

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 227**

51 Int. Cl.:

A23J 1/00	(2006.01)
C07K 1/00	(2006.01)
C07K 14/00	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
C07K 17/00	(2006.01)
C12Q 1/68	(2006.01)
C12P 19/34	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2007 PCT/US2007/021723**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2008 WO08045505**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2007 E 07852665 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2081442**

54 Título: **Composiciones, métodos y kits para aislar ácidos nucleicos de fluidos corporales usando medios de intercambio aniónico**

30 Prioridad:

10.10.2006 US 850839 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2016

73 Titular/es:

**TROVAGENE, INC. (100.0%)
11055 Flintkote Avenue
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**FEAVER, WILLIAM JOHN;
MELKONYAN, HOVSEP;
UMANSKY, SAMUIL y
MEYER, ERIK**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 588 227 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

Composiciones, métodos y kits para aislar ácidos nucleicos de fluidos corporales usando medios de intercambio aniónico

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general a la separación rápida, aislamiento, y purificación de ácidos nucleicos exentos de células, ADN y/o ARN, de muestras biológicas. El método puede referirse especialmente a una purificación simple y rápida de ácidos nucleicos de fluidos corporales para diagnóstico clínico, y seguimiento de enfermedades y tratamientos.

10

Antecedentes de la invención

La biología molecular moderna requiere el aislamiento de ácidos nucleicos de una variedad de fuentes, que comprenden mezclas complejas de ácidos nucleicos con otros compuestos tales como proteínas, lípidos y otros componentes celulares. Los ejemplos especialmente importantes de este tipo de mezclas incluyen nucleoproteínas solubles, que consisten en moléculas de ácido nucleico de longitud variable, complejadas con proteínas, por ejemplo, histonas. Estos complejos se pueden liberar en el torrente sanguíneo como resultado de la apoptosis normal u otras formas de muerte celular. Se ha demostrado que pueden eventualmente cruzar la barrera renal (ADR/ARN tr) y se pueden detectar en la orina (Umansky, S.R., et al. 1982, *Biochim. Biophys. Acta* 655:9-17; Lichstenstein, A.V., et al. 2001, *Ann NY Acad Sci*, 945:239-249; Umansky, S & Tomei, D. 2006 *Expert Rev. Mol. Diagn.* 6:153-163). Como son solubles, y se liberan de las células por todo el cuerpo, pueden ser útiles como indicadores para la detección y seguimiento de enfermedades y estados anómalos que pueden estar presentes en zonas del cuerpo diferentes al punto de obtención del fluido (Al-Yatama et al. 2001, *Prenat Diagn*, 21:399-402, Utting, M., et al. (2002), *Clin Cancer Res*, 8:35-40). La mayoría de tecnologías actuales existentes se pueden diseñar para el aislamiento de ADN y ARN celular de alto peso molecular. Estos métodos requieren varias etapas. En primer lugar, las células se deben lisisar. En segundo lugar, se debe inhibir la actividad nucleasa para evitar la degradación de los ácidos nucleicos liberados. En tercer lugar, los ácidos nucleicos deberán separarse de las proteínas. Esta etapa de desproteínización puede incluir la extracción con una variedad de disolventes orgánicos, incluidos fenol y/o cloroformo, ido de precipitación con etanol, (Maniatis et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Otro método para la extracción de ácidos nucleicos puede estar basado en su adsorción en gel de sílice a partir de soluciones muy concentradas de agentes caotrópicos con posterior elución a fuerza iónica baja. Estos métodos convencionales tienen las desventajas de requerir tiempo y ser laboriosos, y también pueden implicar el uso de reactivos químicos que son peligrosos y/o tóxicos para el trabajador y/o el medio ambiente.

15

20

25

30

35

40

45

50

Es posible que la purificación del ADN y/o ARN de complejos de nucleoproteínas exentas de células no requiera la etapa de lisis celular. Sin embargo, existe amplia evidencia que demuestra que los ácidos nucleicos en circulación libres en los fluidos corporales pueden estar presentes a concentraciones muy bajas y están fragmentados a un tamaño promedio de 150-300 pb, lo que introduce requisitos adicionales en un procedimiento de purificación. En primer lugar, para un volumen de muestra grande, puede ser técnicamente difícil realizar la desproteínización con fenol, la automatización del proceso es casi imposible, y el uso del fenol, extremadamente tóxico, en un escenario de laboratorio clínico no resulta práctico. Los métodos basados en gel de sílice pueden ser mucho más adecuados para el aislamiento de los ácidos nucleicos de soluciones diluidas. Sin embargo, en primer lugar, puede ser necesaria una dilución adicional significativa de la solución original de ácido nucleico para conseguir una concentración suficiente de un agente caotrópico, y el aislamiento de ADN de volúmenes grandes supone un problema. En segundo lugar, la unión de fragmentos cortos de ácido nucleico monocatenario (menos de 200 pb) al gel de sílice no es muy eficaz, y se pueden perder durante la purificación.

Se han utilizado medios de intercambio aniónico para el fraccionamiento y aislamiento de ácidos nucleicos, aunque la muestra biológica que los contiene normalmente se procesan en primer lugar para liberar los ácidos nucleicos de otros componentes celulares (Yamakawa et al., *Analytical Biochemistry*, 24:242-250 (1996)).

55

60

65

El documento EP 0270017 describe un método para aislar y purificar ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica. El documento US 6492144 describe métodos para detectar secuencias de ácidos nucleicos en orina. El documento WO 00/70041 describe una fase sólida de lecho mixto y su uso en el aislamiento de ácidos nucleicos. El documento US 5990301 describe un proceso para separar y purificar ácidos nucleicos de fuentes biológicas. El documento US 6872527 describe un proceso para unir fuertemente ácido nucleico a una fase sólida, y los correspondientes procesos. El documento EP 0268946 describe un método para separar ácidos nucleicos de cadena larga. El documento WO 2005/026331 describe un método de preparación de ADN plásmido de calidad farmacéutica. El documento WO 93/11221 describe un proceso para aislar y purificar ácidos nucleicos. El documento US 2001/047966 describe un proceso y un dispositivo para aislar componentes celulares tales como ácidos nucleicos procedentes de fuentes naturales. El documento EP 1245674 describe un proceso para purificar ADN plásmido a partir de una muestra que contiene ácido nucleico que comprende ADN plásmido y contaminantes. El documento WO 96/36706 describe un método para la purificación de plásmidos a gran escala. El documento EP

0507591 describe la separación mediante intercambio aniónico de ácidos nucleicos. El documento EP 1394269 describe un método para aislar macromoléculas biológicas y un equipo para llevar a cabo dicho método. El documento WO 99/29832 describe un método para purificar ADN y ADN plásmido prácticamente exento de ADN genómico.

5 Existe una necesidad no satisfecha en la técnica de un método novedoso para aislar y conservar ácidos nucleicos exentos de células procedentes de fluidos corporales donde dicho método evite procedimientos múltiples para liberar los ácidos nucleicos del material celular, que proporcione secuencias de ácidos nucleicos de diferentes longitudes, conserve la integridad de los ácidos nucleicos y se pueda adaptar con facilidad al análisis de alto rendimiento de
10 muestras para análisis diagnóstico.

Sumario de la invención

15 La presente invención se refiere en parte a un método novedosos para la separación rápida, aislamiento, y purificación de ADN o ARN de bajo peso molecular exento de células procedente de muestras biológicas. El presente método es especialmente ventajoso para resolver ADN o ARN de bajo peso molecular exento de células (<40 pares de bases e incluso hasta 10 pares de bases) encontrados en muestras de orina o de plasma sanguíneo.

20 En algunas realizaciones, la invención se refiere al método de aislar sustancialmente ácidos nucleicos de una muestra de orina o plasma sanguíneo, que comprende:

a) seleccionar un material de intercambio aniónico que comprende grupos amonio cuaternarios que adsorben eficazmente dichos ácidos nucleicos diana o complejos de los mismos con proteínas.

25 Los métodos de la presente invención pueden utilizar, por tanto, materiales de intercambio aniónico fuerte comercialmente disponibles. Los intercambiadores aniónicos de base fuerte tienen grupos de amonio cuaternario (es decir, no protonables y siempre cargados positivamente) como sitios de intercambio, y se pueden seleccionar con respecto a sus fuerzas iónicas de absorción y elución relativas y/o el pH del ADN o ARN a separar. La purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico se describe en el documento EP 0 268 946 B1.

30 El material que está comercialmente disponible bajo la designación Q-Sepharose™ (GE Healthcare) es especialmente adecuado para los métodos de la presente invención.

35 Q-Sepharose™, puede ser un intercambiador de aniones fuerte basado en una perla fuertemente reticulada formada por una matriz de agarosa al 6 %, con un tamaño de partículas promedio de 90 μm. La Q-Sepharose™ puede ser estable en todos los tampones acuosos habitualmente utilizados, con un pH recomendado de 2-12 y un caudal de trabajo recomendado de 300-500 cm/h. En otras realizaciones preferidas, el medio de intercambio aniónico se puede seleccionar entre medios de intercambio aniónico de amonio cuaternario basados en sefarosa, tales como los filtros Q o las resinas Q.

40 El material de soporte cromatográfico para la carga de aniones utilizada en los presentes métodos puede ser un material inorgánico poroso modificado. Como materiales de soporte inorgánicos, se pueden utilizar materiales tales como gel de sílice, tierra de diatomeas, vidrio, óxidos de aluminio, óxidos de titanio, óxidos de circonio, hidroxapatito, y, como materiales de soporte orgánico, tales como dextrano, agarosa, amida acrílica, resinas de poliestireno, o copolímeros de los bloques de construcción monoméricos de los polímeros mencionados.

45 Los ácidos nucleicos también se pueden purificar con materiales de intercambio aniónico basados en poliestireno/DVB, tales como Poros 20 para cromatografía de media presión, Poros.RTM. 50 HQ, de la marca BioPerseptive, Cambridge, EE.UU., o con DEAE sepharose.RTM., Q sepharose.RTM., DEAE Sephadex.RTM. de la marca Pharmacia, Suecia; DEAE Spherodex.RTM. LS, DEAE Spherosil.RTM., de la marca Biosepra, Francia.

50 b) aplicando una fracción exenta de células obtenida a partir de orina o plasma sanguíneo por eliminación de las células y residuos insolubles que contienen ácidos nucleicos en el intervalo de 10 a 100 pares de base al material de intercambio aniónico seleccionado, y quedando dichos ácidos nucleicos o sus complejos adsorbidos sobre dicho material de columna.

55 El contacto y la posterior adsorción sobre la resina puede tener lugar por simple mezclado del medio de intercambio aniónico con el fluido corporal, con la adición opcional de un disolvente, tampón u otro diluyente, en un recipiente adecuado para la muestra tal como un tubo de vidrio o plástico, o recipiente habitualmente utilizado para manipular muestras biológicas. Este mezclado simple denominado procesamiento en lotes, se puede dejar actuar durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión de la nucleoproteína al medio, preferentemente de 10 a 40 min. El medio/complejo se puede separar a continuación del resto de la muestra/líquido por decantación, centrifugación, filtración y otro medio mecánico.

60 c) opcionalmente, por lavado de dicho material de intercambio aniónico con una solución acuosa de una sal a la que los ácidos nucleicos quedan unidos en dicho material de intercambio aniónico, teniendo dicho lavado suficiente volumen y fuerza iónica para lavar los componentes no unidos o unidos débilmente a través de dicho
65

material de intercambio aniónico. En algunas realizaciones, la resina se puede lavar con 2xSSC (NaCl 300 mM/citrato de sodio 30 mM (pH 7,0)). Los intervalos preferidos de las soluciones salinas son NaCl 300-600/citrato de sodio 30 mM (pH 7,0). En otras realizaciones preferidas, la resina se puede lavar con LiCl 300 mM/NaOAc 10 mM (pH 5,2). Los intervalos preferidos de las soluciones salinas son LiCl 300-600/NaOAc 10 mM (pH 5,2)

d) eluyendo los ácidos nucleicos unidos haciendo pasar por dicho material de intercambio aniónico una solución acuosa de fuerza iónica creciente para eliminar sucesivamente las proteínas que no están unidas o están débilmente unidas al material de intercambio aniónico y dichos ácidos nucleicos de peso molecular creciente de la columna. En algunas realizaciones preferidas, ambas proteínas y los ácidos nucleicos de peso molecular alto y bajo (incluso de 10 pares de bases) se pueden eluir selectivamente de la resina por pasos con la solución salina de concentraciones de NaCl entre 300 mM y 2,0 M y finalmente con isotiocianato de guanidina 2,0 M. En otras realizaciones preferidas, en la elución por pasos se utilizan soluciones de LiCl en el intervalo de concentraciones de 300 mM a 2,0 M de LiCl.

e) analizar la fracción eluida de ácido nucleico.

Los ácidos nucleicos eluidos según los métodos de la presente invención están comprendidos en un intervalo de tamaños de 10-100 pares de bases, y lo más preferentemente en un intervalo de tamaños inferior a 40 partes de bases. El intervalo de tamaño más pequeño del fragmento eluido según los métodos de la presente invención está tiene 10 pares de bases. Los cebadores para amplificar los ácidos nucleicos se obtienen preferentemente de los genes que se deben analizar, es decir, de los oncogenes, genes supresores de tumor y/o microsátélites, por ejemplo, o pueden ser adecuados para amplificar secuencias de ácido nucleico vírico o bacteriano. Las enzimas y endonucleasas de restricción adecuadas para amplificar ácidos nucleicos son conocidos y están comercialmente disponibles.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados según los métodos de la presente invención pueden estar en forma monocatenaria o bicatenaria.

En algunas realizaciones diferentes, el fluido corporal que contiene el ácido nucleico exento de células es plasma sanguíneo.

En algunas realizaciones, el fluido corporal es orina y se puede prefiltrar a través de una membrana y complementarse con EDTA 10 mM (pH 8,0) y Tris- HCl 10 mM (pH 8,0) antes de su adsorción sobre el medio de intercambio aniónico. Las fuentes comerciales de dispositivos de filtración incluyen Pall-Filtron (Northborough, Mass.), Millipore (Bedford, Mass.), y Amicon (Danvers, Mass.). Los siguientes dispositivos de filtración se pueden utilizar con los métodos de la presente invención tales como un dispositivo de placa plana, cartucho enrollado en espiral, fibra hueca, dispositivo tubular o de una sola hoja, dispositivo de canal abierto, etc.

El área superficial de la membrana de filtración utilizada puede depender de la cantidad de ácido nucleico a purificar. La membrana puede ser un material de baja unión para minimizar las pérdidas adsorptivas y es preferentemente duradero, limpiable, y químicamente compatible con los tampones a utilizar. Numerosas membranas adecuadas están comercialmente disponibles, incluyendo, por ejemplo, acetato de celulosa, polisulfona, polietersulfona, y poli(difluoruro de polivinilideno). Preferentemente, el material de la membrana es polietersulfona o polietersulfona.

En otras realizaciones, el fluido corporal es plasma sanguíneo y puede estar suplementado con EDTA y tampón Tris-HCl (pH 8,0) y digerido con Proteinasa K antes su adsorción sobre el medio de intercambio aniónico.

En otras realizaciones adicionales, el medio de intercambio aniónico se puede inmovilizar sobre un portador individualizado donde dicho portador es una columna, cartucho o sistema de filtración portátil que se puede utilizar para el transporte o el almacenamiento del complejo unido al medio/nucleoproteína. En algunas realizaciones, el intercambio ácido nucleico/anión se mantiene en almacenamiento durante 3 semanas.

Se divulga en el presente documento un kit con un portador sólido capaz de adsorber los ácidos nucleicos contenidos en una muestra de orina o de plasma sanguíneo. El kit puede también contener componentes necesarios para realizar el proceso de acuerdo con la invención. Estos incluyen, en particular, reactivos, también en forma concentrada para el mezclado final por el usuario, materiales cromatográficos para la separación de los ácidos nucleicos, soluciones acuosas (tampones, opcionalmente también en forma concentrada para ajuste final por el usuario) o materiales cromatográficos para desalar ácidos nucleicos que se han eluido con cloruro de sodio.

Preferentemente, el kit de reactivo contiene medios adicionales para purificar ácidos nucleicos que comprenden, por ejemplo, portadores orgánicos y/o inorgánicos y soluciones, excipientes y/o accesorios opcionales. Dichos agentes son conocidos de la técnica anterior (por ejemplo, el documento WO 95/01359) y están comercialmente disponibles. Los componentes inorgánicos de los portadores pueden ser, por ejemplo, óxidos metálicos porosos o no porosos o mezcla de óxidos metálicos, por ejemplo, óxido de aluminio, dióxido de titanio, óxido de hierro u óxido de circonio, geles de sílice, materiales de tipo vidrio, por ejemplo, partículas de vidrio o vidrio molido modificado o sin modificar, cuarzo, zeolita o mezclas de uno o más de las sustancias anteriormente mencionadas. Por otra parte, el portador puede incluir también ingredientes orgánicos que se pueden seleccionar, por ejemplo, a partir de partículas de látex

opcionalmente modificadas con grupos funcionales, polímeros sintéticos tales como polietileno, polipropileno, poli(fluoruro de vinilideno), especialmente polietileno o HD-polietileno de peso molecular ultra elevado, o mezclas de una o más de las sustancias anteriormente mencionadas.

- 5 Además, el kit reactivo puede también incluir excipientes tales como, por ejemplo, una proteasa tal como la proteinasa K, o enzimas y otros agentes para manipular ácidos nucleicos, por ejemplo, al menos un cebador de amplificación, y enzimas adecuadas para amplificar los ácidos nucleicos, por ejemplo, un ácido nucleico polimerasa y/o al menos una endonucleasa de restricción.
- 10 Los cebadores para amplificar los ácidos nucleicos se obtienen preferentemente de los genes que se deben analizar, es decir, de los oncogenes, genes supresores de tumor y/o microsatélites, por ejemplo, o pueden ser adecuados para amplificar secuencias de ácido nucleico vírico o bacteriano. Las enzimas y endonucleasas de restricción adecuadas para amplificar ácidos nucleicos son conocidos y están comercialmente disponibles.
- 15 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones detalladas.

Descripción de las figuras

- 20 La **Figura 1** es una fotografía de un gel de poliacrilamida que demuestra la separación y caracterización de ADN y ARN aislado de orina mediante cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharose™.
- La **Figura 2** es una fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra ácidos nucleicos aislados de orina usando adsorbentes de membrana Q.
- La **Figura 3** es una fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra la purificación de ácidos nucleicos con Q-Sepharose usando orina completa o filtrada.
- 25 Las **Figuras 4A y 4B** son fotografías de una ilustración gráfica de un perfil de elución de ADN desde una resina de intercambio aniónico. Se sometieron a ensayo los siguientes medios de intercambio aniónico: DEAE, Q, XL, y ANX.
- La **Figura 5** es una fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra el perfil de elución de ácido nucleico y proteína de Q-Sepharose™.
- 30 La **Figura 6** es una fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra la estabilidad de ácidos nucleicos adsorbidos sobre resina Q.
- Las **Figuras 7** es una fotografía de una ilustración gráfica de la estabilidad del ADN aislado adsorbido en la resina.
- 35 La **Figura 8** es una fotografía de un gel de poliacrilamida que compara diferentes tasas de carga, tales como en lotes, columna y vacío, en el aislamiento de ácidos nucleicos desde orina.
- La **Figura 9** es un diagrama de flujo que resume el procedimiento general de purificación y concentración.
- La **Figura 10** es un diagrama de flujo que resume el procedimiento general de purificación y concentración usando un cartucho que posteriormente se utiliza para almacenamiento, estabilización y transporte de la muestra.
- 40 La **Figura 11** es una fotografía de un gel de poliacrilamida que muestra ácidos nucleicos totales, de alto peso molecular y de bajo peso molecular, fraccionados en una microcolumna de gel de sílice.
- La **Figura 12** es un gráfico de PCR en tiempo real que muestra la presencia de microARN 16 (mir-16) en ácidos nucleicos eluidos en TRYzol procedentes del plasma sanguíneo.
- 45

Descripción detallada de la invención

- La invención se basa en parte en el descubrimiento de que los ácidos nucleicos exentos de células se pueden detectar en los fluidos corporales de un sujeto. Esta invención proporciona métodos para aislamiento, estabilización y purificación de los ácidos nucleicos exentos de células. Existen varias ventajas importantes del método propuesto.
- 50 En primer lugar, se puede lograr la concentración y purificación parcial de los ácidos nucleicos exentos de células de una forma simultánea. Esto es especialmente ventajoso cuando el volumen de muestra de fluido corporal es grande, pero la concentración de ácido nucleico en la muestra es baja. En segundo lugar, el comportamiento de absorción no depende del peso molecular de los ácidos nucleicos, permitiendo el aislamiento de fragmentos cortos de peso molecular bajo (<40 pares de base e incluso de 10 pares de bases) presentes en las nucleoproteínas exentas de células.
- 55 Además, el medio de intercambio aniónico, es decir, resinas o filtros, que contienen material de ácido nucleico exento de células se puede utilizar para transportar y almacenar las muestras. La adsorción en medios de intercambio aniónico separan sustancialmente los ácidos nucleicos de las nucleasas normalmente presentes en los fluidos corporales. Una vez adsorbidos, los ácidos nucleicos pueden estar estables durante al menos 10 días a temperatura ambiente.
- 60

Los métodos de la presente invención son adecuados para detectar un ácido nucleico exento de células de interés, incluyendo fragmentos de bajo peso molecular, en un fluido corporal, tal como sangre, fluido amniótico, fluido cefalorraquídeo, plasma, leche materna, semen, fluido linfático, suero, esputo, licor, saliva y orina.

65

La invención se refiere al método de aislar sustancialmente ácidos nucleicos exentos de células de una muestra de orina o plasma sanguíneo, que comprende la etapa de seleccionar un material de intercambio aniónico que comprende grupos amonio cuaternarios que adsorben eficazmente dichos ácidos nucleicos diana o complejos de los mismos con proteínas.

5 Los métodos de la presente invención pueden utilizar, por tanto, materiales de intercambio aniónico fuerte comercialmente disponibles. Los intercambiadores aniónicos de base fuerte tienen grupos de amonio cuaternario (es decir, no protonables y siempre cargados positivamente) como sitios de intercambio, y se pueden seleccionar con respecto a sus fuerzas iónicas de absorción y elución relativas y/o el pH del ADN o ARN a separar.

10 El material que está comercialmente disponible bajo la designación Q-Sepharose™ (GE Healthcare) es especialmente adecuado para los métodos de la presente invención.

15 Q-Sepharose™, puede ser un intercambiador de aniones fuerte basado en una perla fuertemente reticulada formada por una matriz de agarosa al 6 %, con un tamaño de partículas promedio de 90 μm. La Q-Sepharose™ puede ser estable en todos los tampones acuosos habitualmente utilizados, con un pH recomendado de 2-12 y un caudal de trabajo recomendado de 300-500 cm/h. En otra realización preferida, el medio de intercambio aniónico se puede seleccionar entre medios de intercambio aniónico de amonio cuaternario basados en sefarosa, tales como los filtros Q o las resinas Q.

20 Los ácidos nucleicos también se pueden purificar con materiales de intercambio aniónico basados en poliestireno/DVB, tales como Poros 20 para cromatografía de media presión, Poros.RTM. 50 HQ, de la marca BioPerceptive, Cambridge, EE.UU., o con DEAE sepharose.RTM., Q sepharose.RTM., DEAE Sephadex.RTM. de la marca Pharmacia, Suecia; DEAE Spherodex.RTM. LS, DEAE Spherosil.RTM., de la marca Biosepra, Francia. Otros ejemplos de resinas de tipo sefarosa, funcionalizadas con grupos amonio catiónicos que se pueden utilizar incluyen Sepharose™ Fast Flow, DEAE-Sepharose™ Q-Sepharose- XL™ DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare).

30 El presente método incluye aplicar una fracción exenta de células obtenida a partir de orina o plasma sanguíneo que contiene ácidos nucleicos en el intervalo de 10 a 100 pares de bases al material de intercambio aniónico seleccionado, y quedando dichos ácidos nucleicos o sus complejos adsorbidos sobre dicho material de columna.

35 El contacto y la posterior adsorción sobre la resina pueden tener lugar por simple mezclado del medio de intercambio aniónico con el fluido corporal, con la adición opcional de un disolvente, tampón u otro diluyente, en un recipiente adecuado para la muestra tal como un tubo de vidrio o plástico, o recipiente habitualmente utilizado para manipular muestras biológicas. Este mezclado simple denominado procesamiento en lotes, se puede dejar actuar durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión de la nucleoproteína al medio, preferentemente de 10 a 40 min. El medio/complejo se puede separar a continuación del resto de la muestra/líquido por decantación, centrifugación, filtración y otro medio mecánico.

40 Los métodos de la presente invención también incluyen opcionalmente, por lavado de dicho material de intercambio aniónico con una solución acuosa de una sal a la que los ácidos nucleicos quedan unidos en dicho material de intercambio aniónico, teniendo dicho lavado suficiente volumen y fuerza iónica para lavar los componentes no unidos o unidos débilmente a través de dicho material de intercambio aniónico. En algunas realizaciones, la resina se puede lavar con 2xSSC (NaCl 300 mM/citrato de sodio 30 mM (pH 7,0)). Los intervalos preferidos de las soluciones salinas son NaCl 300-600/citrato de sodio 30 mM (pH 7,0). En otras realizaciones preferidas, la resina se puede lavar con LiCl 300 mM/NaOAc 10 mM (pH 5,2). Los intervalos preferidos de las soluciones salinas son LiCl 300-600/NaOAc 10 mM (pH 5,2).

50 La elución de los ácidos nucleicos unidos haciendo pasar por dicho material de intercambio aniónico una solución acuosa de fuerza iónica creciente para eliminar sucesivamente las proteínas que no están unidas o están débilmente unidas al material de intercambio aniónico y dichos ácidos nucleicos de peso molecular creciente de la columna. Mediante el uso de una solución de fuerza iónica conocida para la unión inicial de los ácidos nucleicos a la resina de intercambio aniónico, la mayoría de los componentes solubles en agua, incluyendo otras moléculas electronegativas tales como proteínas (contaminantes unidos débilmente) se puede eliminar por lavado de la columna. Para la elución, la fuerza iónica necesaria se puede conseguir usando concentraciones conocidas de una sal tal como NaCl, que se puede mezclar con un tampón para controlar el pH, correspondiendo idealmente a la fuerza iónica más baja a la que los ácidos nucleicos se pueden eluir por completo. Las sustancias contaminantes unidas a la resina de intercambio aniónico con mayor rigurosidad que los ácidos nucleicos pueden quedar, de esta forma, unidas a la resina, es decir, los contaminantes unidos con más fuerza se pueden separar de los ácidos nucleicos.

60 En algunas realizaciones preferidas, ambas proteínas y los ácidos nucleicos de peso molecular alto y bajo (incluso de 10 pares de bases) se pueden eluir selectivamente de la resina por pasos con la solución salina de concentraciones de NaCl entre 300 mM y 2,0 M y finalmente con isotiocianato de guanidina 2,0 M. En otras realizaciones preferidas, las soluciones de LiCl se utilizan para la elución por etapas.

65

Los métodos de la presente invención también implican analizar la fracción de ácido nucleico eluido. El ácido nucleico eluido está comprendido en un intervalo de tamaños de 10-100 pares de bases, y lo más preferentemente en un intervalo de tamaños inferior a 40 partes de bases. El intervalo de tamaño más pequeño del fragmento eluido según los métodos de la presente invención están tiene 10 pares de bases. Los cebadores para amplificar los ácidos nucleicos se obtienen preferentemente de los genes que se deben analizar, es decir, de los oncogenes, genes supresores de tumor y/o microsátélites, por ejemplo, o pueden ser adecuados para amplificar secuencias de ácido nucleico vírico o bacteriano. Las enzimas y endonucleasas de restricción adecuadas para amplificar ácidos nucleicos son conocidos y están comercialmente disponibles.

5 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados según los métodos de la presente invención pueden estar en forma monocatenaria o bicatenaria.

En algunas realizaciones diferentes, el fluido corporal que contiene el ácido nucleico exento de células es plasma sanguíneo.

15 En algunas realizaciones, el fluido corporal es orina y se puede prefiltrar a través de una membrana y complementarse con EDTA 10 mM (pH 8,0) y Tris- HCl 10 mM (pH 8,0) antes de su adsorción sobre el medio de intercambio aniónico. La etapa de filtración elimina los posibles residuos insolubles que pueden estar presentes. Dichos residuos o material insoluble, por ejemplo, pueden aparecer si la muestra biológica se ha almacenado (archivado) en estado congelado durante un periodo de tiempo prolongado. Las fuentes comerciales de dispositivos de filtración incluyen Pall-Filtron (Northborough, Mass.), Millipore (Bedford, Mass.), y Amicon (Danvers, Mass.). Los siguientes dispositivos de filtración se pueden utilizar con los métodos de la presente invención tales como un dispositivo de placa plana, cartucho enrollado en espiral, fibra hueca, dispositivo tubular o de una sola hoja, dispositivo de canal abierto, etc.

25 El área superficial de la membrana de filtración utilizada dependerá de la cantidad de ácido nucleico a purificar. La membrana puede ser un material de baja unión para minimizar las pérdidas adsorptivas y es preferentemente duradero, limpiable, y químicamente compatible con los tampones a utilizar. Numerosas membranas adecuadas están comercialmente disponibles, incluyendo, por ejemplo, acetato de celulosa, polisulfona, polietersulfona, y poli(difluoruro de polivilideno). Preferentemente, el material de la membrana es polietersulfona o polietersulfona.

30 En otras realizaciones, el fluido corporal es plasma sanguíneo y puede estar suplementado con EDTA y tampón Tris-HCl (pH 8,0) y digerido con Proteinasa K antes su adsorción sobre el medio de intercambio aniónico.

35 En otras realizaciones adicionales, el medio de intercambio aniónico se puede inmovilizar sobre un portador individualizado donde dicho portador es una columna, cartucho o sistema de filtración portátil que se puede utilizar para el transporte o el almacenamiento del complejo unido al medio/nucleoproteína. En algunas realizaciones, el intercambio ácido nucleico/anión se mantiene en almacenamiento durante 3 semanas.

40 El complejo de nucleoproteína/intercambio aniónico, ya esté preparado de forma discontinua o en una forma inmovilizada, se puede tratar con un eluyente para eliminar por lavado el posible material remanente no unido, tales como proteínas con menos carga neta negativa y sales inorgánicas. También se puede utilizar como medio para almacenar la nucleoproteína/ácidos nucleicos. El complejo también se puede tratar opcionalmente con un disolvente miscible con agua para secar la resina, que se puede almacenar a continuación durante periodos de tiempo prolongados hasta desorción y análisis final.

50 El complejo de ácido nucleico/intercambio aniónico también puede servir como recipiente de almacenamiento de la muestra. Por ejemplo, el fluido corporal obtenido de un paciente se puede enviar al laboratorio para su análisis normalmente congelado para evitar la degradación, pero la muestra también se puede aplicar al medio inmovilizado de intercambio aniónico en o cerca del sitio donde se ha realizado la toma de muestra. El complejo de nucleoproteína/intercambio aniónico, por ejemplo, el cartucho, tubo o columna que contiene la muestra de nucleoproteína se puede preparar en el sitio de extracción y enviarse directamente al laboratorio para su análisis.

55 Para la detección de un ácido nucleico de interés, se puede utilizar una etapa de amplificación de ADN o ARN (tal como PCR o RT-PCR). En una realización, la reacción comprende la amplificación con seguimiento en tiempo real. En otra realización, la detección y/o cuantificación del ácido nucleico se realiza con un sistema de lectura de punto final. Dichos sistemas pueden incluir una detección colorimétrica, un ensayo enzimático, y/o una tira reactiva.

60 Se divulga en el presente documento un kit de piezas para detectar, identificar y/o cuantificar un ácido nucleico de interés en una muestra, que comprende: un portador sólido capaz de absorber al menos en parte los complejos de nucleoproteína exentos de células de una muestra; y un conjunto de soluciones para el posterior lavado de la resina y elución del ácido nucleico. En alguna realización, el kit puede incluir el propio portador que puede absorber el fluido corporal, unido a un trozo de papel o superficie sobre la que se puede escribir o imprimir información, por ejemplo, información acerca del paciente, la fecha de la toma de muestra, o fechas adicionales de toma de muestra, régimen de tratamiento, códigos de barras, números de ID, etc. Dicha superficie para este tipo de información está inequívocamente vinculada al portador con una muestra, haciendo de esta forma que la trazabilidad de la muestra

sea más cómoda y fiable. Normalmente, este tipo de superficie puede incluir más información de la que puede contener un tubo. En otra realización, el portador puede ser una resina Q que contiene un cartucho con un conector luer convencional. Una muestra de fluido corporal se puede pasar por el cartucho y posteriormente, tras lavado con NaCl, el cartucho se puede enviar a un laboratorio clínico donde los ácidos nucleicos se eluirán y analizarán.

5 En alguna realización, el kit comprende además medios para amplificación del ácido nucleico. Este medio puede comprender componentes para una amplificación con seguimiento en tiempo real, y/o componentes para amplificación con detección/cuantificación de punto final. Un kit de piezas puede ser de utilidad en países de pocos recursos con pocos hospitales. Dichos hospitales pueden distribuir los portadores sólidos, tales como papeles de filtro, entre los habitantes de zonas remotas. Tras la recogida de las muestras, se pueden almacenar a temperatura ambiente y transportarse a los hospitales. Si el hospital tiene el equipo adecuado, las muestras se pueden investigar usando el kit suplementado con las soluciones de aislamiento de ácidos nucleicos y los componentes para el análisis. Por supuesto, también los hospitales de países desarrollados pueden utilizar un kit de piezas para recoger y someter a ensayo una muestra.

15 Un kit de piezas para la detección, identificación y/o cuantificación puede incluir una recogida de materiales necesarios para extraer con seguridad el fluido corporal del paciente. Con fluidos corporales externos, por ejemplo, orina, leche materna o saliva, deben tomarse las precauciones de seguridad adecuadas, así como cuando los fluidos corporales son muestras tales como sangre, plasma, suero, o fluido linfático. Para los fluidos corporales internos, se puede componer un kit que contenga un portador sólido capaz de absorber al menos en parte la muestra, y una solución de aislamiento de ácido nucleico, junto a un par de guantes de exploración, un hisopo en alcohol para limpiar la piel, un dispositivo punzante para el dedo o talón[Lambda], una venda, un sobre, por ejemplo, con la dirección del laboratorio de destino, así como un espacio para un número de identificación o código de paciente, e interior acolchado para un transporte postal seguro, y un desecador para mantener la muestra seca y evitar el crecimiento de hongos o bacterias. Otras posibilidades para el dispositivo de recogida pueden comprender dispositivos especialmente diseñados de un solo uso, tal como el dispositivo descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.139.742: *Disposable liquid testing device* de Livestock Control Holding B.v. en Amersfoort, Países Bajos. Cualquier combinación de estos elementos, o la sustitución por otro tipo de elementos/dispositivos a utilizar para el almacenamiento y/o transporte de cualquier fluido corporal que contenga ácido nucleico es posible.

30 En la realización preferida, el kit puede estar basado en la adsorción directa de ácido nucleico/nucleoproteínas de la orina sobre un intercambiador aniónico, preferentemente Q-Sepharose®, seguido de elución, que puede incluir etapa(s) de fraccionamiento del ADN/ARN.

35 Para facilitar la comprensión de la invención, se definen a continuación varios términos:

El término ácido nucleico "diana" es una secuencia de ácido nucleico que se va a evaluar mediante hibridación, amplificación o cualquier otro medio para analizar una secuencia de ácido nucleico, incluyendo una combinación de métodos de análisis.

40 El término "sonda", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), tanto de origen natural como producida sintéticamente, que forma una estructura de duplete u otro tipo de complejo con una secuencia de otro ácido nucleico, debido a la complementariedad u otros medios de interacción atractiva reproducible, de al menos una secuencia de la sonda con una secuencia del otro ácido nucleico. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de secuencias génicas concretas. Se contempla que cualquier sonda utilizada en la presente invención se pueda marcar con cualquier "molécula indicadora", de tal forma que se pueda detectar en cualquier sistema de detección, incluyendo, pero sin limitación, enzimas (por ejemplo, ELISA, así como un análisis histoquímico de tipo enzimático), y sistemas fluorescentes, radioactivos y luminiscentes. Se contempla además que el oligonucleótido de interés (es decir, a detectar) se marque con una molécula indicadora. Se contempla también que tanto la sonda como el oligonucleótido de interés estén marcados. No se pretende que la presente invención esté limitada a cualquier sistema de detección o etiqueta concretos.

55 El término "etiqueta" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier átomo o molécula que se pueda utilizar para proporcionar una señal detectable (preferentemente cuantificable), y que se puede unir a un ácido nucleico o proteína. Las etiquetas proporcionan señales que se pueden detectar por numerosos métodos, incluyendo, pero sin limitación, fluorescencia, radioactividad, colorimetría, gravimetría, difracción o absorción de rayos X, magnetismo, y actividad enzimática.

60 La expresión "prácticamente monocatenario", cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico diana, significa que la molécula diana existe principalmente como una cadena simple de ácido nucleico a diferencia de una diana bicatenaria que existe en forma de dos hebras de ácido nucleico que se mantienen juntas entre sí por interacciones de emparejamiento de bases entre las cadenas.

65 Tal como se usa en el presente documento, los términos "prácticamente purificado" y "prácticamente aislado" se refieren a secuencias de ácidos nucleicos que se han separado de su entorno natural, aisladas o separadas, y están

preferentemente exentas en un 60 %, más preferentemente, exentas en un 75 %, y lo más preferentemente exentas en un 90 % de otros componentes a los que pueden estar naturalmente asociados. Un "polinucleótido aislado" es, por tanto, un polinucleótido prácticamente purificado. Se contempla que, para llevar a la práctica los métodos de la presente invención, los polinucleótidos pueden estar purificados, aunque no necesitan estar prácticamente purificados. Se conocen en la técnica diferentes métodos para detectar secuencias de ácidos nucleicos en forma no purificada.

"Amplificación" se define como la producción de copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico, y por lo general se lleva a cabo usando la reacción en cadena de la polimerasa u otras tecnologías bien conocidas en la técnica (por ejemplo, Dieffenbach y Dveksler, PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. [1995]). Tal como se usa en el presente documento, la expresión "reacción en cadena de la polimerasa" ("PCR") se refiere al método de K. B. Mullis (patentes de Estados Unidos números 4.683.195 y 4.683.202), que describe un método para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia de ácido nucleico diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación o purificación. Este proceso para amplificar la secuencia diana consiste en introducir un importante exceso de dos cebadores de oligonucleótidos en la mezcla de ADN que contiene la secuencia diana deseada, seguido por una secuencia precisa de ciclación térmica en presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores son complementarios de sus respectivas hebras de la secuencia diana bicatenaria. Para realizar la amplificación, la mezcla se desnaturaliza, y los cebadores se hibridan a continuación con sus secuencias complementarias dentro de la molécula diana. Tras la hibridación, los cebadores se extienden con una polimerasa de tal manera que se forma una nueva pareja de hebras complementarias. Las etapas de desnaturalización, hibridación de cebadores y extensión con polimerasa se puede repetir varias veces (es decir, la desnaturalización, la hibridación y la extensión constituyen un "ciclo"; así pueden realizarse varios "ciclos") para obtener una concentración elevada de un segmento amplificado de la secuencia diana deseada. La longitud del fragmento amplificado de la secuencia diana deseada se determina por las posiciones relativas de los cebadores entre sí y, por tanto, esta longitud es un parámetro controlable. Por el aspecto repetitivo del proceso, el método se denomina como "reacción en cadena de la polimerasa" (a partir de ahora en el presente documento "PCR"). Como los segmentos amplificados deseados de la secuencia diana se convierten en las secuencias predominantes (en términos de concentración) de la mezcla, esta se denomina "amplificada mediante PCR".

30 Abreviaturas y acrónimos:

ANX-4	[también ANX Sepharose™ 4 Fast Flow (high sub)] Marca comercial de GE Healthcare Systems AB. Resina A basada en perlas de agarosa al 4 % fuertemente reticulada.
pb	pares de bases de nucleótidos
DEAE	grupo funcional de dietilaminometil éter
dATP	5'-trifosfato de 2'-desoxiadenosina
dCTP	5'-trifosfato de 2'-desoxiciditina
dGTP	5'-trifosfato de 2'-desoxiguanidina
dNTP	una mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP,
dUTP	5'-trifosfato de 2'-desoxiuridina
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EtOH	etanol
GITC	isotiocianato de guanidina
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
membrana Q	Soporte de intercambio aniónico con grupos funcionales colgantes de amina cuaternaria en un recubrimiento polimérico reticulado sobre una membrana semipermeable. Los fabricantes incluyen Mustang y Sartorius.
resina Q	cualquiera de numerosos soportes sólidos para intercambio iónico, incluyendo, pero sin limitarse a perlas de polímero (por ejemplo, poliestireno), partículas cerámicas, resinas de sefarosa, y resinas de dextrano, que están funcionalizadas con grupos amonio cuaternario
Q-Sepharose™	Un intercambiador aniónico fuerte que contiene grupos amonio cuaternario sobre un soporte de Sepharose. Marca comercial de GE Healthcare Systems AB.
Q-Sepharose™ XL	resina de sefarosa-Q modificada para permitir mayor capacidad de carga. Marca comercial de GE Healthcare Systems AB
DEAE Sephadex™ A-25	un intercambiador aniónico débil que contiene el grupo DEAE en un soporte de dextrano. Marca comercial de GE Healthcare Systems AB
Sepharose®	una matriz de filtración en gel basada en agarosa en forma de perlas. Marca comercial registrada de GE Healthcare Bio-Sciences AB
SSC	tampón de NaCl 150 mM/citrato de sodio 15 mM, a veces denominado como 1xSSC; así, 2xSSC sería NaCl 300 mM/citrato de sodio 30 mM
SYBR® Gold	colorante sensible a fluorescencia disponible para detectar ácidos nucleicos con transiluminadores de ultravioleta convencionales; SYBR es una marca comercial registrada de Molecular Probes, Inc.
Taq	(o polimerasa Taq), una polimerasa termoestable utilizada en la reacción en cadena de

	la polimerasa para comprobar la presencia o ausencia de un gen mediante la amplificación de un fragmento de ADN.
TE	una mezcla de (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0)/EDTA 1 mM (pH 8,0)
ADN-Tr	ADN transrenal, es decir, ADN que se origina fuera del tracto urinario y que ha atravesado la barrera renal
Tris (tampón Tris)	Tris hidroximetilaminometano
TRizol®	una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, utilizada para el aislamiento de ARN; una marca comercial registrada de Molecular Research Center, Inc.
ARN-Tr	ARN transrenal, es decir, ARN que se origina fuera del tracto urinario y que ha atravesado la barrera renal
U	unidades de actividad de una enzima, tal como Taq
Wizard®	Sistema de purificación de ADN basado en gel, marca comercial registrada de Promega Corporation

Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente una persona normalmente experta en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención, se describen a continuación los métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y resto de las referencias citadas en el presente documento se han incorporado por referencia en su totalidad expresamente. En caso de conflicto, tendrá preferencia la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos, y ejemplos descritos en el presente documento son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones detalladas.

Ejemplos

Ejemplo 1

A) Aislamiento de ADN y ARN a partir de orina mediante cromatografía de intercambio iónico con O-Sepharose™

Preparación de la orina y unión a Q: Para estos experimentos, la orina (15 ml) de voluntarios sanos se filtró a través de un filtro de jeringa de 5,0 µm Millex-SV (Millipore) y a continuación se complementó con EDTA 10 mM (pH 8,0) y Tris- HCl 10 mM (pH 8,0). La orina se dejó unir en forma discontinua durante 10 minutos en 400 [µl] de Q-Sepharose™ (GE Healthcare) sin lavar en un tubo de centrifuga de 50 ml a temperatura ambiente. La resina se recogió mediante centrifugación a ~1900 g durante 5 min a temperatura ambiente en una centrifuga clínica de sobremesa usando un rotor con canchales oscilantes. Todo el sobrenadante, salvo ~500 µl, se eliminó mediante aspiración. El aglomerado de resina se resuspendió en el resto del sobrenadante y se transfirió a una columna de cromatografía Micro Bio-Spin (Bio-Rad). La resina (volumen empaquetado de ~150 µl) se recogió mediante centrifugación por pulsos en una microfuga durante ~10 s (~10k rpm) y se descartó el líquido del flujo pistón. La resina se lavó tres veces con 500 µl de 2 x SSC (NaCl 300 mM/citrato de sodio 30 mM (pH 7,0)).

Elución de ácidos nucleicos unidos a Q-Sepharose™: Los ácidos nucleicos unidos se eluyeron adicionalmente con un volumen de lecho de resina de tres veces bien con una solución salina muy concentrada [por ejemplo, NaCl 1500 mM/citrato de sodio 150 mM (10xSSC) o LiCl 2 M] o reactivo TRizol™ (Invitrogen). Cuando se eluyó con TRizol™ fue necesario tapar la parte inferior de la columna para evitar el flujo por gravedad.

Separación de las fases de TRizol™: Los dos eluatos de 200 µl de TRizol se combinaron y se añadieron 80 µl de CHCl₃/alcohol isoamílico (24:1). La muestra se agitó manualmente y, después de una incubación de 3 min a temperatura ambiente, la muestra se centrifugó a 12k g durante 15 min t 4 °C. Exactamente 240 µl de la fase sobrenadante acuosa se transfirieron a un tubo nuevo.

Precipitación de los ácidos nucleicos eluidos con TRizol™: Los ácidos nucleicos de la fase acuosa se precipitaron a -20 °C durante 30 min mediante la adición de 1 µl de glucógeno 20 mg/ml (Roche) y 240 µl de alcohol isopropílico al 100 %. El precipitado se recogió mediante centrifugación y el aglomerado se lavó dos veces con 200 µl de etanol al 70 %. El aglomerado se dejó secar al aire durante 5 min a temperatura ambiente y a continuación se volvió a suspender en 30 µl de EDTA 0,1 mM/1x RNA Secure (Ambion). Las muestras se incubaron a 60 °C durante 10 min para inactivar cualquier actividad RNasa residual.

Purificación basada en sílice de los ácidos nucleicos eluidos de TRizol™ (alternativa a la precipitación): A la fase acuosa superior se añadieron tres volúmenes de EtOH al 100 %, se mezcló bien y se incubó a temperatura

ambiente durante 5 min. La mezcla se cargó en una minicolumna de sílice Axygen Bioscience (número de catálogo 2227), o equivalente, mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 1 minuto (se puede usar en su lugar una carga bajo vacío). La columna de gel de sílice se lava dos veces con 500 µl de LiCl 2 M/EtOH al 80 % seguido por dos lavados adicionales con 500 µl de NaOAc 80 mM a pH 5,2/EtOH al 80 %. Secar la columna de centrifugación en un tubo Eppendorf nuevo mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 3 minutos. Eluir el ARN con 50-60 µl de H₂O doblemente destilada.

Purificación basada en sílice de los ácidos nucleicos eluidos con una solución salina de concentración elevada: Se añadieron tres volúmenes de EtOH al 100 % al eluato fuertemente salino, se sometió a vortización y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. La mezcla se cargó en una minicolumna de sílice Axygen Bioscience (número de catálogo 2227). Como alternativa, se puede utilizar una toma de vacío.

La columna de gel de sílice se lava dos veces con 500 µl de LiCl 2 M/NaAc 10 mM (pH 5,2) en EtOH al 70 % seguido por dos lavados adicionales con 500 µl de tampón de lavado (KOAc 75 mM pH 5,0, EtOH al 80 %). Después del lavado final, la columna de gel de sílice se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó a 10.000 durante 3 minutos. De la columna de gel de sílice, los ácidos nucleicos se eluyeron con 50-60 µl de Tris-HCl 1 mM (pH 8,0)/EDTA 0,025 mM (pH 8,0). Para purificar el ARN de la orina de los ácidos nucleicos totales aislados, la fracción eluida se digirió con ADNsa I como se describe en la sección siguiente (véase digestión con ADNsa I y ARNsa I).

Digestión con ADNsa I y ARNsa I: Para cada muestra, 50 µl de eluato Q NaCl se diluyeron con un volumen equivalente de TE (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0)/EDTA 1 mM (pH 8,0)) y se precipitó a -20 °C durante 30 min mediante la adición de 1 µl de glucógeno 20 mg/ml (Roche) y 100 µl de alcohol isopropílico al 100 %. El precipitado se recogió mediante centrifugación, se lavó dos veces con 200 µl de etanol al 70 % y se dejó secar al aire durante 5 min.

Específicamente, para la digestión con ADNsa I, el aglomerado se resuspendió en 10 µl de 1x tampón de reacción ADNsa I (NEB) que contenía dos unidades de ADNsa I exenta de RNasa (NEB). Específicamente, para la digestión con ARNsa A, el aglomerado se resuspendió en 10 µl de H₂O desionizada que contenía 50 ng/ml de ARNsa hervida. Ambas muestras digeridas se incubaron a 37 °C durante 60 min antes de la adición de colorante de carga y electroforesis. Todas las muestras se sometieron a electroforesis sobre poliacrilamida en geles de 1x TBE de poliacrilamida al 5 % y se tiñeron con SYBR® Gold (Invitrogen) con dilución 1/10000. Los resultados de estos experimentos se resumen en la Figura 1, y demuestran claramente que tanto el ADN como el ARN se aislaron de la orina mediante cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharose™.

B) Aislamiento de ácidos nucleicos de la orina usando adsorbentes de Q membrane™.

Para estos experimentos, orina (no filtrada) de voluntarios sanos (100 ml), suplementada con EDTA 5 mM (pH 8,0) y Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) se aplicó a una membrana adsorbente MA5 Sartobind Q (Sartorius) prehumedecida con 5 ml de tampón de lavado (EDTA 5 mM (pH 8,0)/Tris-HCl 10 mM (pH 8,0)) con una toma de vacío. La membrana se lavó con 5 ml de tampón de lavado y se eluyó sucesivamente con un gradiente en etapa de 1 ml de 1x SSC hasta 10x SSC (1x SSC: NaCl 150 mM/Nacitrato 15 mM (pH 7,0)). Para cada elución se recogieron dos fracciones de 500 µl. Los 100 µl de la segunda fracción de cada etapa se diluyeron dos veces con TE y se precipitaron mediante la adición de un volumen equivalente de isopropanol al 100 % usando glucógeno como transportador. Todas las muestras se sometieron a electroforesis sobre poliacrilamida en geles de 1x TBE de poliacrilamida al 5 % y se tiñeron con SYBR® Gold (Invitrogen) con dilución 1/10000. Como se muestra en la Figura 2, tanto los fragmentos de ADN como los de ARN, incluyendo fragmentos de bajo peso molecular, se aislaron con adsorbentes de Q-membrane.

C) Purificación de ácidos nucleicos de la orina usando Q-Sepharose™ para orina tanto completa como filtrada.

El ácido nucleico de la orina se aisló con Q-Sepharose™ mediante elución con NaCl como se describe en el Ejemplo 1, Sección A. Sin embargo, para estos experimentos, la muestra de orina tanto no se filtró (completa) o se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm Millex-HV (Millipore). Además, cada muestra se precipitó con isopropanol antes de la electroforesis como se describe en el Ejemplo 1, apartado B, en geles de 1x TBE de poliacrilamida al 5 % y se tiñeron con SYBR® Gold (Invitrogen) con dilución 1/10000. Tal como se muestra en la Figura 3, el ADNtr, el ARNtr y el ADN genómico se detectaron en todas las muestras analizadas independientemente de si la orina se había filtrado o no antes de la adsorción en la resina. Es también evidente que se produjo una disminución en la cantidad de ADN genómico presente en la muestra filtrada, en comparación con la muestra no filtrada. No se produjeron diferencias observables en la cantidad de ARN más pequeño y ADN más pequeño aislado en comparación con la orina sin filtrar.

D) Comparación entre diferentes resinas de intercambio aniónico

Para estos experimentos, la orina no filtrada (20 ml) se unió a aproximadamente 400 µl de cada resina por el método discontinuo durante 30 min (como se resume en la Tabla 1). El volumen de resina se midió por adición de la

suspensión de resina comercial a una probeta o jeringa, y eliminando el líquido por decantación. Las mezclas se centrifugaron durante 5 min a 1900 g y la resina aglomerada se enjuagó después con alícuotas de 1 ml de concentraciones de cloruro de sodio crecientes, siendo la concentración final de NaCl 2 M (1,1) y a continuación se enjuagó con tiocianato de guanidina 2 M. Las fracciones recogidas se precipitaron con glucógeno e isopropanol y se volvieron a suspender en 100 µl de TE (tampón Tris 10 mM y EDTA 1 mM)

Tabla 1

Resina	N.º de cat. GEN.º de lote	N.º de lote	Grupo funcional	Capacidad	Capacidad
DEAE - Sepharose™	17-0709-10	307354	Intercambiador aniónico débil de dietilaminoetilo	0,11-0,16 mmol (Cl)/ml	110 mg HSA/ml medio
ANX-4 Sepharose™	17-1287-10	303229	Intercambiador aniónico débil de dietilaminopropilo	0,13-0,18 mmol (Cl)/ml	5 mg de tiroglobulina/ml
Q-Sepharose™	17-0510-10	310297	Intercambiador aniónico fuerte de amonio cuaternario	0,18-0,25 mmol (Cl)/ml	120 mg HSA/ml medio
Q-Sepharose XL™	17-5437-10	303229	Intercambiador aniónico fuerte de amonio cuaternario modificado	0,18-0,26 mmol Cl/ml	130 mg BSA/ml medio

Además, el contenido de ácido nucleico de las fracciones purificadas se determinó mediante ensayo para la secuencia de nucleótidos que codifica la β-Actina, usando la PCR en tiempo real. La mayoría de la plantilla amplificable se eluyó con NaCl de 650 a 800 mM. Las condiciones del ensayo para una reacción de 25 µl fueron las siguientes: MgCl₂ 3,0 mM, 0,2 mM d(A, G, C)TP, dUTP 0,4 mM, 0,2 µM de cebadores, 0,1 µM de sonda, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 5 mM, gelatina al 0,001 %, y 0,3 Utaq (Jump Start, Sigma D4184). Después de 1 minuto a 95 °C, la amplificación se llevó a cabo en 50 ciclos de 30 segundos a 96 °C y 1 min a 60 °C. Los siguientes cebadores se utilizaron en las reacciones de la PCR:

Cebadores:

β-Actina directo 5' - CCCTGGAGAAGAGCTACGAG - 3'
 β-Actina inverso 5' - AGGAAGGCTGGAAGAGTGC - 3'
 β-Actina sonda FAM 5' - TGACGGCCAGGTCATCACCA - 3'

La Figura 4A muestra el comportamiento de adsorción-elución de ácido nucleico de cada resina. Para estos experimentos, los ácidos nucleicos se eluyeron tanto de Q-sepharose como de ANX usando NaCl 0,50 - 0,9 mM para elución. La elución de ácidos nucleicos se produjo para la resina DEAE con NaCl de 0,3 a 0,5 mM, y para la resina XL con de 0,75 mM a aproximadamente 1,2 mM. La Figura 4B muestra la cantidad total de ácidos nucleicos que se recuperaron de cada resina a medida que aumentaba el gradiente de NaCl. Tal como se muestra en las Figuras 4A y 4B, se recuperó aproximadamente la misma cantidad de ácido nucleico desde ANX y Q-sepharose; menos cantidades de ácido nucleico desde DEAE, y una cantidad significativamente inferior para la resina XL.

E) Elución en gradiente por etapas del complejo nucleoproteína/resina

Para estos experimentos, 20 ml de muestra de orina sin filtrar se adsorbieron en 400 µl de Q-Sepharose™ y se eluyeron por etapas con porciones de 1 ml de solución de NaCl con concentraciones de 300 mM a 2,0 M, y finalmente con isotiocianato de guanidina 2,0 M. Las fracciones se recogieron, y se sometieron a análisis mediante PCR y se examinaron mediante electroforesis en gel de acrilamida al 6 %. El gel se reveló en primer lugar con SYBR® Gold para visualizar los ácidos nucleicos, y después con el colorante Silver para visualizar las proteínas.

Tal como se muestra en la Figura 5, tanto las proteínas como los ácidos nucleicos se pueden eluir selectivamente de la resina y el contenido se puede controlar mediante la concentración de NaCl. Por ejemplo, las fracciones 1-4 contienen principalmente proteínas y ácidos nucleicos de bajo peso molecular, (<40 pb), las fracciones 5-8 contienen principalmente ácidos nucleicos de (40-400 pb) y las fracciones 9 y superiores contienen principalmente los ácidos nucleicos de peso molecular elevado. Finalmente, la fracción final, obtenida mediante la elución con isotiocianato de guanidina 2,0, contenía proteínas que no se habían eluido en las fracciones anteriores.

F) Fraccionamiento en columna de gel de sílice de ácidos nucleicos de la orina.

Los ácidos nucleicos eluidos de la resina Q se separaron en fracciones de alto y bajo peso molecular como se describe a continuación.

Fracción de peso molecular elevado (HMW):

A los ácidos nucleicos eluidos con alto contenido salino se añadieron volúmenes iguales de soluciones de EtOH 100 % y GuSCN (isotiocianato de guanidina) 6 M (hasta concentraciones finales de 33 % y 2 M, respectivamente). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se aplicó a una minicolumna de gel de sílice Axigen

mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 1 min. La fracción de flujo pistón (FT) se recogió para la posterior purificación de ácidos nucleicos de bajo peso molecular. La columna se lavó una vez con 500 µl de LiCl 2 M/EtOH al 70 % seguido por dos lavados con KOAc 80 mM pH 5,0, EtOH al 80 %. La columna se transfirió a un nuevo tubo de recogida, se centrifugó durante 1 min a 10.000 rpm durante 3 min para secar la membrana. Los ácidos nucleicos se eluyeron con 50 µl de Tris-HCl 1 mM (pH 8,0)/EDTA 25 µM EDTA (pH 8,0) en un nuevo tubo de recogida como fracción HMW. Estos resultados se resumen en la Figura 11.

Fracción de peso molecular bajo (LMW):

Al FT (véase anteriormente) se añadió EtOH 100 % hasta una concentración final de aproximadamente un 75 %, se mezcló, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, y se aplicó a una minicolumna de gel de sílice Axigen mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 1 min. Las etapas posteriores fueron idénticas a las descritas para la fracción HMW. En la Figura 11 se resumen los resultados de estos experimentos.

G) Estabilidad de los ácidos nucleicos unidos a Q-Sepharose

Se estudió el efecto de varias condiciones sobre la estabilidad de los ácidos nucleicos unidos a la columna de Q-Sepharose™, usando β-Actina y Lambda como analitos. Para estos experimentos, orina no filtrada (20 ml) y 300 µl de resina se mezclaron por el método discontinuo. La resina recogida se eluyó con 1 ml de TE, 1 ml de NaCl 400 mM en TE. A continuación se eluyeron cuatro resinas/columnas diferentes bien con NaCl 1 mM en TE, tampón del kit de eliminación de nucleótido de Qiagen (tampón PN, tampón de solubilización), tampón del kit Qiagen Viral (tampón AVL, tampón de solubilización) o GuSCN 3,0 M. Cada una de las soluciones eluidas se procesó a continuación mediante precipitación simultánea en glucógeno/isopropanol, protocolo de eliminación de nucleótidos (Qiagen Manual), protocolo de aislamiento de ARN vírico (Qiagen Manual), o protocolo Promega Wizard, respectivamente. Usando 1 ml de equivalentes de orina por reacción de la polimerasa, se determinó la presencia del molde como se describe en el Ejemplo 1, sección D, usando los cebadores de β-Actina y una sonda TaqMan marcada con Fam. Las mismas muestras también se analizaron para determinar su efecto sobre la amplificación Lambda ADN enriquecido con los cebadores (Lmd f, Lmd r) y la sonda Hex (Lmg Hex). Se utilizaron los siguientes tres cebadores Lambda:

Cebadores Lambda:

Lmd_f 5' - ACTTTATGAAAACCCACGTTGAGC - 3'

Lmd_r 5' - CCAGAAGCCACGCCATTAG - 3'

Lmg Hex sonda 5' - TGGGTAATGCGCGGGTTGTCCTTT - 3'

Las curvas de calibración se generaron con patrones humanos y ADN genómico de fago lambda y se resumen en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2

Orina (A ₂₆₀)	Resina	Elución (1 ml)	β- Actina		Lambda	
			Tc	ng/reac.	Tc	ng/reac.
16	Q	NaCl 1 M	-		-	
		Tampón PN	25,3	3,04	25,7	1,37
		Tampón AVL	24,9	3,84	26,0	1,14
		Tampón Wizard	24,9	3,95	25,7	1,38
48	Q	NaCl 1 M	-		-	
		Tampón PN	23,9	7,20	25,1	2,17
		Tampón AVL	23,7	8,35	24,5	3,37
		Tampón Wizard	24,7	4,38	24,7	2,94

A₂₆₀ - absorbancia UV de la muestra de orina, **Q** Q-Sepharose™- resina inicial con la carga del proceso discontinuo, **PN** – kit de eliminación de nucleótidos Qiagen, **AVL** – kit vírico de Qiagen, **Wizard** – usado GITC 3 M y 100 µl de suspensión de gel de sílice, **GITC 2 M** – siguiente elución después de NaCl 1 M.

Tabla 3
ADN patrón genómico

		β - Actina	Lambda
	ng/reac.	Tc	Tc
Control TE (5 μ l)		-	25,8
0,02 ng/ μ l	0,12	30,5	26,1
0,23 ng/ μ l	1,17	26,7	25,8
2,34 ng/ μ l	11,7	23,2	25,8
0,23 ng/ μ l (5/12)	1,17	23,8	26,4
Control TE (5 μ l)		-	25,1

Comparación de la estabilidad de los ácidos nucleicos almacenados en resina Q húmeda:

5 Se llevaron a cabo experimentos adicionales que determinan la estabilidad de los ácidos nucleicos unidos a Q Sepharose. Para estos experimentos, la orina no filtrada (10 ml) y 150 μ l de resina Q-Sepharose™ se mezclaron por el método discontinuo. La resina se lavó con 1 ml de TE, 1 ml de NaCl 400 mM en TE y finalmente con 1 ml de TE. La resina bien se dejó secar al aire a temperatura ambiente, o se protegió con más cantidad de TE. En puntos temporales dados, la resina se rehidrató con 1 ml de TE, y se eluyó con NaCl 1 M en TE. Esta se precipitó con glucógeno e isopropanol, de los que 2 ml de equivalentes de orina se cargaron sobre el gel. Tal como se muestra en la Figura 6, la mezcla de ácidos nucleicos y proteínas permaneció inalterada durante 11 días cuando se unió a la resina Q-Sepharose™, tanto seca (hileras 5-7) o en solución tamponadora (hileras 8-10).

15 Además, se realizaron experimentos para examinar, mediante PCR en tiempo real, la estabilidad de moldes de ácido nucleico almacenados como complejos de nucleoproteína/resina Q. De manera similar, la Figura 7 ilustra que los moldes de ácido nucleico permanecen estables durante 11 días. Los resultados de estos experimentos indican claramente que, tras la adsorción y almacenamiento en Q-Sepharose™, los ácidos nucleicos permanecen estables (Tabla 4).

20

Tabla 4

Resina	Tampón de almacenamiento	Días	Tc	ng/reac.
Q	T	0	28,1	0,27
	TE	0	28,1	0,28
	EtOH al 20 %	0	27,5	0,37
	EtOH al 40 %	0	28,6	0,21
	EtOH al 60 %	0	28,4	0,23
Q	T	2	28,4	0,23
	TE	2	27,9	0,30
	EtOH al 20 %	2	27,7	0,35
	EtOH al 40 %	2	27,9	0,30
	EtOH al 60 %	2	28,2	0,25
Q	T	5	28,7	0,19
	TE	5	28,9	0,18
	EtOH al 20 %	5	28,6	0,20
	EtOH al 40 %	5	28,5	0,22
	EtOH al 60 %	5	28,5	0,22
Q	T	8	28,5	0,21
	TE	8	28,7	0,19

Resina	Tampón de almacenamiento	Días	Tc	ng/reac.
	EtOH al 20 %	8	28,7	0,19
	EtOH al 40 %	8	29,5	0,12
	EtOH al 60 %	8	29,1	0,16
Q	T	11	28,8	0,18
	TE	11	28,1	0,27
	EtOH al 20 %	11	28,7	0,20
	EtOH al 40 %	11	28,6	0,20
	EtOH al 60 %	11	28,2	0,25

H) Discontinuo vs. columna vs. vacío

- 5 Se realizaron experimentos para demostrar que la velocidad de carga de la muestra de orina en Q-Sepharose™ tiene un efecto mínimo sobre la unión de los diferentes componentes. Para estos experimentos, se cargó orina (20 ml) en cuatro resinas diferentes (400 µl) de cuatro formas diferentes:
1. De forma discontinua, como se ha descrito anteriormente, mezclando la resina y la muestra de orina durante 40 minutos.
 - 10 2. Mediante contacto rápido (un minuto con una minicolumna Q-Sepharose™ empaquetada: (Columnas disponibles de Bio-Rad: 5 cm Bio-Spin 732-6008 o 3 cm Micro BioSpin 732-6204; o de Sigma C2728-200 o una columna equivalente fritada con un tamaño de poro de 30 µm).
 - 15 3. Mediante contacto lento (aproximadamente 8 minutos) con minicolumnas Q-Sepharose™ empaquetadas. Las columnas se eluyeron a 2.500 rpm (1303 g) durante 5 minutos usando una centrifuga Sorvall TR-5 (Newtown, CT), RTH-250 con un rotor de cangilones basculantes, mediante jeringa a través de un cartucho de columna de resina empaquetada (de 3 a 6 minutos), o
 4. Mediante el uso de una toma de vacío en un cartucho de resina Q-Sepharose™ empaquetada con un accesorio luer lock.
- 20 Tras la carga, en cada caso, la resina se enjuagó con NaCl 400 mM y se eluyó con NaCl 1 M en TE. los ácidos nucleicos se precipitaron junto con el transportador, por ejemplo, glucógeno e isopropanol. Cada hilera contiene 4 ml de equivalentes de orina. Como se muestra en la Tabla 5 y en la Figura 8, no hubo diferencias en la adsorción con Q-Sepharose de los ácidos nucleicos independientemente del método de carga.
- 25 Un análisis mediante PCR muestra una retención similar del molde para todas las muestras medidas. Los datos se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5

Resina	Método de flujo	Tiempo	Tc
Q-Sepharose™	Discontinuo	40:00	24,4
	Lento	8:20	25,1
	Rápido	0:45	25,1
	Vacío	6:02	24,8
DEAE-Sepharose	Discontinuo	40:00	26,7
	Lento	8:13	25,8
	Rápido	0:54	25,9
	Vacío	3:36	25,7
XI-Sepharose	Discontinuo	40:00	41,2
	Lento	8:37	no aplicable
	Rápido	0:55	39,0
	Vacío	4:37	27,8
ANX-4-Sepharose	Discontinuo	40:00	24,6

Resina	Método de flujo	Tiempo	Tc
	Lento	8:30	24,8
	Rápido	0:54	25,2

El método de aislamiento de ácidos nucleicos a partir de orina presente se resume gráficamente en las Figuras 9 y 10.

5 Ejemplo 2

Preparación del plasma:

10 Para estos experimentos, se recogieron muestras de sangre de donantes sanos en tubos para extracción de sangre venosa BD VACUTAINER que contenían EDTA como anticoagulante EDTA (K3). Las células sanguíneas se eliminaron mediante centrifugación durante 10 min a 1.000 rpm.

Aislamiento de los ácidos nucleicos contenidos en plasma sanguíneo

15 Protocolo 1 (aislamiento de ADN).

La muestra de plasma se complementó con un volumen equivalente de solución de NaCl 0,4 M NaCl preparada con TE. Veinte mililitros de plasma diluido se mezclaron con 0,5 ml de suspensión de resina Q y se incubaron de 15 a 60 min a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se centrifugó durante 5 min a 1900 x g y la resina aglomerada se transfirió a una minicolumna (Bio-Rad). Antes de la elución con NaCl 1,0 M, la resina se lavó dos veces con NaCl 0,5 M. Los ácidos nucleicos eluidos se precipitaron mediante la adición de un volumen equivalente de isopropanol al 100 % usando glucógeno como transportador y se volvieron a suspender en 100 µl de TE (tampón Tris 10 mM y EDTA 1 mM).

25 Protocolo 2 (aislamiento de ADN y de ARN)

Preparación del plasma para unión a Q: 1 ml de una muestra de plasma de un voluntario sano se suplementó con EDTA y tampón Tris-HCl (pH 8,0) hasta concentraciones finales de 50 mM y se digirió con 75 µl de proteinasa K (Qiagen) durante 1 hora a 37 °C. Tras la digestión, el volumen de las mezclas se llevó hasta 5 ml por adición de 4 ml a una solución que contenía EDTA 50 mM; Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) y Tween 20 al 0,01 %. Unión a Q: Las muestras de plasma diluido se dejaron unir en forma discontinua durante 10 minutos en 250 µl de Q-Sepharose™ (GE Healthcare) sin lavar en un tubo de centrifuga de 15 ml a temperatura ambiente. La resina se recogió mediante centrifugación a 2.000 g durante 5 min a temperatura ambiente en una centrífuga clínica de sobremesa usando un rotor con canjilones oscilantes. Todo el sobrenadante, salvo aproximadamente 0,5 ml, se eliminó mediante aspiración. El aglomerado de resina se resuspendió en el resto del sobrenadante y se transfirió a una columna de cromatografía Micro Bio-Spin (Bio-Rad). La resina se recogió mediante centrifugación por pulsos en una micrófuga durante ~10 s (~10k rpm) y se descartó el líquido del flujo pistón. La columna se lavó tres veces con 500 µl de LiCl 300 mM/NaOAc 10 mM (pH 5,2).

40 Elución de ácidos nucleicos unidos a Q-Sepharose™: Los ácidos nucleicos unidos se recogieron mediante dos eluciones consecutivas de 200 µl bien con LiCl 2 M/NaOAc 10 mM (pH 5,2) Los ácidos nucleicos purificados se desalaron mediante adsorción en gel de sílice como se ha descrito anteriormente.

45 Protocolo 3 (aislamiento de ARN)

Preparación del plasma para unión a Q: 1 ml de una muestra de plasma de un voluntario sano se suplementó con EDTA y tampón Tris-HCl (pH 8,0) hasta concentraciones finales de 50 mM y 40 µl del inhibidor de ARNsa - RNasecure (Ambion). La mezcla se calentó durante 10 min a 60 °C para inactivar la ribonucleasas presentes en el plasma. Para la digestión de las proteínas del plasma, se añadieron 75 µl de proteinasa K (Qiagen) a la mezcla y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Tras la digestión, el volumen de las mezclas se llevó a 5 ml por adición de 4 ml de una solución que contenía EDTA 50 mM; Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) y Tween 20 al 0,01 %.

55 Unión a Q: La muestra de plasma diluido se dejaron unir en forma discontinua durante 10 minutos en 250 µl de Q-Sepharose™ (GE Healthcare) sin lavar en un tubo de centrifuga de 15 ml a temperatura ambiente. La resina se recogió mediante centrifugación a 2.000 g durante 5 min a temperatura ambiente en una centrífuga clínica de sobremesa usando un rotor con canjilones oscilantes. Todo el sobrenadante, salvo aproximadamente 0,5 ml, se eliminó mediante aspiración. Los aglomerados de resina se resuspendieron en el resto de sobrenadantes y se transfirió a una columna de cromatografía Micro Bio-Spin (Bio-Rad). La resina (volumen empaquetado de ~65 µl) se recogió mediante centrifugación por pulsos en una micrófuga durante ~10 s (~10.000 rpm) y se descartó el líquido del flujo pistón. La columna se lavó tres veces con 500 µl de LiCl 300 mM/NaOAc 10 mM (pH 5,2).

Elución de ácidos nucleicos unidos a Q-Sepharose™: Los ácidos nucleicos unidos se recogieron mediante dos eluciones consecutivas de 200 µl bien con LiCl 2 M/NaOAc 10 mM (pH 5,2) o el reactivo TRIzol™ (Invitrogen).

5 Separación de las fases de TRIzol™: Los eluatos de 200 µl de TRIzol de cada columna se combinaron y se complementaron con 80 µl de CHCl₃/alcohol isoamílico (24:1). Las muestras se agitaron manualmente y después de 3 min de incubación a temperatura ambiente se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 min a 4 °C. 240 µl de la fase acuosa superior de cada tubo se transfirieron a tubos nuevos.

10 Precipitación de los ácidos nucleicos eluidos con TRIzol™: Los ácidos nucleicos de la fase acuosa se precipitaron a -20 °C durante 30 min mediante la adición de 1 µl de glucógeno 20 mg/ml (Roche) y 240 µl de alcohol isopropílico al 100 %. El precipitado se recogió mediante centrifugación y se lavó dos veces con 200 µl de etanol al 70 %. El aglomerado se secó durante 5 min a temperatura ambiente y a continuación se volvió a suspender en 30 µl de EDTA 0,1 mM/1x RNA Secure (Ambion). La muestra se incubó a 60 °C durante 10 min para inactivar cualquier actividad ARNasa o ADNsa residual.

15 La purificación de los ácidos nucleicos eluidos con gel de sílice se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.
Análisis de los ácidos nucleicos purificados a partir del plasma: La preparación de ácido nucleico del plasma eluida con TRIzol se sometió a análisis adicional. Los inventores seleccionaron el microARN 16 (mir-16), expresado de forma abundante, como diana. Alícuotas de 5 µl de cada muestra de ácido nucleico del plasma eluida con TRIzol se sometió a una reacción de la PCR cuantitativa con TaqMan microRNA usando cebadores y sondas suministrados por Applied Biosystem. Las reacciones se llevaron a cabo esencialmente según las recomendaciones del fabricante. Mir-16 se detectó fácilmente en la preparación de ARN del plasma. En la Figura 12 se resumen los resultados de estos experimentos.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar ácidos nucleicos de una muestra de orina que comprende:

5 separación de la muestra de orina en una fracción exenta de células, que contiene ácidos nucleicos en el intervalo de 10 a 100 pares de bases, por eliminación de las células y los residuos insolubles mediante filtración o centrifugación;
 aplicación de la fracción exenta de células que contiene los ácidos nucleicos o sus complejos proteínicos a un material de intercambio aniónico que comprende grupos amonio cuaternarios, y quedando dichos ácidos nucleicos o sus complejos adsorbidos sobre dicho material;
 10 elución de los ácidos nucleicos unidos haciendo pasar por dicho material de intercambio aniónico una solución acuosa fuertemente salina que eluye los ácidos nucleicos diana o los complejos proteínicos de los mismos adsorbidos sobre el material de intercambio aniónico;
 y purificación mediante gel de sílice de los ácidos nucleicos eluidos con la solución fuertemente salina para
 15 proporcionar ácidos nucleicos exentos de células en el intervalo de 10 a 100 pares de bases.

2. Un método para aislar ácidos nucleicos de una muestra de plasma sanguíneo que comprende:

20 separación de la muestra de sangre en una fracción de plasma sanguíneo exenta de células, que contiene ácidos nucleicos en el intervalo de 10 a 100 pares de bases, por eliminación de las células y los residuos insolubles mediante filtración o centrifugación;
 aplicación de la muestra de plasma sanguíneo exenta de células que contiene los ácidos nucleicos o sus complejos proteínicos a un material de intercambio aniónico que comprende grupos amonio cuaternarios, y quedando dichos ácidos nucleicos o sus complejos adsorbidos sobre dicho material;
 25 elución de los ácidos nucleicos unidos haciendo pasar por dicho material de intercambio aniónico una solución acuosa fuertemente salina que eluye los ácidos nucleicos diana o los complejos proteínicos de los mismos adsorbidos sobre el material de intercambio aniónico;
 y purificación mediante gel de sílice de los ácidos nucleicos eluidos con la solución fuertemente salina para
 30 proporcionar ácidos nucleicos exentos de células en el intervalo de 10 a 100 pares de bases.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que los ácidos nucleicos se seleccionan del grupo que consiste en ADN bicatenario y monocatenario y ARN.

35 4. El método de la reivindicación 1 o 2 que comprende la etapa de mantener el complejo de ácido nucleico/intercambio aniónico en almacenamiento durante hasta 3 semanas.

5. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además lavar dicho material de intercambio aniónico con una solución acuosa de una sal a la que los ácidos nucleicos quedan unidos en dicho material de intercambio aniónico, teniendo dicho lavado suficiente volumen y fuerza iónica para lavar los componentes no unidos o unidos débilmente a través de dicho material de intercambio aniónico.
 40

6. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además el análisis de los ácidos nucleicos aislados exentos de células.

45 7. El método de la reivindicación 1 o 2, donde dichos ácidos nucleicos aislados están en el intervalo de 10 a 40 pares de bases.

8. El método de la reivindicación 1 o 2, donde dicha elución comprende además la adición de isotiocianato de guanidina a dichos ácidos nucleicos diana o complejos proteínicos eluidos.
 50

9. El método de la reivindicación 1 o 2, donde dicho isotiocianato de guanidina es isotiocianato de guanidina 2 M.

FIG. 1

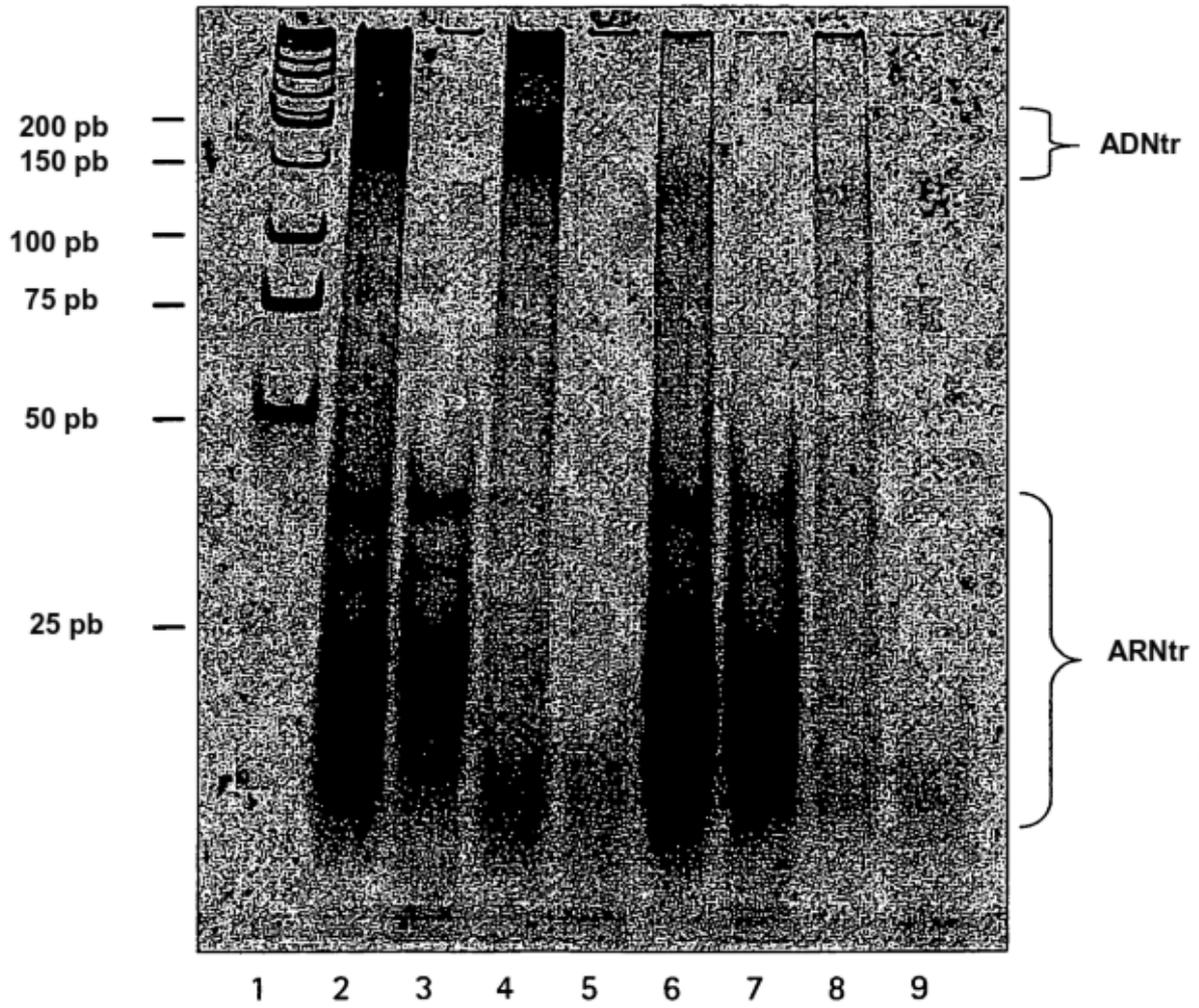


FIG. 2

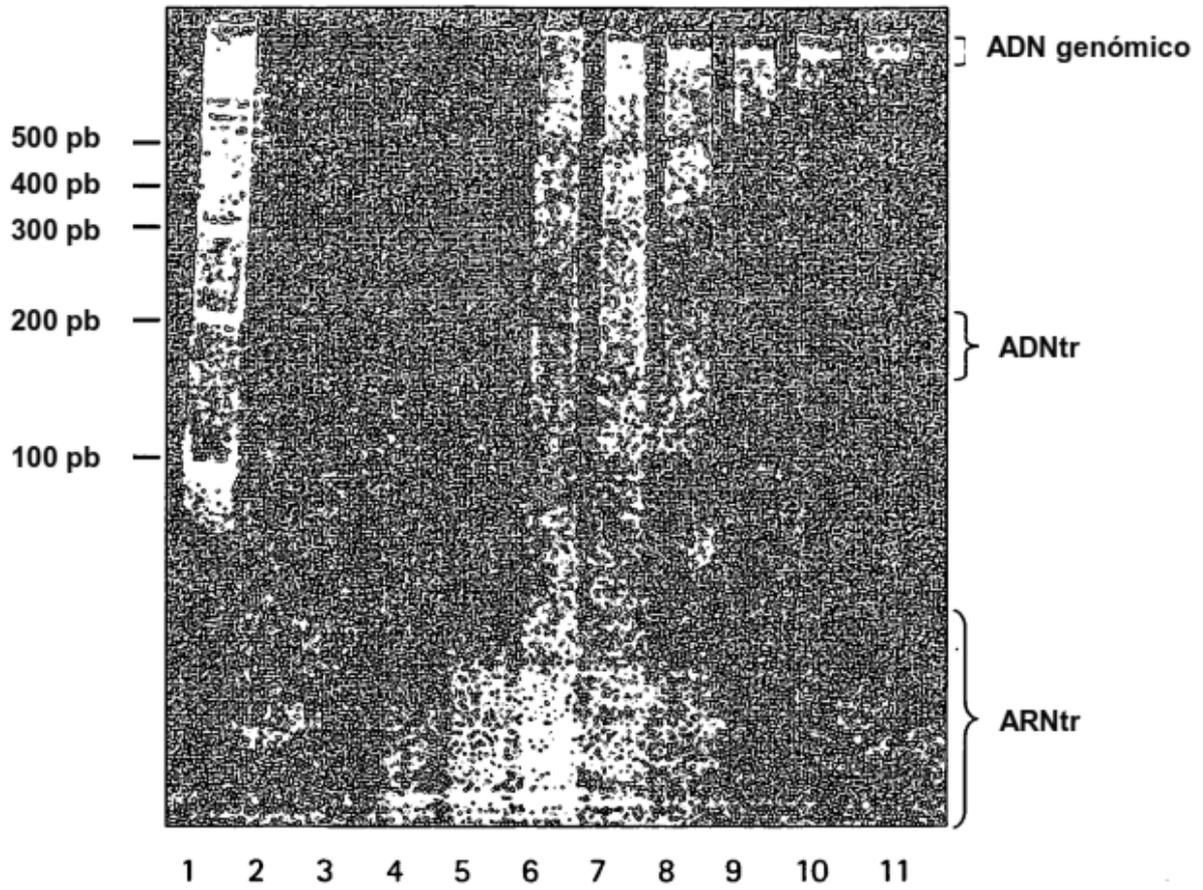


FIG. 3

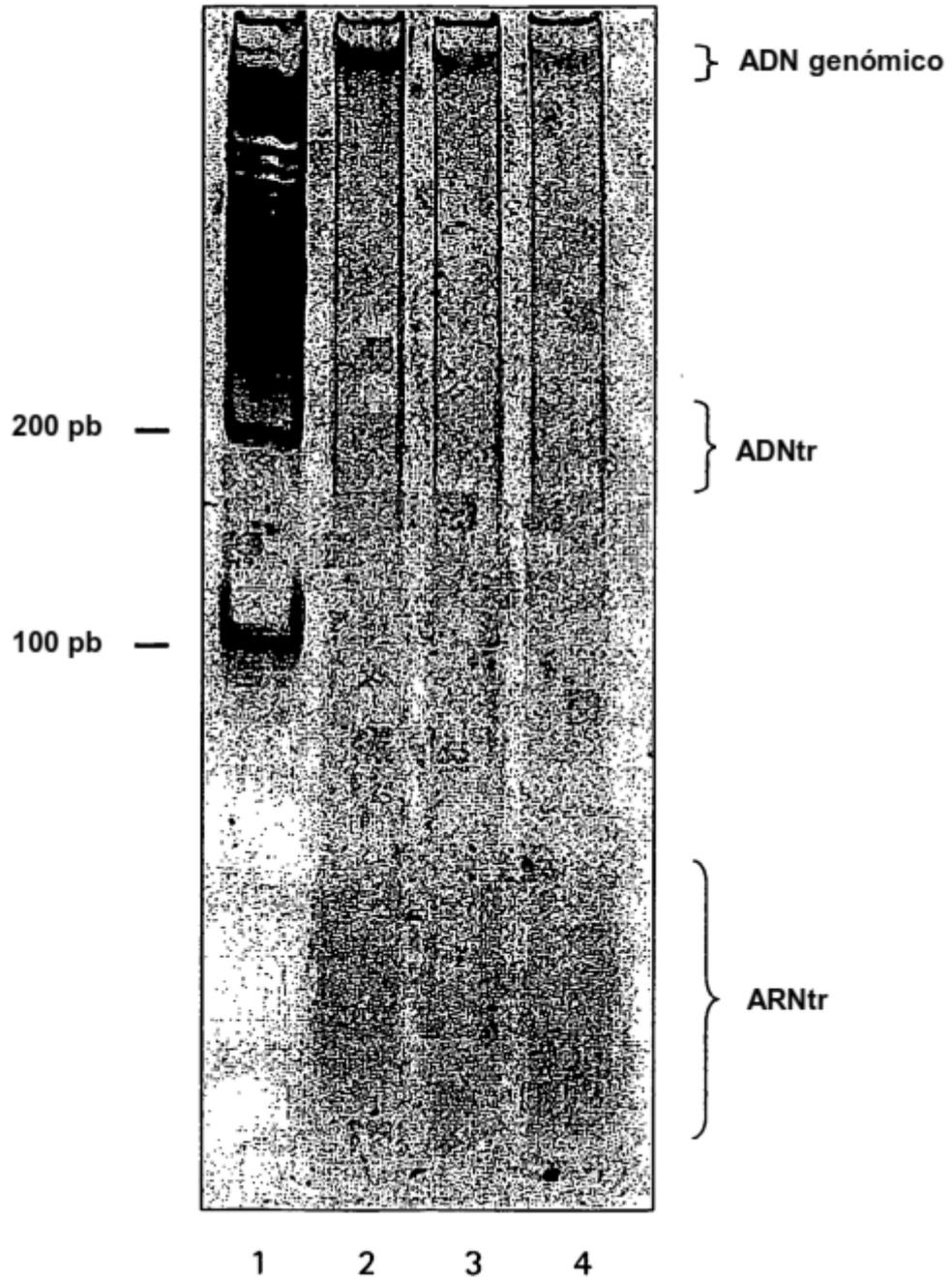


FIG. 4A

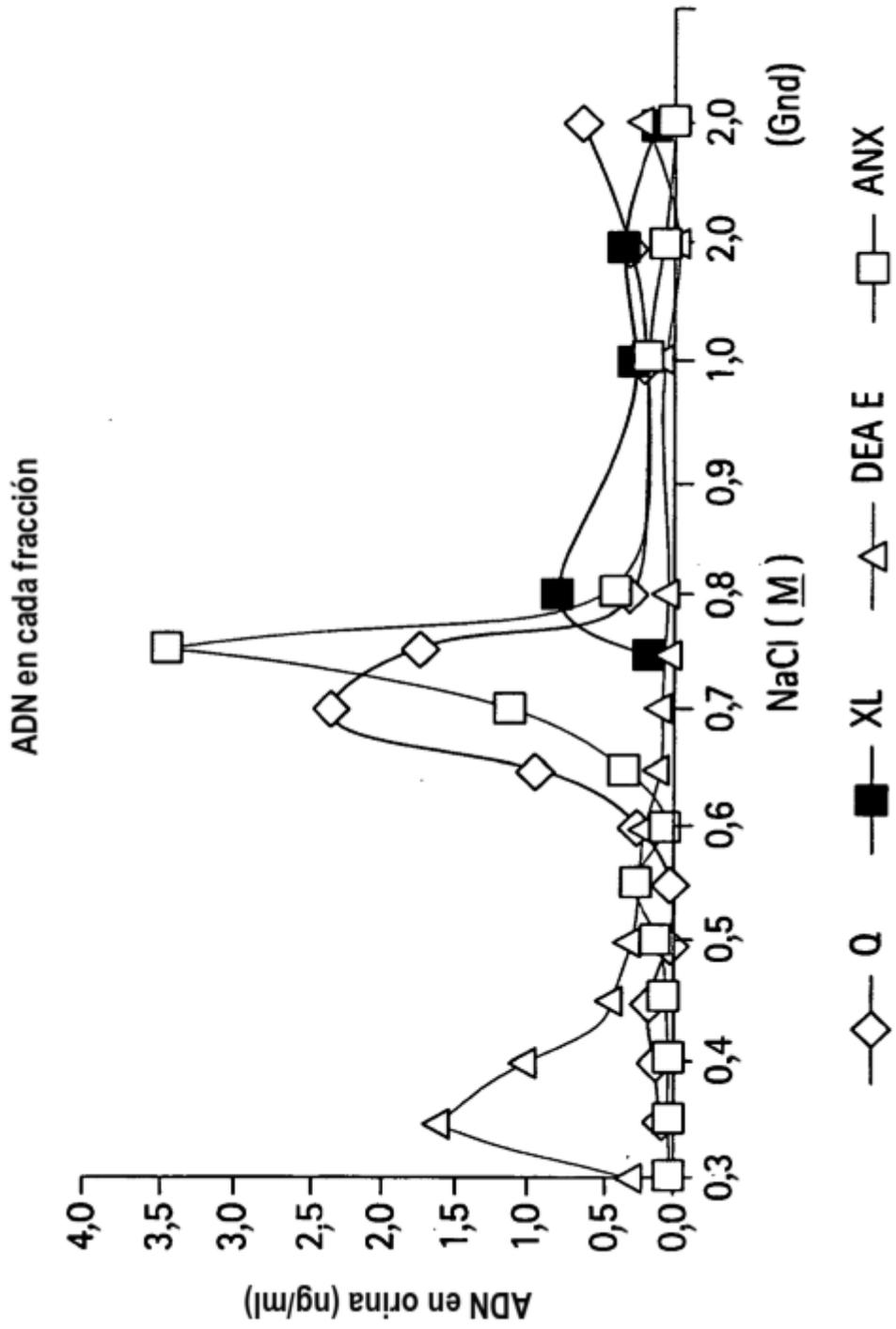


FIG. 4B

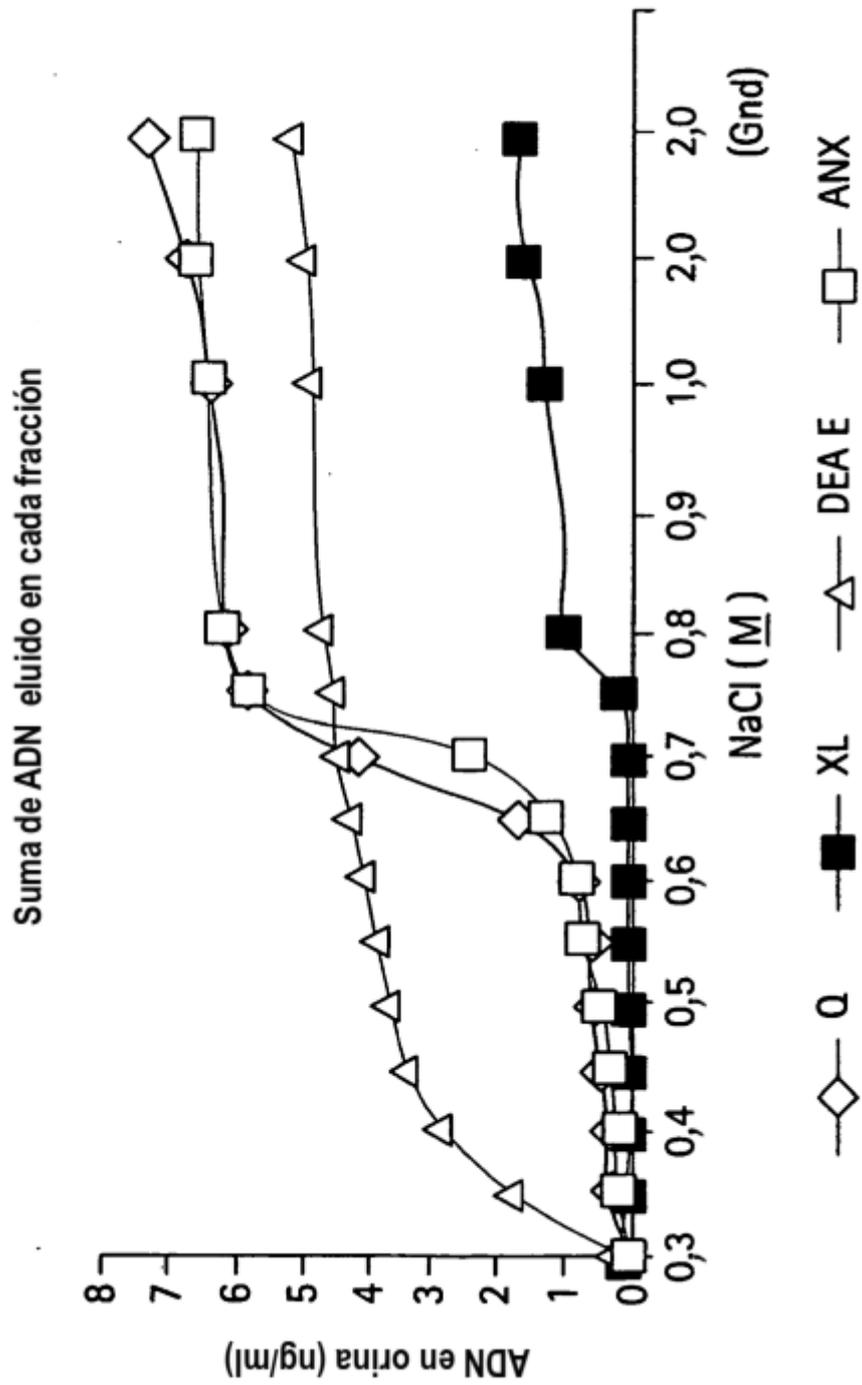


FIG. 5

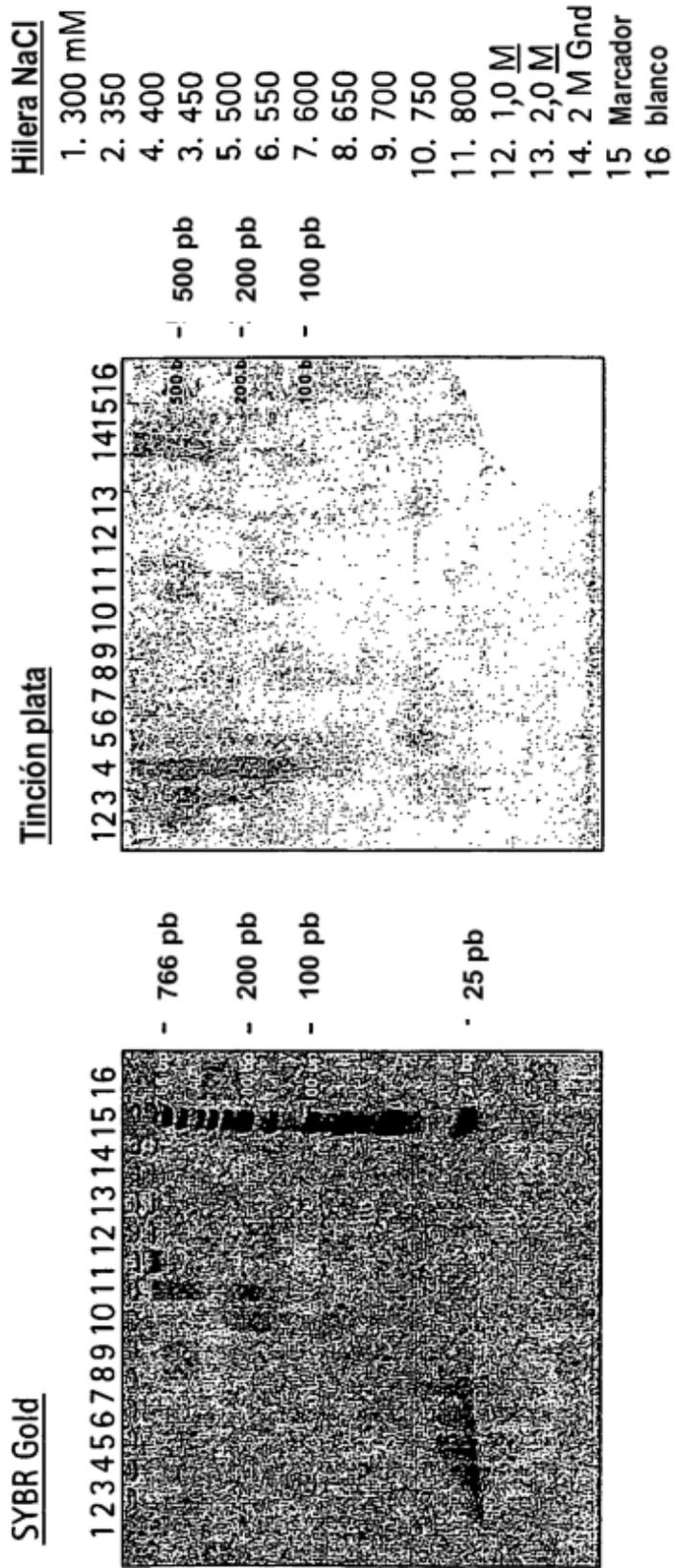


FIG. 6

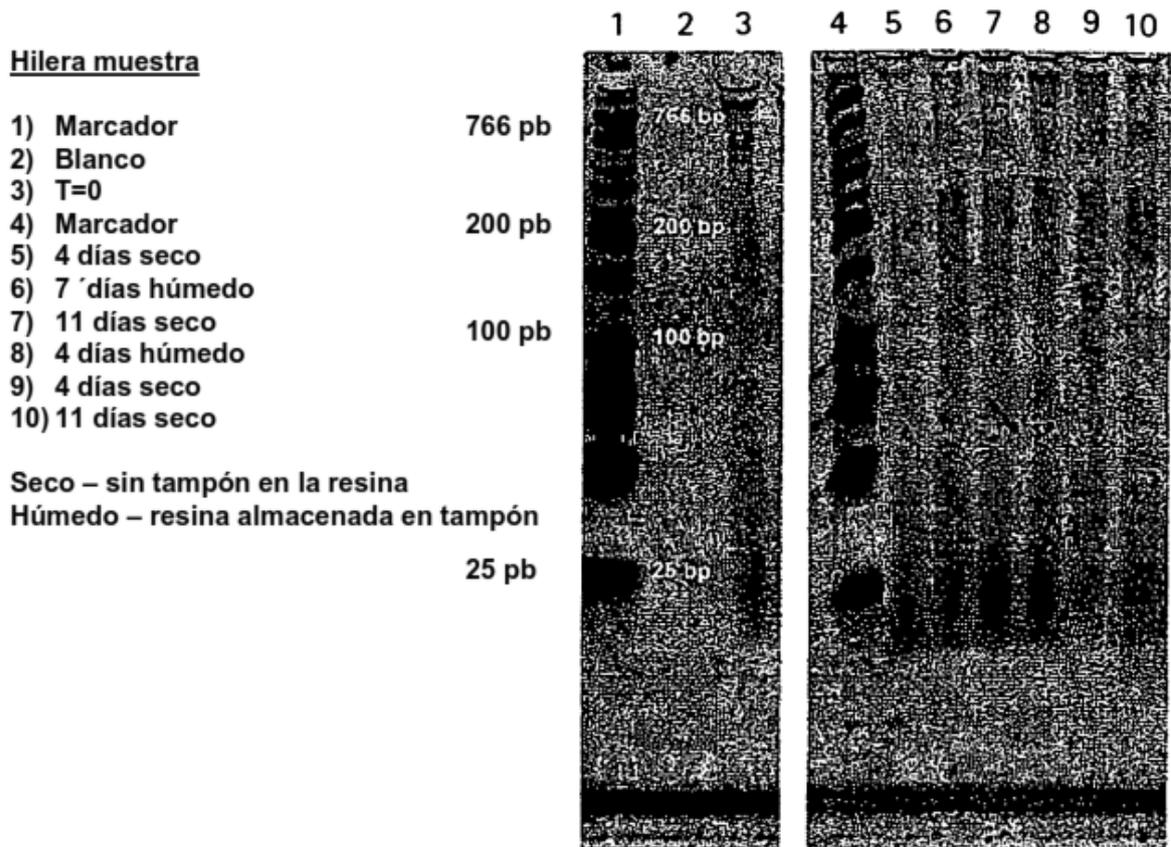


FIG. 7

Estabilidad del ADN adsorbido en resina
Almacenamiento del molde en resina Q (húmeda)

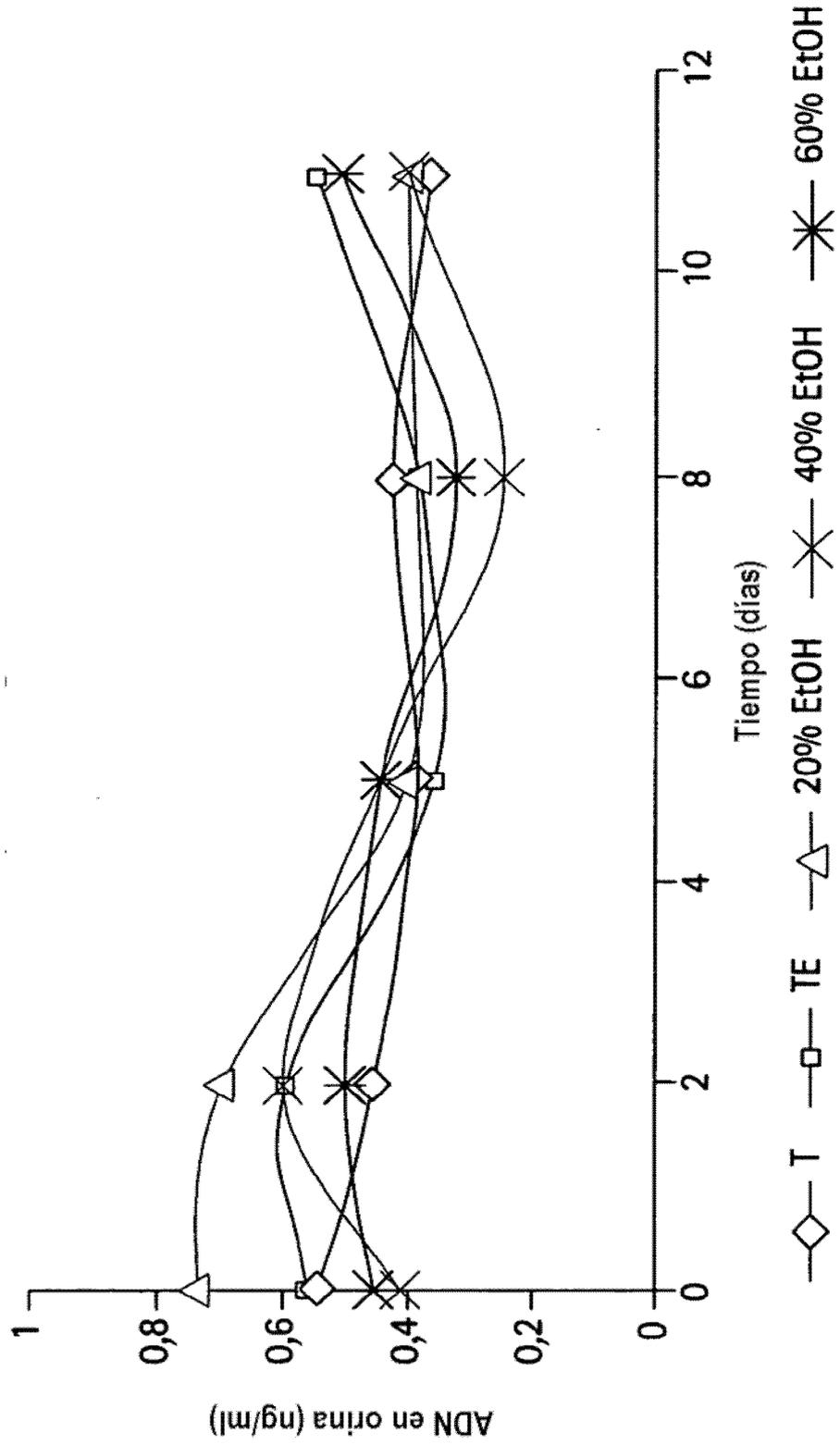
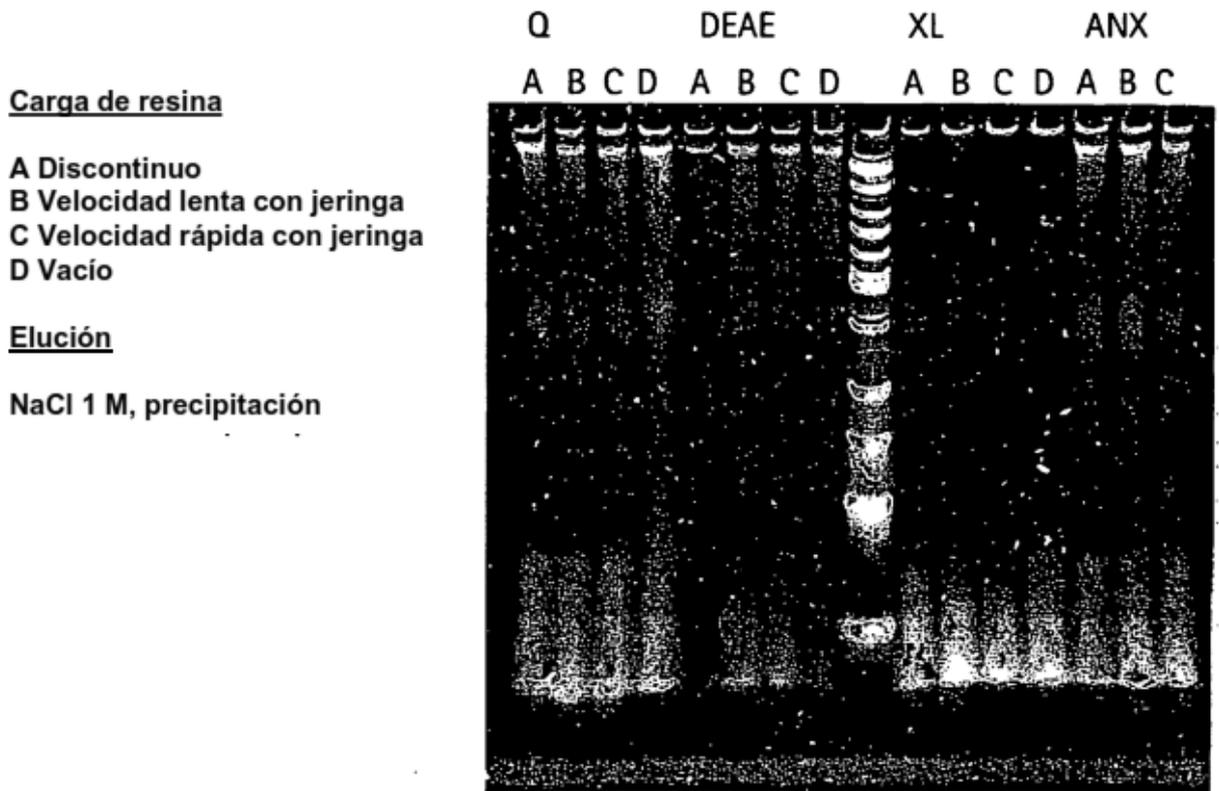


FIG. 8



Gel de poliacrilamida al 6%, tinción SYBR gold

FIG. 9

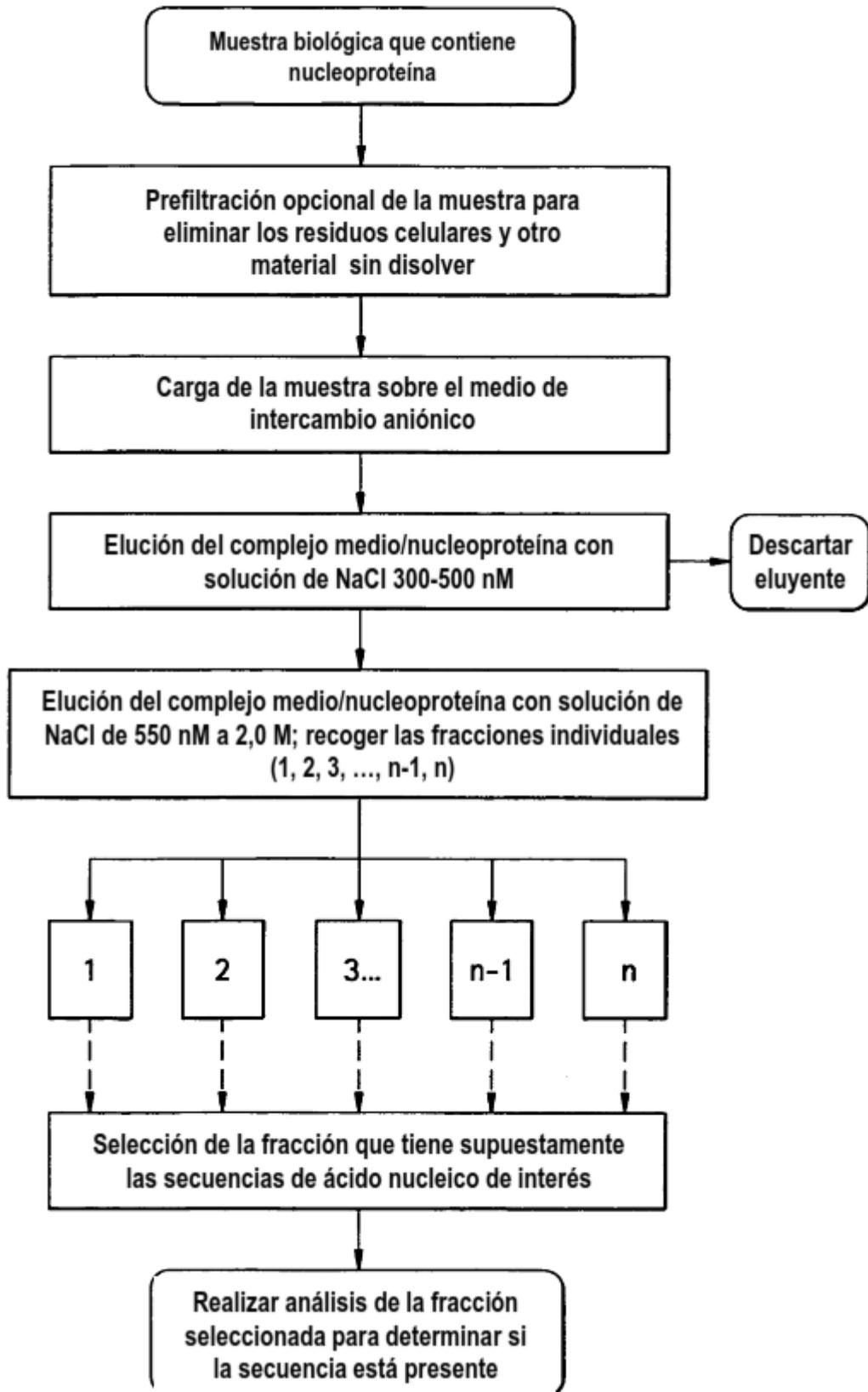


FIG. 10

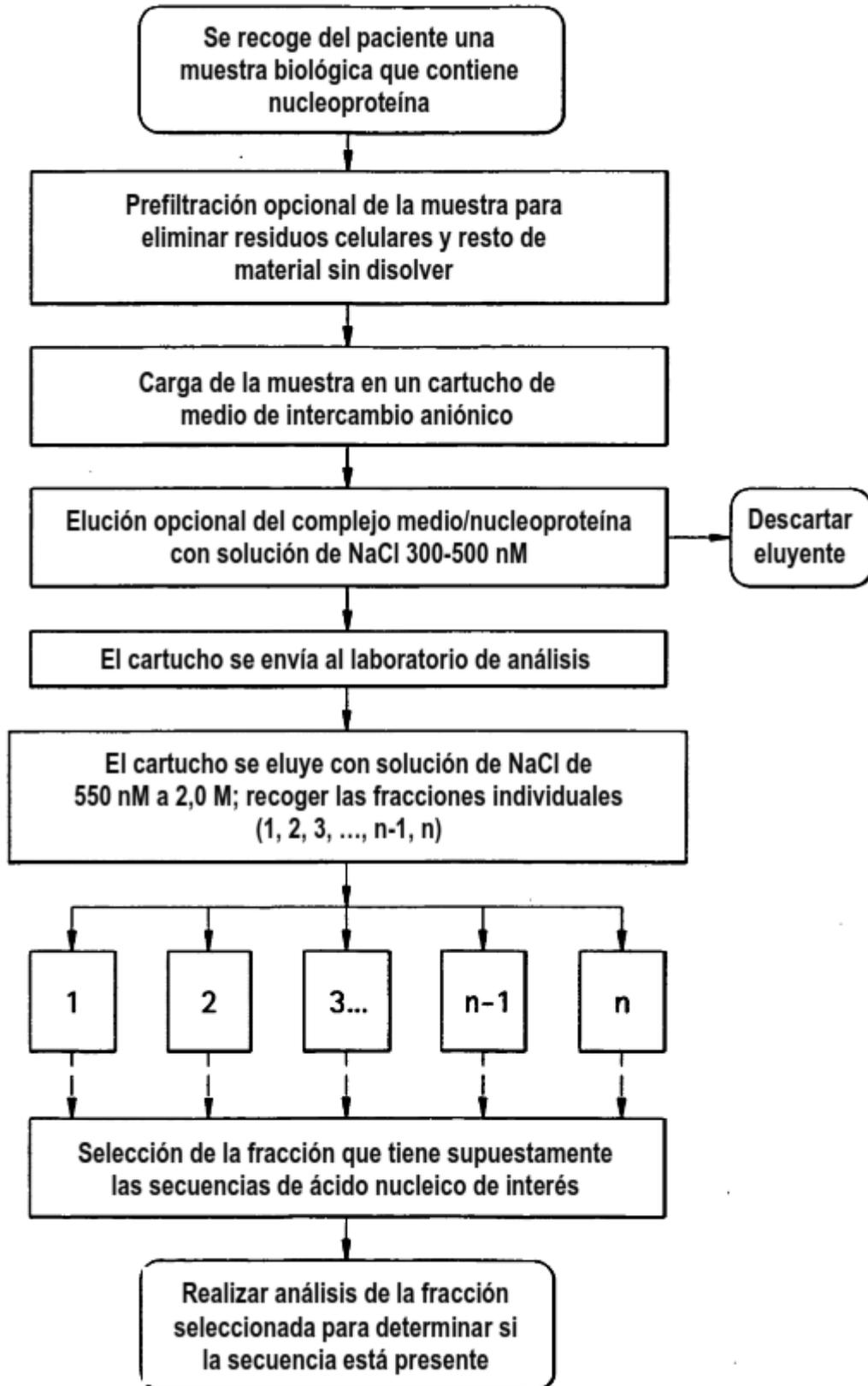


FIG. 11

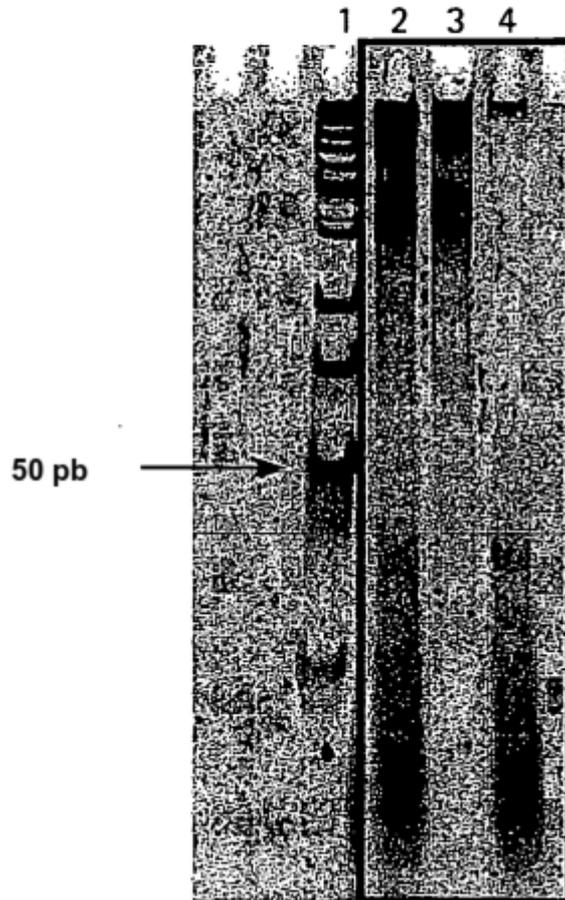


FIG. 12

