ventajosa forma de realización del procedimiento conforme al invento, en la etapa b) la proteinasa se añade como un material sólido en común con un disolvente o en forma de una solución de una proteinasa, siendo ajustada la respectiva cantidad de líquido de tal manera que esta cantidad de líquido sea a lo sumo de un 20 % del volumen formado por la muestra y por la solución acuosa de lisis, en particular a lo sumo de un 10 %. Mediante la medida técnica precedentemente mencionada se evitan asimismo una dilución innecesaria de la muestra y un innecesario aumento del volumen de la muestra, lo que repercute ventajosamente sobre la posibilidad de automatización del procedimiento conforme al invento.

60 Para las "sustancias para lisis", que se pueden emplear dentro del marco del procedimiento conforme al invento, entran en consideración una serie de compuestos. En el presente caso, por el concepto de una "sustancia para lisis" dentro del sentido del presente invento se entiende un compuesto, que está en la situación de liberar unas biomoléculas a partir de la muestra de sangre entera, y ciertamente por lo menos el ARN. Así, la sustancia para lisis puede contener una sal caotrópica o unas mezclas de diferentes sales caotrópicas. En el presente caso, las sales caotrópicas se escogen en particular entre unos tiocianatos, tales como el tiocianato de sodio, el tiocianato de

potasio y el tiocianato de guanidinio, la urea, unas sales percloratos tales como el perclorato de sodio y/o el yoduro de potasio o unas mezclas de éstos. Entre los compuestos precedentemente mencionados se prefieren unos tiocianatos, puesto que estos compuestos están en la situación de desactivar a las ARNasas, siendo preferido especialmente el tiocianato de guanidinio.

5 De acuerdo con una forma de realización especialmente preferida del procedimiento conforme al invento, la solución de lisis contiene unos iones de magnesio en una concentración de 10 a 1.000 mMol/l, de manera preferida de 100 a 600 mMol/l, de manera más preferida de 150 a 400 mMol/l. La adición de los iones de magnesio es especialmente ventajosa, puesto que de esta manera se pueden aumentar los rendimientos de ARN.

10 En una forma de realización asimismo preferida puede estar previsto que la sustancia para lisis comprenda un tiocianato de potasio y/o de sodio y que la solución de lisis contenga unos iones de calcio, siendo la concentración de los iones de calcio en particular de 10 a 150 mMol/l, de manera preferida de 50 a 100 mMol/l. También mediante esta combinación se puede aumentar el rendimiento de ARN del procedimiento conforme al invento, siendo posible también el empleo simultáneo con unos iones de magnesio, tal como se ha descrito más arriba.

15 Como fuente para los iones de magnesio y de los iones de calcio entran en cuestión en principio todas las sales solubles en agua de los metales precedentemente mencionados, siempre y cuando que los cationes de estas sales sean química y biológicamente inertes en las condiciones del procedimiento. Esto es válido, por ejemplo, para los cloruros de magnesio y de calcio.

20 En otra forma de realización preferida, la solución de lisis está exenta de otros iones de metales di- o trivalentes, es decir, dejando aparte a los iones de magnesio o respectivamente de calcio. Esto es especialmente ventajoso, ya que se ha puesto de manifiesto que ciertamente los iones de magnesio o respectivamente de calcio tienen una influencia ventajosa sobre el rendimiento de ARN, pero otros iones de metales plurivalentes conducen por regla general a una precipitación de los componentes de las muestras. Esto tiene como consecuencia una considerable disminución del rendimiento de ARN y dificulta, además de ello, la elaboración automática de las muestras, puesto que, por ejemplo, las membranas utilizadas para el aislamiento son obstruidas por medio de los componentes precipitados.

25 Conforme al invento está previsto que la solución de lisis contenga un detergente. En el presente caso, pueden pasar a usarse en principio todos los detergentes que sean utilizables para los procesos bioquímicos de extracción de componentes del núcleo celular, prefiriéndose especialmente unos detergentes no iónicos, así como unas mezclas de éstos. El detergente apoya a la lisis, disuelve a los lípidos de las células de sangre lisadas y evita de esta manera una obstrucción de las membranas que se hayan utilizado para la separación. Repercute de una manera especialmente ventajosa sobre la calidad del ARN extraído el empleo de un poli(oxietileno)-20-cetil-éter (Brij 30®), de la N-lauroil-sarcosina, así como de unas mezclas de éstos. También se pueden utilizar otros detergentes, tales como, por ejemplo, el Tween20 a solas o en forma de unas mezclas con los detergentes precedentemente mencionados.

30 Las cantidades de los detergentes empleados pueden variar a lo largo de amplios intervalos. Así, la solución de lisis puede tener, por ejemplo, un contenido total de detergentes de 10 a 200 g/l, de manera preferida de 30 a 100 g/l.

35 La solución de lisis, que se emplea conforme al invento, puede contener, junto a las sustancias constituyentes precedentemente mencionadas, todavía otros componentes, que se escogen en particular entre unas sustancias tamponadoras, unas enzimas, unos agentes de reducción y/o unos alcoholes.

40 El aislamiento del ARN a partir del material lisado en la etapa d) se puede llevar a cabo en principio de cualquier manera conocida. De una manera ventajosa, para el aislamiento a partir del material lisado, el ARN reacciona por adición con una fase sólida, lo que, en caso deseado, va seguido por una o varias etapas de lavado.

45 Por el concepto de "fases sólidas" se entienden unos materiales insolubles en agua, a los que se fijan los ácidos nucleicos con una fase acuosa en presencia de una alta fuerza iónica. Éstas son, por ejemplo, unas partículas porosas o no porosas de unos materiales minerales, tales como los de sílice, vidrio, cuarzo, zeolitas o unas mezclas de éstos. Las partículas precedentemente mencionadas pueden estar estructuradas además como unas partículas magnéticas. En el caso de la utilización de las partículas modificadas magnéticamente, que se han mencionado precedentemente, y que también son conocidas como perlas magnéticas (en inglés "Magnetic-Beads"), se puede recurrir a una separación magnética. Tales modos de proceder son conocidos en principio por un experto en la especialidad. Por lo demás, en el caso de la utilización de unas partículas no magnéticas, se lleva a cabo una separación por sedimentación o centrifugación.

50 La fase sólida puede presentarse en forma de un polvo que se está sedimentando o de una suspensión, o sino puede estar estructurada en forma de una membrana, de una capa de filtro, de una fritada sinterizada, de un cuerpo monolítico o de un cuerpo sólido de cualquier otro tipo. Entre las posibles formas de realización precedentemente mencionadas, para el procedimiento conforme al invento se prefieren especialmente unas membranas de sílice o unos velos de fibras de vidrio. El transporte de la solución tratada previamente a través de estos materiales puede

efectuarse a solas mediante la gravitación o mediante una centrifugación así como también mediante la aplicación de una depresión.

En el caso de unos representantes especialmente preferidos, la fase sólida precedentemente mencionada, en forma de una membrana o de un velo, se fija en una o múltiples capas en un cuerpo hueco que está provisto de un orificio de entrada y de otro de salida. Tales cuerpos huecos son conocidos por un experto en la especialidad, por ejemplo, como los cuerpos de centrifugadoras Minispin. Así, en el caso de los cuerpos de centrifugadoras Minispin o respectivamente de las columnas de Minispin, las etapas de fijación, lavado, separación y elución son mediadas por la fuerza centrífuga o por un vacío.

En otra forma de realización preferida, la reacción por adición del ARN con la fase sólida puede ser apoyada mediante el recurso de que al material lisado se le añade un agente de fijación. Para esto entran en consideración, por ejemplo, un alcohol, de manera preferida el etanol y/o el isopropanol, así como una correspondiente mezcla de un alcohol y agua, tal como una mezcla de etanol y agua. El contenido de etanol puede estar situado en particular entre un 50 y 95 % en volumen, por ejemplo en un 70 % en volumen de etanol.

Dentro del marco del procedimiento conforme al invento puede estar previsto, además de ello, que el ADN sea eliminado por lo menos en parte, de manera preferida casi totalmente, en particular mediante una digestión con una ADNasa. El resultado de que el ADN sea eliminado o no, se orienta al hecho de si éste actúa perturbando al realizar la analítica consecutiva. La eliminación del ADN se puede efectuar en un momento arbitrario, después de que se hubo llevado a cabo la lisis de la muestra. Es conveniente después de la reacción por adición del ARN con un soporte sólido, por ejemplo degradar enzimáticamente al ADN, es decir someterlo a una digestión con una ADNasa. Puesto que, típicamente, el ADN reacciona por adición, asimismo en las condiciones de fijación del ARN, por lo menos parcialmente, con el soporte sólido, sobre cuya superficie puede ser a continuación degradado selectivamente el ADN.

La digestión con una ADNasa se puede efectuar durante el proceso de purificación, p.ej. después de la fijación de los ácidos nucleicos a una fase sólida (la denominada degradación en una columna [en inglés "on-column"]), o sino, después del aislamiento del ARN, en una solución. La detección del ADN se efectúa usualmente mediante una PCR. Una eliminación completa del ADN, de tal manera que ni siquiera por medio de unos fragmentos muy cortos de unas dianas con un número múltiple de copias (en inglés "multi-copy targets") se efectúe ninguna amplificación por PCR, es técnicamente casi imposible, solamente debido al hecho de que existen determinadas secuencias y especies de ADN que no pueden ser degradadas mediante una digestión con una ADNasa. A pesar de todo, la eliminación del ADN mediante digestión con una ADNasa es significativa: Así, la digestión con una ADNasa, durante el aislamiento de un ARN a partir de unas muestras de sangre entera, conduce usualmente a un desplazamiento por 8 - 10 ciclos de los valores de C_p en la PCR en tiempo real (en inglés "real time"). Debido a la relación semilogarítmica entre el valor de C_p y la concentración del ADN, esto significa aproximadamente un empobrecimiento por un factor de 250 - 1.000.

Para la obtención del ARN aislado pueden pasar a usarse unos modos de proceder en sí conocidos. Así, el ARN aislado, puede ser por ejemplo eluido o respectivamente desorbido desde la fase sólida. Para esto, se puede utilizar una solución de elución, por ejemplo, un agua exenta de ARNasa o unas soluciones acuosas sólo ligeramente tamponadas, tales como, por ejemplo, unas Tris/HCl 5 M de pH 8,5.

Otro objeto del presente invento se refiere a la utilización de un estuche para el aislamiento de un ARN a partir de una muestra de sangre entera, que contiene por lo menos los siguientes componentes:

- a) una solución acuosa de lisis que contiene por lo menos una sustancia para lisis en una concentración de 1 mol/l a 5 mol/l,
- b) por lo menos un detergente,
- c) unos iones de magnesio,
- d) una proteinasa, en particular la proteinasa K.

El presente invento se refiere además a la utilización del estuche conforme al invento para el aislamiento de un ARN a partir de una muestra de sangre entera.

El presente invento se explicará más detalladamente en lo sucesivo con ayuda de varios Ejemplos de realización.

Ejemplo 1:

Lisis de unas muestras de sangre entera y aislamiento del ARN en el formato Minispin con unas membranas de sílice

Para la lisis de las muestras de sangre 200 µl de una sangre entera se reúnen con 200 µl de un tampón de lisis y se mezclan enérgicamente. Una composición conforme al invento del tampón de lisis RNA Blood Lyse se representa como sigue:

- GuSCN 3 M
- 5 % de Brij 58 (p/v)
- 0,015 % de N-lauroíl-sarcosina,
- MgCl₂ 100 mM.

A continuación, se añade a esto la proteinasa K (20 mg/ml de una solución patrón) y se incuba durante 15 min a la TA (acrónimo de "temperatura ambiente"). Este modo de proceder conforme al invento se designa en lo sucesivo como una lisis directa.

Aislamiento del ARN liberado

Para el aislamiento del ARN liberado, mediante la adición de 200 µl de etanol al 70 % (véase la etapa 9) se ajustan las condiciones de tal manera que el ARN se pueda fijar a una matriz de sílice. El procesamiento ulterior (a partir de la etapa 12) inclusive una digestión del ADN se efectúa con el estuche de purificación de ARN que está disponible comercialmente de la entidad MACHEREY-NAGEL, NucleoSpin RNA II, REF 740955. Este estuche contiene los siguientes componentes:

- el tampón de lisis RA1 (que no es necesario en el presente caso)
- el tampón de lavado RA2
- el tampón de lavado RA3 (concentrado)
- el tampón de desalinización con membranas MDB
- un tampón de reacción para una ADNasa recombinante
- una ADNasa recombinante liofilizada
- una ARNasa exenta de agua
- unas columnas de NucleoSpin Filter (que no son necesarias en el presente caso)
- unas columnas de NucleoSpin RNA II
- unos tubos de recogida
- un manual del usuario

El tampón de lavado RA2 contiene el GuSCN así como un alcohol, el tampón de lavado RA3 contiene un etanol al 80 %, siendo el resto agua y unas sustancias tamponadoras.

Alternativamente a 200 µl de la muestra, se pueden procesar también unas cantidades que se desvían de ésta. Las relaciones entre la muestra de sangre, el tampón de lisis de sangre para ARN "RNA Blood Lysis" y el etanol son de 1:1:1. En el caso de un valor doble del volumen de sangre se duplican también las cantidades del tampón de lisis y del etanol.

Una evolución esquemática del procedimiento se representa en la siguiente tabla:

Etapa	
1	200 µl de sangre entera en un tubo con una capacidad de 1,5 ml
2	200 µl del tampón RNA Blood Lysis
3	mezclar por inversión 3 veces
4	20 µl de la proteinasa K (aproximadamente 200 mg/ml)
5	mezclar (con un vórtice)
6	incubar durante 15 min a la temperatura ambiente en el sacudidor del tipo: Eppendorf Thermoshake, a 1.400 rpm
7	centrifugar brevemente (durante 1 s, con 2.000 x g)
8	añadir 200 µl de etanol al 70 %
9	sacudir enérgicamente
10	centrifugar brevemente (durante 1 s, con 2.000 x g)
11	tratar con el estuche NucleoSpin RNA II Kit. Añadir con pipeta 700 µl del material lisado a una columna de NucleoSpin RNA II situada dentro del tubo de recogida
12	centrifugar durante 30 s con 11.000 x g
13	desechar el flujo que ha pasado y el tubo de recogida
14	introducir la columna dentro de un nuevo tubo de recogida
15	añadir 350 µl de MDB (acrónimo de "Membrane Desalting Puffer", tampón de desalinización con membranas)
16	centrifugar durante 1 min con 11.000 x g
17	añadir 95 µl de una ADNasa recombinante

18	incubar a la TA durante 15 min
19	añadir 200 µl del RA2
20	centrifugar durante 30 s con 11.000 x g
21	desechar el flujo que ha pasado a su través y el tubo de recogida
22	introducir la columna en un nuevo tubo de recogida
23	añadir 600 µl del RA3
24	centrifugar durante 30 s con 11.000 x g
25	desechar el flujo que ha pasado e introducir de nuevo la columna dentro del tubo de recogida
26	añadir 250 µl del RA3
27	centrifugar durante 2 min con 11.000 x g
28	introducir la columna dentro de un tubo de recogida exento de nucleasas (con una capacidad de 1,5 ml)
29	añadir 60 µl de agua exenta de ARNasa
30	centrifugar durante 1 min a 11.000 x g

5 El esquema de evolución muestra a modo de ejemplo el tratamiento de 200 µl de unas muestras de sangre entera, pero también se puede aumentar de escala hasta unos volúmenes arbitrarios. Para esto, los volúmenes del tampón de lisis, de la proteinasa y del etanol son aumentados por el mismo factor, de tal manera que se obtienen unas condiciones comparables de lisis y de fijación.

Análisis del ARN aislado:

10 Para la evaluación de la cantidad y de la calidad de un ARN se pueden aprovechar toda una serie de métodos de investigación. La cuantificación del ARN se efectúa a través de unas mediciones de la absorción a 260 nm, la calidad se determina con ayuda de los cocientes A260/280 y A260/228. Este método ha sido descrito en la obra: Short protocols in molecular biology [Breves protocolos en biología molecular]. F. M. Ausubel (coordinador de edición). 1999 Wiley.

15 Una característica decisiva para la calidad del ARN aislado es también su integridad. Ésta se determina con ayuda de unas mediciones con un Bioanalyzer (Agilent 2100 Bioanalyzer), que aprovechan el índice de integridad de ARN generado por el sistema como una medida de la calidad del ARN. El índice de integridad de ARN, RIN (acrónimo del inglés "RNA-Integrity-Number"), es una medida de la calidad del ARN y se extiende desde un valor ideal de 10,0 hasta uno de 0.

20 Por lo demás, se comprueba la idoneidad del ARN aislado para la analítica consecutiva con ayuda de unos experimentos de RT-PCR [Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa]. Para esto se transcribe inversamente una secuencia de ARN de 73 nt (nucleótidos) y se amplifica mediante una PCR. El análisis se efectúa en el dispositivo Roche LightCycler mediante una PCR en tiempo real. Si se arrastran ciertos componentes de la sangre, tales como, por ejemplo, el hemo, entonces se llega a una inhibición de la PCR.

Resultados:

25 El hecho de que si, en el caso de la evolución descrita más arriba, se añade la proteinasa K antes de la adición del tampón de lisis a la muestra de sangre, o si ésta se añade a la mezcla de sangre y del tampón de lisis, no tiene ninguna influencia sobre el resultado. En la Fig. 1 se muestra una comparación entre los dos procedimientos:

30 Tanda 1 (a la izquierda): la proteinasa K se añadió directamente a la muestra de sangre.
Tandas 2 (en el centro) y 3 (a la derecha): La muestra de sangre se mezcló con un tampón de lisis, a continuación se añadió la proteinasa (tanda 2 con 20 µl de la proteinasa K (20 mg/ml).
Tanda 3: con 5 µl de la proteinasa K (20 mg/ml)).

35 En cada caso se muestran los valores individuales de 3 muestras de sangre (representadas respectivamente por triángulos, rombos o cuadrados). La cantidad de ARN se representa en el presente caso como el valor de Cp después de una RT-PCR en tiempo real. Los resultados muestran además que la cantidad de la proteinasa empleada tiene sólo una importancia secundaria. Incluso una variación por el factor de 4 proporciona unos valores de Cp comparables.

40 El hecho de que el rendimiento de ARN aumenta con una cantidad creciente de sangre se muestra en la Figura 2. La representación ilustra los resultados del aislamiento de un ARN a partir de unas muestras de sangre entera mediante una lisis directa mediante utilización de unas columnas con Minispín. Se representa una comparación del rendimiento de ARN en los casos de 200 y 400 µl de sangre entera. La determinación de la cantidad de ARN se efectuó por medio de una determinación espectrofotométrica a 260 nm. La sangre A-I: una sangre fresca, del donante individual A-I, que había sido estabilizada con EDTA.

50 Se pueden ver unas fluctuaciones que eran de esperar entre las muestras individuales, todas las veces, el rendimiento, en el caso de la utilización de una muestra de 400 µl, es mayor que en el caso de la utilización de 200 µl de una muestra. También se puede reconocer el factor de 2 del mismo modo que en el volumen de la muestra, también en el rendimiento de ARN. En la gran cantidad de muestras lisadas no se llegó en ningún caso a

una obstrucción de las columnas, ni siquiera en los casos de un hematocrito muy alto y de unos rendimientos de ARN correspondientemente altos (compárese la sangre I).

5 La diferencia en el rendimiento, en el caso de la utilización de 400 µl en lugar de 200 µl de sangre entera, se pone de manifiesto también en el análisis con una RT-PCR en tiempo real. Tal como se muestra en la Fig. 3, el empleo de 400 µl de sangre conduce a una reducción del valor de Cp en aproximadamente 1 ciclo. Las muestras de sangre A-I son una sangre fresca de unos donantes individuales A-I, que había sido estabilizada con EDTA. Se representan los valores individuales, así como los valores de la media y de la mediana.

10 Mediante la relación semilogarítmica entre el valor de Cp y la concentración de ARN, la disminución en un ciclo corresponde a un aumento de la concentración en el factor de 2. Éste es exactamente el factor que era de esperar en el caso de una duplicación de la cantidad de sangre. La calidad de un ARN aislado, medida por la relación A260/280, se representa en las Figuras 4A (el aislamiento de un ARN a partir de unas muestras de sangre entera mediante una lisis directa) y 4B (una lisis selectiva de los eritrocitos). Los resultados se basan en el procesamiento de en cada caso 400 µl de sangre entera mediante una lisis directa de acuerdo con el Ejemplo de realización 1.

15 La lisis selectiva de los eritrocitos se llevó a cabo con el estuche de Qiagen, QiAamp RNA Blood Mini Kit, de acuerdo con el manual adjunto. En el caso de las muestras de sangre A-F se trata, de nuevo, de una sangre entera de unos donantes individuales A-F, que había sido estabilizada con EDTA. Se representan los valores individuales (n = 2) y de la media. Idealmente, el ARN debería tener unas relaciones de A260/280 situadas en torno a 2,0-2,1. Por lo general, la calidad de un ARN, que se ha aislado a partir de sangre, es sin embargo más baja que la de uno procedente de otros tejidos o células. Las relaciones (Ratios) determinadas con el procedimiento conforme al invento están situadas casi idealmente entre 1,8 y 2,1.

20 Como comparación, en la Fig. 4B se muestran las relaciones, que se obtuvieron con un estuche comercial basado en una lisis selectiva de eritrocitos (Qiagen QiAamp RNA Blood Mini Kit). También en el presente caso la calidad es buena, pero no se alcanzan unas relaciones situadas por encima de 1,9. También es llamativa la muestra 2, la cual, con una lisis directa, proporcionó una relación de 1,8, pero, con una lisis selectiva de eritrocitos, solamente proporcionó una relación de 1,2. Debido a la costosa y compleja manipulación en el caso de una lisis selectiva, ya no se pueden excluir unas impurificaciones de un ARN.

25 La integridad del ARN, que se puede conseguir con el procedimiento conforme al invento, es comparativamente alta y por lo menos comparable con la de los procedimientos clásicos, que se basan en la lisis selectiva de eritrocitos. En la Fig. 5 se muestran los valores de RIN de 5 muestras diferentes de sangre. En el presente caso, el aislamiento del ARN se efectuó a partir de 400 µl de unas muestras de sangre entera mediante una lisis directa (es decir conforme al invento) y mediante una lisis selectiva de eritrocitos. Lisis directa: realización de acuerdo con el Ejemplo de realización 1. Lisis selectiva de eritrocitos: realización con el estuche de Qiagen, QiAamp RNA Blood Mini Kit, de acuerdo con el manual. Se representa la integridad del ARN (los valores de RIN) después del análisis con el Bioanalyzer. Sangre 1-5: una sangre fresca, de los donantes individuales 1-5, que había sido estabilizada con EDTA. Se representan los valores individuales y de la media.

30 Los valores de 7,8 de la media, que se consiguieron con la lisis directa, son sobresalientes, ellos muestran una alta integridad del ARN y demuestran expresivamente que las ARNasas son desactivadas eficientemente durante la lisis y la disgregación de las células. Como comparación, se muestran los valores de RIN después de una lisis selectiva de eritrocitos. Éstos, con un valor de la media de 6,8, están situados por debajo de los valores de la lisis directa.

Ejemplo 2:

Automatización del procedimiento para el aislamiento a partir de una sangre entera – Procesamiento bajo un vacío y en la centrifugadora

50 A continuación se representa un desarrollo del procedimiento para el procesamiento de hasta 96 muestras. La lisis de las muestras de sangre y el aislamiento del ARN tienen lugar en unas placas de 96 pocillos. También en el presente caso, el ARN es aislado después de la lisis con un estuche comercial de purificación del ARN de la entidad MACHEREY-NAGEL, NucleoSpin 8 RNA (REF 740698) o NucleoSpin 96 RNA (740709). Estos estuches contienen los siguientes componentes.

55 el tampón de lisis RA1 (que no es necesario en el presente caso)

el tampón de lavado RA2

el tampón de lavado RA3 (concentrado)

el tampón de lavado RA4 (concentrado)

un tampón de reacción para la ADNasa

60 una ADNasa recombinante, liofilizada

una ARNasa exenta de agua

unas tiras de fijación de ARN NucleoSpin RNA (con la REF 740698) o

una placa de fijación NucleoSpin ARN (con la REF 740709)

una placa de lavado

65 un bloque de pocillos cuadrados

una placa de elución

El tampón de lavado RA2 contiene GuSCN así como un alcohol, el tampón de lavado RA3 (con el contenido que se ha indicado más arriba) y el tampón de lavado RA4 contiene 70 % de etanol, siendo el resto agua.

Etapa	
1	disponer previamente 400 µl de sangre entera
2	añadir 400 µl del tampón RNA Blood Lysis
3	mezclar (con un sacudidor o añadir y retirar con pipetas)
4	añadir 10 µl de la proteinasa K (aproximadamente 20 mg/ml)
5	mezclar (con un sacudidor, durante 5 s)
6	incubar durante 15 min a la temperatura ambiente, de manera preferida en un sacudidor
7	añadir 400 µl de etanol al 70 %
8	mezclar (con un sacudidor o añadir y retirar por pipeteo)
9	aplicar el material lisado sobre las placas de fijación de ARN NucleoSpin o sobre unas tiras de a 8
10	a partir de aquí, seguir el protocolo NucleoSpin 8/96 RNA. El procesamiento se puede efectuar o bien en una centrifugadora o bajo un vacío.

5 La extracción en el formato de 96 pocillos se muestra a modo de ejemplo en la Fig. 6. En el presente caso se procesaron 8 muestras de sangre cada vez en una determinación en 3 veces mediante centrifugación y bajo un vacío. La determinación de la cantidad de ARN se efectuó por una espectrofotometría a 260 nm. Las muestras 1-8: 10 400 µl de una sangre entera, donantes individuales 1-8, n = 3 (A, B, C), que había sido estabilizada con EDTA. Se representan los valores individuales y de la media.

Estos resultados muestran que son posibles las dos posibilidades para el tratamiento de las muestras. Las fluctuaciones entre las muestras individuales de sangre representan de nuevo las fluctuaciones en el hematocrito (con diferentes cantidades de leucocitos y por consiguiente diferentes rendimientos de ARN).

15

Ejemplo 3:

Automatización del procedimiento para el aislamiento del ARN a partir de una sangre entera - Procesamiento mediante utilización de perlas magnéticas

20 Como fase sólida para la fijación del ARN aislado se pueden emplear también otras distintas de las membranas de sílice que se han descrito precedentemente. En el siguiente Ejemplo de realización, en lugar de las membranas, se emplean unas perlas (en inglés beads) magnéticas. La separación y el aislamiento del ARN no se efectúan en el presente caso mediante una centrifugación o bajo un vacío sino por medio de una separación magnética en un dispositivo separador adecuado, p.ej. con unos imanes estáticos tales como el dispositivo de MACHEREY-NAGEL NucleoMag SEP, REF 744900, para placas de 96 pocillos.

25

A continuación se representa la evolución del procedimiento para el procesamiento de hasta 96 muestras. La lisis de las muestras de sangre y el aislamiento del ARN tienen lugar en unas placas de 96 pocillos. En el presente caso, el ARN se aísla, después de la lisis, con un estuche de purificación disponible comercialmente de la entidad MACHEREY-NAGEL, NucleoMag 96 RNA (REF 744350). El estuche contiene los siguientes componentes:

30

- el tampón de lisis MR1 (que no se utiliza en el presente caso)
- el tampón de fijación MR2
- el tampón de lavado MR3
- el tampón de lavado MR4
- 35 el tampón de elución MR5
- unas perlas magnéticas
- agua exenta de ARNasa
- un tampón de reacción para una ADNasa recombinante
- una ADNasa recombinante (liofilizada)
- 40 el agente de reducción TCEP (que no se utiliza en el presente caso)

El tampón de fijación MR2 contiene > 90 % de isopropanol, siendo el resto agua.

El tampón de lavado MR3 contiene GuSCN así como un alcohol, el tampón de lavado MR4 contiene aproximadamente 80 % de etanol, siendo el resto agua.

45

Etapa	
1	disponer previamente 400 µl de una sangre entera
2	añadir 400 µl del tampón RNA Blood Lysis
3	mezclar (con un sacudidor o añadir y retirar por pipeteo)
4	añadir 10 µl de la proteinasa K (aproximadamente 20 mg/ml)
5	mezclar (con un sacudidor, durante 5 s)
6	incubar durante 15 min a la temperatura ambiente, de manera preferida en un sacudidor
7	añadir 28 µl de perlas magnéticas y 400 µl del tampón de fijación MR2

8	mezclar (con un sacudidor o añadir y retirar por pipeteo)
9	seguir a partir de aquí el protocolo NucleoMag RNA.

5 También con este procedimiento se extrajo un gran número de muestras de sangre. En el caso de la utilización de 400 µl de sangre entera se aislaron, según fuese la muestra, 1-2 µg de un ARN con una relación A260/280 de aproximadamente 1,6. El procedimiento conforme al invento es adecuado, por lo tanto, también en combinación con una separación magnética de un ARN.

Ejemplo 4:

Extracción de un ARN a partir de una sangre entera humana fresca y de otra congelada

10 En este ensayo el procedimiento conforme al invento se llevó a cabo con unas muestras de sangre entera congelada. Para esto se distribuyeron 6 muestras frescas de una sangre entera tratada con EDTA: una parte de las muestras se congeló a -20°C, la otra parte se almacenó, como comparación, durante un período de tiempo de 8 h a 4°C. A continuación, las muestras congeladas se descongelaron, y en un extracción paralela el ARN se aisló de acuerdo con el Ejemplo de realización 2. El rendimiento de ARN se representa en la Fig. 7. El procesamiento se efectuó bajo un vacío de acuerdo con el Ejemplo de realización 2, la determinación de la cantidad de ARN se efectuó por una espectrofotometría a 260 nm.

20 Color negro: muestras frescas de sangre, Color blanco: muestras congeladas de sangre. Muestras 1-6: 200 µl de una sangre entera, de los donantes individuales 1-6, que había sido estabilizada con EDTA. Se representan los valores de la media de n = 3.

25 Los resultados confirman que el procedimiento conforme al invento se puede emplear de igual manera para unas muestras frescas, que para unas muestras congeladas. Asimismo, se investigaron la pureza de un ARN (A260/280), la calidad de un ARN (el RIN) así como la aptitud de amplificar mediante una RT-PCR. Tampoco en el presente caso hubo unas diferencias significativas entre las muestras frescas y las muestras congeladas: la pureza y la calidad de un ARN eran comparables, y tampoco en el caso de la aptitud de amplificar se observó ninguna diferencia.

Ejemplo 5:

Aislamiento del ARN a partir de sangre de animales

30 A modo de ejemplo de la utilización de sangre de animales, en este lugar se aisló el ARN a partir de una sangre de caballo congelada de acuerdo con el Ejemplo de realización 2. A partir de en total 5 muestras individuales de sangre, se pudo aislar en cada caso el ARN. En ningún caso se llegó a una obstrucción de la placa de fijación ni a otros hechos llamativos, todas las muestras pudieron ser procesadas sin problemas bajo un vacío. Por consiguiente, se pudo demostrar que el procedimiento conforme al invento no sólo es adecuado para una sangre humana entera sino también para unas muestras de sangre de otras especies.

Ejemplo 6:

Concentraciones y componentes del tampón de lisis

El tampón de lisis conforme al invento tiene que asegurar que después de la adición de la muestra de sangre fuesen resueltos varios problemas. Así, se tienen que cumplir las siguientes cuatro premisas:

- 40 1. La proteinasa no debe de ser desactivada por el tampón. Se tiene que asegurar que también en las condiciones de altas concentraciones de sales que se habían escogido, tuviese lugar todavía una eficiente digestión de las proteínas.
2. Las ARNasas tienen que ser desactivadas para que no se influya negativamente sobre la calidad del ARN aislado.
- 45 3. La fijación del ARN a la fase sólida tiene que ser posible en las condiciones escogidas en cooperación con el etanol.
4. La lisis de la sangre entera tiene que estar asegurada.

50 En este contexto es especialmente relevante la concentración de la sal caotrópica. Por un lado, la sal conduce a la lisis de las células sanguíneas (característica 4), ella desactiva a las ARNasas (característica 2) y conduce a la fijación del ARN a la fase sólida (característica 3). Si la concentración es, por el contrario, demasiado alta, entonces las proteinasas son desactivadas y la lisis es incompleta; no se puede evitar una obstrucción de la columna en estas condiciones escogidas (característica 1).

55 Por lo tanto, se trata de escoger las condiciones de tal manera que se consiga una acción combinada óptima entre una sal caotrópica y una proteinasa. En un primer experimento, la concentración de GuSCN en el tampón de lisis se hizo variar, de acuerdo con el Ejemplo de realización 2, dentro de la región de concentraciones de 0,5, 1, 2, 3, 4 y 5 M. Se procesaron 4 muestras individuales de sangre.

60 Como resultado de esto, se comprobó que los pocillos se obstruyeron en el caso de unas concentraciones de GuSCN de 0,5 y 1 M. A pesar de la presencia de una proteinasa en la tanda, la eficiencia para la lisis del tampón de lisis (con una concentración final de GuSCN de 0,25 y 0,5 M) no es suficiente como para disgregar completamente a las muestras de sangre. La proteinasa por sí sola no conduce por lo tanto a una lisis satisfactoria de las muestras de sangre.

Como siguiente etapa, se investigó la fijación de un ARN a la fase sólida. Como parámetro sirve en el presente caso el rendimiento de ARN. En la Fig. 8 se han recopilado los resultados de la investigación de la influencia de la concentración de la sal caotrópica sobre el rendimiento de ARN. El aislamiento del ARN se efectuó mediante una lisis directa a partir de unas muestras de sangre entera en el formato de 96 pocillos con el NucleoSpin 96 RNA. El procesamiento se llevó a cabo bajo un vacío y la cantidad de ARN se determinó por una espectrofotometría a 260 nm. Se emplearon 4 muestras individuales de sangre. Se representan los valores de la media de n = 3.

En primer lugar, se puede ver en el presente caso que las concentraciones de GuSCN de 0,5 y 1 M no proporcionaron ningún rendimiento, puesto que los pocillos se obstruyeron y no se pudo llevar a cabo ningún aislamiento. Una concentración de GuSCN 2 M condujo ya al aislamiento del ARN, teniendo lugar el procedimiento óptimamente a partir de unas concentraciones de 3 M, los rendimientos de ARN son en el presente caso más altos que en el caso de una concentración de GuSCN 2 M.

La pureza de un ARN en dependencia de la concentración de la sal caotrópica se representa en la Fig. 9. El aislamiento de un ARN a partir de unas muestras de sangre entera se efectuó mediante una lisis directa en el formato de 96 pocillos con el NucleoSpin 96 RNA. El procesamiento se llevó a cabo bajo un vacío y la cantidad de ARN se determinó por medio de una determinación espectrofotométrica de la relación A260/280. Se emplearon 4 muestras individuales de sangre. Se representan los valores de la media de n = 3.

También en el presente caso, para unas concentraciones de GuSCN a partir de 2 M se determinaron unos resultados óptimos con unas relaciones de aproximadamente 2,1. Fundamentalmente, el procedimiento conforme al invento funciona también con una concentración de GuSCN 1,5 M, las relaciones son, sin embargo, algo más bajas y también las fluctuaciones a lo largo de las muestras de sangre son un poco más grandes.

En la Fig. 10 se representa la calidad de un ARN en dependencia de la concentración de la sal caotrópica.

El aislamiento de un ARN a partir de unas muestras de sangre entera se efectuó mediante una lisis directa en el formato de 96 pocillos con el NucleoSpin 96 RNA. El procesamiento se llevó a cabo bajo un vacío y la determinación de la integridad del ARN (el RIN) se llevó a cabo mediante unas mediciones con un Bioanalyzer. Se analizaron unas muestras con 3 muestras individuales de sangre (que son caracterizadas respectivamente por los colores negro, gris y blanco). La muestra 1 (de color negro) con GuSCN 2 M obstruyó el paso en el Bioanalyzer y no proporcionó ningún RIN. Se representan los valores individuales.

Unos altos valores del RIN y por lo tanto también una alta calidad del ARN se obtuvieron para unas concentraciones de GuSCN > 2 M. Fundamentalmente, el procedimiento funciona también con unas concentraciones de GuSCN de 1,5 o 2 M, pero los valores del RIN son un poco más bajos que en el caso de unas concentraciones más altas, pero a pesar de todo, en el presente caso también las ARNasas son desactivadas al parecer por lo menos parcialmente por la sal caotrópica. Si la molaridad del tampón de lisis está situada en una concentración de 3 M o más alta, entonces la desactivación es todavía más eficiente, lo que se puede reconocer en una integridad aumentada de un ARN y en unos valores aumentados del RIN.

El efecto de la concentración de la sal caotrópica sobre la actividad de la proteinasa se investigó en un experimento realizado por separado. Fundamentalmente, se repitieron los experimentos precedentemente mostrados de acuerdo con el Ejemplo de realización 2, pero en presencia o respectivamente en ausencia de la proteinasa K. Los resultados se han recopilado en la siguiente Tabla:

Como muestra uniforme para todas las tandas se empleó una agrupación de sangre patrón (Master-Blutpool). Se representan los valores de la media de n = 3.

Concentración de GuSCN	Sin ninguna proteinasa						Con una proteinasa					
	0,5	1	2	3	4	5	0,5	1	2	3	4	5
Obstrucción	sí	sí	sí	sí	sí	no	sí	sí	no	no	no	no
Rendimiento de ARN en µg	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	0,39	-/-	-/-	1,2	2,6	2,6	2,6
Pureza del ARN A260/280	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	1,4	-/-	-/-	1,82	1,97	1,97	2,0
RIN	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	3,3	6,8	6,9	7,4

A partir de esta Tabla puede verse que sin la adición de una proteinasa se llega a una lisis incompleta, y que la placa de fijación se obstruye. Solamente con unas concentraciones de la sal caotrópica de 5 M, la lisis era tan eficiente que no se observó ninguna obstrucción. El rendimiento de ARN y la pureza eran, sin embargo, pequeños.

Además, se observó que la membrana de sílice, después de una lisis y de haber lavado, estaba teñida todavía de un color manifiestamente oscuro (debida a contaminaciones de restos de células y proteínas), mientras que las membranas, después de una lisis con la proteinasa K, eran de color blanco y estaban exentas de residuos.

5 En presencia de la proteinasa, unas concentraciones de la sal caotrópica > 1 M conducen a una lisis completa (no se presenta ninguna obstrucción de la membrana). El rendimiento de ARN aumenta desde los 2 hasta los 3 M, y permanece luego relativamente constante. Lo mismo sucede con la pureza del ARN. Ésta es buena en el caso de una concentración 2 M, a partir de una concentración de GuSCN de 3 M se consiguen unos valores mejores. La calidad del ARN, medida con ayuda del RIN, es asimismo aceptable en el caso de una concentración de GuSCN 2 M, y es muy buena a partir de 3 M.

En resumen, se puede retener el hecho de que, incluso unas concentraciones de GuSCN de 4 y 5 M aseguran una actividad suficientemente alta de la proteinasa. Si falta la proteinasa, entonces la lisis es ineficiente e incompleta.

15 **Ejemplo 7:**
Influencia del MgCl₂ y de otros iones de metales divalentes sobre la eficiencia para la lisis y el rendimiento de ARN

En un primer ensayo se hizo variar la concentración del cloruro de magnesio en el tampón de lisis. La realización se efectuó de acuerdo con el Ejemplo de realización 1, los resultados se han recopilado en la Fig. 11. El aislamiento del ARN se efectuó a partir de una sangre entera mediante una lisis directa de acuerdo con el Ejemplo de realización 1. La determinación del rendimiento de ARN se realizó mediante una cuantificación con RiboGreen. Se empleó una agrupación de sangre, en cada caso n = 4. Se representan los valores individuales y las medianas.

25 Los resultados confirman que mediante la adición del MgCl₂ es posible conseguir un aumento adicional del rendimiento de ARN, y que éste prácticamente se puede duplicar mediante la adición de hasta 200 mM de MgCl₂ al tampón de lisis. Independientemente de la concentración de los iones de magnesio, las muestras se pudieron procesar sin problemas, y no se observó ninguna obstrucción de la membrana.

30 En otro ensayo de acuerdo con el Ejemplo de realización 2 se aumentó todavía más la cantidad de MgCl₂. En el presente caso se obtuvieron los siguientes resultados:

Cantidad empleada de MgCl ₂	Rendimiento de ARN
0 mM	1,22 µg
100 mM	2,28 µg
200 mM	2,36 µg
400 mM	2,24 µg
800 mM	2,04 µg

35 Esto confirma que una cantidad creciente de los iones de magnesio conduce a un aumento del rendimiento de ARN. El valor óptimo está situado en el presente caso en aproximadamente 200 mM; si se aumenta aún más la concentración, entonces el procedimiento conforme al invento sigue funcionando, pero el rendimiento de ARN retrocede de nuevo ligeramente en comparación con el valor óptimo.

40 Este efecto obtenido mediante la utilización de MgCl₂ es también sorprendente, por cuanto que otros iones divalentes (con la excepción de calcio en determinadas circunstancias) en el mismo intervalo de concentraciones, conducen a una obstrucción completa de la membrana. Los iones dan lugar a una precipitación, de tal manera que las muestras ya no pueden ser procesadas adicionalmente. Los rendimientos de ARN son correspondientemente bajos o iguales a cero. El rendimiento de ARN en dependencia de los iones empleados se representa en la Fig. 12. El aislamiento del ARN se efectuó a partir de una sangre entera mediante una lisis directa de acuerdo con el Ejemplo de realización 2. Todos los iones de metales se emplearon en una concentración de 100 mM en el tampón de lisis. La determinación del rendimiento de ARN se efectuó mediante una cuantificación con RiboGreen. Se empleó una agrupación de sangre, en cada caso con n = 3, se representan los valores de la media. Con la excepción de las tandas sin iones divalentes y con MgCl₂, todas las demás combinaciones condujeron a una obstrucción de la membrana y por lo tanto a unos rendimientos de ARN iguales a cero.

50 En otros experimentos se comprobó que, junto a los iones de magnesio, también los iones de calcio tienen un efecto positivo sobre el rendimiento de ARN. Sin embargo, en el caso del empleo de iones de calcio, este efecto depende adicionalmente todavía de la sal caotrópica empleada. Así, se observó que los iones de calcio (en forma de CaCl₂) en combinación con el tiocianato de guanidinio no tienen ningún efecto favorecedor y que obstruyen a las membranas. En combinación con un tiocianato de metal alcalino, tal como el tiocianato de sodio, se pudo observar, no obstante, un mejoramiento del rendimiento de ARN. La concentración de iones de calcio, con la que este ventajoso efecto aparece de modo especialmente pronunciado, está situada en aproximadamente 50-100 mM.

Estos ensayos muestran que el procedimiento conforme al invento funciona de manera muy preferida con iones de magnesio, así como también con iones de calcio, y que en tal caso se ajusta un mejoramiento del rendimiento de ARN. Otros iones de metales divalentes no tienen, por el contrario, ningún efecto positivo, sino, al contrario, un efecto manifiestamente negativo, puesto que conducen a la precipitación de los componentes celulares.

Ejemplo 8

Empleo de diferentes detergentes en el tampón de lisis

A continuación se investiga la influencia de los detergentes sobre la eficiencia para la lisis y el rendimiento de ARN. En el presente caso se emplearon ciertos detergentes individualmente o en mezcla. Se ensayaron las siguientes combinaciones:

Número de la muestra	Detergente no iónico	Detergente aniónico
1	50 g/l de Brij58	0,15 g/l de N-lauroil-sarcosina
2	50 g/l de Brij58	-
3	50 g/l de Brij58	0,5 g/l de SDS
4	50 g/l de Brij58	0,5 g/l de docusato
5	50 g/l de Tween20	0,15 g/l de N-lauroil-sarcosina
6	50 g/l de Brij56	0,15 g/l de N-lauroil-sarcosina
7	50 g/l de Brij35	0,15 g/l de N-lauroil-sarcosina
8	50 g/l de Brij56	0,5 g/l de SDS

La sal caotrópica, así como la concentración de $MgCl_2$, se mantuvo constante a lo largo de todas las tandas (GuSCN 3 M, $MgCl_2$ 100 mM; la realización se efectúa de acuerdo con el Ejemplo de realización 2).

La Fig. 13 muestra la influencia de diferentes detergentes y combinaciones de detergentes sobre el rendimiento del ARN y la eficiencia para la lisis. El aislamiento del ARN a partir de una sangre entera se efectúa mediante una lisis directa de acuerdo con el Ejemplo de realización 2. Se representan unos valores individuales y la mediana de $n = 4$.

En resumen, se puede retener el hecho de que se pueden emplear de acuerdo con el procedimiento conforme al invento tanto unos detergentes individuales como también unas combinaciones de detergentes no iónicos y aniónicos. Solamente la combinación n° 5 con Tween 20 condujo a unas fluctuaciones más grandes del rendimiento y en promedio a unos rendimientos reducidos de ARN. Sin embargo, no se observó ninguna obstrucción de las membranas, de tal manera que el procedimiento conforme al invento funciona también con Tween 20.

El detergente apoya la lisis, disuelve los lípidos de las células lisadas de la sangre y evita de esta manera una obstrucción de las membranas. Si, por el contrario, se renuncia completamente al detergente, entonces se llega a una lisis incompleta y a una obstrucción de las membranas.

Ejemplo 9

Empleo de diferentes sales caotrópicas en el tampón de lisis

Con el fin de investigar la influencia de diferentes sales caotrópicas, se ensayaron de acuerdo con el Ejemplo de realización 2 el tiocianato de guanidinio (GuSCN), el hidrocloreuro de guanidinio (GuHCl) y el tiocianato de sodio (NaSCN) como sustancias caotrópicas en el tampón de lisis, empleándose la sal caotrópica en cada caso en una concentración de 3 M. Valores de la media de $n = 3$. Los resultados se han representado en la Fig. 14.

Para el tiocianato de guanidinio se reconoce la manifiesta influencia de los iones de magnesio sobre el rendimiento del ARN, al igual que el efecto favorecedor de los iones de calcio. En el caso de la utilización del tiocianato de sodio, el rendimiento de ARN es por lo general más bajo, a pesar de todo, el procedimiento funciona sin iones divalentes, con $CaCl_2$ 10 mM y con $MgCl_2$ 100 mM. En el caso de la utilización del hidrocloreuro de guanidinio se obstruyeron las membranas.

Por consiguiente, se puede sacar la conclusión de que unas sales caotrópicas, que están constituidas sobre la base del ion tiocianato, de manera muy especialmente preferida el tiocianato de guanidinio, se adecuan para el procedimiento conforme al invento.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el aislamiento del ARN a partir de una muestra de sangre entera, que comprende las etapas de:
- 5 a) poner en contacto la muestra con una solución acuosa de lisis, que contiene por lo menos una sustancia para lisis en una concentración de 1,5 mol/l a 7 mol/l, por lo menos un detergente y unos iones de magnesio,
- 10 b) añadir simultánea o subsiguientemente una proteinasa, en particular la proteinasa K,
- c) después de esto, incubar la solución, que se había obtenido de acuerdo con la etapa b), para realizar una digestión enzimática y una lisis por lo menos parciales de la muestra, obteniéndose un material lisado, y
- d) aislar el ARN a partir del material lisado,
- 15 poniéndose en contacto la muestra en la etapa a) directamente con la solución de lisis y no siendo diluida ésta hasta la finalización de la etapa c) mediante la adición de más cantidad de disolvente, no añadiéndose ningún agente estabilizador y/o no centrifugándose, realizándose que el volumen total, que está constituido por la muestra, la solución acuosa de lisis y la proteinasa, sobrepasa al volumen de partida de la muestra hasta la finalización de la etapa c) en no más que el factor de 2,5, de manera preferida en no más que el factor de 1,5.
- 20 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** en la etapa c) las ARNasas, que están contenidas en la solución, son desactivadas de una manera amplísimamente completa.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** la solución acuosa de lisis contiene la sustancia para lisis en una concentración de 2 mol/l a 6 mol/l, en particular de 2,5 mol/l a 5 mol/l, de manera preferida de 3 mol/l a 4 mol/l.
- 25 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** la solución acuosa de lisis se mezcla con la muestra en una relación volumétrica de 1,8 : 1 a 1 : 1,8, en particular de 1,5 : 1 a 1 : 1,5, de manera preferida de 1,2 : 1 a 1 : 1,2.
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** en la etapa b) la proteinasa se añade como un material sólido en común con un disolvente o como una solución de una proteinasa, ajustándose la respectiva cantidad de líquido de tal manera que la cantidad de líquido sea a lo sumo de 20 % del volumen de la muestra y de la solución acuosa de lisis, en particular a lo sumo de 10 %.
- 35 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** la sustancia para lisis comprende una o varias sales caotrópicas, y en particular se escoge entre unos tiocianatos, tales como el tiocianato de sodio, el tiocianato de potasio y el tiocianato de guanidinio, la urea, y unas sales percloratos tales como el perclorato de sodio y/o el yoduro de potasio.
- 40 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** la solución de lisis contiene unos iones de magnesio en una concentración de 10 a 1.000 mMol/l, de manera preferida de 100 a 600 mMol/l, de manera más preferida de 150 a 400 mMol/l.
- 45 8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** la sustancia para lisis comprende los tiocianatos de potasio y/o de sodio, y la solución de lisis contiene unos iones de calcio, siendo la concentración de iones de calcio en particular de 10 a 150 mMol/l, de manera preferida de 50 a 100 mMol/l.
- 50 9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** la solución de lisis está exenta de iones de metales di- o plurivalentes con la excepción de magnesio y calcio.
10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** el detergente se escoge entre unos detergentes no iónicos, unos detergentes aniónicos o unas mezclas de éstos, en particular un poli(oxietilen)-20-cetil-éter (Brij 58®) o la N-lauroil-sarcosina.
- 55 11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** la solución de lisis contiene otras sustancias constituyentes, que se escogen en particular entre unas sustancias tamponadoras, unas enzimas, unos agentes de reducción y/o unos alcoholes.
- 60 12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** para el aislamiento del ARN a partir del material lisado, el ARN reacciona por adición con una fase sólida, en caso deseado seguido por una o varias etapas de lavado.
- 65 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado por que** para la reacción por adición del ARN a la fase sólida, al material lisado se le añade un agente de fijación, en particular un alcohol, de manera preferida el etanol y/o el isopropanol, así como una mezcla de un alcohol y agua.

14. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** el ADN se elimina por lo menos parcialmente, de manera preferida casi completamente, en particular mediante una digestión con una ADNasa.
- 5
15. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** el ARN aislado se obtiene, en particular, mediante una desorción.
- 10
16. Utilización de un estuche para el aislamiento del ARN a partir de una muestra de sangre entera de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 15, que contiene por lo menos los siguientes componentes:
- 15
- a) una solución acuosa de lisis, que contiene por lo menos una sustancia para lisis en una concentración de 1 mol/l a 5 mol/l
 - b) por lo menos un detergente,
 - c) unos iones de magnesio,
 - d) una proteinasa, en particular la proteinasa K.

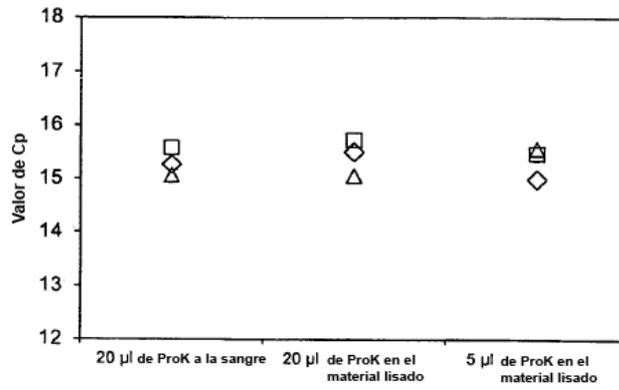


Fig. 1

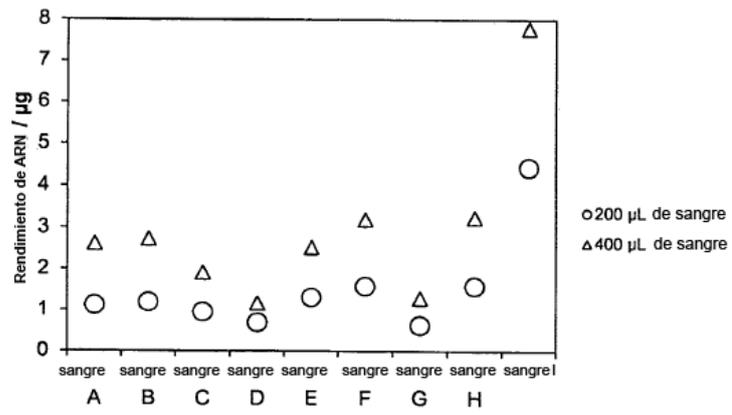


Fig. 2

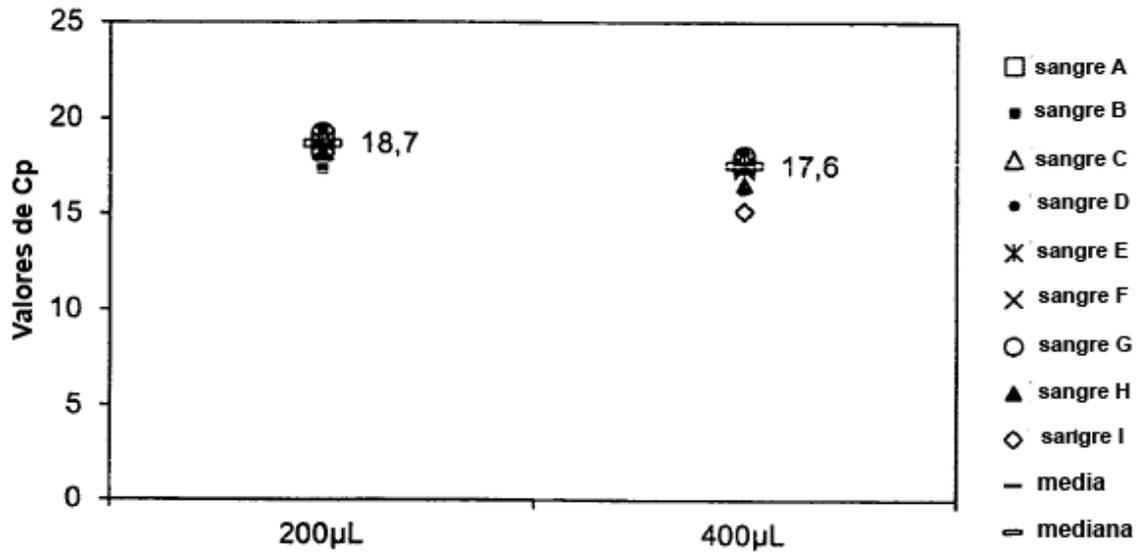


Fig. 3

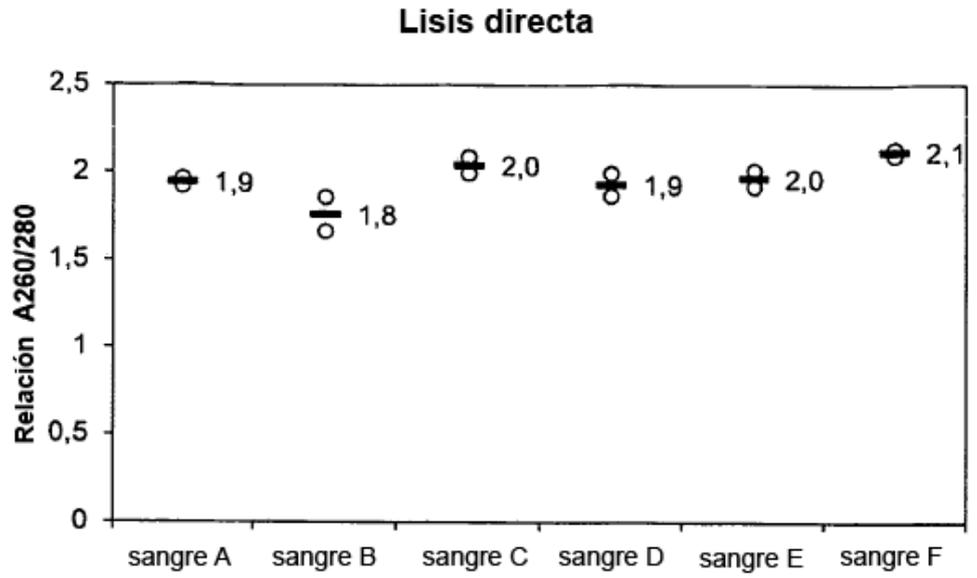


Fig. 4A

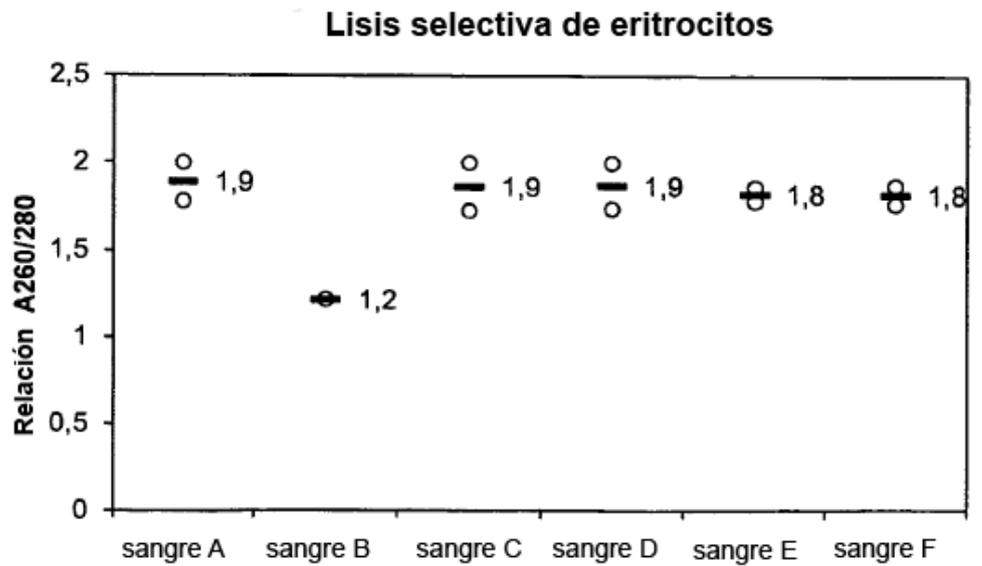


Fig. 4B

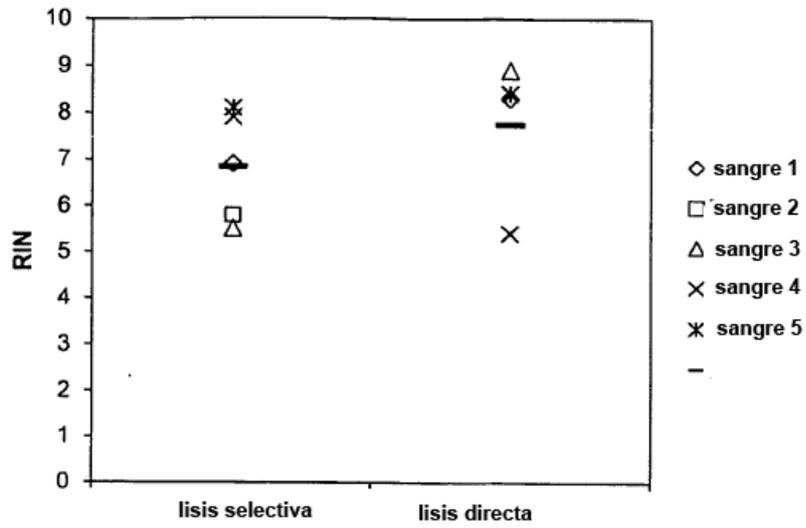


Fig. 5

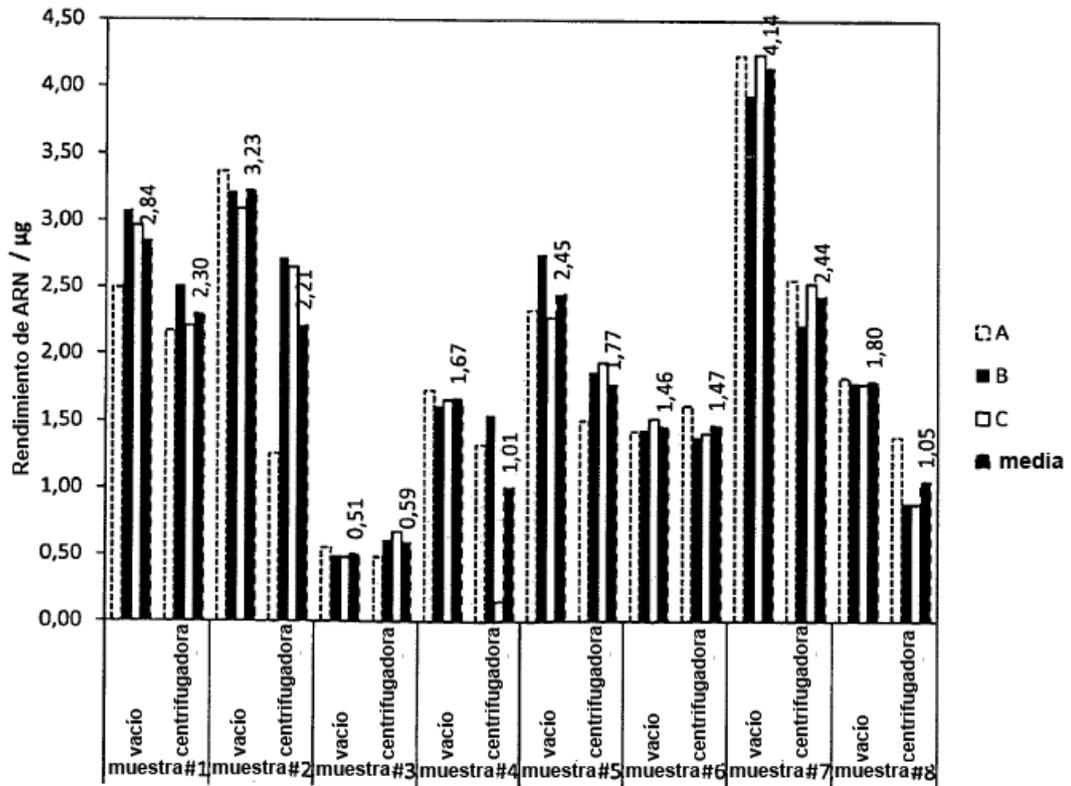


Fig. 6

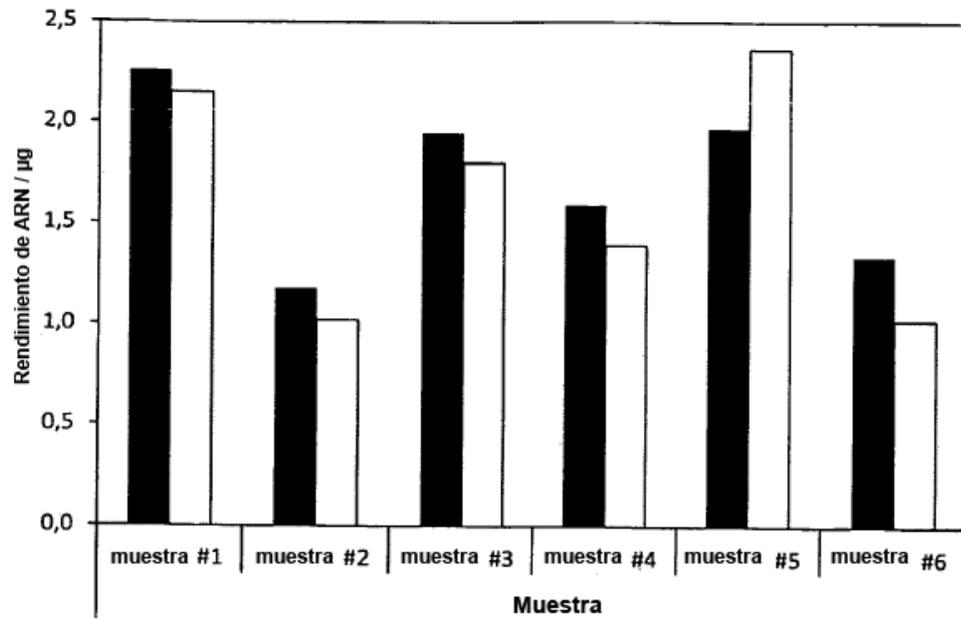


Fig. 7

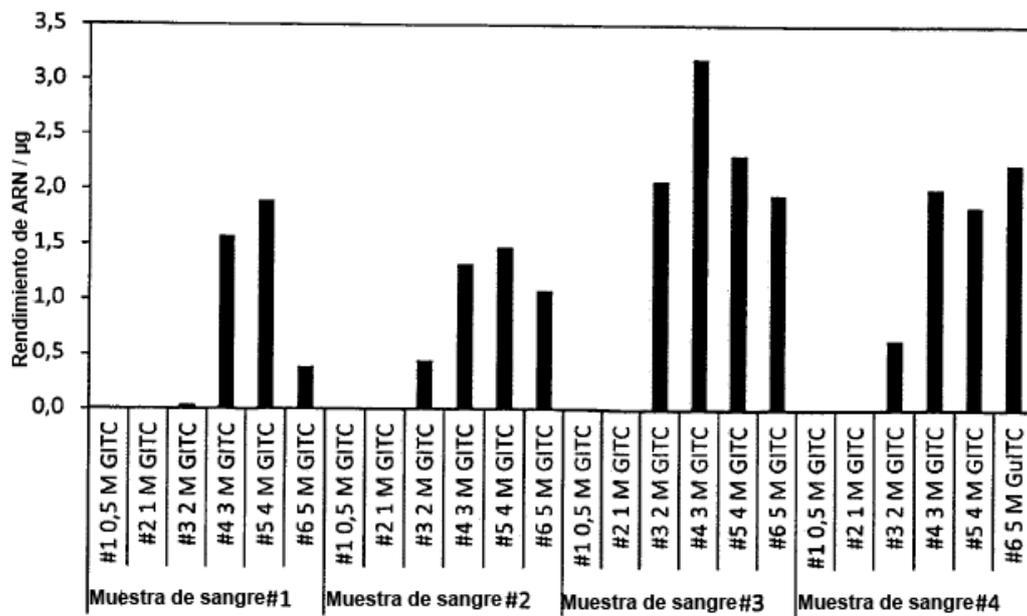


Fig. 8

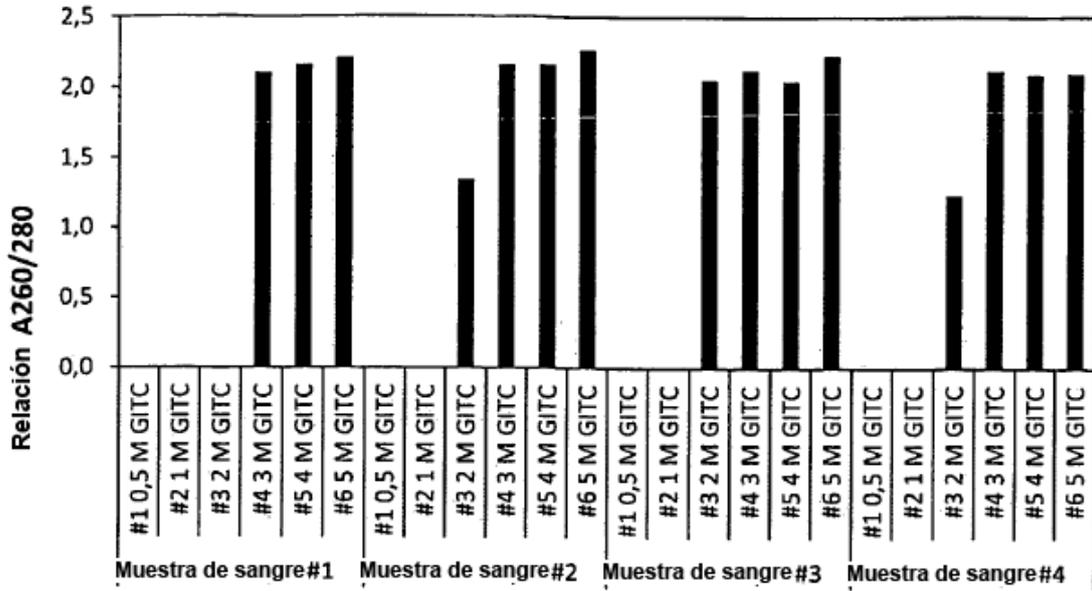


Fig. 9

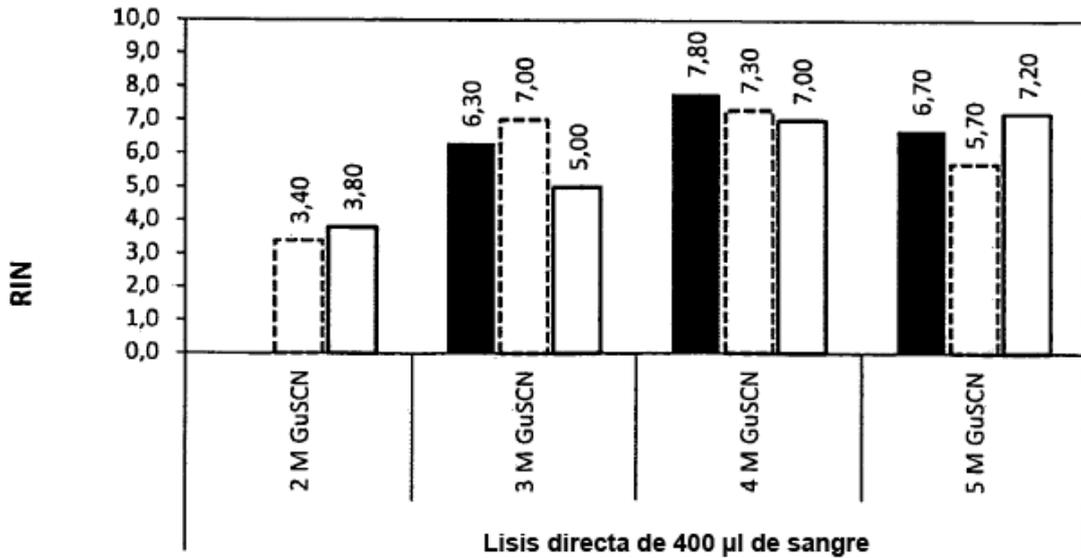


Fig. 10

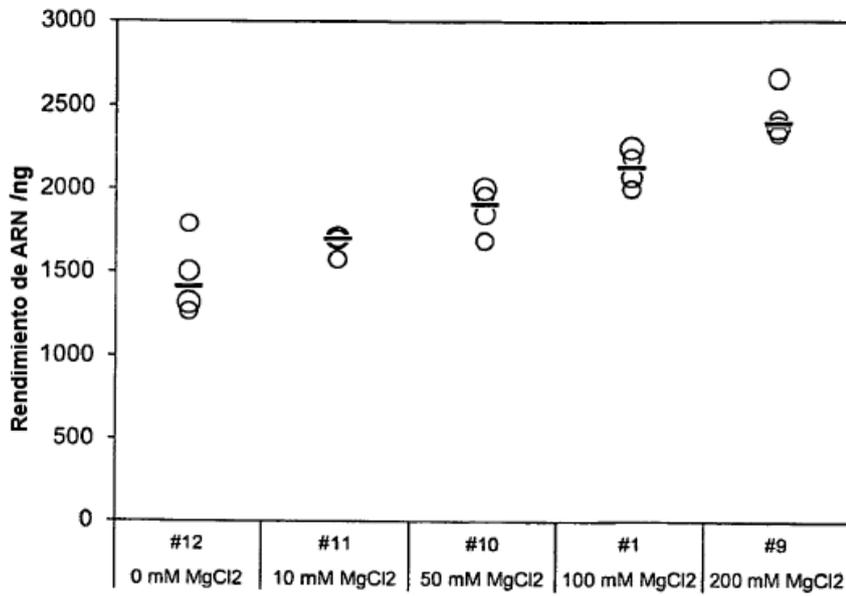


Fig. 11

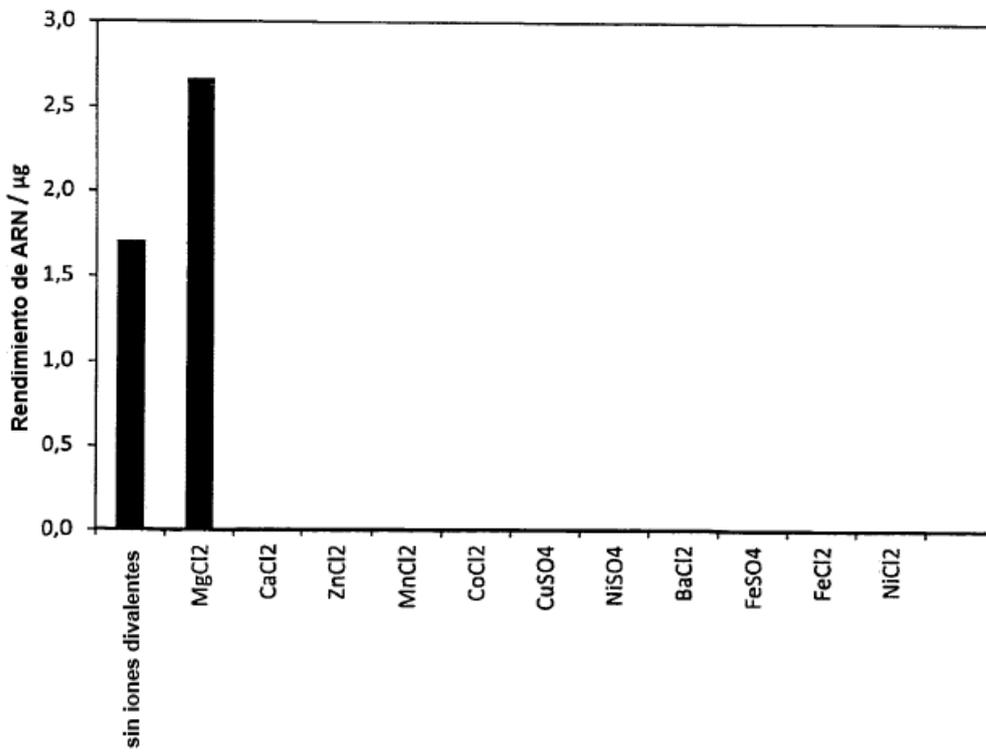


Fig. 12

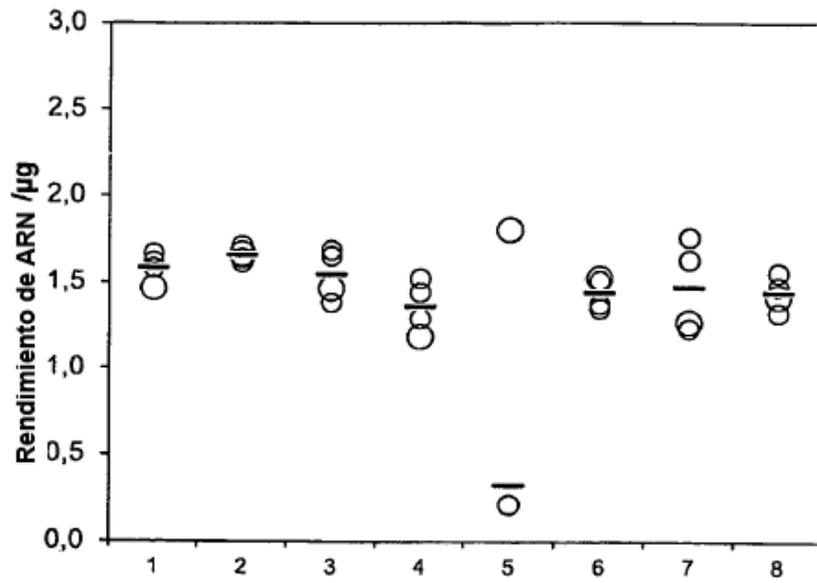


Fig. 13

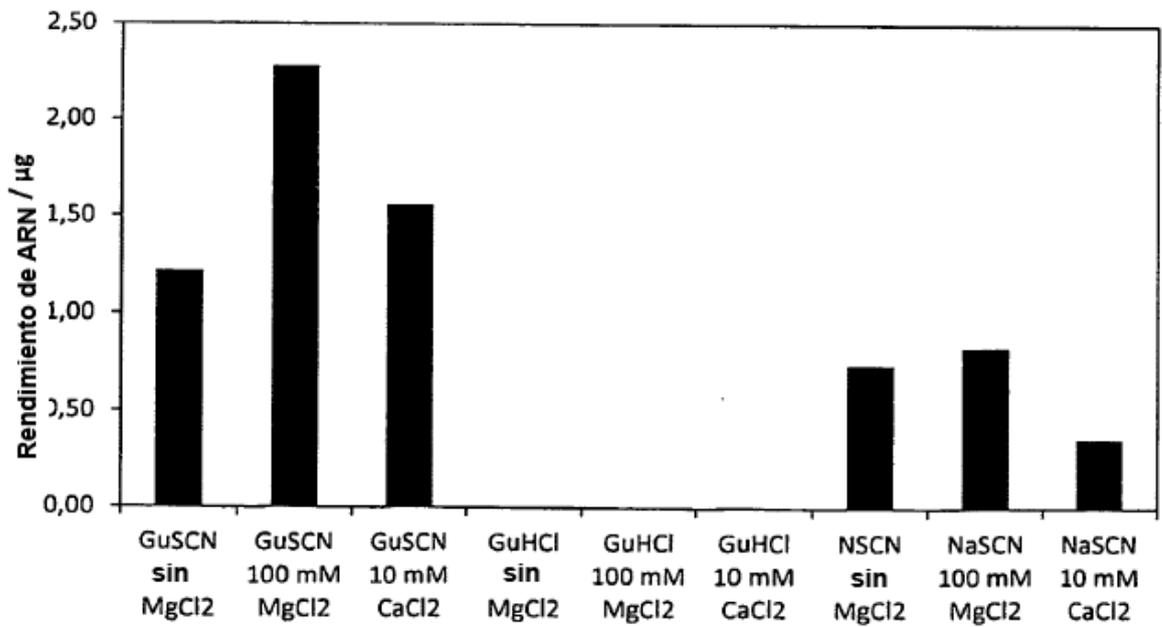


Fig. 14