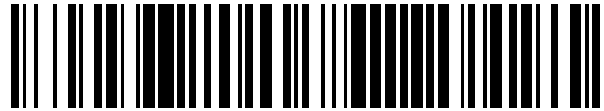


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 117**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2011 E 11752549 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2614147**

54 Título: **Método de aislamiento de ARN purificado con contaminación reducida de ADN**

30 Prioridad:

**06.09.2010 EP 10009219**

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

**10.02.2016**

73 Titular/es:

**QIAGEN GMBH (100.0%)  
Qiagen Str. 1  
40724 Hilden, DE**

72 Inventor/es:

**CHRISTOFFEL, GABRIELE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 559 117 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

Método de aislamiento de ARN purificado con contaminación reducida de ADN

5 La presente invención se refiere a un método para aislar ARN purificado a partir de muestras que comprenden ARN y ADN, donde la cantidad de contaminaciones de ADN en el ARN purificado es reducida. Además, la presente invención se refiere a composiciones y métodos útiles para dicho propósito.

10 El documento US 2005/009045 describe un método para la liberación y aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas que incluye la lisis de la muestra usando un tensioactivo catiónico y una proteasa que va seguido por la purificación de los ácidos nucleicos liberados usando procedimientos clásicos, por ejemplo, por extracción con fenol y una etapa de precipitación de los ácidos nucleicos extraídos con alcohol y una sal caotrópica.

15 El documento WO 95/28409 A1 describe métodos para el aislamiento de ARN y presenta dos métodos alternativos diferentes para efectuar la lisis celular: Según la primera alternativa, el ARN se libera mecánicamente en presencia de un tampón que contiene fenol y un TCG o cloruro de guanidinio y que tiene un pH de aproximadamente 4 a 4,5. A esta mezcla se añade un disolvente orgánico insoluble en agua para formar una mezcla de dos fases que comprende una fase acuosa con el ARN y una fase orgánica que contiene el ADN. La segunda alternativa difiere de la primera en que el ADN se libera en presencia de un detergente en lugar del tiocianato de guanidinio (TCG) o cloruro de guanidinio.

25 El aislamiento del ARN puro intacto es un paso crítico para el análisis de la expresión génica en biología molecular, aplicaciones clínicas y de biotecnología. En la técnica anterior se han desarrollado muchos métodos para lograr ese objetivo. Los métodos más utilizados para el aislamiento del ARN se basan en la extracción con fenol, precipitación mediante el uso de soluciones de sal caotrópica y la adsorción en sílice. Los métodos basados en fenol-cloroformo que utilizan sales caotrópicas se describen por ejemplo en el documento US 4.843.155 y US 2008/057560. Los métodos respectivos permiten el aislamiento del ARN puro o el aislamiento de ARN, ADN y opcionalmente proteínas de la misma muestra. El principal de los métodos respectivos es homogeneizar la muestra en una composición desnaturalizante que comprende fenol y un agente caotrópico. El homogeneizado se somete a separación de fases mediante la adición de un disolvente orgánico insoluble en agua tal como cloroformo. Después de la centrifugación, la mezcla se separa en una fase acuosa que contiene ARN y una interfase y la fase orgánica que contiene el ADN y las proteínas. Para el aislamiento del ARN, se recoge la fase acuosa y el ARN se aísla de la misma, por ejemplo, por precipitación del ARN mediante la adición de un alcohol a dicha fase acuosa.

35 Los respectivos métodos proporcionan ARN no degradado sustancialmente puro. Sin embargo, el ARN aislado de acuerdo con el método respectivo, basado en fenol-cloroformo, contiene cantidades residuales de ADN que pueden detectarse, por ejemplo, mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Estas contaminaciones de ADN residual pueden perturbar la aplicación posterior del ARN purificado. Esto constituye un problema, debido a que el ADN contaminante sirve como molde para la ADN polimerasa, lo que potencialmente podría dar productos de amplificación adicional, distorsionando así el rendimiento de una RT-PCR dependiente de ARN. Por lo tanto, el ARN aislado usando los métodos respectivos debe ser purificado para dar el ARN purificado libre de ADN.

45 Por lo tanto, ha habido intentos en la técnica anterior para mejorar la calidad del ARN aislado mediante la reducción de la cantidad de contaminaciones de DNA en el ARN purificado. Una práctica común para la eliminación de la contaminación de ADN es tratar la muestra que contiene ARN con una ADNasa. Sin embargo, la realización del respectivo tratamiento con ADNasa tiene inconvenientes, ya que aumenta los costes y etapas de manipulación y la ADNasa puede comprender trazas de ARNasa, exponiendo así el ARN al riesgo de degradación. Otros intentos de reducir las contaminaciones de ADN incluyen una etapa de precipitación adicional de ADN de la fase acuosa. Enfoques mejorados han utilizado adicionalmente una fase sólida que une ácido nucleico y condiciones de unión adecuadas para la unión del ADN a dicha fase sólida, con el fin de eliminar las contaminaciones de ADN a partir de la fase acuosa que contiene ARN. Sin embargo, los métodos respectivos también tienen inconvenientes, ya que aumentan los costos debido a la necesidad de usar una fase sólida que une ácido nucleico adicional y las medidas de manipulación adicionales. Otro enfoque para reducir las contaminaciones de ADN se basa en la reducción del valor de pH hasta un valor inferior a 4 durante la extracción con fenol (consulte por ejemplo, el documento US 2008/0057560). Sin embargo, también este método no da lugar a una reducción satisfactoria de las contaminaciones de DNA en el ARN aislado.

60 Por lo tanto es entre otros un objetivo de la presente invención proporcionar un método para aislar ARN a partir de una muestra que comprende ARN, ADN y opcionalmente proteínas, que consiga ARN puro y reduzca la cantidad de contaminaciones de DNA en el ARN aislado.

65 Además, es un objetivo de la presente invención reducir la cantidad de ADN en una fase acuosa que contiene ARN que se obtuvo en particular durante una extracción con fenol/cloroformo o durante un método de producción de fase similar.

## Sumario de la invención

La presente invención se basa en el hallazgo de que la adición de al menos un detergente catiónico a una muestra que se trata mediante la adición de una composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol disminuye considerablemente la cantidad de ADN en el ARN aislado. La adición de dicho detergente catiónico tiene sorprendentemente el efecto de que considerablemente menos ADN permanece en la fase acuosa que contiene ARN que se obtiene cuando se añade un disolvente orgánico insoluble en agua tal como, por ejemplo cloroformo. Sin pretender imponer ninguna teoría, se supone que la adición del detergente catiónico tiene el efecto de que se elimina más ADN de la fase acuosa que contiene ARN y, por lo tanto, se dirige a la interfase y/o la fase orgánica formada durante la separación de fases. Por lo tanto, mediante la adición del detergente catiónico, el ADN se elimina de manera eficiente a partir de la fase acuosa que contiene el ARN y se concentra en la interfase y/o la fase orgánica resultante. Esto reduce considerablemente la cantidad de contaminaciones de DNA en el ARN que posteriormente se aísla de dicha fase acuosa. Por lo tanto, la presente invención proporciona considerables ventajas sobre la técnica anterior y hace que los tratamientos adicionales de la fase acuosa que contiene ARN para la eliminación de contaminaciones de ADN, tales como por ejemplo los tratamientos con ADNasa o la eliminación de la contaminaciones de ADN mediante el uso de fases específicas que unen ácidos nucleicos o purificación adicional sean obsoletos.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de aislamiento de al menos ARN de una muestra que comprende ARN y ADN, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- a) añadir a la muestra una composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol y efectuar la lisis y/u homogeneizar la muestra;
- b) añadir un disolvente orgánico insoluble en agua y separar las fases resultantes, formando de este modo una mezcla de múltiples fases que comprende una fase acuosa, opcionalmente una interfase y una fase orgánica, en el que el ARN se concentra en dicha fase acuosa y el ADN se concentra en dicha fase orgánica y/o en dicha interfase; y
- c) aislar dicho ARN a partir de dicha fase acuosa,

en el que al menos un detergente catiónico se añade antes de la separación final de las fases.

Como se ha descrito antes, la adición de al menos un detergente catiónico antes de separar las fases individuales tiene el efecto de que las contaminaciones de ADN se reducen considerablemente en la fase acuosa que contiene ARN, si se usa para la preparación de la muestra una composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol.

De acuerdo con un segundo aspecto, se proporciona un kit para uso en un método de acuerdo con la presente invención, que comprende

- a) una composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol;
- b) una solución para la reducción de las contaminaciones de ADN que comprende al menos un detergente catiónico;
- c) opcionalmente una fase sólida que une ácido nucleico y
- d) opcionalmente tampones de lavado y elución.

De acuerdo con un tercer aspecto, se proporciona un método para reducir la cantidad de ADN en una fase acuosa que contiene ARN formada en un método de aislamiento de ARN que implica el uso de una composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol, en el que al menos se añade un detergente catiónico a una muestra homogeneizada en dicha composición de desnaturalización ácida antes de que las fases obtenidas por la adición de un disolvente orgánico insoluble en agua se separen en una fase acuosa, opcionalmente una interfase y una fase orgánica.

De acuerdo con un cuarto aspecto, la presente invención se refiere al uso de al menos un detergente catiónico para reducir la cantidad de ADN en un fase acuosa que contiene ARN que se obtiene

- homogeneizando una muestra en una composición acuosa de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol;
- añadiendo un disolvente orgánico insoluble en agua y
- separando la mezcla en una fase acuosa, opcionalmente una interfase y una fase orgánica,

en el que el detergente catiónico se añade antes de la separación final de las fases.

De acuerdo con un cuarto aspecto, la presente invención se refiere al uso de al menos un detergente catiónico para aumentar la cantidad de ADN en una interfase y/o una fase orgánica opcional reduciendo la cantidad de ADN en una

fase acuosa que contiene ARN que se obtiene

- homogeneizando una muestra en una composición acuosa de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol;
- 5 – añadiendo un disolvente orgánico insoluble en agua y
- separando la mezcla en una fase acuosa, opcionalmente una interfase y una fase orgánica,

en el que el detergente catiónico se añade antes de la separación final de las fases.

10 Como se ha descrito anteriormente, la adición del detergente catiónico antes de separar las fases reduce considerablemente la cantidad de ADN en la fase acuosa que contiene ARN cuando la muestra se prepara en una composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol. Esto permite, por ejemplo, el aislamiento de ARN puro que comprende menos contaminaciones de ADN.

15 Otros objetos, rasgos, ventajas y aspectos de la presente solicitud se harán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse, sin embargo, que la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la solicitud, se dan a modo de ilustración solamente. Diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención divulgada serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica a partir de la lectura de lo siguiente.

### Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se refiere a un método de aislamiento de ARN que se basa en el uso de fenol, un agente caotrópico y un disolvente orgánico insoluble en agua tal como por ejemplo cloroformo. En los métodos respectivos, se forma una mezcla de múltiples fases, que comprende una fase acuosa que contiene ARN, opcionalmente una interfase y una fase orgánica. El ADN y las proteínas (si están comprendidas en la muestra) están comprendidos en la interfase y/o la fase orgánica. La presente invención se basa en el hallazgo de que la cantidad de ADN se puede reducir considerablemente en la fase acuosa que contiene ARN, si al menos un detergente catiónico se añade antes de la separación final de las fases. La adición de al menos un detergente catiónico tiene el efecto de que más ADN se elimina de la fase acuosa que contiene ARN y, en consecuencia, se concentra en la interfase y/o la fase orgánica. Ya que el ADN se extrae de manera más efectiva de la fase acuosa que contiene ARN, el ARN aislado a partir de una fase acuosa respectivamente empobrecida en ADN comprende menos cantidades de ADN y, por lo tanto, menos contaminación de ADN. Por lo tanto, la presente invención proporciona una solución al problema de la contaminación de ADN residual en el ARN purificado que es eficaz, simple y no pone en peligro la calidad del ARN. Más bien, la calidad del ARN es a menudo incluso mejor respecto a los métodos en los que no se añade ningún detergente catiónico. Además, el método de acuerdo con la presente invención es muy rentable, porque no hay necesidad de usar materiales adicionales, tales como fases sólidas o enzimas, tales como por ejemplo, columnas de unión a ADN o ADNasa. Por lo tanto, la presente invención tiene ventajas considerables.

40 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método de aislamiento de al menos ARN de una muestra que comprende ARN y ADN, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

45 a) añadir a la muestra una composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol y efectuar la lisis y/u homogeneizar la muestra;

50 b) añadir un disolvente orgánico insoluble en agua y separar las fases resultantes, formando de este modo una mezcla de múltiples fases que comprende una fase acuosa, opcionalmente una interfase y una fase orgánica, en el que el ARN se concentra en dicha fase acuosa y el ADN se concentra en dicha fase orgánica y/o en dicha interfase; y

c) aislar dicho ARN a partir de dicha fase acuosa,

en el que al menos un detergente catiónico se añade antes de la separación final de las fases.

55 Las etapas a) a c) son etapas que también se realizan en los métodos conocidos en la técnica anterior para el aislamiento de ARN. En la etapa a) la muestra se procesa, por lo general se lisa y/o homogeneiza, en una composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol. La mezcla resultante se separa en una fase orgánica, por lo general, una interfase (dependiendo de la muestra) y una fase acuosa mediante la adición en la etapa b) de un disolvente orgánico insoluble en agua tal como cloroformo. La formación de dichas fases puede ser promovida por centrifugación. En la etapa c), el ARN se aísla de la fase acuosa. La mejora de la presente invención reside en que se añade al menos un detergente catiónico a la mezcla antes de la separación final de las fases. Sorprendentemente, se encontró que la adición de dicho detergente catiónico reduce considerablemente la cantidad de ADN en la fase acuosa que contiene ARN, si para preparar la muestra se usa una composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol. Esta combinación de reactivos utilizados en el método de acuerdo con la presente invención (en particular, el agente caotrópico, fenol, el

detergente catiónico y el disolvente orgánico insoluble en agua) es importante para conseguir las ventajas de la presente invención. Por ejemplo, las ventajas no se logran cuando se añade el agente caotrópico o el detergente catiónico solos. Por lo tanto, es decisiva la combinación precisa como se describe en la presente memoria. Las ventajas obtenidas con la combinación específica de las etapas, como se enseña en la presente invención, se pone de manifiesto en los ejemplos proporcionados en este documento.

De acuerdo con una realización, se usa al menos un detergente catiónico que tiene la siguiente fórmula:



en la que

Y es nitrógeno o fósforo;

R1, R2, R3 y R4 se seleccionan independientemente de un resto alquilo C1-C20 ramificado o no ramificado, un residuo alquileo C3 a C6, un residuo alquinilo C3 a C6 y/o un residuo aralquilo C6-C26 y en el que preferiblemente al menos uno de R1, R2, R3 o R4 es un residuo alquilo C6 a C20 e incluso más preferido es al menos un residuo alquilo C10;

X - es el anión de un ácido inorgánico u orgánico monobásico o polibásico.

Como ejemplos de detergentes catiónicos se incluyen, pero sin limitación, sales de amonio cuaternario, aminas con enlace amida, polioxietileno alquil aminas y aminas alicíclicas, etilendiaminas sustituidas con N,N,N',N'-tetrakis, 2-alquil-1-hidroxietil-2-imidazolin aminas etoxiladas y sales de alquil amonio.

De acuerdo con una realización, se usa un detergente catiónico, que comprende un catión de amonio cuaternario cargado de forma permanente como grupo de cabeza polar. Preferiblemente, el detergente catiónico es una sal de alquiltrimetilamonio. Preferiblemente, el detergente catiónico comprende bromuro de amonio o cloruro de amonio. Lo más preferiblemente, el detergente catiónico se selecciona entre el grupo que consiste en bromuro de cetil trimetil de amonio (CTAB), bromuro de tetra decil trimetil amonio bromuro (TTAB) y bromuro de dodecil trimetil amonio (DTRB) o los compuestos correspondientes que comprenden un cloruro en lugar del bromuro.

Otros detergentes catiónicos incluyen, pero no se limitan a cloruro de didecildimetilamonio, cloruro de benzalconio, bromuro de n-dodecil trimetil amonio (DTAB), bromuro de trimetil-tetradecilamonio, N,N'-dimetildodecilamina-N-óxido diclorhidrato de ctenidina; alquiltrimetilamonio, sales de bromuro de hexadecil trimetil amonio, cloruro de cetilpiridinio (CPC), amina de sebo polietoxilada (POEA), cloruro de benzalconio (BAC), cloruro de bencetonio (BZT), 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano, cloruro de dimetildiodecildimetilamonio, bromuro de dioctadecildimetilamonio (DODAB), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB), cloruro de cetilpiridinio, bromuro de dimetil dioctadecil amonio, cloruro de coco alquilo dimetil bencil amonio, cloruro de alquil hidroxietil dimetil amonio, esterquat de trietanolamina y ácido dioleico, cloruro de diestearil dimetil amonio, esterquat de trietanolamina y ácido disebácico, esterquat de trietanolamina.

De acuerdo con una realización, se añade el al menos un detergente catiónico en una concentración que da lugar a una concentración de detergente catiónico en la muestra homogeneizada de la etapa a) y/o en la mezcla obtenida después de la adición del disolvente orgánico insoluble en agua en la etapa b), que se selecciona del grupo que consiste del 0,01 % al 10 %, del 0,03 % al 7,5 %, del 0,03 % al 5 %, del 0,04 % al 2,5 %, del 0,04 % al 2 % y del 0,03 % al 1,7 % basado en el volumen total. Preferiblemente, el detergente catiónico o la mezcla de detergentes catiónicos están comprendidos en una concentración seleccionada del grupo que consiste en al menos el 0,03 %, al menos el 0,04 %, al menos el 0,05 %, al menos el 0,06 %, al menos el 0,08 %, al menos el 0,09 %, al menos el 0,1 % y al menos el 0,15 %. Como se ha descrito anteriormente, se pueden usar también mezclas de detergentes catiónicos, preferiblemente CTAB mezclado con TTAB.

De acuerdo con una realización preferida, se añade el al menos un detergente catiónico en forma de una solución. En dicha solución, el detergente catiónico está preferiblemente comprendido en una concentración seleccionada del grupo que consiste del 0,1 % al 20 %, del 0,5 % al 10 %, del 0,1 % al 5 %, del 0,5 % al 5 %, del 0,1 % al 3 %, del 0,5 % al 3 %, y lo más preferiblemente en una concentración del 0,1 % al 1 % y del 0,5 % al 1 %, basado en el volumen total de la solución. Lo mismo se aplica en caso de que se utilice una mezcla de detergentes catiónicos.

Dicha solución que comprende el al menos un detergente catiónico puede comprender ingredientes adicionales, tales como por ejemplo, sales. La sal que está preferiblemente comprendida en dicha solución se puede seleccionar del grupo que consiste en sales de metal alcalino, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de litio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, acetato de sodio, nitrato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de litio, sulfato de potasio y mezclas de los mismos. La adición de una sal respectiva, en particular, tiene la ventaja de que el detergente catiónico permanece en solución. Preferiblemente, dicha sal está comprendida en la solución en una concentración seleccionada del grupo que consiste de 0-10 M, preferiblemente de 0,5 a 5 M, más preferido de 0,5 a 1,5 M.

Existen varias opciones a la hora de añadir el detergente catiónico antes de la separación de las fases. De acuerdo con una realización, el detergente catiónico se añade durante la etapa a) ya sea antes, durante o después de añadir a la muestra, respectivamente, la composición de desnaturalización ácida. El detergente catiónico también puede

estar comprendido en la composición de desnaturalización ácida. Además, el detergente catiónico se puede añadir junto con, respectivamente, al mismo tiempo cuando se añade el disolvente orgánico insoluble en agua en la etapa b). Sin embargo, es importante que el detergente catiónico se añada antes de llevar a cabo la separación fase final de las fases con el fin de permitir que el detergente catiónico ejerza sus efectos beneficiosos con respecto a la reducción de la cantidad de ADN en la fase acuosa que contiene ARN. Dado que la separación de fases final es decisiva, también está dentro del alcance de la presente invención llevar a cabo una separación de fases inicial, a continuación, añadir el detergente catiónico a la fase acuosa y, finalmente, separar las fases, por ejemplo, con la ayuda de la centrifugación, con el fin de permitir que el detergente catiónico y el ADN residual se elimine de la fase acuosa en la fase orgánica y/o la interfase. Sin embargo, en particular, para ahorrar etapas de manipulación se prefiere que el agente catiónico se añada antes o al mismo tiempo que se añade el disolvente orgánico insoluble en agua. De acuerdo con una realización preferida, el detergente catiónico se añade por separado y, por lo tanto, después de mezclar la muestra con la composición de desnaturalización ácida y antes de añadir el disolvente orgánico insoluble en agua. Como se muestra en los ejemplos, se consiguen particularmente buenos resultados cuando se añade el al menos un detergente catiónico después de la etapa a) y antes de la etapa b).

La separación de fases se puede lograr por sedimentación. De acuerdo con una realización, la mezcla multi-fase se forma mediante la centrifugación de la muestra. Aquí, se prefiere centrifugar la muestra a temperaturas más bajas y, por lo tanto, a temperaturas por debajo de la temperatura ambiente. Preferiblemente, la temperatura es  $\leq 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\leq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$  y particularmente preferidas son temperaturas aún más bajas tales como  $\leq 7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\leq 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $\leq 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se encontró, que la centrifugación a una temperatura más baja promueve la separación de fases y, además, promueve la reducción de ADN en la fase acuosa que contiene ARN cuando se usa un detergente catiónico.

Para aislar el ARN a partir de dicha fase acuosa, se puede usar básicamente cualquier método conocido en la técnica anterior para el aislamiento de ARN a partir de una solución acuosa. Preferiblemente, el ARN se aísla mediante la adición de al menos un alcohol a dicha fase acuosa, precipitando de ese modo el ARN. De acuerdo con una realización, el ARN respectivamente precipitado se puede recuperar por centrifugación de la fase acuosa y decantando el líquido sobrenadante.

Preferiblemente, la fase acuosa se mezcla con al menos un alcohol y a continuación dicha mezcla se pone en contacto con una fase sólida que une ácido nucleico con el fin de ayudar a la purificación de ácidos nucleicos.

Como fase sólida que une ácido nucleico, se puede usar cualquier material que sea capaz de unir ácidos nucleicos y así incluye varios materiales que son capaces de unir ácidos nucleicos en condiciones adecuadas. Fases sólidas ilustrativas que se pueden utilizar junto con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, compuestos que comprenden sílice y fases sólidas silíceas, incluyendo, pero sin limitarse a, partículas de sílice, dióxido de silicio, tierra de diatomeas, vidrio, alquil-sílice, silicato de aluminio y borosilicato; nitrocelulosa; papel diazotizado; hidroxiapatita (también conocida como hidroxilo apatita); nylon; óxidos metálicos; zirconia; alúmina; soportes poliméricos, soportes de dietilaminoetil y trietilaminoetil derivatizados, resinas de cromatografía hidrófobas (tales como fenilo u octil Sepharose) y similares. El término fase sólida no pretende implicar ninguna limitación en cuanto a su forma o diseño. Por lo tanto, el término fase sólida abarca materiales apropiados que son porosos o no porosos; permeables o impermeables; incluyendo, pero sin limitarse a, membranas, filtros, láminas, partículas, partículas magnéticas, perlas, geles, polvos, fibras, y similares. De acuerdo con una realización, la superficie de la fase sólida no está modificada y está, por ejemplo, modificada con grupos funcionales. Preferiblemente, se usa una membrana que une ácido nucleico. Las membranas adecuadas incluyen, pero no se limitan a membranas hidrófilas, membranas hidrófobas y membranas que unen ácidos nucleicos a través de intercambio iónico. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, membranas de sílice y otras membranas que comprenden sílice, membranas de nylon, membranas de celulosa tales como membranas de nitrocelulosa. Preferiblemente, la membrana es porosa. Además, se prefiere utilizar una membrana que comprende o que consiste en sílice.

Como alcohol, se prefiere usar alcoholes de cadena corta ramificados o no ramificados con preferiblemente de uno a 5 átomos de carbono. Ejemplos son metanol, etanol, propanol, isopropanol y butanol. También se pueden utilizar mezclas de alcoholes. El alcohol se selecciona preferiblemente de isopropanol y etanol porque dichos alcoholes son, en particular, eficaces para precipitar el ARN.

La concentración de alcohol usada para aislar el ARN depende de si está destinada a incluir pequeños ARN en el ARN total aislado o no. En caso de que se pretenda purificar también ARN pequeños tales como miARN, se recomienda utilizar concentraciones superiores de alcohol. En caso de que no se desee incluir las respectivas especies pequeñas de ARN en el ARN total aislado, se prefieren concentraciones de alcohol menores. La concentración de alcohol cuando se mezcla con la fase acuosa puede estar en un intervalo del 10 % v/v al 90 % v/v en la mezcla resultante. Para el aislamiento del ARN total, incluyendo el ARN pequeño, es beneficioso usar una concentración de alcohol  $\geq 40\text{ } \%$  v/v, preferiblemente  $\geq 50\text{ } \%$  v/v. En caso de que no se desee incluir ARN pequeños, la concentración de alcohol es preferiblemente  $\leq 40\text{ } \%$  v/v. Por lo tanto, la concentración puede ser seleccionada del grupo que consiste en al menos el 20 %, al menos el 30 % v/v, al menos el 40 % v/v, al menos el 50 % v/v y al menos el 60 % v/v cuando se mezclan con la fase acuosa. Preferiblemente, la concentración de alcohol se encuentra en un intervalo del 20 % v/v al 90 % v/v o del 30 % v/v al 85 %, preferiblemente en el intervalo del 30 % v/v al 70 % v/v cuando se mezcla con la fase acuosa.

El término "muestra" se utiliza en la presente memoria en un sentido amplio y se pretende que incluya varias fuentes que contienen ácidos nucleicos. La muestra puede ser una muestra biológica pero el término también incluye otras, por ejemplo, muestras artificiales que comprenden ácidos nucleicos. Ejemplos de muestras incluyen, pero no se limitan a, sangre entera; hemoderivados; glóbulos rojos; glóbulos blancos; capa leucocitaria; frotis, incluyendo, pero sin limitarse a, frotis bucales, frotis faríngeos, frotis vaginales, frotis uretrales, frotis cervicales, frotis rectales, frotis de lesión, frotis de absceso, frotis nasofaríngeos y similares; orina; esputo; saliva; semen; líquido linfático; fluido amniótico; líquido cefalorraquídeo; derrames peritoneales; derrames pleurales; líquido de quistes; líquido sinovial; humor vítreo; humor acuoso; líquido de la bursa; lavados oculares; aspirados oftálmicos; plasma; suero; lavado pulmonar; aspirados pulmonares; tejidos, incluyendo, pero sin limitarse a, hígado, bazo, riñón, pulmón, intestino, cerebro, corazón, músculo, páncreas; cultivos celulares, así como lisados, extractos, o materiales obtenidos a partir de las muestras descritas anteriormente o cualquier célula y microorganismos y virus que pueden estar presentes en una muestra y similares. Los materiales obtenidos de entornos clínicos o forenses que contienen ácidos nucleicos también están dentro del sentido previsto del término "muestra". Además, el experto en la técnica apreciará que también están dentro del alcance del término "muestra" los lisados, extractos, o materiales procesados o porciones obtenidas a partir de cualquiera de las muestras ilustrativas anteriores. Preferiblemente, la muestra es una muestra biológica derivada de un ser humano, animal, planta, bacteria u hongo. Preferiblemente, la muestra se selecciona del grupo que consiste en células, tejidos, bacterias, virus y fluidos corporales, como por ejemplo sangre, hemoderivados, tales como capa leucocitaria, plasma y suero, orina, licor, esputo, heces, LCR y esperma, frotis epiteliales, biopsias, muestras de médula ósea y muestras de tejidos, preferiblemente muestras de tejidos de órganos, preferiblemente de órganos como el pulmón, el riñón o el hígado. El método de acuerdo con la presente invención es particularmente adecuado para el aislamiento de ARN a partir de muestras de tejido, en particular, de muestras de tejidos de órganos. De acuerdo con una realización, el tejido no es sangre. De acuerdo con una realización, la muestra no es una muestra bacteriana ni una muestra derivada de bacterias.

Los términos "ácido nucleico pequeño" y "ácidos nucleicos pequeños", en particular, se refieren a los ácidos nucleicos que tienen una longitud de menos de 1.000 nt, 500 nt, 400 nt, 300nt, 100 nt o menos de 70nt e incluyen, pero no se limitan a, miARN, siARN y otros ácidos nucleicos de interferencia cortos, snoARN, snARN, ARNt, hnARN, ácidos nucleicos circulantes, fragmentos de ADN genómico o ARN, ácidos nucleicos degradados, ribozimas, ARN o ADN viral, ácidos nucleicos de origen infeccioso, productos de amplificación, ácidos nucleicos modificados, ácidos nucleicos plasmídicos u organelares, ácidos nucleicos artificiales tales como oligonucleótidos.

La composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y el fenol puede tener una composición como se describe en la técnica anterior, por ejemplo, en el documento US 4.843.155 o el documento US 5.346.994.

Se puede usar cualquier agente caotrópico en la composición de desnaturalización ácida que causa la alteración en una proteína o ácido nucleico mediante, por ejemplo, pero sin limitarse a, la alteración de la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de una proteína o un ácido nucleico, dejando la estructura primaria intacta. Preferiblemente, el agente caotrópico se selecciona del grupo que consiste en clorhidrato de guanidinio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio, tiocianato de sodio, yoduro de sodio, perclorato de sodio, tricloroacetato de sodio, trifluoroacetato de sodio y urea. Preferiblemente, se usa una sal caotrópica. En particular, se puede utilizar como agente caotrópico el clorhidrato de guanidinio y/o el tiocianato de guanidinio.

El agente caotrópico puede estar comprendido en la composición de desnaturalización ácida en una concentración seleccionada del grupo que consiste en 0,1 hasta el límite de saturación, de 0,1 a 6 M, de 0,5 a 4 M, de 0,5 a 3 M y de 0,5 a 2M.

El fenol está preferiblemente comprendido en la composición de desnaturalización ácida en una concentración seleccionada del grupo que consiste en del 10 % v/v al 70 % v/v, del 20 % v/v al 60 % v/v y del 30 % v/v al 50 % v/v basado en el volumen total de la composición de desnaturalización ácida. Preferiblemente, la concentración de fenol se encuentra en el intervalo del 35 % v/v al 40 % v/v.

El valor pH de la composición de desnaturalización es ácido y puede ser  $\leq 6$ , preferiblemente  $\leq 5$ . Preferiblemente, el valor pH de la composición de desnaturalización ácida se encuentra en el intervalo de 3 a 6, y más preferido, en un intervalo de 4 a 5.

Además, la composición de desnaturalización ácida puede comprender un tampón en una cantidad suficiente para mantener dicha composición a un pH ácido. Dicho tampón puede ser una sal de al menos uno de acetato, citrato, fosfato, ftalato, tartrato o lactato y puede ser, por ejemplo, seleccionado de fosfato de sodio, acetato de sodio y citrato de sodio. Preferiblemente, se usa acetato de sodio.

La composición de desnaturalización ácida puede comprender un solubilizante para mantener el fenol en solución, sobre todo a 4 °C, y para lograr o mantener el disolvente como una solución monofásica. Un solubilizante adecuado es glicerol. De acuerdo con una realización, el solubilizante está comprendido en una concentración de aproximadamente 2 a 10 %, preferiblemente de aproximadamente 5 %.

Además, la composición de desnaturalización ácida puede comprender un componente tiocianato, preferiblemente tiocianato de amonio o tiocianato de sodio. Se cree que este componente tiocianato adicional mejora la extracción de ARN a partir de la muestra biológica. El componente tiocianato puede estar comprendido en una concentración de 0,1 a 1 M, preferiblemente 0,4 M.

5

De acuerdo con una realización, la composición de desnaturalización ácida tiene las siguientes características:

- comprende fenol en una concentración superior al 30 %, preferiblemente superior al 35 % y lo más preferido entre el 35 % y el 40 %;
- tiene un pH de 4,3 a 6, preferiblemente de 4,5 a 5;
- comprende una sal caotrópica en una concentración de 0,5 a 4 M, preferiblemente de 0,5 a 3 M; y
- comprende preferiblemente al menos un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en un tampón, un solubilizante y un compuesto tiocianato; ejemplos y concentraciones preferidas se han descrito anteriormente.

10

15

Preferiblemente, la composición de desnaturalización ácida combina todas las características preferidas descritas anteriormente.

20

Disolventes orgánicos insolubles en agua adecuados incluyen, pero no se limitan a, caprolactona, etilenglicol diacetato, polietilenglicol dibenzoato, cloroformo, tetracloruro de carbono, bromocloropropano, bromonaftaleno, bromoanisol, bromuro de ciclohexilo, dibromopropano, ácido diclorobenzoico o mezclas de los mismos. Preferiblemente, el disolvente orgánico insoluble en agua es cloroformo.

25

El método de acuerdo con la presente invención también puede comprender uno o más etapas adicionales. Posteriormente se describen algunas opciones no limitantes.

30

Si se desea, las proteínas (si están contenidas en la muestra) y/o el ADN pueden recuperarse también de la fase orgánica y/o la interfase con el método de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, las proteínas se pueden precipitar mediante la adición de un alcohol inferior a la fase orgánica y recuperando las proteínas por sedimentación. El ADN puede ser recuperado de la interfase y/o la fase orgánica, por ejemplo, por lavado con una cantidad predeterminada de la solución de disolvente, la sedimentación del ADN y la eliminación de cualquier contaminación de fenol y sal del ADN. Los métodos adecuados para el aislamiento de ADN y/o proteínas de la interfase y/o la fase orgánica se conocen en la técnica anterior y, por tanto, no necesitan ninguna descripción adicional aquí. La realización de los métodos de acuerdo con la presente invención también tiene con respecto al aislamiento de ADN el efecto ventajoso de que el rendimiento de ADN se incrementa porque el ADN se elimina de manera más eficiente de la fase acuosa y por lo tanto se concentra en la interfase y/o la fase orgánica, de donde se puede aislar el ADN.

35

40

Además, pueden llevarse a cabo una o más etapas de lavado cuando se aísla el ARN de la fase acuosa. Preferiblemente, dichas etapas de lavado se llevan a cabo mientras el ARN se une a la fase sólida que une ácido nucleico en caso de que se utilice una fase sólida. Para ello se pueden utilizar soluciones de lavado comunes. Se recomienda utilizar soluciones de lavado que no conducen a una liberación del ARN de la fase sólida de unión a ácidos nucleicos. Además, el sedimento que contiene ARN se puede lavar en el caso de que no se utilice ninguna fase de unión. De acuerdo con una realización, la solución utilizada para el lavado comprende al menos un agente caotrópico, al menos un alcohol, al menos un detergente y/o al menos un componente de tamponamiento. Los agentes caotrópicos que se pueden utilizar en las soluciones de lavado incluyen, pero no se limitan a, clorhidrato de guanidinio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio y yoduro de sodio. Además, se pueden usar sales caotrópicas que comprenden un anión caotrópico seleccionado del grupo que consiste en tricloroacetato, perclorato y trifluoroacetato. Ejemplos de las respectivas sales caotrópicas son sales alcalinas como perclorato de sodio, tricloroacetato de sodio y trifluoroacetato de sodio. Como alcohol para el lavado, se pueden usar alcoholes de cadena corta ramificada o no ramificada con preferiblemente de uno a 5 átomos de carbono para el lavado, respectivamente, en la solución de lavado. Ejemplos son metanol, etanol, propanol, isopropanol y butanol. Preferiblemente, se utilizan isopropanol y/o etanol. Preferiblemente, la solución de lavado comprende al menos alcohol 10 % y al menos sal caotrópica 900 mM, preferiblemente al menos sal caotrópica 2 M. Además, la solución de lavado puede comprender un detergente.

50

55

También se proporciona un kit adecuado para su uso en el método de acuerdo con la presente invención. Dicho kit comprende

- a) una composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol;
- b) una solución para la reducción de ADN en la fase acuosa que comprende al menos un detergente catiónico y preferiblemente una sal;
- c) opcionalmente una fase sólida que une ácido nucleico y
- d) opcionalmente tampones de lavado y elución.

60

65

La composición de desnaturalización ácida preferiblemente tiene las características descritas anteriormente. Se remite a la divulgación anterior. Además, la solución para reducir ADN tiene también preferiblemente las



características descritas anteriormente. Se remite de nuevo a la divulgación anterior.

5 De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método para reducir la cantidad de ADN en una fase acuosa que contiene ARN formada en un método de aislamiento de ARN que implica el uso de una composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol, en el que al menos un detergente catiónico se añade a una muestra homogeneizada en dicha composición de desnaturalización ácida antes de que las fases obtenidas por la adición de un disolvente orgánico insoluble en agua se separen en una fase acuosa, opcionalmente una interfase y una fase orgánica.

10 La presente invención también se refiere al uso de al menos un detergente iónico para reducir la cantidad de ADN en una fase acuosa que contiene ARN obtenida

- homogeneizando una muestra en una composición acuosa de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol;
- 15 – añadiendo un disolvente orgánico insoluble en agua y
- separando la mezcla en una fase acuosa, opcionalmente una interfase y una fase orgánica, en el que al menos un detergente catiónico se añade antes de la separación final de las fases. Como detergente iónico, se usan detergentes aniónicos tales como SDS y preferiblemente detergentes catiónicos. Como se ha descrito anteriormente, el detergente es preferiblemente un detergente catiónico, porque un detergente catiónico
- 20 proporciona los mejores resultados con respecto a la reducción de la cantidad de ADN en una solución acuosa que contiene ARN. Más detalles con respecto a la composición de desnaturalización ácida, los detergentes y otros detalles del uso descrito se han descrito anteriormente en relación con el método de acuerdo con la presente invención. Se remite a la divulgación anterior. Preferiblemente, la composición de desnaturalización ácida combina todas las características preferidas descritas anteriormente.

25 La presente invención también se refiere al uso de al menos un detergente catiónico para aumentar la cantidad de ADN en una interfase y/o una fase orgánica reduciendo la cantidad de ADN en una fase acuosa que contiene ARN obtenida

- 30 – homogeneizando una muestra en una composición acuosa de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol;
- añadiendo un disolvente orgánico insoluble en agua y
- separando la mezcla en una fase acuosa, opcionalmente una interfase y una fase orgánica,

35 en el que al menos un detergente catiónico se añade antes de la separación final de las fases.

Los detalles con respecto a la composición de desnaturalización ácida y el detergente catiónico y las ventajas asociadas se han descrito en detalle anteriormente. Se remite a la respectiva divulgación que también se aplica aquí.

40

## Ejemplos

### Ejemplo 1:

45 El efecto de diferentes detergentes sobre la eliminación del ADN genómico durante el aislamiento de ARN a partir de hígado de rata se evaluó por el método siguiente:

1. Se homogeneizaron 270 mg de tejido hepático estabilizado con RNAlater en 27 ml de reactivo Qiazol, un fenol ácido y reactivo que contiene sal caotrópica, utilizando un homogeneizador TissueRuptor.
2. Se dividieron en alícuotas 1000 µl del homogeneizado resultante en tubos Eppendorf de 2 ml. Por lo tanto, se
- 50 utilizó 10 mg de tejido por muestra.
3. Se añadieron 8 µl (5 µg) de ADN genómico al reactivo Qiazol antes de la separación de fases.
4. En una etapa siguiente, se añadieron 100 µl de los siguientes detergentes a los homogeneizados (por duplicado):

- Tritón X-100 [100 %]
- 55 – Tween 20 [20 %]
- Bromuro de cetil-trimetil-amonio [1 %], CTAB
- Bromuro de tetra-decil-trimetil-amonio [1 %], TTAB.

Para la referencia, no se añadió detergente (“referencia”).

60 Esto fue seguido por la adición de 200 µl de cloroformo y se agitó con vórtex.

5. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 12.000xg a 4 °C y la fase acuosa resultante se transfirió a nuevos tubos Eppendorf.

6. Se añadieron 1,5 volúmenes de etanol absoluto a cada fase acuosa y se mezcló.

65 7. La mezcla se transfirió a mini columnas RNeasy (Qiagen) y se centrifugó durante 15s a 8.200xg, seguido por un lavado con 700 µl de tampón RWT (Qiagen) y posterior centrifugación, 15s en 8.200xg.

8. Las columnas se lavaron a continuación dos veces con 500 µl de tampón RPE (Qiagen), se centrifugaron a 8.200xg durante 15 segundos y 2 minutos, respectivamente, seguido de una etapa de centrifugación final a la velocidad máxima durante 1 minuto.

9. El ARN unido se eluyó en 30 µl de agua libre de ARNasa por centrifugación a 8.200xg durante 1 min y la concentración de ARN se determinó espectroscópicamente utilizando un NanoDrop (ThermoScientific). Los resultados se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Cuantificación del ARN aislado utilizando Tritón X-100, Tween 20, CTAB o TTAB como detergentes. La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó utilizando un espectrómetro NanoDrop (ThermoScientific).

detergente	A260	A280	260/280	260/230	ng/µl	Rendimiento de ARN [µg]	Media
Blanco	-0,008	-0,024	0,33	3,10	-0,32		
Tritón x-100	35.705	17.434	2,05	1,95	1428,2	42,85	37,71
Tritón x-100	27.149	13.336	2,04	1,96	1085,95	32,58	
Tween20	31.686	15.717	2,02	1,96	1267,46	38,02	36,14
Tween20	28.553	14.056	2,03	1,98	1142,1	34,26	
CTAB	26.687	13.115	2,03	1,97	1067,46	32,02	32,24
CTAB	27.039	13.182	2,05	1,97	1081,56	32,45	
TTAB	27.278	13.353	2,04	1,98	1091,11	32,73	34,49
TTAB	30.206	14.758	2,05	1,98	1208,25	36,25	
referencia	29.524	14.469	2,04	1,93	1180,97	35,43	32,23
referencia	24.184	11.942	2,03	1,82	967,37	29,02	

Como puede verse, todas las variantes de protocolo dan como resultado un buen rendimiento de ARN. Sin embargo, los métodos de espectrometría utilizados no diferencian estrictamente entre ARN y ADN y, por tanto, el ARN, así como el ADN se determina en el "rendimiento de ARN". El rendimiento de ARN puro se mejora cuando se utiliza el método de acuerdo con la presente invención en comparación con el método de referencia y los métodos que utilizan los detergentes no catiónicos Tritón y Tween, debido a que la cantidad de ADN en el ARN aislado se reducía considerablemente cuando se utiliza el método de acuerdo con la presente invención como posteriormente se demuestra por la correspondiente Tabla 3 y la Figura 1.

10. La integridad del ARN se evaluó usando un Agilent BioAnalyzer 2100® para comparar la influencia de los detergentes probados sobre la integridad del ARN. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Valores RIN (número de integridad del ARN) superiores indican un mayor grado de integridad del ARN. Los valores RIN varían entre 10 (ARN intacto) y 1 (ARN totalmente degradado).

detergente	Tritón	Tween	CTAB	TTAB	Ref.
Área de ARN	1207,1	1105	810,8	793,2	891,3
Conc. de ARN	520 ng/µl	476 ng/µl	349 ng/µl	342 ng/µl	384 ng/µl
Relación [28s/18s]	1,2	1,4	1,4	1,4	1,4
RIN	8,0	8,30	8,90	8,90	8,60

La Tabla 2 muestra que los números RIN más altos se obtienen con el método de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, la integridad del ARN del ARN aislado con el método de acuerdo con la presente invención es mejor que la integridad del ARN del ARN que se aisló utilizando el método de referencia o cuando se añadían otros detergentes no catiónicos.

11. Las muestras de ARN se diluyeron 1:50 con agua libre de ARNasa y a continuación se sometieron a transcripción inversa con 10 pmol de cebadores específicos del gen y sonda (mezcla de cebador PGK1, sonda PGK1) usando cada uno un kit QuantiTect RT-PCR (Qiagen) con y sin transcriptasa inversa en un volumen de reacción de 25 µl:

- (1) 30 min a 50 °C
- (2) 15 min a 95 °C
- (3) 15 s a 95 °C
- (4) 1 min a 60 °C, repetir los pasos (3), (4) durante 40 ciclos.

Los valores de Ct y ΔCt resultantes se muestran en la Tabla 3 y la Figura 1 a) (valores Ct) y 1b) (valores ΔCt).

**Tabla 3:** Resultados de qRT-PCR llevados a cabo utilizando el ARN aislado del ejemplo 1. "-RT" indica reacciones de control, que no contienen la transcriptasa inversa, "+ RT" indica reacciones qRT-PCR con transcriptasa inversa.

	<b>Ct - RT</b>	<b>Ct + RT</b>	<b>ΔCt</b>
<b>Tritón</b>	35,42	24,27	11,15
<b>Tween</b>	37,31	24,47	12,84
<b>CTAB</b>	39,61	24,55	15,06
<b>TTAB</b>	39,45	24,42	15,03
<b>Ref.</b>	37,29	24,36	12,93

En las reacciones "- RT", solamente las contaminaciones de ADN pueden servir como molde y, en consecuencia, se amplifican en la PCR (el ARN no se transcribe inversamente en las reacciones "- RT" y, por tanto, no puede servir como molde). Por lo tanto, en las muestras que comprenden cantidades bajas de ADN, el umbral se alcanza después de más ciclos y, en consecuencia, los valores de Ct son más altos. Por lo tanto, cuanto mayor es el valor Ct en la reacción "- RT", menor es la cantidad de molde y por lo tanto, menor es la cantidad de contaminaciones de ADN en el ARN aislado. Los mayores valores de Ct se consiguen con el método de acuerdo con la presente invención. A fin de garantizar que los valores de Ct superiores no son atribuibles a un rendimiento global inferior de ácidos nucleicos, se determinaron valores de Ct para la reacción "+ RT", en el que el ARN se transcribe de forma inversa y, en consecuencia, puede servir como molde para la PCR. Los valores de Ct son más bajos en todas las reacciones "+ RT", porque en las mismas, el ARN transcrito inversamente (y las contaminaciones de ADN) pueden servir como molde para la PCR y, por tanto, el umbral se alcanza antes que en las reacciones "- RT". Como puede verse a partir de los resultados, los valores de Ct obtenidos son aproximadamente iguales en todas las muestras analizadas.

Los valores de  $\Delta Ct$  ( $\Delta Ct = (Ct \text{ de la reacción "-RT"}) - (Ct \text{ de la reacción "+ RT"})$ ) muestran las diferencias entre las dos reacciones y, por tanto, indican la cantidad de contaminaciones de ADN en el ARN aislado. Cuanto mayor es el valor  $\Delta Ct$ , menor es la cantidad de contaminación de ADN en el ARN aislado. La Tabla 3 y la Figura 1 a) y b) demuestran, que el ARN aislado de acuerdo con la presente invención en el que se añadieron detergentes catiónicos comprende considerablemente menos cantidades de contaminaciones de ADN que el método de referencia. Por lo tanto, las contaminaciones de ADN se reducen de manera efectiva por las enseñanzas de la presente invención. Los otros detergentes, no catiónicos no fueron capaces de reducir la cantidad de contaminación de ADN. Por el contrario, incluso condujeron a un aumento del ADN en el ARN aislado, como se puede ver a partir de los valores de  $\Delta Ct$  que son incluso menores que el valor  $\Delta Ct$  del método de referencia.

### **Ejemplo 2:**

El siguiente experimento se realizó para evaluar la cantidad de ADN genómico co-purificado durante el aislamiento de ARN de diferentes tejidos usando el reactivo Qiazol al tiempo que se añade el detergente directamente al homogeneizado:

1. Se homogeneizaron 200 mg de pulmón, riñón, corazón, bazo y tejido cerebral estabilizado con RNAlater en 8 ml de reactivo Qiazol, usando un homogeneizador TissueRuptor.
2. Los homogeneizados, 1000  $\mu$ l cada uno (correspondiente a 25 mg de tejido por muestra), se dividieron en alícuotas en tubos Eppendorf de 2 ml y se añadieron a los mismos 100  $\mu$ l de las siguientes soluciones madre de detergente:

- Bromuro de cetil-trimetilamonio [1 %], CTAB
- Bromuro de tetra-deciltrimetilamonio [1 %], TTAB.

Para la referencia, no se añadió detergente ("referencia").

Esto fue seguido por la adición de 200  $\mu$ l de cloroformo y se agitó en vórtex.

3. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 12.000xg a 4 °C y la fase acuosa resultante se transfirió a nuevos tubos Eppendorf.

4. El sobrenadante se mezcló con 1,5 volúmenes de etanol absoluto y las fases acuosas se transfirieron a las mini columnas RNeasy (Qiagen) y se centrifugó durante 15s a 8.200xg, seguido de un lavado con 700  $\mu$ l de tampón RWT (Qiagen) y posterior centrifugación, 15s a 8.200xg.

5. Las columnas se lavaron a continuación dos veces con 500  $\mu$ l de tampón RPE (Qiagen), se centrifugaron a 8.200xg durante 15 segundos y 2 minutos, respectivamente, seguido de una etapa de centrifugación final a la velocidad máxima durante 1 minuto.

6. El ARN unido se eluyó en 30  $\mu$ l de agua libre de ARNasa por centrifugación a 8.200xg durante 1 min y la concentración de ARN se determinó espectroscópicamente utilizando un NanoDrop (ThermoScientific). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

55

**Tabla 4:** Cuantificación del ARN aislado de los tejidos estabilizados con RNAlater sin utilizar detergente (“-”), (“CTAB”) [1 %] o (“TTAB”) [1 %]. La cuantificación del ARN se realizó utilizando un NanoDrop (ThermoScientific).

Tejido	Detergente	A260	A280	260/280	260/230	ng/μl	Rendimiento de ARN [μg]	Media
Pulmón	-	46.489	22.449	2,07	2,14	1860,0	55,80	49,89
		36.654	17.840	2,05	2,10	1466,0	43,98	
Pulmón	CTAB	28.391	13.337	2,13	2,10	1136,0	34,08	34,22
		28.615	13.288	2,15	2,12	1145,0	34,35	
Pulmón	TTAB	32.779	15.829	2,07	2,12	1311,0	39,33	39,50
		33.057	15.950	2,07	2,12	1322,0	39,66	
Riñón	-	67.937	33.207	2,05	2,15	2717,0	81,51	80,39
		66.060	32.092	2,06	2,13	2642,0	79,26	
Riñón	CTAB	61.260	30.006	2,04	2,03	2450,0	73,50	70,53
		56.288	27.522	2,05	2,09	2252,0	67,56	
Riñón	TTAB	83.496	41.914	1,99	2,03	3340,0	100,20	94,16
		73.435	36.589	2,01	2,08	2937,0	88,11	
Corazón	-	39.950	19.412	2,06	2,16	1598,0	47,94	41,63
		29.422	14.065	2,09	2,18	1177,0	35,31	
Corazón	CTAB	23.998	11.216	2,14	2,22	959,9	28,80	28,47
		23.445	11.083	2,12	2,22	937,8	28,13	
Corazón	TTAB	30.764	14.469	2,13	2,05	1231,0	36,93	34,97
		27.505	13.121	2,10	2,15	1100,0	33,00	
Bazo	-	67.898	33.537	2,02	1,99	2716,0	81,48	80,78
		66.713	32.764	2,04	2,02	2669,0	80,07	
Bazo	CTAB	65.670	33.013	1,99	2,03	2627,0	78,81	69,66
		50.415	24.906	2,02	2,04	2017,0	60,51	
Bazo	TTAB	63.087	30.851	2,04	2,03	2523,0	75,69	72,21
		57.286	27.859	2,06	2,02	2291,0	68,73	
Cerebro	-	23.881	11.279	2,12	2,15	955,2	28,66	30,11
		26.289	12.786	2,06	2,16	1052,0	31,56	
Cerebro	CTAB	24.501	11.645	2,10	2,11	980,0	29,40	29,81
		25.168	11.965	2,10	2,03	1007,0	30,21	
Cerebro	TTAB	22.299	10.787	2,07	2,14	892,0	26,76	26,92
		22.572	10.757	2,10	2,16	902,9	27,09	

- 5 Como puede verse, el rendimiento fue bueno con todos los protocolos, pero el ARN aislado con el método de acuerdo con la presente invención comprende mucho menos ADN y, por lo tanto, el rendimiento de ARN puro incluso aumentó como también se demostró posteriormente en la Tabla 6.
7. La integridad del ARN se evaluó mediante un Agilent Bioanalyzer 2100, los resultados se muestran en la Tabla 5.

10 **Tabla 5:** Evaluación de la integridad del ARN, que se aisló en el ejemplo 2 usando un Agilent Bioanalyzer 2100.

detergente	-	CTAB	TTAB	-	CTAB	TTAB
Tejido	pulmón	pulmón	pulmón	riñón	riñón	riñón
Área de ARN	178,6	143	165,3	435,3	331,5	347,8
Conc. de ARN	93 ng/μl	74 ng/μl	86 ng/μl	226 ng/μl	172 ng/μl	180 ng/μl
Relación [28s/18s]	1,6	1,5	1,5	1,4	1,4	1,5
RIN	9,40	9,60	9,80	9,10	9,10	9,0

detergente	-	CTAB	TTAB	-	CTAB	TTAB
Tejido	corazón	corazón	corazón	bazo	bazo	bazo
Área de ARN	163,4	138,7	121,9	403,8	444,4	435,2
Conc. de ARN	85 ng/μl	72 ng/μl	63 ng/μl	209 ng/μl	230 ng/μl	226 ng/μl
Relación [28s/18s]	1,4	1,5	1,5	1,3	1,5	1,6
RIN	8,70	8,70	8,60	7,0	7,90	7,90

Como antes, el RIN es o bien igual al del método de referencia o incluso mejor cuando se utiliza el método de acuerdo con la presente invención.

- 5 8. Las muestras de ARN se diluyeron con agua libre de ARNasa como sigue: pulmón 1:80, riñón 1:100, corazón1:50, bazo 1:100, cerebro 1:50. Dos μl de cada dilución se sometieron a transcripción inversa con 10 pmol de cebadores específicos del gen y sonda (mezcla de cebador PGK1, sonda PGK1) utilizando un kit QuantiTect RT-PCR (Qiagen) con y sin transcriptasa inversa en un volumen de reacción de 25 μl:

- 10 (1) 30 min a 50 °C  
 (2) 15 min a 95 °C  
 (3) 15 s a 95 °C  
 (4) 1 min a 60 °C, repetir los pasos (3), (4) durante 40 ciclos.

15 Los valores de Ct y ΔCt resultantes se muestran en la Tabla 6 y la correspondiente Figura 2 a) y 2 b).

**Tabla 6:** Cuantificación de la co-purificación del ADN genómico mediante qRT-PCR utilizando el kit "QuantiTect RT-PCR" (Qiagen) con mezcla de cebador PGK1 específico del gen, sonda PGK1. "-RT" indica reacciones sin la transcriptasa inversa, "+ RT" reacciones con transcriptasa inversa

Pulmón	Ct - RT	Ct + RT	ΔCt
-	35,79	23,26	12,53
CTAB	37,69	23,75	13,94
TTAB	36,61	23,41	13,20
Riñón	Ct - RT	Ct + RT	ΔCt
-	36,02	20,10	15,92
CTAB	37,92	20,89	17,03
TTAB	37,61	20,50	17,11
Corazón	Ct - RT	Ct + RT	ΔCt
-	34,03	20,85	13,18
CTAB	36,67	21,09	15,58
TTAB	36,32	21,10	15,23
Bazo	Ct - RT	Ct + RT	ΔCt
-	33,27	21,68	11,60
CTAB	35,14	21,78	13,36
TTAB	34,55	21,59	12,97
Cerebro	Ct - RT	Ct + RT	ΔCt
-	35,69	21,44	14,25
CTAB	36,52	21,22	15,31
TTAB	37,13	21,46	15,67

- 20 Como puede deducirse a partir de los valores de ΔCt más altos (véase también la figura 2 b), el método de acuerdo con la presente invención reduce considerablemente la cantidad de contaminaciones de ADN en el ARN aislado a partir de diferentes muestras de tejido. Así, el método de acuerdo con la presente invención es particularmente adecuado para el aislamiento de ARN puro a partir de diferentes tejidos.

25

**Ejemplo 3:**

Se aisló ARN de cantidades crecientes de tejido utilizando el reactivo Qiazol, añadiendo el detergente catiónico directamente al homogeneizado de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- 5 1. Se homogeneizaron 5 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg y 50 mg de (a) hígado estabilizado con RNAlater o (b) hígado congelado en 1 ml de reactivo Qiazol usando un homogeneizador TissueRuptor.
2. Se añadieron 100 µl de las siguientes soluciones madre de detergente:
  - 10 – Bromuro de cetil-trimetilamonio [1 %], CTAB
  - Bromuro de tetra-deciltrimetilamonio [1 %], TTAB.

Para la referencia, no se añadió detergente (“referencia”).

Esto fue seguido por la adición de 200 µl de cloroformo y se agitó en vórtex.

15 3. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 12.000xg a 4 °C y la fase acuosa resultante se transfirió a nuevos tubos Eppendorf.

4. El sobrenadante se mezcló con 1,5 volúmenes de etanol absoluto y las fases acuosas se transfirieron a las mini columnas RNeasy (Qiagen) y se centrifugó durante 15s a 8.200xg, seguido de un lavado con 700 µl de tampón RWT (Qiagen) y posterior centrifugación, 15s a 8.200xg.

20 5. Las columnas se lavaron a continuación dos veces con 500 µl de tampón RPE (Qiagen), se centrifugaron a 8.200xg durante 15 segundos y 2 minutos, respectivamente, seguido de una etapa de centrifugación final a la velocidad máxima durante 1 minuto.

6. El ARN unido se eluyó en 30 µl de agua libre de ARNasa por centrifugación a 8.200xg durante 1 min y la concentración de ARN se determinó espectroscópicamente utilizando un NanoDrop (ThermoScientific). Los resultados se muestran en las Tablas 7 y 8 y las Figuras 3 y 4.

25

*Tabla 7:* ARN aislado de cantidades crecientes de tejido hepático estabilizado con RNAlater. La cantidad de tejido varía de 5 mg a 50 mg. El rendimiento de ARN también se representó en forma de gráficos de barras (ver Figura 3).

detergente	Tejido [mg]	A260	A280	260/280	260/230	ng/µl	Rendimiento [µg]	Media [µg]
-	5 mg	24.452	11.957	2,05	1,78	978,1	29,34	26,78
-		20.184	9.772	2,07	1,67	807,4	24,22	
<b>CTAB</b>	5 mg	27.690	13.550	2,04	1,63	1108	33,24	30,39
<b>CTAB</b>		22.943	11.122	2,06	1,84	917,7	27,53	
<b>TTAB</b>	5 mg	26.255	12.763	2,06	1,81	1050	31,50	32,37
<b>TTAB</b>		27.692	13.517	2,05	1,84	1108	33,24	
-	10 mg	32.399	15.988	2,03	1,74	1296	38,88	36,56
-		28.529	14.006	2,04	1,84	1141	34,23	
<b>CTAB</b>	10 mg	35.878	17.622	2,04	1,65	1435	43,05	39,93
<b>CTAB</b>		30.673	14.941	2,05	1,75	1227	36,81	
<b>TTAB</b>	10 mg	33.162	16.048	2,07	1,68	1326	39,78	37,37
<b>TTAB</b>		29.124	14.254	2,04	1,66	1165	34,95	
-	20 mg	47.934	23.695	2,02	1,88	1917	57,51	57,72
-		48.286	23.939	2,02	1,91	1931	57,93	
<b>CTAB</b>	20 mg	42.961	21.064	2,04	1,94	1718	51,54	51,50
<b>CTAB</b>		42.875	21.048	2,04	1,93	1715	51,45	
<b>TTAB</b>	20 mg	50.276	24.630	2,04	1,87	2011	60,33	55,46
<b>TTAB</b>		42.155	20.318	2,07	1,94	1686	50,58	
-	30 mg	52.353	25.974	2,02	1,57	2094	62,82	61,40
-		49.972	24.760	2,02	1,68	1999	59,97	
<b>CTAB</b>	30 mg	47.091	23.258	2,02	1,66	1884	56,52	54,38
<b>CTAB</b>		43.525	21.625	2,01	1,72	1741	52,23	
<b>TTAB</b>	30 mg	39.126	19.177	2,04	1,72	1565	46,95	46,02
<b>TTAB</b>		37.573	18.623	2,02	1,76	1503	45,09	
-	50 mg	54.934	27.221	2,02	1,37	2197	65,91	65,99
-		55.061	27.002	2,04	1,62	2202	66,06	

ES 2 559 117 T3

<b>CTAB</b>	50 mg	48.503	23.899	2,03	1,54	1940	58,20	56,69
<b>CTAB</b>		45.963	22.397	2,05	1,68	1839	55,17	
<b>TTAB</b>	50 mg	42.100	20.818	2,02	1,61	1684	50,52	48,14
<b>TTAB</b>		38.122	18.843	2,02	1,73	1525	45,75	

*Tabla 8:* ARN aislado de cantidades crecientes de tejido hepático congelado. La cantidad de tejido varía de 5 mg a 50 mg. El rendimiento de ARN también se representó en forma de gráficos de barras (ver Figura 4).

detergente	Tejido [mg]	A260	A280	260/280	260/230	ng/μl	Rendimiento [μg]	Media [μg]
-	5 mg	22.364	10.897	2,05	1,79	894,6	26,84	25,35
-		19.890	9.507	2,09	1,66	795,6	23,87	
<b>CTAB</b>	5 mg	20.513	10.067	2,04	1,84	820,5	24,62	22,95
<b>CTAB</b>		17.732	8.776	2,02	1,83	709,3	21,28	
<b>TTAB</b>	5 mg	15.694	7.761	2,02	1,85	627,8	18,83	18,22
<b>TTAB</b>		14.671	7.324	2,00	1,75	586,8	17,60	
-	10 mg	34.160	16.683	2,05	1,91	1366	40,98	36,30
-		26.352	12.897	2,04	1,85	1054	31,62	
<b>CTAB</b>	10 mg	28.975	14.074	2,06	1,86	1159	34,77	38,04
<b>CTAB</b>		34.420	16.551	2,08	1,88	1377	41,31	
<b>TTAB</b>	10 mg	33.370	16.137	2,07	1,90	1335	40,05	37,56
<b>TTAB</b>		29.217	14.178	2,06	1,90	1169	35,07	
-	20 mg	40.552	19.820	2,05	1,65	1622	48,66	45,93
-		36.012	17.575	2,05	1,75	1440	43,20	
<b>CTAB</b>	20 mg	32.167	15.513	2,07	1,83	1287	38,61	41,58
<b>CTAB</b>		37.117	18.403	2,02	1,87	1485	44,55	
<b>TTAB</b>	20 mg	42.320	20.829	2,03	1,82	1693	50,79	47,67
<b>TTAB</b>		37.131	18.027	2,06	1,74	1485	44,55	
-	30 mg	44.764	21.929	2,04	1,71	1791	53,73	50,93
-		40.108	19.658	2,04	1,82	1604	48,12	
<b>CTAB</b>	30 mg	36.568	17.965	2,04	1,66	1463	43,89	43,32
<b>CTAB</b>		35.634	17.471	2,04	1,68	1425	42,75	
<b>TTAB</b>	30 mg	32.383	15.709	2,06	1,82	1295	38,85	45,36
<b>TTAB</b>		43.215	21.409	2,02	1,85	1729	51,87	
-	50 mg	51.985	25.841	2,01	1,59	2079	62,37	63,18
-		53.315	26.260	2,03	1,72	2133	63,99	
<b>CTAB</b>	50 mg	44.704	21.817	2,05	1,79	1788	53,64	52,92
<b>CTAB</b>		43.495	21.121	2,06	1,73	1740	52,20	
<b>TTAB</b>	50 mg	44.839	21.898	2,05	1,84	1794	53,82	51,54
<b>TTAB</b>		41.056	20.090	2,04	1,66	1642	49,26	

5 7. La integridad del ARN se evaluó usando un Agilent Bioanalyzer 2100, los resultados se muestran en las Tablas 9 y 10.

*Tabla 9:* Integridad del ARN de ARN aislado de tejido estabilizado con RNAlater ensayado con un Agilent Bioanalyzer 2100:

detergente	-	<b>CTAB</b>	<b>TTAB</b>	-	<b>CTAB</b>	<b>TTAB</b>
<b>Cantidad de tejido</b>	5 mg	5 mg	5 mg	10 mg	10 mg	10 mg
<b>Área de ARN</b>	377,1	441,4	511,4	574,5	552,1	582,6
<b>Conc. de ARN</b>	173 ng/μl	203 ng/μl	235 ng/μl	264 ng/μl	253 ng/μl	267 ng/μl

10

<b>Relación [28s/18s]</b>	1,6	1,6	1,6	1,5	1,7	1,5
<b>RIN</b>	9,40	9,60	9,60	9,30	9,70	9,40
<b>detergente</b>	-	<b>CTAB</b>	<b>TTAB</b>	-	<b>CTAB</b>	<b>TTAB</b>
<b>Cantidad de tejido</b>	20 mg	20 mg	20 mg	30 mg	30 mg	30 mg
<b>Área de ARN</b>	1109,6	955,9	806,6	967	991,4	749,4
<b>Conc. de ARN</b>	509 ng/μl	439 ng/μl	370 ng/μl	444 ng/μl	455 ng/μl	344 ng/μl
<b>Relación [28s/18s]</b>	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,4
<b>RIN</b>	9,10	9,40	9,40	9,10	9,10	8,90

*Tabla 10:* Integridad del ARN de ARN aislado de muestras de tejido congelado ensayado con un Agilent Bioanalyzer 2100:

<b>detergente</b>	-	<b>CTAB</b>	<b>TTAB</b>	-	<b>CTAB</b>	<b>TTAB</b>
<b>Cantidad de tejido</b>	N.º 1	N.º 2	N.º 3	N.º 4	N.º 5	N.º 6
<b>Área de ARN</b>	313,8	329,7	273,7	656,9	517,0	557,8
<b>Conc. de ARN</b>	165 ng/μl	173 ng/μl	144 ng/μl	345 ng/μl	272 ng/μl	293 ng/μl
<b>Relación [28s/18s]</b>	1,7	1,8	1,7	1,8	1,8	1,8
<b>RIN</b>	9,80	9,70	9,80	9,60	9,60	9,70
<b>detergente</b>	-	<b>CTAB</b>	<b>TTAB</b>	-	<b>CTAB</b>	<b>TTAB</b>
<b>Cantidad de tejido</b>	N.º 7	N.º 8	N.º 9	N.º 10	N.º 11	N.º 12
<b>Área de ARN</b>	681	629,9	715,4	776,7	641,6	638,9
<b>Conc. de ARN</b>	358 ng/μl	331 ng/μl	376 ng/μl	408 ng/μl	337 ng/μl	336 ng/μl
<b>Relación [28s/18s]</b>	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	2,0
<b>RIN</b>	9,60	9,50	9,70	9,70	9,70	9,50

5 Como puede verse, el valor RIN es excelente para el ARN aislado por el método de acuerdo con la presente invención.

8. Las muestras de ARN se diluyeron 1:70 con agua libre de ARNasa. Dos μl de esta dilución se sometieron a continuación a transcripción inversa con 10 pmol de cebador específico de gen y sonda (mezcla de cebador PGK1, sonda PGK1) cada uno usando un kit QuantiTect RT-PCR (Qiagen) con y sin transcriptasa inversa en un volumen de reacción de 25 μl:

- (1) 30 min a 50 °C
- (2) 15 min a 95 °C
- (3) 15 s a 95 °C
- (4) 1 min a 60 °C, repetir los pasos (3), (4) durante 40 ciclos.

Los valores de Ct y ΔCt resultantes se enumeran en la Tabla 11 a) y b) y se representan como gráficos de barras en la Figura 5 a) y b).

**Tabla 11 a) y b):** Ensayos de qRT-PCR utilizando el kit “QuantiTect RT-PCR” (Qiagen) para evaluar la co-purificación del ADN genómico y, por lo tanto, la contaminación durante el aislamiento del ARN a partir de tejido hepático estabilizado con RNAlater ((a)) y congelado ((b)) sin detergente (“-”), CTAB o TTAB como se indica por las cantidades crecientes de tejido. Los gráficos de barras mostrados en la Fig. 5 a) y b) ilustran la disminución de ADN genómico de acuerdo con los valores de ΔCt mostrados en la Tabla 11 a) y b).

a)				
<b>hígado estabilizado con RNAlater</b>				
<b>detergente</b>	<b>cantidad de tejido</b>	<b>Ct - RT</b>	<b>Ct + RT</b>	<b>Δct</b>



-	5 mg	36,53	23,54	12,99
<b>CTAB</b>	5 mg	36,89	23,25	13,64
<b>TTAB</b>	5 mg	37,36	23,22	14,14
-	10 mg	35,19	22,56	12,63
<b>CTAB</b>	10 mg	37,67	22,98	14,70
<b>TTAB</b>	10 mg	37,11	22,84	14,28
-	20 mg	34,38	22,44	11,94
<b>CTAB</b>	20 mg	36,95	22,19	14,76
<b>TTAB</b>	20 mg	36,45	22,61	13,84
-	30 mg	34,88	22,85	12,04
<b>CTAB</b>	30 mg	38,29	22,62	15,67
<b>TTAB</b>	30 mg	36,80	22,47	14,33
-	50 mg	34,67	22,19	12,48
<b>CTAB</b>	50 mg	37,29	22,52	14,77
<b>TTAB</b>	50 mg	36,70	22,58	14,13
b)				
<b>hígado congelado</b>				
<b>detergente</b>	<b>cantidad de tejido</b>	<b>Ct - RT</b>	<b>Ct + RT</b>	<b>Δct</b>
-	5 mg	34,80	23,78	11,02
<b>CTAB</b>	5 mg	36,53	23,52	13,01
<b>TTAB</b>	5 mg	36,46	24,11	12,35
-	10 mg	33,85	23,24	10,61
<b>CTAB</b>	10 mg	35,97	23,00	12,97
<b>TTAB</b>	10 mg	36,35	23,21	13,14
-	20 mg	34,07	22,77	11,31
<b>CTAB</b>	20 mg	36,28	23,08	13,20
<b>TTAB</b>	20 mg	36,85	22,94	13,91
-	30 mg	34,66	22,75	11,91
<b>CTAB</b>	30 mg	36,59	22,78	13,81
<b>TTAB</b>	30 mg	36,37	22,52	13,85
-	50 mg	33,94	22,56	11,38
<b>CTAB</b>	50 mg	36,10	22,21	13,89
<b>TTAB</b>	50 mg	36,46	22,43	14,03

**Ejemplo 4:**

- El efecto sobre la co-purificación del ADN genómico durante el aislamiento de ARN se evaluó utilizando cantidades variables de un detergente catiónico, el cual se añadió directamente al homogeneizado de acuerdo con el siguiente procedimiento con cuatro preparaciones de ARN individuales por condición:
1. Se homogeneizaron 930 mg de hígado estabilizado con RNAlater en 31 ml de reactivo Qiazol usando un homogeneizador TissueRuptor.
  2. Los homogeneizados, 1000 µl cada uno (corresponde a 30 mg de hígado), se dividen en alícuotas en tubos Eppendorf de 2 ml y a las muestras no se añadió detergente o se añadieron cantidades crecientes de una solución madre CTAB 1 %: 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl seguido de la adición de 200 µl de cloroformo y agitación en vórtex.
  3. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 12.000xg a 4 °C, la fase acuosa resultante se transfirió a nuevos tubos Eppendorf.
  4. El sobrenadante se mezcló con 1,5 volúmenes de etanol absoluto y las fases acuosas se transfirieron a mini columnas RNeasy (Qiagen) y se centrifugó durante 15s a 8.200xg, seguido de un lavado con 700 µl de tampón RWT (Qiagen) y posterior centrifugación, 15s a 8.200xg.
  5. Las columnas se lavaron a continuación dos veces con 500 µl de tampón RPE (Qiagen), se centrifugaron a 8.200xg durante 15 segundos y 2 minutos, respectivamente, seguido de una etapa de centrifugación final a la velocidad máxima durante 1 minuto.
  6. El ARN unido se eluyó en 30 µl de agua libre de ARNasa por centrifugación a 8.200xg durante 1 min y la concentración de ARN se determinó utilizando un espectrómetro NanoDrop (ThermoScientific). Los resultados se muestran en la Tabla 12 y la Figura 6.

**Tabla 12:** Influencia de cantidades crecientes de CTAB durante la extracción de ARN sobre la recuperación de ARN. Se realizaron cuatro aislamientos independientes de ARN para cada condición. "Referencia" indica que no se añadió CTAB durante el aislamiento de ARN.

<b>µl CTAB</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>	<b>ng/µl</b>	<b>Rendimiento [µg]</b>	<b>Media</b>
<b>referencia</b>	61.772	30.792	2,01	1,84	2471	74,13	71,97
<b>referencia</b>	61.338	30.397	2,02	1,76	2454	73,62	
<b>referencia</b>	54.492	26.881	2,03	1,75	2180	65,40	
<b>referencia</b>	62.267	30.651	2,03	1,76	2491	74,73	

5

<b>50 µl</b>	56.441	27.980	2,02	1,77	2258	67,74	60,97
<b>50 µl</b>	50.333	24.700	2,04	1,84	2013	60,39	
<b>50 µl</b>	37.408	18.097	2,07	1,91	1496	44,88	
<b>50 µl</b>	59.050	29.230	2,02	1,82	2362	70,85	
<b>100 µl</b>	54.058	26.644	2,03	1,74	2152	64,85	60,11
<b>100 µl</b>	52.015	25.405	2,05	1,78	2081	62,43	
<b>100 µl</b>	45.635	22.325	2,04	1,80	1825	54,75	
<b>100 µl</b>	48.680	23.947	2,03	1,82	1947	58,41	
<b>150 µl</b>	52.744	26.175	2,02	1,64	2110	63,30	56,39
<b>150 µl</b>	46.100	22.432	2,05	1,83	1844	55,32	
<b>150 µl</b>	44.619	21.694	2,05	1,90	1785	53,55	
<b>150 µl</b>	44.492	21.652	2,05	1,81	1780	53,40	
<b>200 µl</b>	41.886	20.785	2,02	1,76	1675	50,25	50,55
<b>200 µl</b>	41.403	20.379	2,03	1,80	1656	49,68	
<b>200 µl</b>	42.729	20.774	2,05	1,79	1709	51,27	
<b>200 µl</b>	42.509	20.974	2,03	1,84	1700	51,00	

Los resultados también se resumen en la Figura 6. La presumible disminución en el rendimiento de ARN entre el método de referencia y el método de acuerdo con la presente invención es atribuible en gran medida a una disminución de ADN genómico en el ARN aislado, y no a una disminución de ARN, lo que entre otros viene apoyado por los ensayos de QRT-PCR (véase la Figura 7) y los otros ejemplos presentados en la presente memoria.

10

7. La integridad del ARN se evaluó usando un Agilent BioAnalyzer 2100. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13:** Efectos de cantidades crecientes de CTAB sobre la integridad del ARN. Los eluidos de ARN se diluyeron 1:10 con agua libre de ARNasa y se analizaron usando un Agilent Bioanalyzer 2100.

<b>µl CTAB</b>	<b>referencia</b>	<b>referencia</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl</b>	<b>100 µl</b>	<b>100 µl</b>	<b>150 µl</b>	<b>150 µl</b>
<b>Área de ARN</b>	338,6	433,3	378,5	356,2	305,3	309,5	337,8	249,7
<b>Conc. de ARN</b>	138 ng/µl	177 ng/µl	154 ng/µl	145 ng/µl	124 ng/µl	126 ng/µl	138 ng/µl	102 ng/µl
<b>Relación [28s/18s]</b>	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
<b>RIN</b>	9,50	9,50	9,50	9,50	9,50	9,50	9,50	9,50

15

8. Las muestras de ARN se diluyeron 1:90 con agua libre de ARNasa y se sometieron a transcripción inversa con 10 pmol de cebador específico de gen y sonda cada uno (mezcla de cebador PGK1, sonda PGK1) utilizando un kit QuantiTect RT-PCR (Qiagen) con y sin transcriptasa inversa en un volumen de reacción de 25 µl:

20

- (1) 30 min a 50 °C
- (2) 15 min a 95 °C
- (3) 15 s a 95 °C
- (4) 1 min a 60 °C, repetir los pasos (3), (4) durante 40 ciclos.

25

Los valores de Ct y ΔCt resultantes se muestran en la Tabla 14 y la correspondiente Figura 7.

**Tabla 14:** Extracción de ADN genómico cuantificado por cantidades crecientes de CTAB durante el aislamiento de ARN mediante ensayos de qRT-PCR utilizando el kit “QuantiTect RT-PCR” (Qiagen) aumentando las cantidades de CTAB evaluadas por qRT-PCR. Los ensayos de qRT-PCR se realizaron de acuerdo con el ejemplo 4.

	<b>Ct - RT</b>	<b>Ct + RT</b>	<b>Δct</b>
<b>Referencia</b>	36,79	23,46	13,33
<b>50 µl CTAB</b>	38,21	23,57	14,64
<b>100 µl CTAB</b>	38,61	23,73	14,88
<b>150 µl CTAB</b>	39,35	23,60	15,75
<b>200 µl CTAB</b>	38,77	23,55	15,22

- 5 Los resultados también se ilustran en la Figura 7. Como puede verse, el aumento de la cantidad de CTAB tuvo como resultado un aumento de la reducción de las contaminaciones de ADN en el ARN aislado.

#### **Ejemplo 5:**

- 10 Para comparar el efecto sobre la co-purificación del ADN genómico durante el aislamiento de ARN de tejido utilizando dos soluciones de detergentes catiónicos diferentes (CTAB y el tampón “BB” (Qiagen, contiene 1 % de CTAB y una sal)) se llevó a cabo el siguiente experimento:

1. Se homogeneizaron 425 mg de bazo estabilizado con RNeasy lysis buffer y 425 mg de bazo congelado en 31 ml de reactivo Qiazol, usando cada uno un homogeneizador TissueRuptor.

- 15 2. Los homogeneizados, 1000 µl cada uno, se dividieron en alícuotas en tubos Eppendorf de 2 ml y se añadieron directamente al homogeneizado 100 µl de las siguientes soluciones madre:

- Bromuro de cetil-trimetilamonio [1 %], CTAB
- Tampón Qiagen BB (1 % CTAB en NaCl)

- 20 Para la referencia, no se añadió detergente (“referencia”). Esto fue seguido por la adición de 200 µl de cloroformo y se agitó en vórtex.

3. Las muestras se centrifugaron durante 15 min a 12.000xg a 4 °C y la fase acuosa resultante se transfirió a nuevos tubos Eppendorf.

- 25 4. El sobrenadante se mezcló con 1,5 volúmenes de etanol absoluto y la fase acuosa se transfirió a mini columnas RNeasy (Qiagen) y se centrifugó durante 15s a 8.200xg, seguido de un lavado con 700 µl de tampón RWT (Qiagen) y posterior centrifugación, 15s a 8.200xg.

5. Las columnas se lavaron a continuación dos veces con 500 µl de tampón RPE (Qiagen), se centrifugaron a 8.200xg durante 15 segundos y 2 minutos, respectivamente, seguido de una etapa de centrifugación final a la velocidad máxima durante 1 minuto.

- 30 6. El ARN unido se eluyó en 30 µl de agua libre de RNasa por centrifugación a 8.200xg durante 1 min y la concentración de ARN se determinó espectroscópicamente utilizando un NanoDrop (ThermoScientific). Los resultados se muestran en la Tabla 15.

- 35 **Tabla 15:** Cuantificación de ARN aislado de bazo estabilizado con RNeasy lysis buffer (“RNeasy”) o congelado (“congelado”) utilizando dos composiciones que contienen diferentes detergentes catiónicos, que se añadieron directamente al homogeneizado. “Referencia” indica que no se añadió detergente o tampón. Se llevaron a cabo cuatro preparaciones de ARN independientes para cada condición ensayada.

<b>tejido</b>	<b>tampón</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>A260/280</b>	<b>A260/230</b>	<b>ng/µl</b>	<b>Rendimiento [µg]</b>	<b>Media</b>
RNeasy	referencia	71.422	36.032	1,98	1,91	2857	85,71	81,68
		69.842	35.012	1,99	1,89	2794	83,82	
		61.597	30.460	2,02	1,91	2464	73,92	
		70.124	35.122	2,00	1,97	2805	84,15	
		67.317	33.899	1,99	1,97	2693	80,79	
RNeasy	100 µl CTAB	72.124	36.581	1,97	1,99	2885	86,55	87,45
		149.061	73.708	2,02	2,02	5962	178,86	
		73.858	36.688	2,01	1,99	2954	88,62	
		72.922	37.341	1,95	1,98	2917	87,51	
		72.588	36.490	1,99	2,01	2904	87,12	

RNAlater	100 µl tampón BB	76.363	38.307	1,99	1,99	3055	91,65	84,30
		74.162	37.259	1,99	1,98	2966	88,98	
		73.515	37.149	1,98	1,99	2941	88,23	
		60.654	30.132	2,01	1,98	2426	72,78	
		66.558	32.823	2,03	2,06	2662	79,86	
congelado	referencia	60.330	30.174	2,00	1,83	2413	72,39	65,43
		51.787	26.151	1,98	1,86	2071	62,13	
		53.694	27.049	1,99	1,85	2148	64,44	
		49.318	24.708	2,00	1,67	1973	59,19	
		57.510	29.020	1,98	1,85	2300	69,00	
congelado	100 µl CTAB	58.830	29.681	1,98	1,87	2353	70,59	69,54
		51.649	25.876	2,00	1,92	2066	61,98	
		58.727	29.401	2,00	1,94	2349	70,47	
		60.331	30.073	2,01	1,92	2413	72,39	
		60.223	30.488	1,98	1,71	2409	72,27	
congelado	100 µl tampón BB	50.196	25.252	1,99	1,91	2008	60,24	64,54
		53.888	26.953	2,00	1,92	2156	64,68	
		49.138	24.273	2,02	1,89	1966	58,98	
		59.651	30.126	1,98	1,92	2386	71,58	
		55.991	28.220	1,98	1,92	2240	67,20	

7. La integridad del ARN se evaluó usando un Agilent BioAnalyzer 2100, véase la Tabla 16.

- 5 *Tabla 16:* Comparación de la integridad del ARN de ARN aislado de bajo estabilizado con RNAlater y congelado de acuerdo con el ejemplo 5. Los eluidos de ARN se diluyeron 1:10 en agua libre de ARNasa antes de analizarlos en un Agilent Bioanalyzer 2100.

RNAlater	referencia	referencia	CTAB	CTAB	BB	BB
<b>Área de ARN</b>	536,4	525,2	717,9	666,0	891,9	605,3
<b>Conc. de ARN</b>	267 ng/µl	262 ng/µl	357 ng/µl	332 ng/µl	444 ng/µl	301 ng/µl
<b>Relación [28s/18s]</b>	1,3	1,5	1,4	1,3	1,6	1,5
<b>RIN</b>	7,0	7,90	8,50	8,40	9,30	8,80
congelado	referencia	referencia	CTAB	CTAB	BB	BB
<b>Área de ARN</b>	446,8	351,6	434,9	422	358	409,3
<b>Conc. de ARN</b>	222 ng/µl	175 ng/µ	217 ng/µ	210 ng/µl	178 ng/µl	204 ng/µl
<b>Relación [28s/18s]</b>	1,0	1,3	1,5	1,6	1,6	1,7
<b>RIN</b>	6,0	7,0	7,60	8,0	8,10	8,0

10 Como puede verse, la integridad del ARN mejora cuando el aislamiento de ARN a partir de dicho tejido se hace utilizando el método de acuerdo con la presente invención.

8. Las muestras de ARN se diluyeron 1:100 con agua libre de ARNasa y se sometieron a transcripción inversa con cebadores específicos del gen (mezcla de cebador PGK1 y sonda PGK1) a una concentración de 10 µM cada uno usando un kit QuantiTect RT-PCR (Qiagen) con y sin transcriptasa inversa en un volumen de reacción de 25 µl:

- 15 (1) 30 min a 50 °C  
 (2) 15 min a 95 °C  
 (3) 15 s a 95 °C  
 (4) 1 min a 60 °C, repetir los pasos (3), (4) durante 40 ciclos.

20 Los valores de Ct y ΔCt resultantes se muestran en la Tabla 17 y la correspondiente Figura 8.

**Tabla 17:** Comparación de la co-purificación del ADN genómico de bazo estabilizado con RNAlater ("RNAlater") y congelado ("congelado") usando CTAB o tampón BB como aditivo. "Ref." indica el uso de reactivo Qiazol sin CTAB o con tampón BB añadido. "RT" y "+ RT" indican ensayos qRT-PCR sin y con transcriptasa inversa.

	<b>Ct - RT</b>	<b>Ct + RT</b>	<b>ΔCt</b>
<b>RNAlater ref.</b>	34,04	23,62	10,42
<b>RNAlater CTAB</b>	35,39	23,57	11,83
<b>RNAlater BB</b>	35,59	23,25	12,34
<b>congelado ref.</b>	34,02	24,19	9,83
<b>congelado CTAB</b>	35,42	24,01	11,41
<b>congelado BB</b>	35,81	24,15	11,66

- 5 Como puede deducirse de la Tabla 17 y la Figura 8, el método de acuerdo con la presente invención mejora la pureza del ARN aislado del respectivo tejido disminuyendo la cantidad de contaminaciones de ADN. Esto puede deducirse de los valores aumentados de  $\Delta Ct$ .

### **Ejemplo 6:**

10 En la presente memoria, el aislamiento de ARN se realizó de acuerdo con el protocolo de referencia utilizando QIAzol (que comprende fenol y un agente caotrópico, pero no CTAB), la presente invención (en la que CTAB se añade al homogeneizado), y de acuerdo con la técnica anterior, en la que sólo se usa fenol y CTAB, pero ningún agente caotrópico (véase, por ejemplo el documento EP 1 219 707). Este ejemplo muestra que la combinación de la  
15 composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol con un detergente catiónico es decisiva para el aislamiento de ARN puro de manera eficiente al tiempo que reduce las cantidades de contaminación de ADN a partir de muestras y, en particular muestras difíciles, tales como muestras de tejido. El ARN se aisló de la fase acuosa que contiene ARN utilizando dos métodos diferentes - por precipitación así como por purificación utilizando minicolumnas RNAeasy (Qiagen) que comprenden una membrana de sílice.

20 6.1. La fase acuosa que contiene ARN para el aislamiento de ARN usando QIAzol se obtuvo como sigue:

1. Para este experimento, se homogeneizaron 2x100 mg de bazo estabilizado con RNAlater y tejido de pulmón en 9 ml de reactivo Qiazol usando un TissueRuptor.
- 25 2. Los homogeneizados se distribuyeron en alícuotas de 900  $\mu$ l en tubos de Eppendorf de 2 ml o en alícuotas de 1000  $\mu$ l.
3. Se añadieron 100  $\mu$ l de tampón BB QIAGEN (comprende CTAB 1 % y una sal) a cada muestra de 900  $\mu$ l. Para el método de referencia utilizando QIAzol solo, no se añadió detergente. Se añadieron 180  $\mu$ l de cloroformo a todas las muestras, se agitaron en vórtex, seguido de una incubación de 2-3 minutos a temperatura ambiente.  
30 Las muestras se centrifugaron a 12.000xg a 4 °C durante 15 minutos y la fase acuosa resultante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf.

35 6.2. La fase acuosa que contiene ARN para el aislamiento del ARN utilizando el método de acuerdo con el documento EP 1 219 707 se obtuvo como sigue:

1. Se homogeneizaron 2x100mg de tejido de pulmón estabilizado con RNAlater y bazo en 9 ml cada uno de una solución que contiene 8 ml de fenol pH 4,3, 2 ml de CTAB 10 %, 500  $\mu$ l de acetato de sodio 2 M pH 4,0, 9,48 ml de agua libre de ARNasa.
2. Los homogeneizados (1000  $\mu$ l) se transfirieron a continuación a tubos Eppendorf de 2 ml. La cantidad de tejido en el homogeneizado fue la misma que con los otros métodos. Se añadió 200  $\mu$ l de cloroformo seguido por agitación en vórtex e incubación durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a continuación durante 15 minutos a 12.000xg a 4 °C.
3. La fase acuosa se transfirió a nuevos tubos Eppendorf y se almacenó durante la noche a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

45 6.3. Aislamiento de ARN a partir de la fase acuosa que contiene ARN por precipitación

Las fases acuosas obtenidas de acuerdo con 6.1 y 6.2 fueron idénticamente procesadas adicionalmente como sigue:

1. El ARN se precipitó mediante la adición de 500  $\mu$ l de isopropanol, mezclando y una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de una etapa de centrifugación de 15 minutos a 12.000xg a 4 °C.
2. El sobrenadante se desechó y el sedimento de ARN se lavó una vez mediante la adición de 1 ml de etanol al 75 %, agitación con vórtex y posterior centrifugación durante 5 minutos a 7500xg a 4 °C.
3. El sobrenadante se desechó, el sedimento se secó al aire y se resuspendió en 30 $\mu$ l de agua libre de ARNasa a 60 °C durante 10 minutos.
- 50 4. El ARN resultante se cuantificó usando un Nanodrop (ThermoScientific), ver Tabla 19.

**Tabla 18:** Se muestran los resultados del ARN precipitado de acuerdo con el ejemplo 6.3. “Fenol con CTAB” se refiere al método de acuerdo con el documento EP 1 219 707 utilizando fenol y CTAB, “QIAzol sin CTAB” se refiere al método de referencia QIAzol, en el que no se añade CTAB y “QIAzol con CTAB” se refiere al método de acuerdo con la presente invención.

Tejido	Extracción	Purificación	A260	A280	260/280	260/230	ng/μl	Rendimiento de ARN [μg]	Media
bazo	fenol con CTAB	precipitación	0,331	0,238	1,39	1,5	13,24	0,40	0,92
			1,207	0,773	1,56	1,99	48,3	1,45	
			0,78	0,488	1,6	2,01	31,18	0,94	
			0,755	0,445	1,7	1,77	30,2	0,91	
bazo	QIAzol sin CTAB	precipitación	42,505	22,024	1,93	1,56	1700	51,00	58,12
			48,968	24,951	1,96	1,81	1959	58,77	
			52,727	26,941	1,96	1,92	2109	63,27	
			49,524	25,066	1,98	1,9	1981	59,43	
bazo	QIAzol con CTAB	precipitación	46,864	23,918	1,96	1,74	1875	56,25	56,15
			45,774	23,047	1,99	1,95	1831	54,93	
			49,143	24,577	2	1,78	1966	58,98	
			45,367	23,141	1,96	1,65	1815	54,45	
pulmón	fenol con CTAB	precipitación	0,203	0,128	1,58	2,07	8,103	0,24	0,31
			0,184	0,126	1,46	2,17	7,363	0,22	
			0,398	0,285	1,4	2	15,91	0,48	
			0,238	0,202	1,18	1,74	9,537	0,29	
pulmón	QIAzol sin CTAB	precipitación	20,544	10,63	1,93	1,56	821,8	24,65	23,35
			20,373	10,682	1,91	1,57	814,9	24,45	
			17,786	9,504	1,87	1,63	711,4	21,34	
			19,137	9,485	2,02	1,63	765,5	22,97	
pulmón	QIAzol con CTAB	precipitación	17,027	9,044	1,88	1,37	681,1	20,43	20,41
			17,696	9,282	1,91	1,54	707,9	21,24	
			17,516	8,973	1,95	1,6	700,6	21,02	
			15,795	8,339	1,89	1,55	631,8	18,95	

5 Los resultados muestran que el método de acuerdo con el documento EP 1 219 707, en el que se usa fenol y CTAB, pero no agente caotrópico, no es adecuado para aislar ARN a partir de muestras de tejido.

10 6.4. Aislamiento de ARN de la fase acuosa que contiene ARN mediante el uso de minicolumnas de RNeasy (Qiagen):

La fase acuosa se obtuvo como se describe anteriormente en 6.1 y 6.2. La fase acuosa se procesó como sigue:

- 15 1. La fase acuosa se mezcló con 1,5 volúmenes de etanol absoluto y se transfirió a las mini columnas RNeasy (Qiagen) y se centrifugó durante 15s a 8.200g. Esto fue seguido por un lavado con 700 μl de tampón RWT (Qiagen) y posterior centrifugación durante 15s a 8.200g.
- 20 2. Las columnas se lavaron a continuación dos veces con 500 μl de tampón RPE (Qiagen) a 8.200g durante 15 segundos y 2 minutos, respectivamente, seguido de una etapa final de centrifugación a velocidad máxima durante 1 minuto.
3. El ARN unido se eluyó en 30 μl de agua libre de ARNasa por centrifugación a 8.200g durante 1 min. La concentración de ARN se determinó espectroscópicamente usando un NanoDrop (ThermoScientific), ver Tabla 19.

25 **Tabla 19:** Se muestran los resultados del ARN aislado de acuerdo con el ejemplo 6.4, se utilizan las mismas referencias como en la Tabla 18.

Tejido	Extracción	Purificación	A260	A280	260/280	260/230	ng/μl	Rendimiento de ARN [μg]	Media
bazo	fenol con CTAB	RNeasy	0,301	0,242	1,24	0,56	12,02	0,36	0,35
			0,33	0,27	1,22	0,44	13,2	0,40	
			0,257	0,164	1,57	0,53	10,28	0,31	

			0,293	0,212	1,38	0,41	11,73	0,35	
bazo	QIAzol sin CTAB	RNeasy	31,044	16,024	1,94	1,83	1242	37,26	43,49
			35,821	18,197	1,97	2,02	1433	42,99	
			39,671	19,348	2,05	2,01	1587	47,61	
			38,404	18,57	2,07	1,82	1536	46,08	
bazo	QIAzol con CTAB	RNeasy	36,822	17,809	2,07	2,02	1473	44,19	42,52
			39,335	19,241	2,04	1,94	1573	47,19	
			34,019	16,201	2,1	2,06	1361	40,83	
			31,56	15,535	2,03	2,02	1262	37,86	
pulmón	fenol con CTAB	RNeasy	0,094	0,043	2,19	0,35	3,762	0,11	0,16
			0,133	0,117	1,14	0,63	5,302	0,16	
			0,189	0,186	1,02	0,63	7,567	0,23	
			0,113	0,117	0,97	0,48	4,54	0,14	
pulmón	QIAzol sin CTAB	RNeasy	15,433	6,975	2,21	2,17	617,3	18,52	18,51
			15,944	7,566	2,11	2,23	637,8	19,13	
			15,674	7,502	2,09	2,21	626,9	18,81	
			14,637	6,918	2,12	2,13	585,5	17,57	
pulmón	QIAzol con CTAB	RNeasy	15,843	7,519	2,11	2,15	633,7	19,01	18,17
			15,901	7,672	2,07	2,17	636	19,08	
			15,4	7,636	2,02	2,07	616	18,48	
			13,424	6,571	2,04	2,02	537	16,11	

6.5 Determinación del contenido de ADN genómico en el ARN aislado.

Se llevó a cabo ensayos qRT-PCR para evaluar el contenido de las contaminaciones de ADN genómico en el ARN aislado de acuerdo con 6.3 o 6.4 de acuerdo con los siguientes pasos:

- 5
1. Las muestras de ARN procedentes de bazo se diluyeron a aproximadamente 30 ng/μl, los derivados de pulmón se diluyeron a ~10 ng/μl.  
Las muestras de ARN que se prepararon usando la formulación de fenol de acuerdo con el documento EP 1 219 707 no se diluyeron para su posterior qRT-PCR.

- 10
2. Los ensayos qRT-PCR se llevaron a cabo en un aparato de PCR en tiempo real RotoGene Q (Qiagen), utilizando la "mezcla maestra QuantiFast Probe RT PCR", con 10 pmol de cebador y sonda (mezcla de cebador PGK1, sonda PGK1) cada una en un volumen de reacción de 20 μl con 2 μl de la muestra de ARN como molde. Se realizaron varias reacciones de qRT-PCR independientes para cada muestra. Las condiciones de los ciclos fueron:

- 15
- (1) 10 minutos a 50 °C
  - (2) 5 minutos a 95 °C
  - (3) 10 s a 95 °C
  - (4) 30 s a 60 °C, repetir los pasos (3), (4) 40x
- 20

Los valores promedio de Ct y ΔCt y se muestran en la Tabla 20.

25 **Tabla 20:** Comparación de la co-purificación del ADN genómico en el ARN preparado de acuerdo con el ejemplo 6.3 y 6.4, las mismas referencias se utilizan como en las Tablas 18 y 19.

Bazo	Ct - RT	Ct + RT	Δct
Fenol con CTAB/ precipitación	36,86	34,32	2,54
Fenol con CTAB/ RNeasy	38,68	38,35	0,32
QIAzol sin CTAB/ precipitación	29,01	20,07	8,94
QIAzol con CTAB/ precipitación	30,19	20,11	10,08
QIAzol sin CTAB/ RNeasy	28,57	21,11	7,47
QIAzol con CTAB/ RNeasy	30,18	20,91	9,27

<b>Pulmón</b>	<b>Ct - RT</b>	<b>Ct + RT</b>	<b><math>\Delta</math>ct</b>
Fenol con CTAB/ precipitación	40,00	40	0,00
Fenol con CTAB/ RNeasy	37,43	36,25	1,18
QIAzol sin CTAB/ precipitación	29,99	26,51	3,48
QIAzol con CTAB/ precipitación	31,31	26,60	4,71
QIAzol sin CTAB/ RNeasy	32,14	26,98	5,16
QIAzol con CTAB/ RNeasy	34,12	27,16	6,96

Como puede verse, los mejores resultados se consiguen con el método de acuerdo con la presente invención, que conduce a una reducción considerable en la cantidad de ADN en el ARN aislado al tiempo que aumenta la cantidad de ARN aislado (puro).

5



## REIVINDICACIONES

1. Un método de aislamiento de al menos ARN de una muestra que comprende ARN y ADN, que comprende:
- 5 a) añadir a la muestra una composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol y lisar y/u homogeneizar la muestra;
- b) añadir un disolvente orgánico insoluble en agua y separar las fases resultantes, formando de este modo una mezcla de múltiples fases que comprende una fase acuosa, opcionalmente una interfase y una fase orgánica, en donde el ARN se concentra en dicha fase acuosa y el ADN se concentra en dicha fase orgánica y/o en dicha
- 10 interfase; y
- c) aislar dicho ARN a partir de dicha fase acuosa,
- en el que al menos un detergente catiónico se añade antes de la separación final de las fases.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **en el que** dicho al menos un detergente catiónico tiene una o más de las siguientes características:
- a) comprende un catión de amonio cuaternario cargado de forma permanente;
- b) comprende bromuro de amonio y/o
- 20 c) se selecciona del grupo que consiste en CTAB, TTAB y DTRB.
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **en el que** dicho al menos un detergente catiónico se añade en forma de una solución.
- 25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, **en el que** dicha solución tiene una o más de las siguientes características:
- a) comprende el al menos un detergente catiónico en una concentración seleccionada del grupo que consiste en del 0,1 % al 10 %, del 0,1 % al 5 %, del 0,1 % al 3 % y del 0,1 % al 1 %; y/o
- 30 b) comprende una sal que se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de amonio, acetato de sodio, nitrato de sodio, cloruro de litio, sulfato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de litio, sulfato de potasio y mezclas de los mismos.
5. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4, **en el que** en la etapa c) la mezcla multi-fase se forma mediante la centrifugación de la mezcla a una temperatura inferior seleccionada del grupo que consiste en una temperatura  $\leq 15$  °C, una temperatura  $\leq 10$  °C, una temperatura  $\leq 7$  °C, una temperatura  $\leq 5$  °C y una temperatura  $\leq 4$  °C.
- 35 6. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 5, **en el que** el ARN se aísla de la fase acuosa mediante la adición de al menos un alcohol a dicha fase acuosa.
- 40 7. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 6, **en el que** la fase acuosa se mezcla con un alcohol y dicha mezcla se pone en contacto con una fase sólida que une ácido nucleico para unir el ARN.
- 45 8. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 7, **en el que** el alcohol se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, propanol, isopropanol y butanol y/o se añade en una concentración seleccionada del grupo que consiste en al menos el 20 %, al menos el 30 % v/v, al menos el 40 % v/v, al menos el 50 % v/v y al menos el 60 % v/v.
- 50 9. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 8, **en el que** la composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol tiene una o más de las siguientes características:
- a) el agente caotrópico es una sal caotrópica;
- b) el agente caotrópico se selecciona del grupo que consiste en hidrocloreto de guanidinio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio, tiocianato de sodio, yoduro de sodio, perclorato de sodio, tricloroacetato de sodio, trifluoroacetato de sodio y urea;
- 55 c) el agente caotrópico está comprendido en una concentración seleccionada del grupo que consiste en de 0,1 a 6 M, de 0,5 a 4 M y de 0,5 a 3 M;
- d) el fenol está comprendido en una concentración seleccionada del grupo que consiste en del 10 % v/v al 70 % v/v, del 20 % v/v al 60 % v/v y del 30 % v/v al 50 % v/v;
- 60 e) comprende un tampón en una cantidad suficiente para mantener dicha composición a un pH ácido;
- f) comprende un solubilizante para mantener el fenol en solución;
- g) comprende un componente de tiocianato; y/o
- h) tiene un valor de pH inferior a 6, preferiblemente el pH es  $\leq 5$ .
- 65

10. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el disolvente orgánico insoluble en agua es cloroformo.
- 5 11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el detergente catiónico se añade antes de la separación de las fases de acuerdo con al menos una de las siguientes realizaciones
- 10 a) el detergente catiónico se añade durante la etapa a) ya sea antes, durante o después de añadir a la muestra la composición de desnaturalización ácida, respectivamente;
- b) el detergente catiónico está comprendido en la composición de desnaturalización ácida;
- c) el detergente catiónico se añade junto con, respectivamente, al mismo tiempo cuando se añade el disolvente orgánico insoluble en agua en la etapa b);
- d) el detergente catiónico se añade por separado después de mezclar la muestra con la composición de desnaturalización ácida y antes de añadir el disolvente orgánico insoluble en agua;
- 15 e) el al menos un detergente catiónico se añade después de la etapa a) y antes de la etapa b).
12. Un kit para su uso en un método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende
- 20 a) una composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol;
- b) una solución para la reducción de la cantidad de ADN en una fase acuosa que contiene ARN que comprende al menos un detergente catiónico;
- c) opcionalmente una fase sólida que une ácido nucleico y
- d) opcionalmente tampones de lavado y de elución.
- 25 13. El kit de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende una composición de desnaturalización ácida tal como se define en la reivindicación 9 y/o una solución de acuerdo con el punto b) que tiene las características definidas en la reivindicación 4.
- 30 14. Un método para reducir la cantidad de ADN en un fase acuosa que contiene ARN formada en un método de aislamiento de ácido nucleico que implica el uso de una composición de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol, en donde al menos un detergente catiónico se añade a una muestra homogeneizada en dicha composición de desnaturalización ácida antes de que las fases obtenidas por la adición de un disolvente orgánico insoluble en agua se separen en una fase acuosa, opcionalmente una interfase y una fase orgánica.
- 35 15. Uso de al menos un detergente catiónico para reducir la cantidad de ADN en un fase acuosa que contiene ARN obtenida
- 40 – homogeneizando una muestra en una composición acuosa de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol;
- añadiendo un disolvente orgánico insoluble en agua y
- separando la mezcla en una fase acuosa, opcionalmente una interfase y una fase orgánica,
- en el que** al menos un detergente catiónico se añade antes de la separación final de las fases.
- 45 16. Uso de al menos un detergente catiónico para aumentar la cantidad de ADN en una interfase y/o una fase orgánica reduciendo la cantidad de ADN en una fase acuosa que contiene ARN obtenida
- 50 – homogeneizando una muestra en una composición acuosa de desnaturalización ácida que comprende un agente caotrópico y fenol;
- añadiendo un disolvente orgánico insoluble en agua y
- separando la mezcla en una fase acuosa, opcionalmente una interfase y una fase orgánica,
- en el que** al menos un detergente catiónico se añade antes de la separación final de las fases.

Figura 1

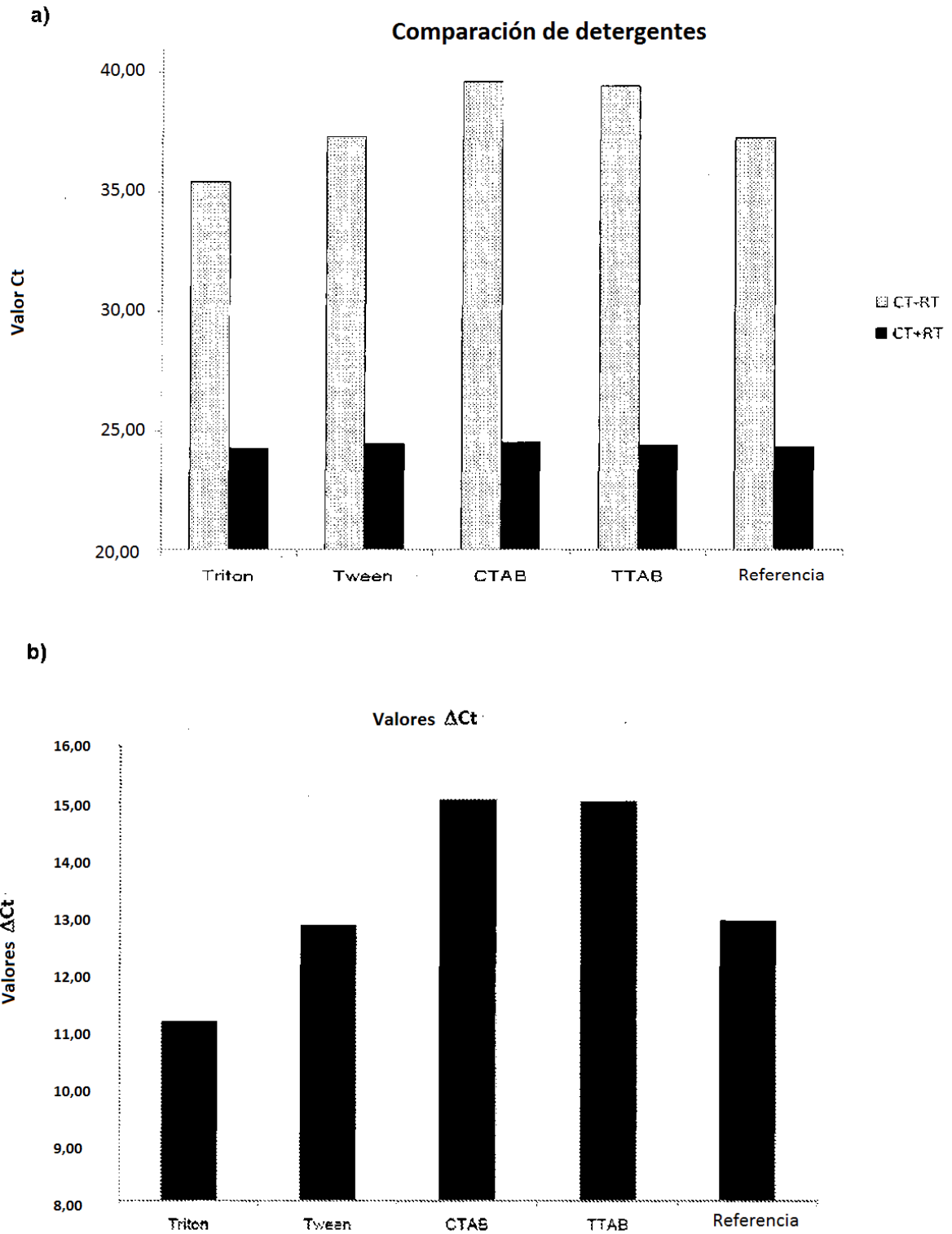


Figura 2

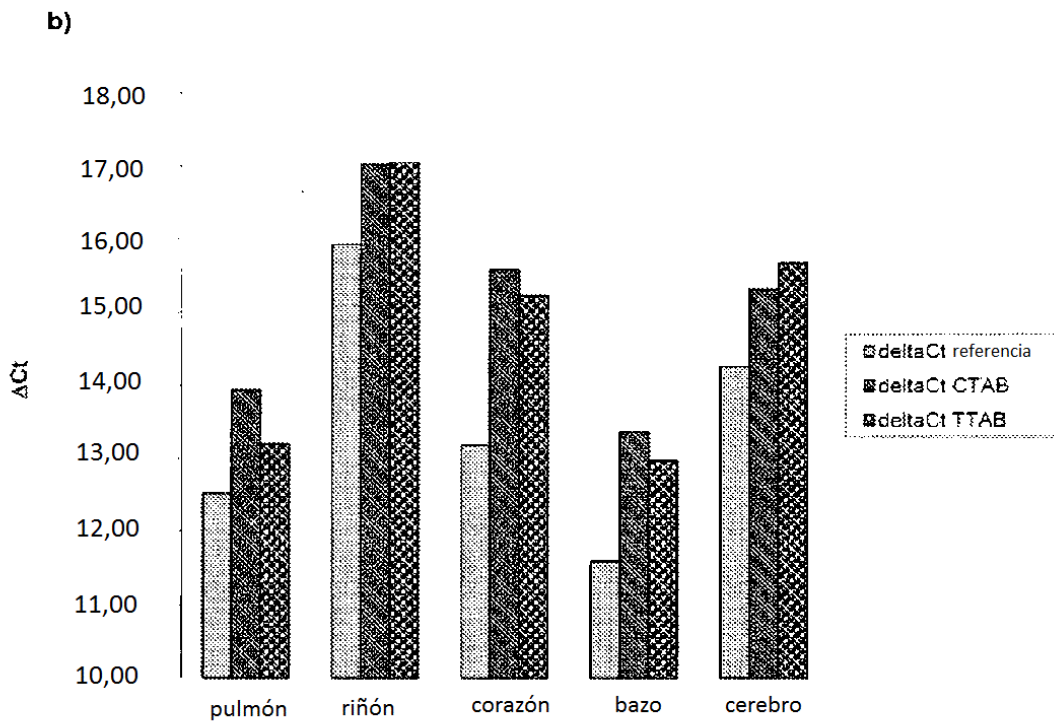
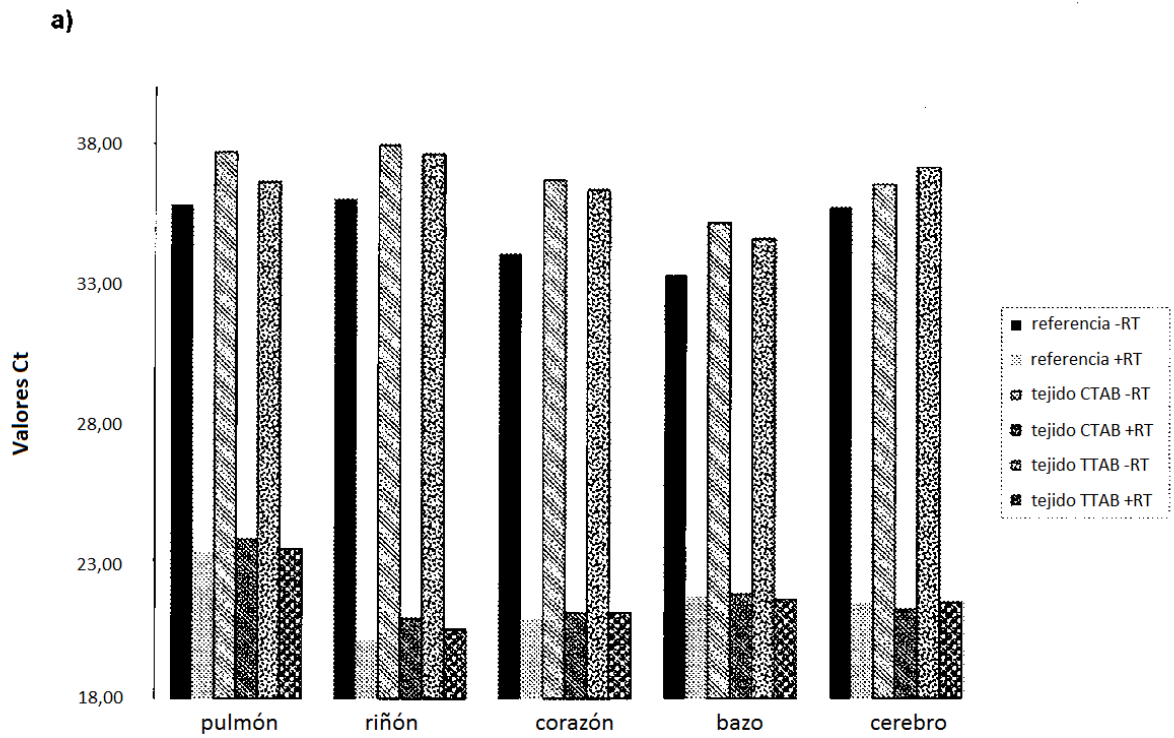


Figura 3

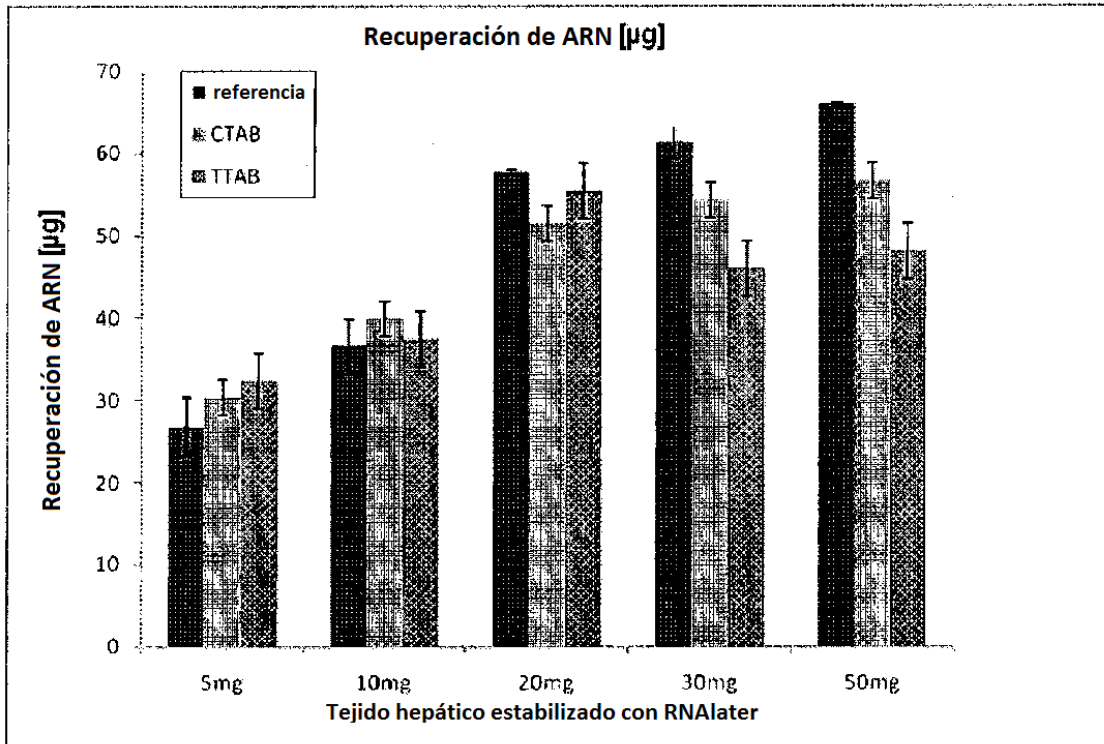


Figura 4

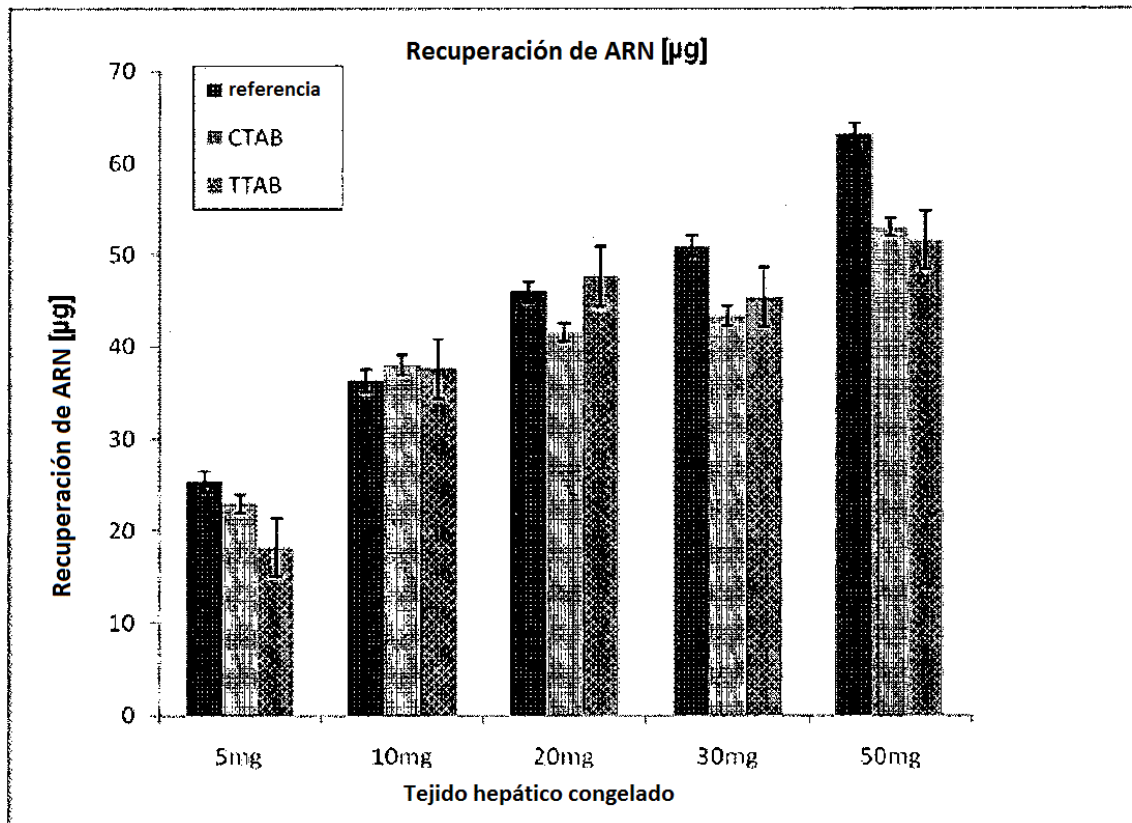
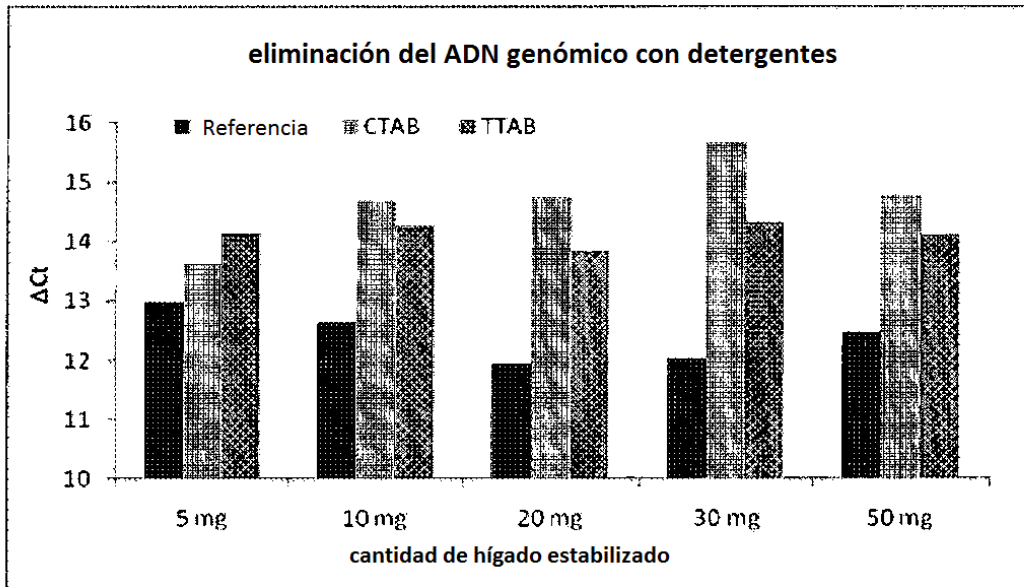


Figura 5

a)



b)

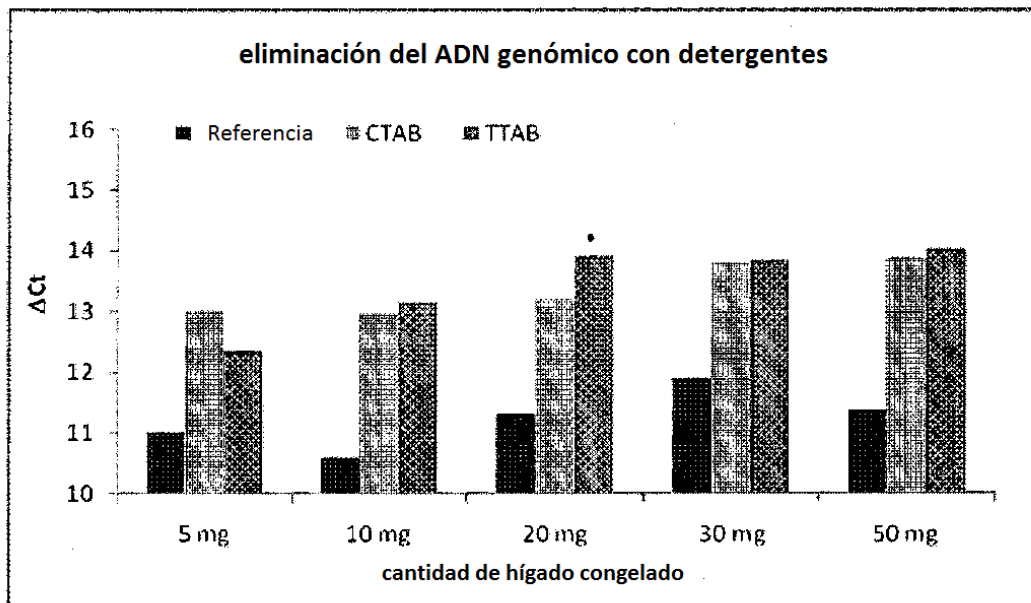


Figura 6

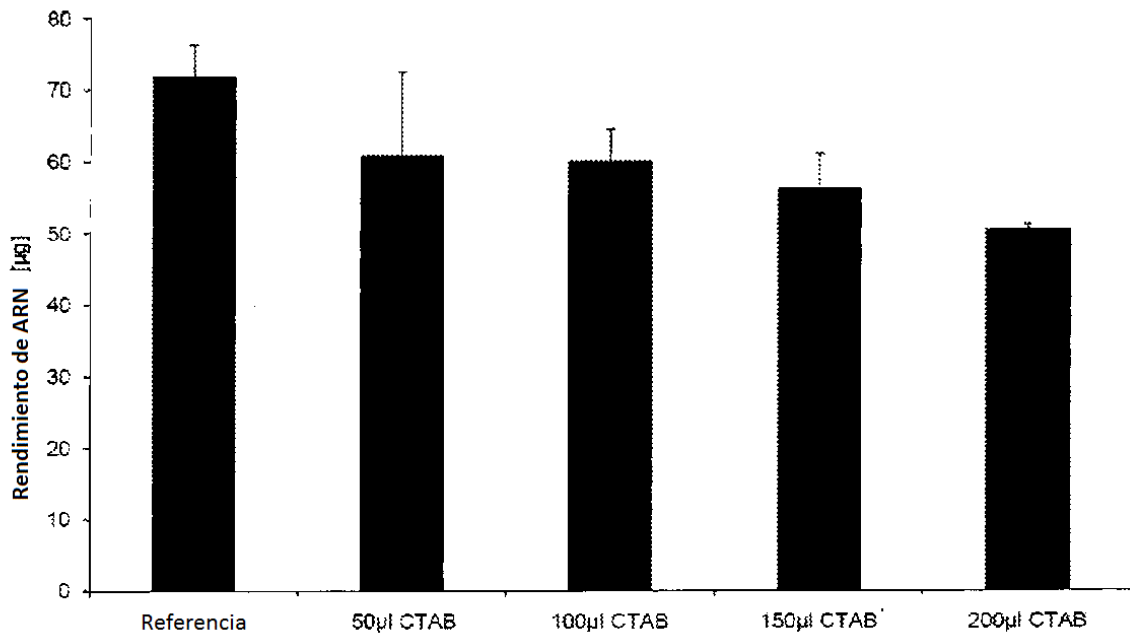


Figura 7

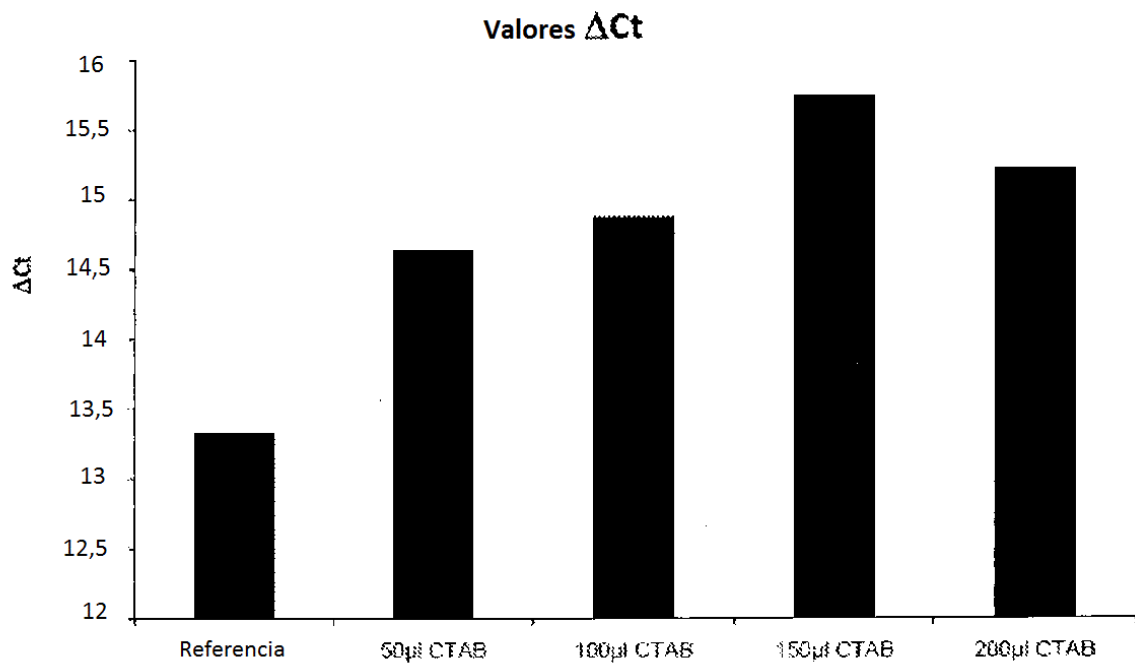


Figura 8

