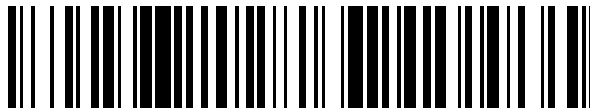


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 763**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2013 PCT/US2013/038576**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO2013165870**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2013 E 13784927 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2844755**

54 Título: **Métodos y composiciones para la extracción y el almacenamiento de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

30.04.2012 US 201213460076

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

24.04.2017

73 Titular/es:

**GENERAL ELECTRIC COMPANY (100.0%)
1 River Road
Schenectady, NY 12345, US**

72 Inventor/es:

**LI, BING;
MOORE, DAVID ROGER y
KVAM, ERIK LEEMING**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 609 763 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

Métodos y composiciones para la extracción y el almacenamiento de ácidos nucleicos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere normalmente a composiciones sólidas para la extracción, estabilización y conservación ambiental de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica en un formato seco. También se describen métodos para extraer, recoger, conservar y recuperar ácidos nucleicos a partir de composiciones sólidas.

Antecedentes

10 El ARN es una de las biomoléculas más inestables como consecuencia de la degradación tanto de la propia hidrólisis química como de la degradación mediada por enzimas. Por consiguiente, la extracción y conservación del ARN derivado de una muestra biológica es sensible a un número de factores ambientales que incluyen pero no se limitan al tampón utilizado para extraer o recoger el ARN, pH, temperatura, y particularmente la presencia generalizada de ribonucleasas resistentes (RNasas). Como resultado, el ARN en ambos estados purificado y no purificado normalmente ha requerido de almacenamiento a -80°C para prevenir la hidrólisis y la degradación enzimática y conservar la integridad de la muestra de ARN. La capacidad para extraer, recoger, y conservar el ARN
15 bajo condiciones ambientales es deseable económicamente para evitar los costes y el espacio requeridos que se asocian con la refrigeración a -80°C .

20 Las metodologías actuales para conservar el ARN bajo condiciones ambientales en un estado líquido se han focalizado en la desactivación de las RNasas a través del uso de, por ejemplo, detergentes, compuestos caotrópicos, agentes reductores, metales de transición, disolventes orgánicos, agentes quelantes, proteasas, inhibidores de la RNasa peptídica, y anticuerpos anti-RNasa. Se han focalizado esfuerzos adicionales en la modificación química del ARN para prevenir la transesterificación y la auto-hidrólisis. Muchos productos de conservación de ARN están disponibles comercialmente pero sólo pueden conservar el ARN durante días o semanas a temperatura ambiente. Las tecnologías actuales que reclaman la recolección y conservación eficaz del ARN en un formato seco normalmente requieren que el ARN primero se "pre-purifique" y concentre a partir del material biológico (por ejemplo, muestras tales como sangre, suero, tejido, saliva, etc.) antes del almacenamiento del ARN.
25

Las tecnologías actuales para la conservación del ARN en un formato seco requieren de instalaciones de secado adicionales. Estos métodos no conducen por lo tanto a la recolección directa de ARN a partir de una muestra (por ejemplo, una muestra biológica) sin un procesamiento significativo de la muestra.

30 Por consiguiente, son deseables y necesarios en la técnica composiciones y métodos que integren dentro de un único proceso la extracción, la estabilización, y el almacenamiento/conservación de ARN a partir de una muestra (por ejemplo, una muestra biológica). Tales composiciones y métodos permitirán el almacenamiento a largo plazo del ARN bajo condiciones ambientales y permitirán recuperar el ARN intacto para posteriores análisis.

Breve descripción

35 Se describe una matriz sólida para la extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos a partir de una muestra, tal como una muestra biológica como se define más abajo en la presente memoria, en donde una composición que comprende un desnaturalizante de proteínas, un agente reductor, y un tampón está presente en la matriz sólida en un formato seco. La aplicación instantánea de las matrices sólidas permiten un almacenamiento prolongado del ARN y del ADN en un formato seco bajo condiciones ambientales. Las matrices sólidas que comprenden ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN) en un formato seco se pueden someter a un proceso para liberar los ácidos nucleicos desde la matriz sólida en un formato intacto que es adecuado para análisis posteriores de las muestras de ácido nucleico obtenido. Se proporcionan también métodos de utilización de las matrices sólidas de la invención para extraer y almacenar ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica.
40

Dibujos

45 Estas y otras características, aspectos, y ventajas de las membranas porosas químicamente modificadas se entenderán mejor cuando se lean las siguientes descripciones detalladas en referencia a los dibujos que acompañan, en los que las características se presentan como partes, a través de los dibujos, en donde:

50 La FIG. 1 proporciona un electroferograma representativo de ácidos nucleicos recuperados a partir de celulosa utilizando electro-elución después de detectar células humanas cultivadas en matrices sólidas de diferentes composiciones. Se indican bandas de DNA genómico de alto peso molecular y ARNr 28s/18s. Se proporciona además la cuantificación de ADN y ARN utilizando Image J. Se dibujaron una vertical desde la cima de cada carril hasta la base en el panel A, y la intensidad de píxeles (unidades arbitrarias del valor gris) se trazó en función de la línea de distancia (cm) utilizando la función Dibujar Perfil. En las cajas se muestran los picos correspondientes al ADN genómico y al ARNr 28s/18s. En la sección de Ejemplos de abajo se establecen detalles experimentales
55 adicionales.

La FIG.2 proporciona las intensidades de píxeles del gel, presentadas como unidades arbitrarias del valor gris, para ARNr 28s y 18s para cada una de las composiciones representadas. Las muestras de celulosa se almacenaron durante 10 días a temperatura ambiente en un cabina desecadora antes del análisis. La relación de ARNr 28s para el 18s se indica encima de cada barra en la gráfica. En la sección de Ejemplos de abajo se establecen detalles experimentales adicionales.

La FIG. 3 proporciona las intensidades de píxeles del gel para el ARNr 28s y 18s para cada una de las composiciones representadas. Las muestras de celulosa se almacenaron durante 13 días a temperatura ambiente en una cabina desecadora antes del análisis. La relación de ARNr 28s para el 18s para cada una de las condiciones experimentales aparece encima de cada barra en la gráfica. En la sección de Ejemplos de abajo se establecen detalles experimentales adicionales.

La FIG. 4 proporciona las intensidades de píxeles del gel para el ARNr 28s y 18s para cada una de las composiciones representadas. Las muestras de celulosa se almacenaron durante 10 días a temperatura ambiente en una cabina desecadora antes del análisis. La relación de ARNr 28s para el 18s para cada una de las condiciones experimentales aparece encima de cada barra en la gráfica. En la sección de Ejemplos de abajo se establecen detalles experimentales adicionales.

La FIG. 5 proporciona las intensidades de píxeles del gel para las bandas de ARNr 28s y 18s para cada una de las composiciones mostradas. Las muestras de celulosa se almacenaron durante 30 días a temperatura ambiente en una cabina desecadora antes del análisis. La relación de ARNr 28s para el 18s para cada una de las condiciones experimentales aparece encima de cada barra en la gráfica. En la sección de Ejemplos de abajo se establecen detalles experimentales adicionales.

La FIG.6 proporciona los Números de Integridad del ARN (RIN) medidos a partir de las gotas de sangre seca en papel de celulosa, como se determinó en un Bionalizador Agilent 2100 usando ARN 6000 Pico LabChips para cada una de las condiciones enumeradas. En la sección de Ejemplos de abajo se establecen detalles experimentales adicionales.

La FIG.7 proporciona la evidencia de la protección del ARNm contra el daño solar en el papel de celulosa. Cada barra en la gráfica representa la diferencia de los umbrales del ciclo qRT-PCR entre las muestras tratadas con UV y las no tratadas que comprenden las composiciones indicadas en la figura. En la sección de Ejemplos de abajo se establecen detalles experimentales adicionales.

La FIG.8 proporciona la actividad TCEP en los papeles basados en celulosa en presencia de diferentes tampones y a diferentes temperaturas durante un periodo de 4 semanas. En la sección de Ejemplos se proporcionan detalles adicionales.

Descripción detallada

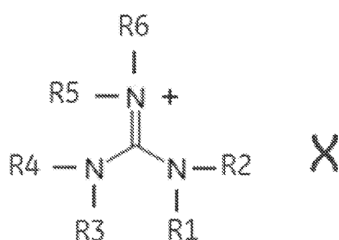
En la presente memoria se describen matrices sólidas para la extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN, ADN, o una combinación de los mismos) a partir de una muestra (por ejemplo, una muestra biológica), en donde en la matriz sólida está presente una composición en un estado seco que comprende un desnaturante de proteínas, un agente reductor, y un tampón. Las composiciones de la invención permiten la conservación seca prolongada de ácidos nucleicos bajo condiciones de almacenamiento ambientales. Esta observación es de una importancia particular con respecto a la conservación ambiental del ARN, el cual es muy conocido por ser inestable. El término "matriz sólida" como se utiliza en la presente memoria incluye pero no se limita a productos basados en celulosa, celulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio, o cualquier combinación de los mismos. Una matriz sólida de la presente aplicación puede ser porosa. En realizaciones particulares, la matriz sólida es un papel de celulosa porosa de Whatman™, tales como FTA™ o FTA™ Elute. El término "extracción" se refiere a cualquier método para separar y aislar los ácidos nucleicos a partir de una muestra, más particularmente una muestra biológica. Se pueden recuperar ácidos nucleicos tales como ARN y ADN, por ejemplo durante la lisis celular de la muestra por evaporación en el aire o por la presencia de compuestos en una matriz sólida químicamente modificada que en contacto con las muestras dan como resultado la lisis celular y la liberación de los ácidos nucleicos (por ejemplo, papeles de celulosa FTA™ Elute). Un experto en la técnica apreciará que se puede usar en las composiciones y métodos descritos cualquier método que dé como resultado la extracción de ácidos nucleicos, particularmente ARN, a partir de una muestra (por ejemplo, una muestra biológica sin purificar) tal que se capturen los ácidos nucleicos en la matriz sólida para la estabilización y conservación de los ácidos nucleicos. Los ejemplos anteriores de los métodos para la extracción de ácidos nucleicos a partir de una muestra se proporcionan sólo con fines ilustrativos. Los términos "almacenamiento" o "conservación" se pueden utilizar de forma intercambiable en la presente memoria con respecto a la conservación de los ácidos nucleicos extraídos en un formato adecuado para posteriores análisis.

Los artesanos expertos en el campo de los ácidos nucleicos, particularmente el ARN, tradicionalmente ensayan la estabilidad y calidad del ARN en base a: (1) la amplificación RT-PCR cuantitativa de los ARNm dianas; (2) el análisis del Número de Integridad del ARN (RIN) en un Bioanalizador Agilent 2100; y (3) la razón de ARN ribosomal (ARNr) 28s:18s, que comprende la mayoría del ARN celular total. El ARN celular de alta-calidad se muestra generalmente

en una razón de ARNr 28s:18s mayor de 1 y a una puntuación RIN próxima a 10. Por otra parte, el ARN celular de alta-calidad ayuda a la amplificación eficiente de tanto el ARNm de baja abundancia como el ARNm de gran abundancia (por ejemplo mayor de 1 kB). Por razones de conveniencia, se utilizan frecuentemente la intensidad de la señal de ARNr y la razón de ARNr 28s:18s para cribado rápido e identificación de muestras con fuertes propiedades de almacenamiento de ARN por electroforesis en gel.

Como se define en la presente memoria, una "muestra biológica" incluye pero no se limita a sangre, suero, tejido, y saliva obtenida a partir de cualquier organismo, incluyendo un ser humano. Las muestras biológicas se pueden obtener mediante un test auto-diagnóstico al que se somete un individuo (por ejemplo, monitorización de la glucosa en sangre) o mediante un profesional médico cualificado a través de una variedad de técnicas que incluyen, por ejemplo, aspiración de la sangre utilizando una aguja o raspado o hisopado de un área particular, tal como una lesión en la piel del paciente. Los métodos para la recogida de las distintas muestras biológicas son bien conocidos en la técnica. El término "muestra" incluye muestras biológicas como se definió anteriormente, pero también incluye, por ejemplo, células cultivadas de tejidos y ácidos nucleicos purificados.

En la matriz sólida seca de esta divulgación está presente una composición que comprende un desnaturalizante de proteínas, un agente reductor, y un tampón. La composición puede comprender uno o más de cada uno de los componentes enumerados anteriormente. La composición puede comprender además opcionalmente un inhibidor ultravioleta (UV), un recolector de radicales libres, un inhibidor de RNasa, un quelante, o cualquier combinación de los mismos. El artesano experto en la técnica apreciará que son conocidas en la técnica numerosas proteínas desnaturalizadas y que se pueden seleccionar empíricamente para usarse en las composiciones y métodos que aquí se describen. Sin la intención de limitar a un desnaturalizante de proteínas particular, ejemplos de proteínas desnaturalizadas incluyen tiocianato de guanidinio, hidrocloreto de guanidinio, arginina, dodecilsulfato sódico (SDS), urea, o cualquier combinación de los mismos. Debajo se indica un esquema de un ejemplo de un desnaturalizante de proteínas:



En donde cada radical R puede ser independientemente un miembro que se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un radical que contiene un heteroátomo o un radical hidrocarburo.

El radical que contiene el heteroátomo es un grupo que comprende un miembro o miembros seleccionados a partir de nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, silicio, y boro. Un objetivo es unir un compuesto que contiene una guanidina utilizando grupos funcionales reactivos. Grupos reactivos típicos que llevan heteroátomos incluyen epóxido, acrilato, maleimida, haluro de acilo, haluro de alquilo, azida, éster de cianato, isocianato, haluro de arilo, aldehído, amina, oxima, tiol, alcohol, ácido, aziridina, azo, isotiocianato, anhídrido, anhídrido mixto, lactona, sultona, y cetona.

El radical hidrocarburo es un grupo que comprende tanto carbono como hidrógeno, aunque también puede contener heteroátomos para mejorar la hidrofilia. Un objetivo es unir un compuesto que contiene una guanidina utilizando grupos funcionales reactivos. Grupos reactivos típicos que llevan hidrocarburo incluyen alilo, estirilo, vinilo, y alquino. Grupos hidrocarburos que contienen heteroátomos incluyen 2,3 ó 4-oxiestirilo, aminoalilo, oxialilo, oxivinilo, aminovinilo.

X es un anión, que es un radical que contiene uno o más cargas negativas formales. Un miembro o miembros que se seleccionan del grupo que consiste en cloruro, tiocianato, sulfato, fosfato, bromuro, clorito, clorato, tiosulfato, carbonato, carbonato de hidrógeno, acetato, formiato, fosfato de hidrógeno, fosfato de dihidrógeno. Está previsto que se puedan usar uno o más aniones y combinaciones de aniones que tienen varios niveles (divalente, monovalente, trivalente) de cargas formales. El peso molecular del anión puede variar de 10-100.000.

El término "agente reductor" se refiere a unas especies químicas que proporcionan electrones a otras especies químicas. De nuevo, son conocidos en la técnica una variedad de agentes reductores, y la lista de ejemplos que se proporciona abajo y en las reivindicaciones no pretenden limitar el agente o agentes reductores que se podrían usar en las composiciones y métodos de la presente divulgación. Ejemplos de agentes reductores incluyen ditiotreitól (DTT), 2-mercaptoetanol (2-ME), y tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP). Por otra parte, se puede utilizar cualquier combinación de estos u otros agentes reductores para ensayar la invención. En realizaciones particulares, el agente reductor es TCEP.

“Tampón” como se emplea en la presente memoria incluye, por ejemplo, 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris), ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico (MOPS), tampones citrato, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES), y tampones fosfato. Esta lista de tampones potenciales sólo es con fines ilustrativos. El artesano experto en la técnica reconocerá que el pH del tampón seleccionado es relevante para el uso en la composición y métodos descritos en la presente memoria. El pH del tampón estará normalmente en el intervalo de 3 a 8.

Como se indicó anteriormente, la composición presente en la matriz sólida puede comprender opcionalmente un protector UV o un recolector de radicales libres. Sin intención de limitar a ningún protector UV específico, ejemplos de agentes incluyen, por ejemplo, monometil éter de hidroquinona (MEHQ), hidroquinona (HQ), toluhidroquinona (THQ), y ácido ascórbico. En determinados aspectos, el radical libre es MEHQ. La composición en la matriz sólida puede incluir también inhibidores RNasa tales como el complejo vanadil ribonucleósido (VRC) o cualquiera de los inhibidores RNasa disponibles comercialmente (por ejemplo SUPERasa-In™). Se describen ejemplos de inhibidores de RNasa adicionales en Kumar *et al.* (2003) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300:81-86, que se incorporan en la presente memoria en referencia a su conjunto.

Se proporcionan además los métodos de utilización de las composiciones que se describen anteriormente en la presente memoria. En una realización, un método para extraer y conservar ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN, ADN, o una combinación de los mismos) comprende las etapas de: a) proporcionar una matriz sólida, en donde una composición que comprende al menos un desnaturalizante de proteínas, al menos un agente reductor, un tampón biológico, y opcionalmente un recolector de radicales libres se incorpora en la matriz sólida en un formato seco; b) aplicar una muestra (por ejemplo, una muestra biológica) a la matriz sólida para extraer los ácidos nucleicos; c) secar la matriz sólida; y d) almacenar los ácidos nucleicos en la matriz sólida en un estado seco bajo condiciones ambientales. En determinados aspectos del método, la matriz sólida es un papel basado en celulosa porosa tal como FTA Elute™ disponible comercialmente. El rendimiento de este método permite el almacenamiento de los ácidos nucleicos, particularmente ARN que es muy conocida por ser una biomolécula inestable para almacenar, en un formato seco (por ejemplo, en una matriz sólida) bajo temperaturas ambientales. Las muestras utilizadas en este método incluyen pero no se limitan a muestras biológicas tales como sangre, suero, tejido, y saliva obtenidas a partir de cualquier organismo, incluyendo un ser humano.

El método que se define anteriormente puede incluir opcionalmente una etapa para recuperar los ácidos nucleicos a partir de la matriz sólida para análisis posteriores. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden recuperar por rehidratación de la matriz sólida (por ejemplo, papel de celulosa) en una disolución acuosa, una disolución tampón, como se definió anteriormente, o una disolución orgánica. Alternativamente, los ácidos nucleicos se podrían recuperar a partir de la matriz sólida mediante electroelución. Un experto en la técnica apreciará que se puede utilizar para ensayar los métodos descritos cualquier método capaz de recuperar los ácidos nucleicos a partir de la matriz sólida.

El término “ácido nucleico” se refiere a todas las formas de ARN (por ejemplo, ARNm), ADN (por ejemplo ADN genómico), así como moléculas de ADN y ARN recombinante o análogos de ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótido. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser monocatenarias o bicatenarias. Las hebras pueden incluir hebras codificantes o no-codificantes. Los fragmentos de ácidos nucleicos que aparecen naturalmente en las moléculas de ARN o ADN se engloban en la presente invención y se pueden recuperar utilizando las composiciones y los métodos descritos. “Fragmento” se refiere a una porción del ácido nucleico (por ejemplo, ARN o ADN).

Los ejemplos siguientes se presentan a modo de ejemplo y no como limitación:

Ejemplos

Ejemplo 1: Análisis de ARN en general

Se utilizó una línea celular de linfocitos humanos cultivados (por ejemplo, células Jurkat) como la fuente del ARN celular total. Las células se secaron en discos de celulosa de 7 mm impregnados con los reactivos indicados, se almacenaron a temperatura ambiente durante 10 días en una cabina desecadora, y los ácidos nucleicos celulares se electroeluyeron de acuerdo con los protocolos estándar. Brevemente, los discos se rehidrataron con 15 µL de proteinasa K 2 mg/mL en agua libre de nucleasa para eliminar el exceso de proteína y se secaron durante ~30 minutos. Los punzones se colocaron en pocillos individuales de un gel de agarosa 1% Tris-borato-EDTA (TBE) y se suspendió en Gel de Carga IX Tampón II que contiene formamida (Ambion). Los ácidos nucleicos celulares se sometieron a electroforesis a 110 voltios durante 1-2 horas, y el ARN y ADN se tificaron posteriormente con SYBR Gold (Invitrogen) y se detectaron utilizando un generador de Imágenes Typhoon (GE Healthcare). Todo el equipamiento y las superficies se trataron con ARNZap (Ambion) para conservar la integridad del ARN celular durante y después de la electro-elución a partir de celulosa. Los estándares internos, incluyendo el ARN 6000 Nano Escalera (Tecnologías Agilent) y el ARN total humano purificado a partir de músculo (Origene), se incluyeron en geles de agarosa para controlar la contaminación de RNasa e identificar las bandas de ARN control.

Los electroferogramas se cuantificaron digitalmente utilizando el programa informático Image J. Brevemente, se dibujó una línea vertical desde la cima hasta la base de cada carril, y se representó la intensidad de los píxeles (unidades arbitrarias del valor gris) como función de la distancia de la línea (cm) utilizando la función Dibujar Perfil. Se identificaron los picos correspondientes al ADN genómico y al ARN 28s/18s y se utilizaron para calcular la razón de ARNr 28s:18s.

La Fig.1 proporciona un electroferograma representativo de los ácidos nucleicos recuperados a partir de celulosa utilizando electroelución. Se identificaron las bandas de ADN genómico de alto peso molecular y de ARNr 28s/18s.

La Fig.1 proporciona además la cuantificación de ADN y ARN utilizando Image J. Se dibujó una línea vertical desde la cima hasta la base en el panel A, y se representó la intensidad de los píxeles (unidades arbitrarias del valor gris) como función de la distancia de la línea (cm) utilizando la función Dibujar Perfil. Los picos que corresponden al ADN genómico y al ARNr 28s/18s están "en el cuadro".

Ejemplo 2: Determinación Empírica de las Condiciones Favorables para la Extracción y el Almacenamiento del ARN

El primer objetivo de este ejemplo era evaluar el efecto de cada factor en solitario y el efecto de la combinación de los factores ensayados (por ejemplo, agente quelante, tampón, pH, un desnaturizante de proteínas, agente reductor, e inhibidor de RNasa peptídica) en la conservación del ARN en papel de celulosa. Un aspecto adicional de este ejemplo era evaluar la presencia del agente reductor (DTT) para mejorar potencialmente el efecto del desnaturizante de proteínas.

Se utilizaron de nuevo células Jurkat como fuente del ARN celular total, y las células se aplicaron directamente en las muestras de papel de celulosa y secaron al aire para imitar una aplicación final típica. El ARN celular total se recuperó mediante electroelución, siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el Ejemplo 1, en gel de agarosa 1% y se analizó el contenido de ARNr 28s:18s según los conocimientos estándar. Las muestras que contienen los componentes enumerados debajo de cada barra en la gráfica de la Fig. 2 se almacenaron durante 10 días a temperatura ambiente en una cabina desecadora antes del análisis.

Los resultados del Ejemplo 2 se indican en la Fig. 2. Los números sobre cada barra corresponden a la razón de ARNr 28s para ARNr 18s. Una razón 28s:18s >1 generalmente indica ARN intacto. Fallaron varias composiciones para estabilizar el ARNr, incluyendo las muestras con agente reductor ausente (DTT) o SUPERasa-In para inactivar la RNasa, o en muestras que poseen un pH alcalino. Las muestras que contienen GITC, DTT, y un tampón neutral superaron a todas las otras combinaciones de reactivo ensayadas.

Ejemplo 3: Continuación de la Determinación Empírica de las Condiciones Favorables para la Extracción y el Almacenamiento del ARN

Después de que se identificaron los componentes clave para el almacenamiento del ARN en el Ejemplo 2, el Ejemplo 3 se diseñó para investigar el efecto del DTT y del SDS tanto en solitario como en combinación en la capacidad para conservar el ARN, y el efecto de la adición de un recolector de radicales libres y un agente quelante para las combinaciones GITC/DTT sobre el rendimiento que mostró propiedades de estabilización del ARN favorables en el Ejemplo 2.

Se aplicaron células Jurkat directamente en las muestras de papel de celulosa y se secaron al aire para imitar una aplicación final típica. El ARN celular total se recuperó mediante electroelución, siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el Ejemplo 1, en gel de agarosa 1% y se analizó el contenido de ARNr 28s:18s según los conocimientos estándar. Las muestras de celulosa se almacenaron durante 13 días a temperatura ambiente en una cabina desecadora antes del análisis. Los números sobre cada barra corresponden a la razón de ARNr 28s para ARNr 18s. Una razón 28s:18s >1 generalmente indica ARN intacto. Los resultados del Ejemplo 3 se proporcionan en la Fig.3.

Ejemplo 4: Continuación de la Determinación Empírica de las Condiciones Favorables para la Extracción y el Almacenamiento del ARN

Después de que se identificaron los componentes clave adicionales para el almacenamiento del ARN en el Ejemplo 3, el Ejemplo 4 se diseñó para investigar si un agente reductor alternativo (TCEP), que tiene mejor estabilidad y mucho menos olor, podría sustituir al DTT. Otro factor que se introduce en este ejemplo fue el complejo vanadil ribonucleósido (VRC), una pequeña molécula inhibidora de RNasa. Estos cambios se compararon y evaluaron para la capacidad de estabilizar el ARNr.

Se aplicaron células Jurkat directamente en las muestras de papel de celulosa y se secaron al aire para imitar una aplicación final típica. El ARN celular total se recuperó mediante electroelución, siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el Ejemplo 1, en gel de agarosa 1% y se analizó el contenido de ARNr 28s:18s según los conocimientos estándar. Las muestras de celulosa se almacenaron durante 10 días a temperatura ambiente en una cabina desecadora antes del análisis. Los números sobre cada barra corresponden a la razón de ARNr 28s para ARNr 18s. Una razón 28s:18s >1 generalmente indica ARN intacto. Los resultados del Ejemplo 4 se proporcionan en la Fig.4.

Ejemplo 5: Rendimiento a Largo-Plazo de las Composiciones Seleccionadas para el Almacenamiento de ARN en Celulosa

El Ejemplo 5 se diseñó para evaluar el rendimiento a largo-plazo de las composiciones seleccionadas después de 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente. Las células Jurkat se aplicaron directamente en las muestras de papel de celulosa y se secaron al aire para imitar una aplicación final típica. El ARN celular total se recuperó mediante electroelución, siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el Ejemplo 1, en gel de agarosa 1% y se analizó el contenido de ARNr 28s:18s según los conocimientos estándar. Las muestras de celulosa se almacenaron durante 30 días a temperatura ambiente en una cabina desecadora antes del análisis. Los números sobre cada barra corresponden a la razón de ARNr 28s para ARNr 18s. Una razón 28s:18s >1 generalmente indica ARN intacto. Los resultados del Ejemplo 5 se proporcionan en la Fig.5.

Ejemplo 6: Análisis de la Estabilidad del ARN Sanguíneo

El Ejemplo 6 se diseñó para evaluar el rendimiento de una composición de papel seleccionada con sangre entera fresca en una variedad de condiciones tampón. Se recogió de la vena caudal de rata de un sujeto de ensayo aproximadamente 50 µL de sangre entera y se detectó la estabilización del ARN en el papel preparado con los componentes tampón indicados. Las tarjetas se secaron y almacenaron a temperatura ambiente pero se controló la humedad (~20% de humedad relativa) de 5 a 22 días. Se extrajo el ARN a partir del centro de un punzón de 7 mm en un tampón de lisis y se purificó mediante una columna de centrifugación de membrana de sílice según los protocolos conocidos en la técnica. Después de la purificación y elución, se midieron los Números de Integridad del ARN (RIN) en un Bionalizador Agilent 2100 usando ARN 6000 Pico LabChips. Convencionalmente, RIN>5 son buenos pero RIN>6 son mejores para cuantificar análisis posteriores tales como RT-PCR o aplicaciones en microarrays. Los resultados del Ejemplo 6 se presentan en la Fig.6.

Ejemplo 7: Impacto de la Protección UV en la Estabilidad del ARN

El Ejemplo 7 se diseñó para demostrar la protección del ARNm mediante inhibidores UV y recolectores de radicales libres presentes en una matriz seca seleccionada. El ARN Jurkat total libre de ADN (1µg) se detectó por duplicado en el papel de ARN que contiene los componentes indicados. Cada tarjeta se dividió en dos, una mitad se mantuvo en oscuridad a 35°C durante 20 horas, mientras que la otra se trató en una cámara de ensayo Q-SUN Xe-1 Xenon durante 20 horas (35°C, 0,3W/cm², 340nm) para replicar el espectro completo de la luz solar (21,7 kJ/m² energía total). Se tomó de cada muestra un punzón de 1,2 mm y se dejó reaccionar directamente con la transcriptasa inversa para crear ADNc de estudio, el cual se probó después contra cebadores específicos para HPRT1 y ARNm clatrina mediante qPCR. Los umbrales de ciclo (C_T) para las muestras expuestas al UV se sustrajeron a partir de los C_T de las parejas acopladas almacenadas en la oscuridad sin tratar. Los resultados del Ejemplo 7 se presentan en la Fig.7.

Ejemplo 8: Estabilidad del Agente Reductor en el Papel bajo Condiciones Ambientales

El papel de WhatmanTM basado en celulosa 31ETF se sumergió en concentraciones ascendentes de TCEP o DTT en presencia de GITC en tampón Tris, pH 7,4. Los papeles basados en celulosa se almacenaron a temperatura ambiente sin regulación de la humedad. A los 5, 19, y 105 días se colocó en cada muestra de papel 5,5'-Ditio-bis(2-ácido nitrobenzoico) ("DTNB"). En presencia del agente reductor activo se observó un cambio instantáneo del color hacia el amarillo. A los 105 días de almacenamiento bajo condiciones ambientales, el papel de celulosa recubierto de la solución TCEP, (a todas las concentraciones) era aún activo y capaz de reducir el DTNB, como se indicó mediante el cambio de color del papel del blanco al amarillo. Las muestras de papel sumergidas en DTT no fueron capaces de reducir el DTNB, y, por consiguiente, el color del papel permaneció blanco. Estas figuras no expresan su significado en negro y blanco y, como tal, no se han incluido en la presente memoria pero están disponibles en la solicitud del examinador. La reacción química relevante para la reducción del DTNB se proporciona en Cline *et al.* (2004) *Biochemistry* 43:15195-15203.

Ejemplo 9: Análisis Cualitativo del Envejecimiento de los Agentes Reductores

Las muestras de papel de celulosa 31ETF contenían GITC en tampón Tris, pH 7,4, con diferentes concentraciones de los agentes reductores TCEP o DTT. Las muestras de papel se almacenaron bajo las diferentes condiciones siguientes: 1) 21°C, 10% de humedad relativa; 2) 21°C, 80% de humedad relativa; y 3) 41°C, 10% de humedad relativa.

En los días 0, 1, 6, y 25, una muestra de 10 mg de papel de celulosa bajo cada condición se puso en disolución DTNB, se agitó brevemente, y se tomaron imágenes en color. En el día 1, todas las muestras TCEP bajo cada una de las condiciones ambientales fueron capaces de cambiar el color de la disolución DTNB al amarillo, indicando que era aún capaz de funcionar como agente reductor. Por el contrario, el DTT fracasó en cambiar el color de las muestras al amarillo en presencia de DTNB, incluso a 21°C y 10% de humedad relativa. En el día 25, el papel TCEP almacenado a 21°C y 10% de humedad relativa continuó mostrando actividad reductora funcional. Sin embargo, un aumento o bien de la humedad o bien de la temperatura, resultó en un evidente descenso en la actividad del TCEP como agente reductor, indicando que tanto la temperatura como la humedad son factores relevantes en la función del TCEP como un agente reductor.

ES 2 609 763 T3

Ejemplo 10: Análisis Cualitativo de la Actividad del TCEP en Papel Basado en Celulosa

- Se prepararon además composiciones de TCEP que comprenden GITC y MEHQ en diferentes tampones (Tris, pH 7,4; MES, pH 6,2; y MPOS, pH 7,0) y una muestra control que no comprende tampón. Después cada papel basado en celulosa se recubrió, con cada una de las diferentes disoluciones anteriores, se secó rápidamente a 50°C en una estufa con aire caliente, se selló con desecantes en bolsas de papel de aluminio para mantener la humedad baja, y después se almacenó a 4°C, a temperatura ambiente, o a 41°C.
- 5
- A las semanas indicadas en las figuras (0, 1, y 4), se analizó la actividad TCEP utilizando un ensayo colorimétrico DTNB en el que se añadió DTMN a cada punzón de papel de 3,6 mm, se agitó durante 30 minutos, y después se midió la absorbancia del líquido a 412 nm.
- 10
- En un mes todas las muestras eran estables a 4°C con aproximadamente 100% de actividad. En un mes, a temperatura ambiente, la actividad TCEP registró variabilidad en base al tampón utilizado (por ejemplo, MOPS (100%)>Sin tampón (90%)>MES (86%)>Tris (81%)). Después de un mes a 41°C, aún se observó variabilidad en la actividad TCEP (por ejemplo, MOPS (67%)>MES (63%)>Tris (48%)>Sin tampón (39%)).
- 15
- Todas las publicaciones, publicaciones de patentes y patentes se incorporan en la presente memoria en referencia al mismo alcance como si cada publicación individual o patente fuese específica e individualmente indicada a incorporarse por referencia.

REIVINDICACIONES

1. Una matriz sólida para extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos a partir de una muestra, en donde la matriz sólida está impregnada con una composición que comprende al menos un desnaturalizante de proteínas, al menos un agente reductor, un protector UV y está presente un tampón en la matriz sólida en un estado seco y donde la matriz sólida es una matriz porosa que comprende celulosa, acetato de celulosa, fibra de vidrio, o cualquier combinación de los mismos y donde el desnaturalizante de proteínas se selecciona de hidrocloreuro de guanidinio, tiocianato de guanidinio (GITC), arginina, dodecilsulfato sódico (SDS), urea, y cualquier combinación de los mismos; el agente reductor se selecciona de ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol (2-ME), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), y una combinación de los mismos; y el protector UV se selecciona de monometil éter de hidroquinona (MEHQ), hidroquinona (HQ), toluhidroquinona (THQ), y ácido ascórbico.
2. La matriz sólida de la reivindicación 1, en donde la composición presente en la matriz sólida comprende además un inhibidor de RNasa.
3. La matriz sólida de la reivindicación 1, en donde la matriz sólida permite el almacenamiento prolongado de ácidos nucleicos en un formato seco bajo condiciones ambientales.
4. La matriz sólida de la reivindicación 1, en donde los ácidos nucleicos son ARN, ADN, o una combinación de los mismos.
5. La matriz sólida de la reivindicación 4, en donde los ácidos nucleicos son ARN.
6. La matriz sólida de la reivindicación 1, en donde la matriz porosa es un papel de celulosa.
7. La matriz sólida de la reivindicación 1, en donde el tampón se selecciona del grupo que consiste en 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES), un tampón citrato, y un tampón fosfato.
8. La matriz sólida de la reivindicación 7, en donde el tampón tiene un pH de un intervalo entre 3 y 8.
9. La matriz sólida de la reivindicación 2, en donde el inhibidor de RNasa es el complejo vanadil ribonucleósido (VRC), un análogo de nucleótido, o un inhibidor de RNasa disponible comercialmente.
10. La matriz sólida de la reivindicación 1, en donde la matriz sólida es una matriz basada en celulosa porosa y:
- el desnaturalizante de proteínas es GITC, un detergente, o una combinación de los mismos;
 - el agente reductor es DTT, TCEP, o una combinación de los mismos; y
 - el tampón es Tris, MES, o MOPS.
11. Un método para extraer y almacenar ácidos nucleicos a partir de una muestra que comprende:
- proporcionar una matriz sólida como se define en la reivindicación 1;
 - aplicar una muestra a la matriz sólida para recoger los ácidos nucleicos;
 - secar la matriz sólida; y
 - almacenar los ácidos nucleicos en la matriz sólida en un estado seco bajo condiciones ambientales.
12. El método de la reivindicación 11, en donde el método comprende además recuperar los ácidos nucleicos a partir de la matriz sólida.
13. El método de la reivindicación 11, en donde la muestra biológica es sangre, suero, tejido, saliva, o células.
14. El método de la reivindicación 11, en donde la muestra es una muestra de ácido nucleico purificado o una preparación celular del cultivo de tejidos.

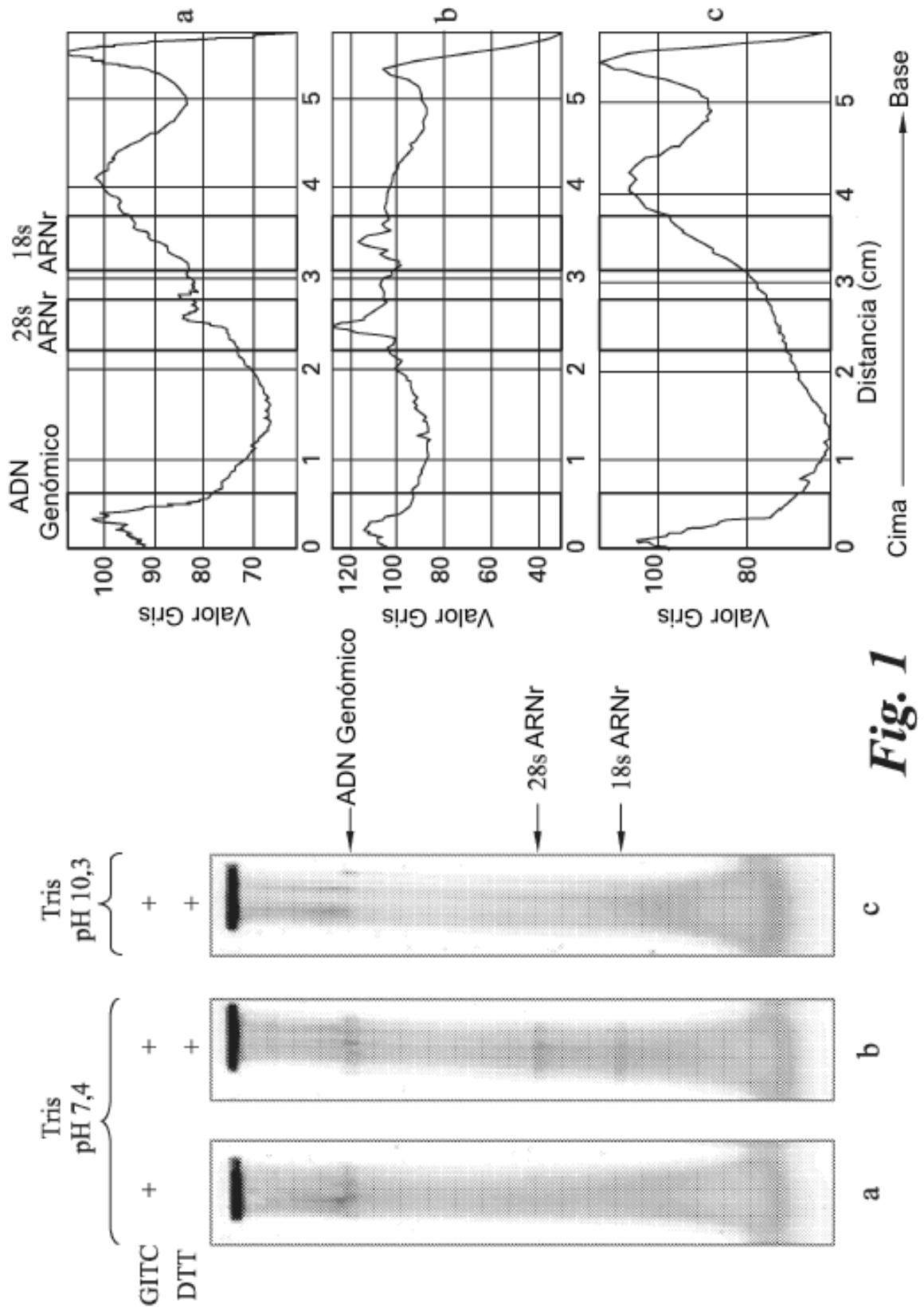


Fig. 1

10 días de almacenamiento en condiciones ambiente en celulosa

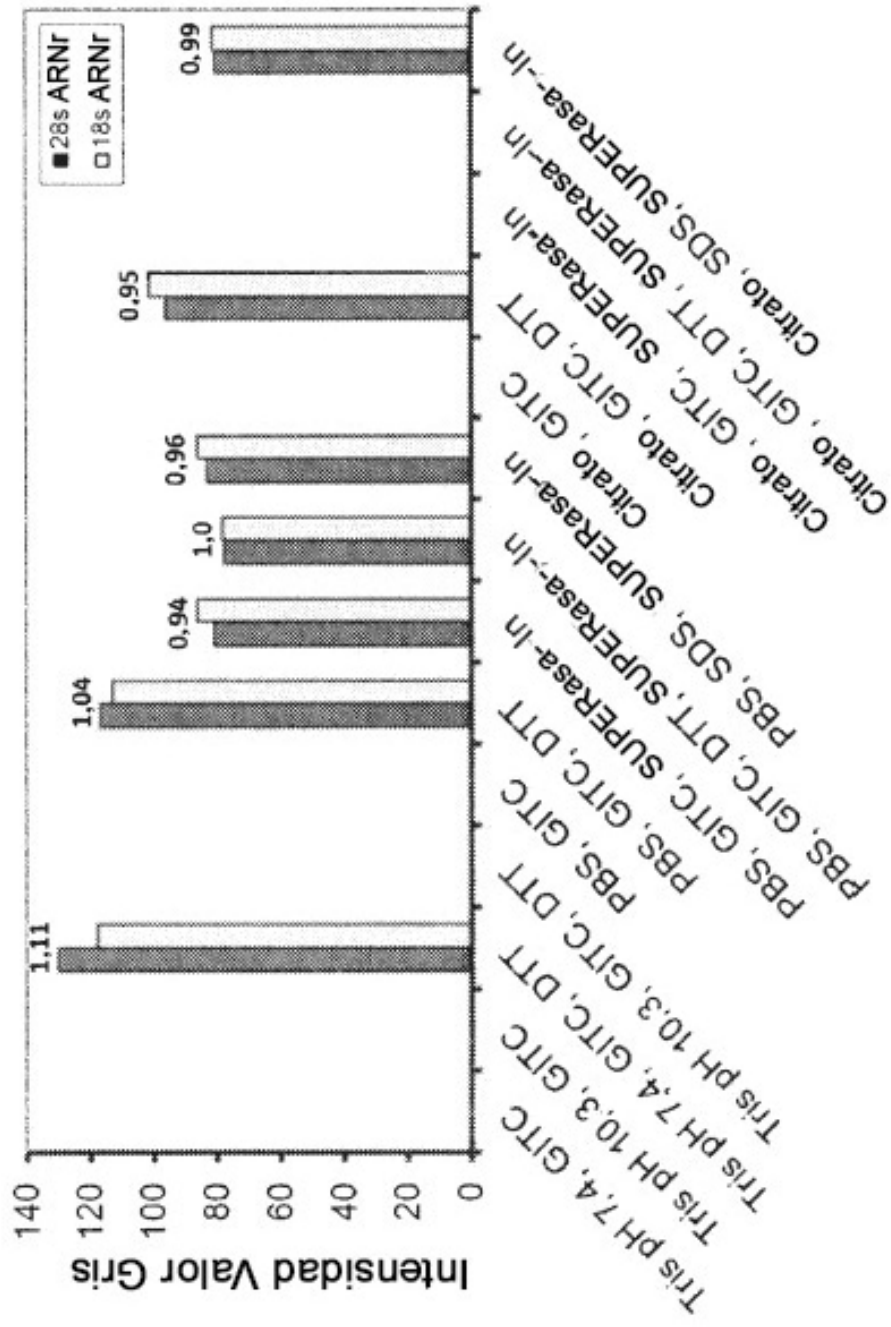


Fig. 2

13 días de almacenamiento en condiciones ambiente en celulosa

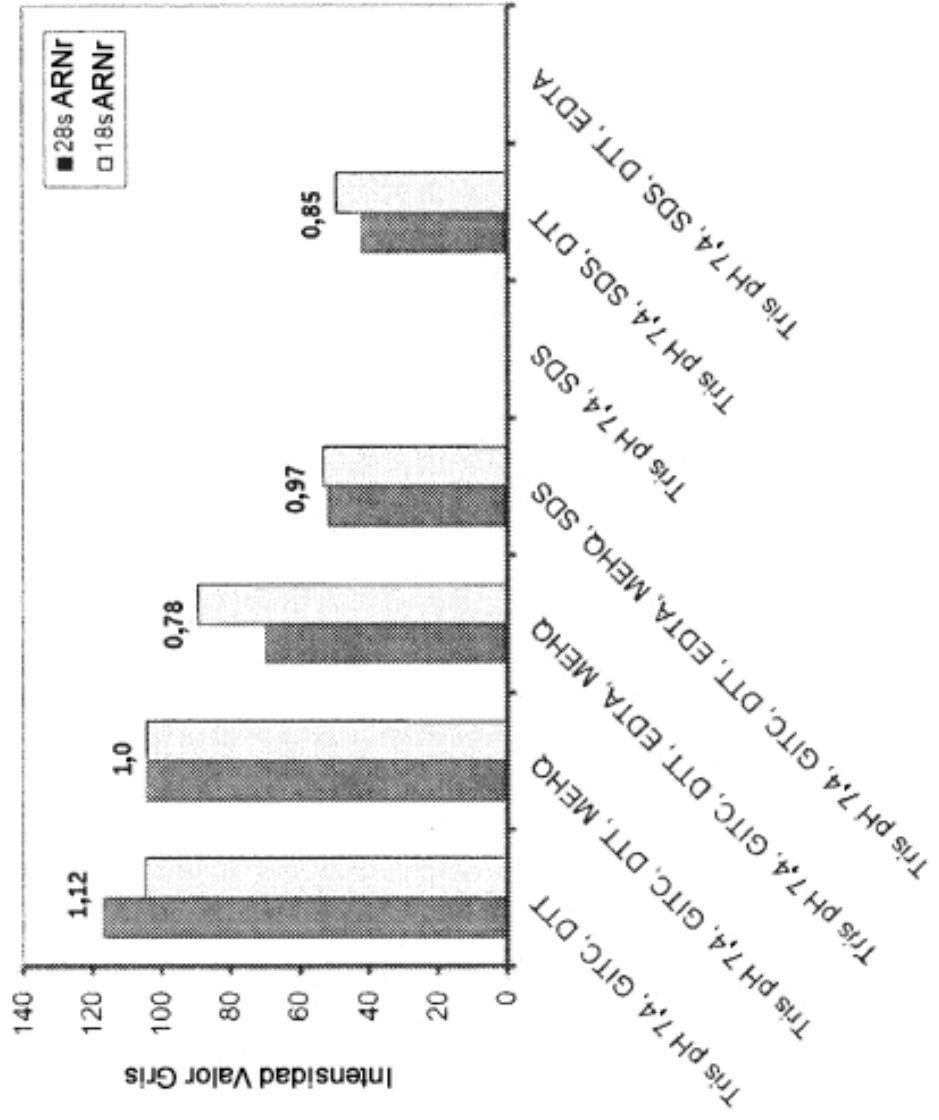


Fig. 3

10 días de almacenamiento en condiciones ambiente en celulosa

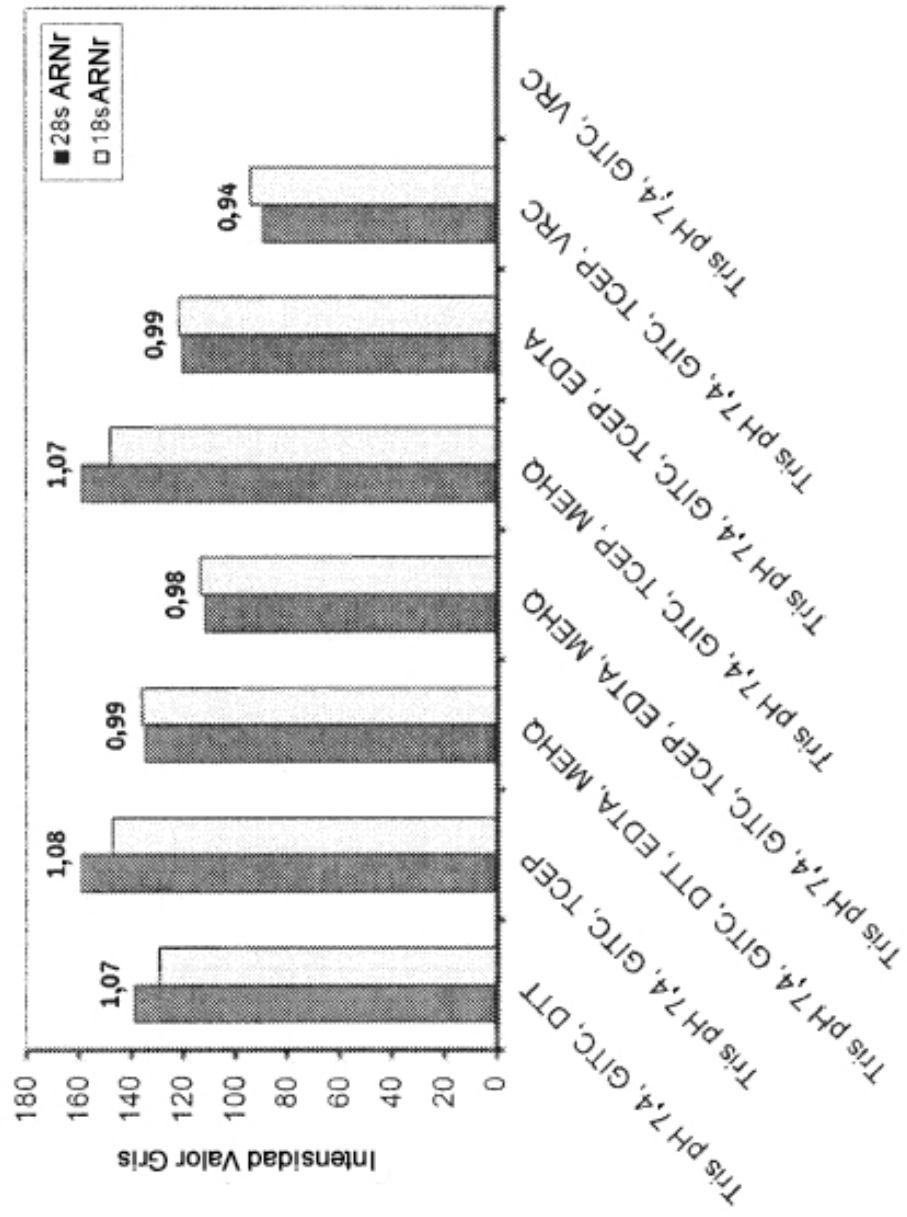


Fig. 4

30 días de almacenamiento en condiciones ambiente en celulosa

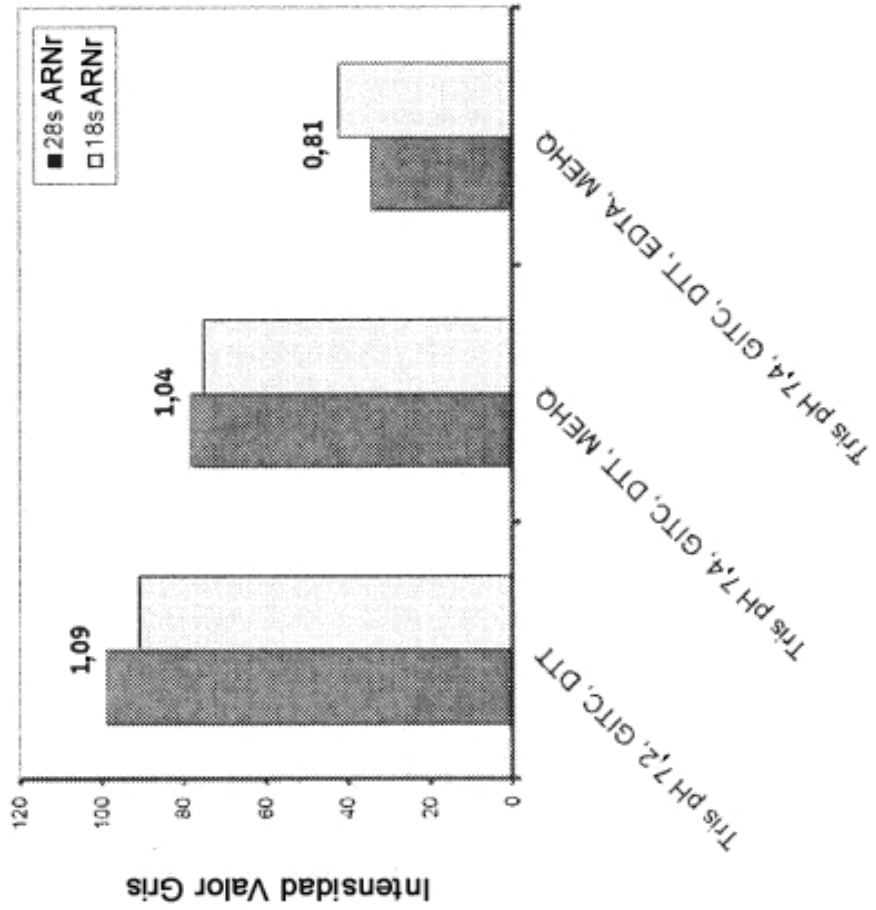


Fig. 5

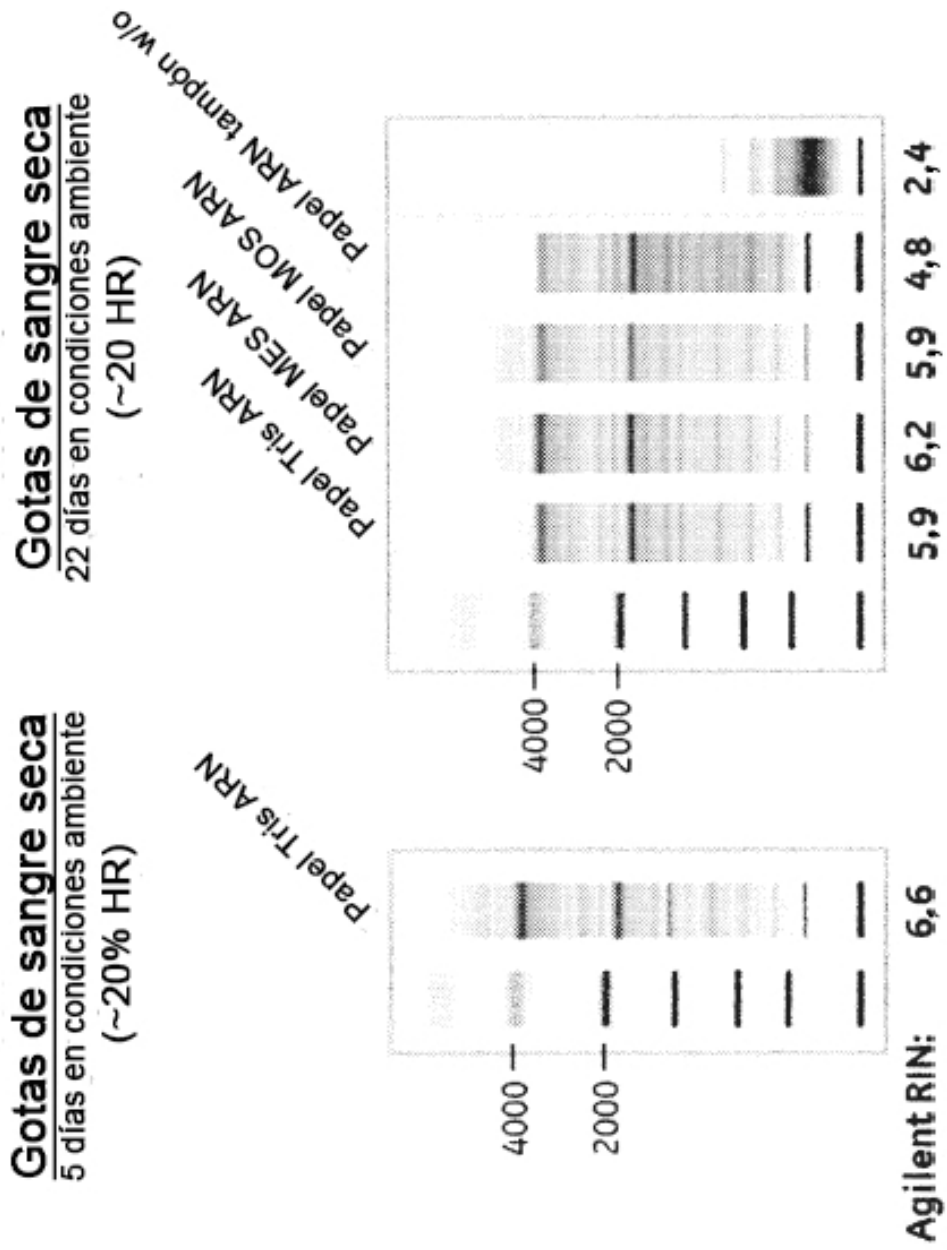


Fig. 6

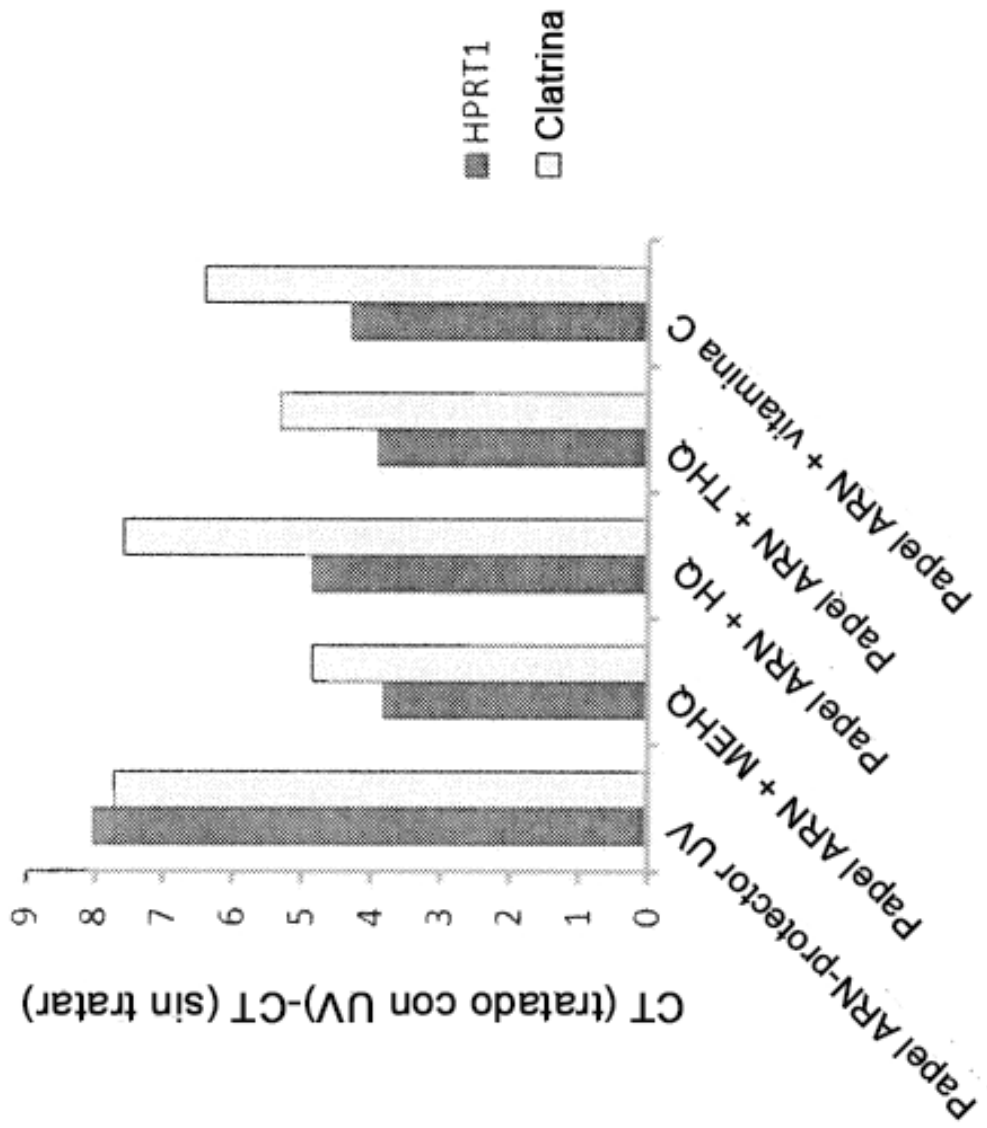


Fig. 7

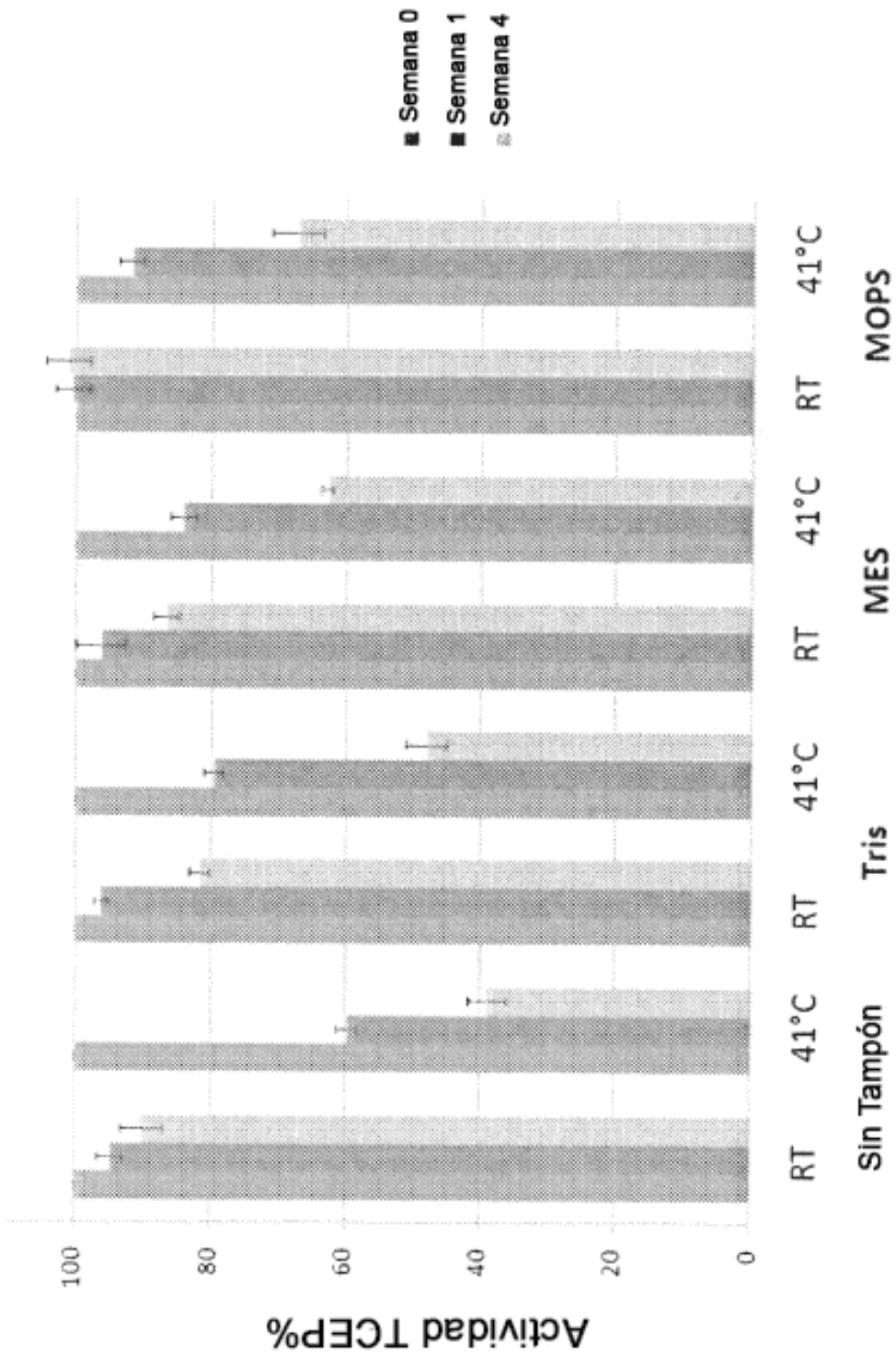


Fig. 8