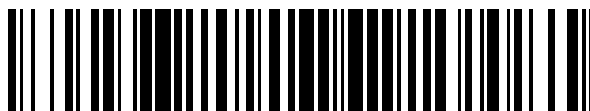


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 778**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2011 PCT/EP2011/065240**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2012 WO2012028737**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2011 E 11758160 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2611916**

54 Título: **Método para aislar un ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, con alto rendimiento**

30 Prioridad:

**02.09.2010 EP 10009130**

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

**19.06.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HOLLÄNDER, VERA;  
CHRISTOFFEL, GABRIELE y  
SCHLUMPBERGER, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 617 778 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).

## DESCRIPCION

Método para aislar un ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, con alto rendimiento

La presente invención se refiere a un método para aislar un ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños a partir de una muestra y en particular, proporciona medios para aislar eficientemente ácidos nucleicos diana pequeños de una muestra con alto rendimiento.

El estudio de ácidos nucleicos pequeños, en el orden de 1000 o 500 nucleótidos o menos, de varios tejidos, fluidos corporales y organismos es un área de extremo interés y promete continuar siéndolo en el futuro. En particular, los ácidos nucleicos pequeños incluyen, pero no están limitados a, RNA pequeños tales como *inter alia* micro RNA (miRNA) y moléculas de RNA interferente pequeño, los cuales pueden tener un poderoso efecto en la expresión de un gen. Además, también son de interés otros RNA nucleares pequeños y nucleolares pequeños (p. ej. snRNA y sonRNA) implicados en el procesamiento de mRNA y rRNA así como moléculas pequeñas de DNA. Además, muestras especiales tales como p. ej. muestras que se han fijado con formalina y embebido en parafina (muestras FFPE), contienen a menudo como productos de degradación ácidos nucleicos que tienen una longitud de 1000 o 500 nucleótidos o menos, porque la preservación respectiva puede comprometer la integridad del DNA y/o RNA.

Con el creciente interés en los respectivos ácidos nucleicos pequeños, los procesos estándar de aislamiento se han modificado para facilitar el aislamiento de ácidos nucleicos pequeños y en particular, para mejorar el rendimiento de ácidos nucleicos pequeños. Los protocolos conocidos utilizados como estándar para aislar DNA o RNA, habitualmente no son ideales para aislar ácidos nucleicos pequeños porque a menudo los ácidos nucleicos pequeños no se capturan y se eluyen eficazmente durante el proceso de aislamiento utilizando los métodos estándar. Por lo tanto, los ácidos nucleicos diana aislados a partir de muestras utilizando procedimientos estándar habitualmente no comprenden los ácidos nucleicos diana pequeños en cantidades suficientes y por consiguiente no proporcionan rendimientos aceptables porque los ácidos nucleicos pequeños no se unen o se pierden durante el proceso de aislamiento de ácido nucleico. Por consiguiente, se necesitan técnicas mejoradas para el aislamiento eficiente de ácidos nucleicos diana pequeños solos o como una porción de los ácidos nucleicos diana totales aislados, tales como p. ej. RNA total o DNA total.

Los métodos que se han optimizado para el aislamiento de ácidos nucleicos pequeños a menudo se basan en la extracción de fenol y cloroformo y fraccionamiento gradual en alcohol. De acuerdo con una realización, el RNA se concentra en la fase acuosa y después se aísla subsecuentemente a partir de la misma p. ej. mediante la adición de al menos un alcohol y la unión del RNA a una membrana. Aquí, también es importante capturar eficientemente los RNA pequeños en el RNA total aislado.

Además, se han desarrollado métodos para aislar ácidos nucleicos pequeños, tales como RNA pequeños, que involucran el uso de agentes caotrópicos, concentraciones elevadas de alcohol y columnas de unión de ácidos nucleicos que comprenden p. ej. membranas de unión a ácidos nucleicos tales como una membrana de sílice.

El RNA total aislado con estos protocolos comprende RNA pequeños, si la muestra contenía los respectivos RNA pequeños. Los respectivos protocolos de aislamiento basados en membranas son particularmente apropiados para aislar ácidos nucleicos pequeños, ya sea solos o como una porción del ácido nucleico diana total, de varias muestras.

Existen/existían kits comerciales disponibles para aislar RNA pequeño p. ej. de QUIAGEN ("miRNAeasy Mini Handbook"); Macherey-Nagel GmbH & Co. KG ("Aislamiento de RNA grande y pequeño, Manual del usuario, NucleoSpin® miRNA"); Roche Diagnostics GmbH ("Kit de aislamiento de miRNA súper puro"); Ambion, Inc. (mirVana™ kit de aislamiento de miRNA); Invitrogen Inc. ("Purelink™ kit de aislamiento de miRNA") y Norgen Biotek Corp. ("kit de purificación de microRNA").

Sin embargo, muchos procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos que utilizan una fase sólida basada en una columna para unir los ácidos nucleicos (p. ej. una membrana de unión a ácidos nucleicos comprendida en una columna) involucran una o más etapas de tratamiento que involucran una o más disoluciones acuosas mientras el ácido nucleico diana está unido a la fase de unión al ácido nucleico (también llamadas p. ej. etapas de tratamiento "en membrana" o "en columna"). Ejemplos respectivos de etapas de tratamientos que se llevan a cabo mientras los ácidos nucleicos están unidos a la fase sólida de unión a ácidos nucleicos incluyen, pero no están limitadas a, etapas de digestión de proteínas y etapas de digestión de nucleasas tales como p. ej. tratamientos de DNasa o RNasa. Se encontró que el rendimiento de las respectivas etapas de tratamiento disminuye el rendimiento de ácidos nucleicos diana y en particular disminuye el rendimiento de ácidos nucleicos diana pequeños porque dichos tratamientos tienen el efecto de que al menos una porción de los ácidos nucleicos diana unidos y en particular de los ácidos nucleicos diana pequeños se liberan de la fase sólida de unión a ácidos nucleicos durante dichas etapas de tratamiento. Por consiguiente, para evitar que los ácidos nucleicos liberados se pierdan en las subsecuentes etapas de lavado o procesado, en la técnica anterior se conocía la aplicación de p. ej. una disolución caotrópica (p. ej. una disolución de lavado caotrópica) que recupera las condiciones apropiadas de unión después de llevar a cabo el tratamiento, con el fin de restaurar la unión de los ácidos nucleicos diana potencialmente liberados a la fase de unión de ácidos nucleicos. Una etapa respectiva de restauración se describe p. ej. en WO 98/59076 y se utiliza también en

muchos kits de aislamiento de ácidos nucleicos comercialmente disponibles.

5 Sin embargo, se encontró que a pesar de llevar a cabo una etapa respectiva de restauración para restaurar la unión de los ácidos nucleicos diana potencialmente liberados a la fase sólida de unión de ácidos nucleicos, los ácidos nucleicos diana pequeños finalmente se perdían durante el proceso de aislamiento. Particularmente, este es el caso cuando se aíslan los ácidos nucleicos utilizando una columna basada en una fase sólida para unir los ácidos nucleicos, p. ej. cuando se utilizan columnas que comprenden una membrana de unión a ácidos nucleicos. Por consiguiente, existe todavía una necesidad de mejora con el fin de aumentar el rendimiento de los ácidos nucleicos pequeños en el ácido nucleico diana aislado.

10 Por consiguiente, el objetivo de la presente invención es proporcionar un método para aislar al menos un ácido nucleico diana que incluye o puede consistir en ácidos nucleicos diana pequeños, en donde se aumenta el rendimiento de los ácidos nucleicos diana pequeños.

### Compendio de la invención

15 La presente invención se basa en la conclusión de que la aplicación de un tampón de restauración o de un tampón de lavado que mejora la unión después de llevar a cabo p. ej. un tratamiento enzimático mientras los ácidos nucleicos están unidos a la fase sólida de unión de ácidos nucleicos es insuficiente para volver a capturar, y por consiguiente aislar, con rendimiento aceptable los ácidos nucleicos diana pequeños que se liberaron durante dicho tratamiento si se utiliza una fase sólida de unión a ácido nucleico basada en una columna. Subsecuentemente, esto se explicará en base a la realización preferida, en donde una membrana de unión a ácido nucleico se utiliza como fase sólida. Sin limitarse por la teoría, se asume que al menos una porción de los ácidos nucleicos diana pequeños liberados durante el tratamiento en membrana se localiza por debajo de la membrana y/o muy por debajo de los poros de la membrana. Los respectivos ácidos nucleicos diana pequeños "escapados" no se pueden volver a unir eficientemente mediante la aplicación de un tampón de restauración (o un tampón de lavado que mejora la unión) porque no están en contacto con el área de unión a ácido nucleico de la membrana y por lo tanto, se pierden en las subsecuentes etapas de procesamiento. Surgen problemas similares cuando se utilizan otras fases sólidas de unión a ácido nucleico basadas en columnas, en particular si la fase sólida de unión a ácido nucleico únicamente forma p. ej. una capa fina en la columna. La presente invención enseña a recoger estos ácidos nucleicos diana pequeños "escapados" y a unirlos a una fase sólida de unión a ácido nucleico. De esta manera, también estos ácidos nucleicos diana pequeños "escapados" (que se pierden cuando se llevan a cabo los métodos de la técnica anterior) pueden capturarse eficientemente en el proceso de aislamiento del ácido nucleico diana, aumentando de esta manera el rendimiento de los ácidos nucleicos pequeños en el ácido nucleico diana aislado. Por consiguiente, el método de acuerdo con la presente invención permite el aislamiento de ácidos nucleicos diana pequeños con rendimiento mejorado, y de esta manera proporciona considerables ventajas sobre los métodos conocidos en la técnica anterior.

La invención puede definirse mediante las reivindicaciones adjuntas.

35 De acuerdo con un primer aspecto, se proporciona un método para aislar al menos un ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños que tienen una longitud inferior a 500 nucleótidos, de una muestra, en donde el ácido nucleico diana comprende o consiste en ácidos nucleicos diana pequeños y en donde dicho método comprende al menos las siguientes etapas

40 a) Unir al menos una porción del ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, a una fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en una columna mediante el paso de la muestra a través de dicha columna de modo que el ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, se una a la fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en la columna,

b) llevar a cabo un tratamiento que involucra una disolución acuosa en la membrana mientras el ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, está unido a dicha membrana,

45 c) pasar una disolución de recuperación a través de dicha membrana y recoger el flujo de salida que comprende ácidos nucleicos diana pequeños,

d) pasar dicho flujo de salida a través de la membrana de la etapa a) para volver a unir los ácidos nucleicos diana pequeños contenidos a dicha membrana,

e) eluir el ácido nucleico diana, incluido el ácido nucleico pequeño, de dicha membrana.

50 También se describe el uso de una disolución de recuperación capaz de unir ácidos nucleicos pequeños a una fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en una columna, para volver a unir los ácidos nucleicos pequeños que se liberaron de dicha fase sólida de unión a ácido nucleico durante un tratamiento que previamente se llevó a cabo mientras los ácidos nucleicos estaban unidos a dicha fase sólida y que preferiblemente se recogieron como flujo de salida.

Además se describe un kit para llevar a cabo los métodos de acuerdo con la presente invención que comprende:

- a) una fase sólida de unión a ácido nucleico, preferiblemente una membrana, comprendida en una columna;
- b) un tampón de unión para unir un ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, a dicha fase sólida de unión a ácido nucleico que comprende un agente caotrópico y un alcohol;
- 5 c) una disolución de recuperación que comprende un agente caotrópico en una concentración de 0,5 M hasta el límite de saturación y un alcohol en una concentración de al menos 50%; y
- d) instrucciones para llevar a cabo el método de acuerdo con la presente invención.

Descripción breve de las figuras

10 Las figuras 1 a 3 muestran la distribución de tamaños de RNA aislados de tejido renal utilizando un Agilent Bio Analyzer. "+" indica el RNA que se aisló utilizando el método de acuerdo con la presente invención y "-" indica el RNA que se aisló utilizando el método de referencia. La fracción de RNA pequeño se marca con una flecha.

15 La figura 4 muestra el resultado de un ensayo de detección de miR16 después del aislamiento de RNA llevando a cabo el método de acuerdo con la presente invención, utilizando diferentes disoluciones de recuperación, o el método de referencia, en donde no se utiliza ninguna disolución de recuperación respectiva. Como puede verse, los valores ct se reducen considerablemente con las disoluciones de recuperación de acuerdo con la presente invención, de esta manera se demuestra la mejora en el aislamiento del RNA pequeño.

La figura 5 muestra una fotografía de un gel de agarosa cargado con RNA purificado con 5 kits diferentes (ver ejemplo 7). La flecha en el lado derecho indica los RNA pequeños.

20 La figura 6 es un diagrama que muestra los resultados de una PCR en tiempo real con mRNA cjun (ver ejemplo 7). El RNA se ha purificado de muestras FFPE derivadas de 3 tejidos de rata diferentes: 1. hepático (embebido durante 2 meses), 2. renal (embebido durante 19 meses) y 3. pulmonar (embebido durante 8 meses).

La figura 7 es un diagrama que muestra el resultado de un análisis de microRNA con miR29a (ver ejemplo 7).

25 La figura 8a y la figura 8b representan el resultado de un análisis de PCR en tiempo real de DNA purificado con kits de diferentes proveedores (ver ejemplo 7). El DNA se ha purificado de muestras FFPE derivadas de 3 tejidos de rata diferentes: 1. hepático (embebido durante 2 meses), 2. renal (embebido durante 19 meses) y 3. pulmonar (embebido durante 8 meses). Se han utilizado para todas las muestras los mismos volúmenes patrón en la figura 8a y las mismas concentraciones patrón en la figura 8b.

30 Los diagramas en la figura 9a y la figura 9b muestran los resultados de un experimento de PCR en tiempo real para analizar RNA Madh7 (ver ejemplo 7). El RNA se ha purificado de muestras FFPE derivadas de 3 tejidos de rata diferentes: 1. hepático (embebido durante 2 meses), 2. renal (embebido durante 19 meses) y 3. pulmonar (embebido durante 8 meses). Se han utilizado para todas las muestras los mismos volúmenes patrón en la figura 9a, y las mismas concentraciones patrón en la figura 9b.

Descripción detallada de la invención

35 Sorprendentemente, se encontró que el rendimiento de ácidos nucleicos diana pequeños que tienen una longitud inferior a 500 nucleótidos puede aumentarse considerablemente en un método para aislar al menos un ácido nucleico diana, incluido un ácido nucleico diana pequeño, de una muestra, en donde el ácido nucleico diana comprende o consiste en ácidos nucleicos diana pequeños, cuando se llevan a cabo al menos las siguientes etapas:

40 a) Unir al menos una porción del ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, a una fase sólida de unión de ácido nucleico comprendida en una columna mediante el paso de la muestra a través de dicha columna, de tal manera que el ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, se una a la fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en la columna,

b) llevar a cabo un tratamiento enzimático y/o químico en la fase sólida de unión a ácido nucleico mientras el ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, está unido a dicha fase sólida,

45 c) recoger al menos una porción de los ácidos nucleicos diana pequeños librados de la fase sólida durante dicho tratamiento de la etapa b) como flujo de salida,

d) poner en contacto dicho flujo de salida que comprende ácidos nucleicos diana pequeños mezclados con una disolución de recuperación con una fase sólida de unión a ácido nucleico para unir los ácidos nucleicos diana pequeños contenidos a dicha fase sólida de unión a ácido nucleico,

e) llevar a cabo una elución.

50 Las etapas individuales del método de acuerdo con la presente invención se explicarán con más detalle a

continuación.

En la etapa a), el ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños que se comprenden en la muestra, se une a la fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en una columna cuando la muestra pasa a través de dicha columna. Preferiblemente, se utiliza una membrana de unión a ácido nucleico como fase sólida. En la técnica precedente se conocen condiciones de unión apropiadas para unir un ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, a una fase sólida de unión a ácido nucleico, tal como una membrana, y se describen con más detalle a continuación. Las condiciones de unión también dependen del ácido nucleico diana que ha de aislarse (p. ej. RNA o DNA o ambos). Preferiblemente, se utilizan condiciones de unión que permiten uniones fuertes, y por consiguiente eficientes, del ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, a la fase sólida de unión a ácido nucleico con el fin de permitir el aislamiento del ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, con alto rendimiento. Para lograr condiciones de unión apropiadas en la etapa a), la muestra puede mezclarse con una disolución de unión apropiada, tal como un tampón de unión que establece las condiciones de unión deseadas. Comúnmente, la etapa a) se llevará a cabo después de la lisis inicial de las muestras, en caso de que se procese una muestra que necesite lisis. Además, otras etapas de pre-tratamiento también pueden llevarse a cabo antes de la etapa a), p. ej. con el fin de clarificar el lisado, para eliminar ácidos nucleicos no diana u otros contaminantes, para concentrar los ácidos nucleicos diana y/o para pre-purificar los ácidos nucleicos diana. En estos casos, la respectiva muestra pre-tratada o procesada se pasa como muestra a través de la columna en la etapa a) y al menos los ácidos nucleicos diana que incluye los ácidos nucleicos diana pequeños, se unen a la fase sólida de unión a ácido nucleico. En caso de que se utilice una disolución de lisis química para la lisis, dicha disolución de lisis también puede contribuir a establecer las condiciones de unión apropiadas.

En la etapa b), un tratamiento enzimático y/o químico se lleva a cabo en la fase sólida mientras el ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, está unido a dicha fase sólida, p. ej. un tratamiento en membrana, en caso de que se utilice una membrana como fase sólida de unión a ácido nucleico. Comúnmente se llevan a cabo respectivos tratamientos durante un procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos e incluyen, pero no están limitado a, tratamientos seleccionados del grupo que consiste en una etapa de digestión con nucleasa, p. ej. un tratamiento de DNasa o RNasa, una etapa de digestión de proteínas, p. ej. un tratamiento con una enzima proteolítica para degradar contaminaciones proteicas que estuvieran unidas p. ej. a una membrana durante la etapa de unión a) (ver p. ej. WO 2009/016110), un tratamiento de lipasa y una etapa de modificación del ácido nucleico diana. Los respectivos tratamientos habitualmente involucran el uso de una o más disoluciones acuosas que tienen una composición que permite o promueve llevar a cabo el tratamiento deseado. Sin embargo, dichas disolución(es) acuosa(s) habitualmente no tiene(n) una composición que permite o promueve la unión del ácido nucleico diana, y en particular de los ácidos nucleicos diana pequeños, a dicha fase sólida de unión a ácido nucleico. Particularmente, esto aplica cuando se lleva a cabo p. ej. un tratamiento enzimático en membrana o en columna porque se deben establecer condiciones que permitan a la enzima estar activa. Por lo tanto, el tratamiento enzimático o químico llevado a cabo en la etapa b) habitualmente involucra condiciones que resultan en una liberación, al menos parcial, de los ácidos nucleicos diana pequeños de la fase sólida de unión a ácido nucleico. Por consiguiente, la adición de la disolución acuosa durante el tratamiento llevado a cabo en la etapa b) resulta en una liberación parcial de los ácidos nucleicos diana que se habían unido en la etapa a) a la fase sólida de unión a ácido nucleico. Cuanto más pequeño sea el ácido nucleico diana, mayor será el riesgo de que dicho ácido nucleico se disocie completamente de la fase sólida de unión a ácido nucleico durante el tratamiento llevado a cabo en la etapa b). Como se discutió anteriormente, los ácidos nucleicos diana respectivamente liberados (que habitualmente son pequeños en tamaño) pueden localizarse sobre, dentro o debajo de la membrana (respectivamente, la fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en la columna). En caso de que los ácidos nucleicos diana liberados estén localizados p. ej. debajo de la membrana o muy por debajo los poros de la membrana, no pueden capturarse eficientemente mediante la aplicación de una disolución de restauración o mediante el uso de un tampón de lavado que mejora la unión. Por consiguiente, se pierden durante el procesamiento siguiente de la muestra, como es el caso en los métodos de acuerdo con la técnica precedente.

Con el fin de capturar, y por consiguiente aislar, respectivamente ácidos nucleicos diana pequeños “escapados” que no pueden volver a unirse mediante la restauración de condiciones de unión apropiadas, la presente invención enseña a eliminar en la etapa c) los ácidos nucleicos diana pequeños “escapados” de la fase sólida de unión a ácido nucleico. Por consiguiente, en la etapa c) al menos una porción de los ácidos nucleicos diana pequeños que se libraron de la fase sólida de unión a ácido nucleico durante dicho tratamiento de la etapa b) se recogen como flujo de salida. Preferiblemente, se recogen respectivamente la mayoría o la totalidad de los ácidos nucleicos diana pequeños “escapados”. Llevar a cabo dicha etapa c) de recolección es esencial, porque aumenta considerablemente el rendimiento de los ácidos nucleicos diana pequeños en el ácido nucleico diana aislado, como también se demuestra mediante los ejemplos. Por supuesto, de esta manera, también pueden recogerse eficientemente ácidos nucleicos diana más grandes que hayan podido liberarse durante la etapa b). Sin embargo, como se discute anteriormente, este problema ocurre con menos frecuencia con ácidos nucleicos diana más grandes porque los ácidos nucleicos diana más grandes habitualmente se unen con más fuerza a la fase sólida de unión a ácido nucleico que los ácidos nucleicos diana más pequeños. Sin embargo, si se liberan, también se recogen eficientemente mediante el método de acuerdo con la presente invención.

En la etapa d), dicho flujo de salida que comprende ácidos nucleicos diana pequeños mezclados con una disolución

de recuperación (y opcionalmente disoluciones/químicos adicionales) se pone en contacto con una fase sólida de unión a ácido nucleico para unir los ácidos nucleicos diana pequeños contenidos a dicha fase sólida. Mediante la mezcla de los ácidos nucleicos diana pequeños con la disolución de recuperación de acuerdo con la presente invención, se establecen las condiciones de unión que permiten unir los ácidos nucleicos diana pequeños recogidos a la fase sólida. Preferiblemente, la fase sólida de unión a ácido nucleico utilizada en la etapa d) para unir los ácidos nucleicos diana pequeños es la misma fase sólida de unión a ácido nucleico que se utiliza en la etapa a). En esta realización, el flujo de salida que comprende los ácidos nucleicos diana pequeños mezclados con una disolución de recuperación se vuelve a aplicar a la fase sólida de unión a ácido nucleico que se utilizó en la etapa a), de esta manera se vuelven a unir los ácidos nucleicos diana pequeños a dicha fase sólida y se reúnen los ácidos nucleicos diana pequeños con los ácidos nucleicos diana que no se liberaron en la etapa b). Como se discute anteriormente, en la etapa a) se utiliza preferiblemente una membrana como fase sólida de unión a ácido nucleico. Sin embargo, también está dentro del alcance de la presente invención utilizar una fase sólida de unión a ácido nucleico diferente en la etapa d), tal como p. ej. partículas magnéticas de sílice, una fase sólida de unión a ácido nucleico basada en columna diferente o el mismo tipo de membrana que se utilizó en la etapa a). Esta recuperación de los ácidos nucleicos diana pequeños "escapados" que se lleva a cabo en la etapa d) permite reducir considerablemente la pérdida de ácidos nucleicos diana pequeños y por consiguiente aumenta el rendimiento de los ácidos nucleicos diana pequeños en el ácido nucleico diana aislado.

En la etapa e) se llevan a cabo una o más etapas de elución. Alternativamente o adicionalmente, se describe que el ácido nucleico diana también puede procesarse mientras está unido a la fase sólida, dependiendo de la aplicación prevista aguas abajo, respectivamente, del uso previsto del ácido nucleico diana. La elución puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la utilización de disoluciones clásicas de elución tales como agua, tampones de elución, tampones bajos en sales y en particular tampones biológicos. Preferiblemente, se utiliza una disolución de elución que no interfiere con las aplicaciones previstas aguas abajo. Sin embargo, también está dentro del alcance de la presente invención liberar y por consiguiente eluir si se desea los ácidos nucleicos diana mediante otros medios de elución, tales como p. ej. calentamiento. En el caso de que en la etapa d) se utilice una fase sólida que difiera de la fase sólida de unión a ácido nucleico utilizada en la etapa a), está dentro del alcance de la presente invención eluir el ácido nucleico diana de la fase sólida utilizada en la etapa a) y separadamente eluir los ácidos nucleicos diana pequeños que se unieron a la fase sólida utilizada en la etapa d) y combinar los respectivos eluidos. También está dentro del alcance de la presente invención combinar las fases sólidas antes de llevar a cabo la etapa de elución. Además, también está dentro del alcance de la presente invención repetir la etapa de elución con el fin de garantizar que todos los ácidos nucleicos diana se liberan eficientemente de la fase de unión a ácido nucleico. Como se muestra mediante los ejemplos, el método de acuerdo con la presente invención, que en contraste con la técnica anterior lleva a cabo adicionalmente las etapas c) y d), aumenta considerablemente el rendimiento de los ácidos nucleicos diana pequeños en el ácido nucleico diana aislado cuando se utiliza un procedimiento de aislamiento de ácido nucleico basado en columna.

Existen varias opciones para llevar a cabo las etapas c) y d) para capturar, y por consiguiente aislar, los ácidos nucleicos diana pequeños "escapados". Algunas realizaciones no limitantes se describen con más detalle a continuación.

De acuerdo con una realización, en la etapa c), se pasa a través de la columna una disolución de recuperación que establece condiciones apropiadas para la unión de ácidos nucleicos pequeños a la fase sólida de unión a ácido nucleico que se utilizó en la etapa a) y se recoge el flujo de salida que comprende los ácidos nucleicos diana pequeños "escapados". Dicho flujo de salida, que ya está mezclado con la disolución de recuperación (y que puede opcionalmente mezclarse con ingredientes adicionales) se aplica en la etapa d) a la misma fase sólida de unión a ácido nucleico que se utilizó en la etapa a). De esta manera, los ácidos nucleicos diana pequeños "escapados" contenidos en el flujo de salida se unen a la fase sólida que se utilizó en la etapa a) (y a la cual están todavía unidos los ácidos nucleicos diana que no se liberaron durante el tratamiento en membrana llevado a cabo en la etapa b)). Se prefiere esta realización porque tiene varias ventajas. Primero, pasar una disolución de recuperación a través de dicha columna, y por consiguiente a través de la fase sólida de unión a ácido nucleico en ella comprendida, establece, respectivamente, restablece las condiciones apropiadas para la unión de ácidos nucleicos pequeños a la fase sólida de unión a ácido nucleico. De esta manera, se garantiza que los ácidos nucleicos diana, y en particular los ácidos nucleicos diana pequeños que se liberaron al menos parcialmente durante el tratamiento de la etapa b) pero que todavía pueden volver a unirse a la fase sólida, se vuelven a unir eficientemente a dicha fase sólida porque la solución de recuperación restablece condiciones apropiadas de unión. Segundo, los ácidos nucleicos diana pequeños "escapados" que no pueden volver a unirse a la fase sólida mediante el restablecimiento de las condiciones apropiadas de unión se eliminan eficientemente, y por consiguiente se recogen como flujo de salida en la disolución de recuperación. Tercero, utilizar directamente la disolución de recuperación en la etapa c) para recoger los ácidos nucleicos diana pequeños "escapados" tiene la ventaja de que los ácidos nucleicos diana pequeños "escapados" se proporcionan directamente en una disolución que proporciona condiciones de unión apropiadas para volver a unir los ácidos nucleicos diana pequeños "escapados" a la fase sólida que se utilizó en la etapa a) para unir los ácidos nucleicos diana que incluye los ácidos nucleicos diana pequeños. De esta manera, los ácidos nucleicos diana pequeños "escapados" pueden volver a reunirse con los ácidos nucleicos diana que todavía están unidos a dicha fase sólida y por consiguiente, todos los ácidos nucleicos diana pueden procesarse juntos en las etapas de preparación subsecuentes.

De acuerdo con una realización adicional para recoger los ácidos nucleicos diana escapados, el tratamiento enzimático y/o químico llevado a cabo en la etapa b) comprende la utilización de una disolución acuosa, y los ácidos nucleicos diana pequeños “escapados” se guardan mediante la recolección del flujo de salida que comprende los ácidos nucleicos pequeños diana y la disolución acuosa que se utilizó para el tratamiento en la etapa b). En esta realización, la disolución de recuperación puede añadirse al flujo de salida después de que sea recogido en la etapa c), y la mezcla obtenida, opcionalmente mezclada con aditivos adicionales, se pone en contacto en la etapa d) con una fase sólida de unión a ácido nucleico, que preferiblemente es la fase sólida de unión a ácido nucleico que se utilizó en la etapa a), como se describe anteriormente.

De acuerdo con una realización, una disolución acuosa, p. ej. un tampón de reacción, agua o un tampón de elución se aplica a, y se pasa a través de, la columna que comprende la fase sólida de unión a ácido nucleico, que preferiblemente es una membrana. Los ácidos nucleicos diana pequeños liberados se recogen entonces en dicha disolución acuosa. Si se desea, puede llevarse a cabo un tratamiento enzimático y/o químico de los respectivos ácidos nucleicos diana pequeños recogidos, y también está dentro del alcance de la presente invención añadir composiciones/sustancias adicionales a los ácidos nucleicos diana pequeños recogidos. Además, se puede llevar a cabo un tratamiento enzimático y/o químico de los ácidos nucleicos diana que todavía están unidos a la fase sólida utilizada en la etapa a). Esta realización tiene la ventaja de que permite tratar los ácidos nucleicos unidos (habitualmente más grandes) de manera diferente a los ácidos nucleicos diana pequeños pre-eluidos y recogidos.

De acuerdo con un aspecto, se proporciona un método para aislar de una muestra un ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños que tienen una longitud inferior a 500 nucleótidos, en donde el ácido nucleico diana comprende o consiste en ácidos diana pequeños, dicho método comprende al menos las siguientes etapas

- a) Unir al menos una porción del ácido nucleico diana, que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, a una membrana de unión a ácido nucleico mediante el paso de la muestra a través de dicha membrana de tal forma que el ácido nucleico diana, que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, se una a la membrana,
- b) llevar a cabo un tratamiento que involucre una disolución acuosa en la membrana mientras el ácido nucleico diana, que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, está unido a dicha membrana,
- c) pasar una disolución de recuperación a través de dicha membrana y recoger el flujo de salida que comprende ácidos nucleicos diana pequeños,
- d) pasar dicho flujo de salida a través de dicha membrana de la etapa a) para volver a unir los ácidos nucleicos diana pequeños contenidos a dicha membrana,
- e) eluir el ácido nucleico diana que incluye el ácido nucleico diana pequeño de dicha membrana. Preferiblemente, se eluyen de la membrana los ácidos nucleicos diana que incluyen los ácidos nucleicos diana pequeños.

Cualquier método apropiado puede utilizarse en la etapa c) para recoger al menos una porción de los ácidos nucleicos diana pequeños como flujo de salida. Los métodos de recolección apropiados utilizados cuando se lleva a cabo un procedimiento de aislamiento de ácido nucleico basado en columna incluyen, pero no están limitados a, llevar a cabo una etapa de centrifugación, aplicar una presión positiva o negativa con el fin de presionar o succionar los ácidos nucleicos diana pequeños, que preferiblemente se comprenden en una disolución de recuperación o una disolución acuosa como se describe anteriormente, en cualquier dirección a través de la fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en la columna, en donde dicha fase sólida preferiblemente es una membrana.

La disolución de recuperación que se utiliza para volver a unir los ácidos nucleicos diana pequeños “escapados” debería proporcionar, respectivamente, establecer, condiciones apropiadas para unir ácidos nucleicos pequeños a la fase sólida de unión a ácidos nucleicos utilizada en la etapa d). La disolución de recuperación también puede obtenerse mediante la mezcla de una o más disoluciones y/o ingredientes. La disolución de recuperación puede proporcionar condiciones apropiadas para unir ácidos nucleicos totales, que incluyen ácidos nucleicos pequeños, a la fase sólida de unión a ácidos nucleicos utilizada en la etapa d). En caso de que se deba aislar un ácido nucleico diana específico, la disolución de recuperación puede proporcionar las condiciones apropiadas para unir preferiblemente el tipo deseado de ácido nucleico diana (p. ej. RNA total que incluye RNA pequeño) a la fase sólida de unión a ácido nucleico utilizada en la etapa d). También puede proporcionar condiciones apropiadas para unir DNA (p. ej. DNA total, DNA genómico, DNA fragmentado y/o DNA de bajo peso molecular tal como DNA plasmídico) que incluye DNA pequeño a la fase sólida de unión a ácido nucleico utilizada en la etapa d), en caso de que el ácido nucleico diana deseado sea DNA. Las condiciones de unión proporcionadas por la disolución de recuperación y/o la mezcla de la disolución de recuperación y el flujo de salida recogido en la etapa c) pueden ser las mismas o similares a las condiciones que se utilizan en la etapa a) para unir los ácidos nucleicos diana, que incluyen los ácidos nucleicos diana pequeños, a la fase sólida de unión a ácidos nucleicos comprendida en la columna. Sin embargo, preferiblemente, la disolución de recuperación, respectivamente, las condiciones de unión que se utilizan en la etapa d), son más fuertes que las condiciones de unión utilizadas en la etapa a). Preferiblemente, la disolución de recuperación, que también puede obtenerse mediante la mezcla de una o más disoluciones o agentes químicos, comprende al menos un agente caotrópico y/o al menos un alcohol.

Puede utilizarse para ese propósito cualquier agente caotrópico que causa desorden en una proteína o ácido nucleico mediante, por ejemplo, pero no limitado a, alterar la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de una proteína o un ácido nucleico mientras que deja la estructura primaria intacta. Preferiblemente, el agente caotrópico se selecciona del grupo que consiste en hidrocloreto de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina, tiocianato de sodio, yoduro de sodio, perclorato de sodio, tricloroacetato de sodio, trifluoroacetato de sodio y urea. Preferiblemente, se utiliza una sal caotrópica. En particular, se pueden utilizar como agente caotrópico hidrocloreto de guanidina y/o tiocianato de guanidina.

La concentración de al menos un agente caotrópico en la disolución de recuperación y/o en la mezcla de unión que se utiliza en la etapa d) puede estar en un rango de 0,05 M hasta el límite de saturación. Los rangos de concentración preferidos están, dependiendo del agente caotrópico que se use, en el rango aproximadamente de 0,1 M a 6 M, aproximadamente de 0,2 M a 4 M, aproximadamente de 0,5 M a 3 M, y preferiblemente se extienden en el rango aproximadamente de 0,8 M a 2 M.

Además, la disolución de recuperación y/o la mezcla de unión que se utiliza en la etapa d) para unir los ácidos nucleicos diana pequeños recogidos a la fase sólida de unión a ácido nucleico puede comprender al menos un alcohol. Como alcohol, es preferible utilizar alcoholes con cadenas de ramificación cortas o sin ramificaciones preferiblemente con uno a 5 átomos de carbono. Algunos ejemplos son metanol, etanol, propanol, isopropanol y butanol. También pueden utilizarse mezclas de alcohol. Preferiblemente el alcohol se selecciona de isopropanol y etanol, cuando se aísla RNA como ácido nucleico diana es particularmente apropiado el isopropanol. De acuerdo con una realización, el método de acuerdo con la presente invención no involucra el uso de fenol y/o cloroformo para unir los ácidos nucleicos. Sin embargo, se pueden utilizar el fenol y el cloroformo p. ej. para la preparación de la muestra y/o la lisis de la muestra, p. ej. con el fin de obtener una fase acuosa que comprenda los ácidos nucleicos diana, en particular RNA. P. ej. dicha fase acuosa también puede utilizarse como muestra en la etapa a) preferiblemente mezclada con un alcohol, para unir los ácidos nucleicos diana a la membrana, como también se demuestra en los ejemplos.

Un alcohol puede comprenderse en la disolución de recuperación y/o en la mezcla de unión utilizadas en la etapa d) en una concentración de 10% v/v a 90% v/v. Para aislar un ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, es beneficioso utilizar una concentración de alcohol de  $\geq 30\%$  v/v,  $\geq 40\%$  v/v,  $\geq 50\%$  v/v, preferiblemente  $\geq 60\%$  v/v,  $\geq 70\%$  v/v. Preferiblemente, la concentración del alcohol está en un rango de aproximadamente 30% v/v a 90% v/v o aproximadamente 40% v/v a 85% v/v, más preferiblemente en el rango de aproximadamente 60% v/v a 80% v/v.

En la etapa a), la unión puede llevarse a cabo bajo las mismas o similares condiciones que se describieron anteriormente para la etapa d). Por consiguiente, las condiciones de unión utilizadas en la etapa a) pueden tener una o más de las siguientes características:

a) las condiciones son apropiadas para unir ácidos nucleicos totales que incluyen ácidos nucleicos pequeños a la fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en la columna;

b) las condiciones son apropiadas para unir el RNA total que incluye RNA pequeños a la fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en la columna;

c) las condiciones son apropiadas para unir DNA que incluye DNA pequeños a la fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en la columna;

d) la unión ocurre en la presencia de al menos un agente caotrópico que se selecciona de un grupo que consiste en hidrocloreto de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina, tiocianato de sodio, yoduro de sodio, perclorato de sodio, tricloroacetato de sodio, trifluoroacetato de sodio y urea;

f) la unión ocurre en la presencia de al menos un agente caotrópico que se contiene en la mezcla de unión en una concentración seleccionada de 0,1 M hasta la concentración límite de saturación, preferiblemente 0,5 a 6 M, más preferiblemente 0,5 a 4 M; y/o

g) la unión ocurre en la presencia de al menos un alcohol que se selecciona del grupo que consiste en alcoholes descritos anteriormente para la etapa de unión d).

También se pueden utilizar aditivos adicionales en la mezcla de unión de la etapa a) y/o etapa d). P. ej. se pueden utilizar aditivos que apoyen la lisis de la muestra, la degradación de proteínas y/o que preserven el ácido nucleico diana en la mezcla de unión. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, agentes quelantes, inhibidores, detergentes, agentes de tamponado, agentes estabilizadores, agentes alcalinos, inhibidores de nucleasas y beta-mercaptoetanol, en particular EDTA, EGTA, sales, tales como cloruro de sodio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, LiCl u otras sustancias que promueven la unión y/o la precipitación de los ácidos nucleicos. Los aditivos respectivos pueden comprenderse p. ej. en la solución de recuperación y/o la disolución de unión pero también pueden añadirse separadamente. Además, un tampón biológico puede utilizarse durante la unión en la etapa a) y/o la etapa d) y por consiguiente, también puede comprenderse en la disolución de recuperación. Los ejemplos de los tampones respectivos incluyen, pero no están limitados a, HEPES, MES, MOPS, TRIS, citrato de sodio, acetato de



sodio y BIS-TRIS Propano.

El valor de pH utilizado durante la unión en la etapa a) y o d) está preferiblemente en un rango de 4 a 11, para el RNA preferiblemente en un rango de aproximadamente 5 a 8, lo más preferiblemente de 5 a 7,5. Para DNA el valor de pH preferiblemente está dentro del rango de aproximadamente 5 a 11, lo más preferiblemente en el rango de aproximadamente 6 a 10. Cuando se aíslan ambos tipos de ácidos nucleicos como ácido nucleico diana el pH preferiblemente está dentro de un rango de aproximadamente entre 6 y 8. Preferiblemente, la solución de recuperación comprende un tampón que tampona el pH en los rangos descritos anteriormente. De acuerdo con una realización, el pH de la disolución de recuperación está dentro del rango de aproximadamente pH 5 a 11, preferiblemente en el rango de aproximadamente 5,5 a 8; lo más preferiblemente la disolución de recuperación tiene un pH en el rango de aproximadamente 5 a 7,5 o aproximadamente 7. En particular, los respectivos valores de pH son apropiados para aislar RNA como ácido nucleico diana.

De acuerdo con una realización, una o más etapas de lavado se llevan a cabo entre las etapas a) y b) y/o después de la etapa d) mientras los ácidos nucleicos diana están unidos a la fase sólida. Para este propósito se pueden utilizar disoluciones de lavado comunes. Se recomienda utilizar disoluciones de lavado que no resulten en una liberación de los ácidos nucleicos diana, que incluyen los ácidos nucleicos diana pequeños, de la fase sólida de unión a ácido nucleico. De acuerdo con una realización, la disolución utilizada para lavar comprende al menos un agente caotrópico, al menos un alcohol y/o al menos un componente de tamponado. También puede comprender un detergente. Los agentes caotrópicos que se pueden utilizar en las disoluciones de lavado incluyen, pero no están limitadas a, hidrocloreuro de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina, y yoduro de sodio. Además, pueden utilizarse sales caotrópicas que comprenden un anión caotrópico seleccionado del grupo que consiste en tricloroacetato, perclorato y trifluoroacetato. Son ejemplos de las respectivas sales caotrópicas sales alcalinas como perclorato de sodio, tricloroacetato de sodio y trifluoroacetato de sodio. Como alcoholes, pueden utilizarse para lavar, respectivamente, en la disolución de lavado, alcoholes con ramificaciones de cadena corta o sin ramificaciones con preferiblemente de uno a 5 átomos de carbono. Algunos ejemplos son metanol, etanol, propanol, isopropanol y butanol. Preferiblemente se utilizan isopropanol y/o etanol.

De acuerdo con una realización, la disolución de lavado comprende al menos 30% de alcohol y al menos 0,5 M de sal caotrópica, preferiblemente al menos 2 M de sal caotrópica. Además, la disolución de lavado puede comprender un detergente. Preferiblemente, se utilizan como detergente detergentes iónicos y/o no iónicos. Preferiblemente, se utiliza un detergente no iónico en una concentración de al menos 0,1%. Una respectiva disolución de lavado es apropiada p. ej. para lavar RNA.

Una disolución de lavado apropiada adicional que puede utilizarse alternativamente, o también además (preferiblemente subsecuentemente), de las disoluciones de lavado descritas anteriormente comprende un alcohol y un tampón biológico. Anteriormente se describen alcoholes y tampones biológicos apropiados. Preferiblemente, isopropanol o etanol, lo más preferiblemente se utiliza etanol para una segunda etapa de lavado. Preferiblemente, se utiliza etanol en una concentración de al menos 30% v/v, preferiblemente al menos 50% v/v. El tampón biológico es preferiblemente Tris a un pH de aprox. 7 a 8. Sin embargo, también pueden utilizarse otros tampones tales como citrato de sodio y también otros valores de pH, dependiendo del ácido nucleico diana aislado y de la muestra procesada.

Otra disolución de lavado apropiada adicional que puede utilizarse alternativamente, o también además (preferiblemente subsecuentemente), de las disoluciones de lavado descritas anteriormente también comprende uno o más alcoholes y opcionalmente un tampón. Anteriormente se describen alcoholes y tampones biológicos apropiados. Preferiblemente, isopropanol o etanol, lo más preferiblemente se utiliza etanol para una etapa de lavado alternativa. Preferiblemente, se utiliza etanol en una concentración de al menos 50% v/v, preferiblemente al menos 70% o más.

El término "muestra" se utiliza en la presente memoria en un sentido amplio y pretende incluir una variedad de fuentes y composiciones que contienen ácidos nucleicos. La muestra puede ser una muestra biológica pero el término también incluye otras, p. ej. muestras artificiales que comprenden ácidos nucleicos tales como p. ej. productos de PCR o composiciones que comprenden ácidos nucleicos ya purificados que se supone p. ej. se van a concentrar aún más y/o a purificar aún más. Las muestras de ejemplo incluyen, pero no están limitadas a, sangre; productos sanguíneos; glóbulos rojos; glóbulos blancos; fracción leucocitaria; frotis, incluidos, pero no limitados a, frotis bucales, frotis faríngeos, frotis vaginales, frotis uretrales, frotis cervicales, frotis faríngeos, frotis rectales, frotis de lesiones, frotis de abscesos, frotis nasofaríngeos, y similares; orina; esputos; saliva; semen; fluido linfático; fluido amniótico; fluido cerebroespinal; efusiones peritoneales; efusiones pleurales; fluidos de quistes; fluidos sinoviales; humor vítreo; humor acuoso; fluido de bursa; lavados oculares; aspirados oculares; plasma; suero; lavado pulmonar; aspirados pulmonares; animal, incluidos tejidos humanos o vegetales, incluidos, pero no limitados a, hígado, bazo, riñón, pulmón, intestino, cerebro, corazón, músculo, páncreas, cultivos celulares así como lisados, extractos, o materiales y fracciones obtenidos de las muestras descritas anteriormente o cualquier célula y microorganismo y virus que pueda presentarse en una muestra y similares. Los materiales obtenidos de escenarios clínicos o forenses que contienen ácidos nucleicos también están dentro del significado pretendido del término "muestra". Preferiblemente, la muestra es una muestra biológica derivada de un humano, animal, planta, bacteria u hongo. Preferiblemente, la muestra se selecciona de un grupo que consiste en células, tejido, bacteria, virus y

fluidos corporales tales como por ejemplo, sangre, productos sanguíneos, tales como la fracción leucocitaria, plasma y suero, orina, fluido, esputos, heces, CSF y esperma, frotis epiteliales, biopsias, muestras de médula ósea y muestras de tejido, preferiblemente muestras de tejido orgánico tales como pulmón, riñón o hígado. Además, un experto en la técnica apreciará que lisados, extractos, o materiales procesados o porciones obtenidas de cualquiera de las muestras de ejemplo anteriores también están dentro del alcance del término "muestra". Este en particular incluye, pero no está limitado a, lisados de muestras, lisados clarificados, porciones de muestras pre-extraídas que están p. ej. enriquecidas en un cierto tipo de ácido nucleico diana como es el caso p. ej. durante una extracción de fenol/cloroforno en donde ácidos nucleicos tales como RNA se concentran en la fase acuosa, ácidos nucleicos purificados que se supone se van a purificar y/o concentrar aún más y similares. El término "muestra" también incluye muestras procesadas, tales como muestras preservadas, fijadas y/o estabilizadas. Se pueden utilizar como fijadores, tanto fijadores que establecen enlaces cruzados como fijadores que no establecen enlaces cruzados (algunos ejemplos comerciales no limitantes incluyen fijador de tejidos PAXgene o disolución de carnoy). Ejemplos de estabilizadores disponibles comercialmente que pueden utilizarse para estabilizar la muestra incluyen, pero no están limitados a, RNAlater, Allprotect Tissue, RNprotect Cell, RNprotect Saliva, RNprotect Bacteria, PAXgene Blood RNA, PAXgene Blood DNA, PAXgene Bone Marrow RNA y QIA-safe.

En particular, el método de acuerdo con la presente invención es útil para aislar ácidos nucleicos diana de muestras que contienen ácidos nucleicos degradados o en riesgo, tales como p. ej. RNA degradado o DNA degradado. Ejemplos no limitantes de tales muestras incluyen muestras que contienen células que han sido preservadas, p. ej. fijadas con formalina y embebidas en parafina (muestras FFPE) u otras muestras que se han tratado con fijadores que establecen enlaces cruzados tales como p. ej. glutaraldehído. P. ej. las muestras de biopsias de tumores se almacenan rutinariamente después de los procedimientos quirúrgicos mediante FFPE, lo cual puede poner en riesgo la integridad del DNA y/o el RNA. Los respectivos ácidos nucleicos degradados a menudo tienen un tamaño pequeño y por consiguiente son ácidos nucleicos pequeños. El método descrito puede utilizarse ventajosamente para aislar ácidos nucleicos diana que consisten en, o comprenden, ácidos nucleicos diana pequeños. P. ej. la muestra puede ser una muestra que comprende ácidos nucleicos pequeños tales como RNA no codificante (p. ej. snoRNA o miRNA) o DNA pequeño. Además, el ácido nucleico diana puede consistir o puede comprender ácidos nucleicos modificados o degradados. La modificación o degradación puede deberse p. ej. al tratamiento con conservador(es).

El término "ácido nucleico" como se utiliza en la presente memoria, se refiere en particular a un polímero que comprende ribonucleósidos y/o desoxirribonucleósidos que están unidos covalentemente, típicamente mediante enlaces fosfodiéster entre subunidades, pero en algunos casos mediante fosforotioatos, metilfosfonatos, y similares. Los ácidos nucleicos incluyen, pero no están limitados a, gDNA; DNA circular; DNA de bajo peso molecular, DNA plasmídico; DNA circulante; hnRNA; mRNA; RNA no codificante (ncRNA), que incluye, pero no se limita a, rRNA, tRNA, miRNA (micro RNA), si RNA (RNA pequeño de interferencia), snoRNA (RNA pequeño nucleolar), snRNA (RNA pequeño nuclear) y stRNA (RNA pequeño temporal); ácidos nucleicos fragmentados o degradados; PNAs; ácido nucleico obtenido de orgánulos subcelulares tales como mitocondrias o cloroplastos; y ácido nucleico obtenido de microorganismos, parásitos, o virus de DNA o de RNA que pueden estar presentes en una muestra biológica. También están dentro del alcance de la invención las secuencias de ácido nucleico sintéticas que pueden incluir o no análogos de nucleótidos que se añaden o adicionan en una muestra biológica.

Los términos "ácido nucleico pequeño" y "ácidos nucleicos pequeños" se refieren a ácidos nucleicos que tienen una longitud inferior a 500 nt, inferior a 400 nt, inferior a 300 nt, inferior a 200 nt, inferior a 100 nt o inferior a 70 nt e incluyen, pero no están limitados a, miRNA, siRNA y otros ácidos nucleicos de interferencia cortos, snoRNA, snRNA, tRNA, piRNA, trRNA, rRNA pequeño, hnRNA, ácidos nucleicos circulantes, fragmentos de DNA genómico o RNA, ácidos nucleicos degradados, ribozimas, RNA o DNA viral, ácidos nucleicos de origen infeccioso, productos de amplificación, ácidos nucleicos modificados, ácidos nucleicos plasmídicos u organulares y ácidos nucleicos artificiales tales como oligonucleótidos.

El método de acuerdo con la presente invención pertenece a un método para aislar al menos un ácido nucleico diana. Los términos "ácido nucleico diana" y "ácidos nucleicos diana" se utilizan en la presente memoria como sinónimos. Como resulta evidente a partir de los ejemplos descritos de muestras que pueden procesarse de acuerdo con el método de la presente invención, una muestra puede comprender más de un tipo de ácido nucleico. Dependiendo del uso previsto, puede ser deseable aislar todos los tipos de ácidos nucleicos de una muestra (p. ej. DNA y RNA que serían después ambos abarcados por el término ácido nucleico diana o ácidos nucleicos diana) o solo ciertos tipos o un cierto tipo de ácido nucleico (p. ej. solo RNA pero no DNA o viceversa) o RNA y DNA en paralelo, p. ej. de una muestra, pero separadamente uno de otro. Todas estas variantes están dentro del alcance de la presente invención. El término "ácido nucleico diana pequeño" o "ácidos nucleicos diana pequeños" (estos términos también se utilizan como sinónimos) en particular se refiere a ácidos nucleicos pequeños del tipo deseado diana, p. ej. RNA pequeño o DNA pequeño, o ambos RNA pequeño y DNA pequeño. Además, la expresión "un ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños" no se refiere únicamente a un ácido nucleico diana que comprende porciones de ácidos nucleicos diana pequeños (tales como p. ej. RNA total o DNA total) sino que también se refiere a, y abarca, ácidos nucleicos diana que consisten en ácidos nucleicos diana pequeños y por consiguiente, que no comprenden ácidos nucleicos más grandes.

La muestra puede procesarse antes de llevar a cabo la etapa de unión a). P. ej. la muestra se puede romper y/o lisar

- con el fin de liberar los ácidos nucleicos contenidos en la muestra. El proceso utilizado depende de la muestra de la que se ha previsto aislar el ácido nucleico diana e incluye, pero no está limitada a, disrupción mecánica, disrupción química, la adición de enzimas proteolíticas, detergentes y similares para conseguir la disrupción, respectivamente, lisis, de la muestra. El lisado también puede ser clarificado o procesado de otra manera antes de llevar a cabo la etapa de unión a). En la técnica anterior se conocen, y por consiguiente no necesitan describirse aquí, métodos apropiados de lisis/disrupción y tampones de lisis. Además, se pueden llevar a cabo etapas de procesamiento adicionales, tales como p. ej. una o más reducciones para eliminar ácidos nucleicos no diana u otros componentes no deseados y/o los ácidos nucleicos u otras biomoléculas contenidas en la muestra pueden modificarse antes de unir en la etapa a) el ácido nucleico diana a la fase sólida de unión a ácido nucleico basada en columna.
- Además, si se procesan de acuerdo con el método de la presente invención muestras especiales, tales como muestras embebidas, es preferible incluir etapas para liberar los ácidos nucleicos y/o la muestra de la matriz de embebecimiento (p. ej. de la parafina). Además, en el caso de que se procesen de acuerdo con el método de la presente invención muestras especiales, tales como muestras fijadas y fijadas con fijadores que establecen enlaces cruzados, también es preferible incluir etapas para liberar los ácidos nucleicos de la muestra fijada y por consiguiente revertir p. ej. las modificaciones causadas por la etapa de fijado, en particular para eliminar los enlaces cruzados. P. ej., etapas adicionales, tales como etapas de calentamiento, pueden llevarse a cabo en el caso de que los ácidos nucleicos contenidos en la muestra tengan p. ej. enlaces cruzados p. ej. como en el caso de las muestras FFPE. En la técnica anterior se conocen métodos y etapas de procesamiento apropiados para conseguir ese resultado y obtener una muestra a partir de la cual el ácido nucleico diana puede ser aislado y también se describen en p. ej. EP 10 001 995.9, PCT/EP2011/000920 y WO 2007/068764.
- De acuerdo con una realización, la muestra comprende al menos un ácido nucleico no diana y al menos un ácido nucleico diana. De acuerdo con una realización, el método de acuerdo con las presentes invenciones comprende una etapa que elimina al menos una porción de ácido nucleico no diana. P. ej., el ácido nucleico no diana puede eliminarse mediante la unión de al menos una porción del ácido nucleico no diana a una fase sólida en condiciones apropiadas y luego separar el ácido nucleico no diana unido a la fase sólida de la muestra restante que comprende el ácido nucleico diana. Esto puede conseguirse p. ej. mediante la adición de una fase sólida apropiada bajo condiciones en donde mayoritariamente los ácidos nucleicos no diana se unen a la fase sólida. Se describen métodos apropiados para eliminar selectivamente un ácido nucleico no diana de un ácido nucleico diana en por ejemplo EP 0 880 537 y WO 95/21849.
- Otros métodos incluyen p. ej. una extracción de fenol/cloroformo p. ej. con el fin de concentrar el RNA en la fase acuosa, que se utiliza luego, preferiblemente mezclada con un alcohol, para unir el RNA a la membrana en la etapa a). Otros métodos apropiados para separar ácidos nucleicos diana de ácidos nucleicos no diana, que en particular son útiles para separar DNA de RNA cuando se aísla el ácido nucleico diana (o RNA y DNA en paralelo) de una muestra fijada, tal como una muestra FFPE, se describen en EP 10 001 995.5 y PCT/EP2011/000920.
- Cuando se pretende aislar (solo) RNA como ácido nucleico diana, el ácido nucleico no diana es habitualmente DNA. En esta realización, preferiblemente se lleva a cabo una digestión DNasa en la etapa b) con el fin de eliminar, respectivamente, reducir, las contaminaciones de DNA. Además, cuando se pretende aislar DNA como ácido nucleico diana, se puede llevar a cabo una digestión RNasa como etapa b) con el fin de eliminar, respectivamente, reducir, las contaminaciones de RNA. Cuando se utiliza una membrana como fase sólida de unión a ácido nucleico, los respectivos tratamientos en membrana resultan en la liberación de una considerable cantidad de los ácidos nucleicos diana y en particular los ácidos nucleicos diana pequeños. Como se describe anteriormente y en el ejemplo, el otro ácido nucleico no diana también puede aislarse en paralelo.
- De acuerdo con una realización, la muestra comprende al menos un ácido nucleico diana y al menos una biomolécula no diana, como p. ej. proteínas, lípidos, carbohidratos o metabolitos. De acuerdo con una realización, el método de acuerdo con las presentes invenciones comprende una etapa que elimina al menos una porción de las biomoléculas no diana. P. ej., la biomolécula no diana puede eliminarse mediante la unión de al menos una porción de la biomolécula no diana a una fase sólida en condiciones apropiadas y luego separar la biomolécula no diana unida a la fase sólida de la muestra restante que comprende el ácido nucleico diana. Esto puede conseguirse p. ej. mediante la adición de una fase sólida apropiada bajo condiciones en donde mayoritariamente las biomoléculas no diana se unen a la fase sólida. Otros métodos apropiados para separar ácidos nucleicos diana de otras biomoléculas no diana, incluyen la eliminación de las biomoléculas no diana mediante reacciones químicas o enzimáticas, que también pueden hacerse en la membrana p. ej. durante la etapa b) (ver p. ej. DE 10 2007 035 250).
- En la técnica anterior se conocen, y por consiguiente no necesitan describirse en detalle, enzimas DNasa y RNasa apropiadas y otras enzimas que afectan a p. ej. biomoléculas no diana así como tampones y soluciones que pueden utilizarse para llevar a cabo respectivamente un tratamiento enzimático en la etapa b).
- La presente invención involucra en la etapa a) el uso de una fase sólida de unión a ácido nucleico que se comprende en una columna. El término "columna" como se usa en la presente memoria describe en particular un recipiente que tiene al menos dos aperturas. De esta manera, una disolución y/o muestra puede pasar a través de dicha columna. El término "columna" en particular no implica ninguna restricción con respecto a la forma del recipiente que puede ser p. ej. circular o angular y preferiblemente es cilíndrico. Sin embargo, también pueden utilizarse otras formas, en

particular cuando se utilizan columnas múltiples. La columna comprende la fase sólida de unión al ácido nucleico. Dicha fase sólida que se comprende en dicha columna debe permitir el paso de una disolución, respectivamente, la muestra, cuando se aplique a la columna. Esto significa que si p. ej. se aplica a la columna una fuerza centrífuga, una disolución y/o la muestra puede pasar a través de la columna en la dirección de la fuerza centrífuga. Como se discute anteriormente, cuando se utiliza un procedimiento respectivo de aislamiento de ácido nucleico basado en columna, habitualmente la muestra se pasa a través de la columna, p. ej. ayudada mediante centrifugación o vacío, y los ácidos nucleicos se unen a la fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida durante dicho paso. La columna puede utilizarse en formato individual o en un formato múltiple. En la técnica anterior se conocen bien tales columnas múltiples que tienen un formato similar a las placas de pocillos múltiples y comprenden una fase sólida de unión a ácido nucleico tal como una membrana. Preferiblemente, la columna es una columna giratoria.

Como fase sólida de unión a ácido nucleico, puede utilizarse cualquier fase sólida que se utilice habitualmente en procesos de aislamiento de ácido nucleico basados en columna. Preferiblemente, se utiliza en la etapa a) una membrana de unión a ácido nucleico, y por consiguiente una membrana que es capaz de unir ácidos nucleicos. Las membranas apropiadas incluyen, pero no están limitadas a, membranas hidrofílicas, membranas hidrofóbicas y membranas que unen ácidos nucleicos vía intercambio iónico. Algunos ejemplos incluyen, pero no están limitados a, membranas de sílice, membranas de fibra de vidrio, membranas de nylon, membranas de celulosa, tales como membranas de nitrocelulosa, membranas de celulosa modificada (p. ej. acetil- o hidroxil-), membranas de papel, en particular de papeles modificados. Preferiblemente, la membrana es porosa. Además, es preferible utilizar una membrana que comprende o que consiste en sílice. Una fase sólida de unión a ácido nucleico adicional comprendida en una columna es un relleno de partículas de unión a ácido nucleico, tales como partículas de sílice, o una capa de un material de unión a ácido nucleico (p. ej. un gel de sílice). P. ej. las partículas de sílice pueden colocarse como una capa sobre un filtro inerte o membrana, de esta manera se forma una fase sólida de unión a ácido nucleico. Los problemas descritos anteriormente con respecto a la pérdida de los ácidos nucleicos diana y en particular la pérdida de ácidos nucleicos diana pequeños son más importantes cuanto más fina es la fase sólida de unión a ácido nucleico. Dado que una capa fina de una fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en una columna (similar a una membrana de unión a ácido nucleico) aumenta el riesgo de que ácidos nucleicos diana pequeños liberados puedan escapar rápidamente y por consiguiente perderse durante el proceso de aislamiento de ácido nucleico. Como se describe anteriormente, la presente invención proporciona una solución a ese problema y de esta manera permite aislar ácidos nucleicos diana que incluyen ácidos nucleicos diana pequeños con alto rendimiento. Por consiguiente, de acuerdo con una realización, la fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en la columna tiene un altura total que es igual o menor que su anchura. P. ej. la fase sólida de unión a ácido nucleico puede componerse de una capa de un material de unión a ácido nucleico y/o un relleno, respectivamente, capa de partículas de unión a ácido nucleico, preferiblemente, partículas de sílice, que se aplica como una pequeña capa sobre una membrana o filtro. Se describen en detalle a continuación materiales y partículas apropiados de unión a ácido nucleico.

Se pueden utilizar medios apropiados para aligerar el paso de la muestra a través de la fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en la columna tales como p. ej. centrifugación o la utilización de un aparato que genera diferencia de presiones que p. ej. presiona la muestra a través de la columna, respectivamente, la fase sólida de unión a ácido nucleico, o la aspira a través de la fase sólida de unión a ácido nucleico mediante la aplicación de un vacío. Los medios respectivos se conocen bien en la técnica anterior, y por consiguiente no necesitan describirse más en detalle aquí.

Como fase sólida de unión a ácido nucleico que puede utilizarse en la etapa d), puede utilizarse cualquier material capaz de unir ácidos nucleicos y en particular ácidos nucleicos diana pequeños e incluye una variedad de materiales que son capaces de unir ácidos nucleicos bajo las condiciones apropiadas. Dicha fase sólida utilizada en la etapa d) no ha de estar necesariamente basada en columna, aunque es preferible por la facilidad de manejo. Fases sólidas a modo de ejemplo que pueden utilizarse en conjunción con la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, compuestos que comprenden sílice, incluidos, pero no limitados a, partículas de sílice, dióxido de silicio, tierra de diatomeas, vidrio, alquilar sílice, silicato de aluminio, y boro silicato; nitrocelulosa; papel diazotizado; hidroxapatita (también referida como hidroxil apatita); nylon; óxidos de metal; circonita; alúmina; soportes poliméricos, soportes derivatizados de dietilaminoetil y trietilaminoetil, resinas de cromatografía hidrofóbicas (tales como fenil u octil Sepharosa) y similares. El término fase sólida no pretende implicar ninguna limitación en relación con su forma o diseño. Por consiguiente, el término fase sólida abarca materiales apropiados que son porosos o no porosos; permeables o impermeables; incluidos, pero no limitados a, membranas, filtros, láminas, partículas, partículas magnéticas, cubiertas líquidas, geles, polvos, fibras, y similares. De acuerdo con una realización, la superficie de la fase sólida, tal como p. ej. la fase sólida de sílice utilizada en la etapa d) o la fase de unión a ácido nucleico utilizada en la etapa a), no se modifica y p. ej. no se modifica con grupos funcionales. Como se describe anteriormente, es preferible que en la etapa d) se utilice una membrana de unión a ácido nucleico. Dicha membrana puede tener las mismas características descritas anteriormente para la membrana de unión a ácido nucleico que se utiliza en la etapa a). Aunque, en particular, es preferible que se utilice la misma membrana de unión a ácido nucleico que se utilizó en la etapa a) para volver a unir los ácidos nucleicos diana pequeños "escapados" de dicha membrana en la etapa d).

También está dentro del alcance de la presente invención llevar a cabo etapas intermedias adicionales a las descritas en la presente memoria. Sin embargo, de acuerdo con ciertas realizaciones, no se llevan a cabo etapas

adicionales a las descritas en la presente memoria.

Además se describe la utilización de una disolución de recuperación capaz de unir ácidos nucleicos pequeños a una membrana, para volver a unir ácidos nucleicos pequeños recogidos que se liberaron de dicha membrana de unión a ácido nucleico durante un tratamiento en membrana. Como se discute anteriormente, los ácidos nucleicos se recogen preferiblemente como flujo de salida con el fin de asegurar que ácidos nucleicos pequeños que p. ej. se escurrieron debajo de la membrana también se recogen eficientemente y por consiguiente se recuperan. Anteriormente se han descrito los detalles de la disolución de recuperación y de las condiciones que resultan en la liberación de los ácidos nucleicos diana pequeños, referirse a la descripción anterior.

Además se describe un kit para llevar a cabo los métodos de acuerdo con la presente invención que comprende:

- 10 a) una fase sólida de unión a ácido nucleico, preferiblemente una membrana, comprendida en una columna;
- b) un tampón de unión para unir un ácido nucleico diana, que incluye ácidos nucleicos diana pequeños, a dicha fase sólida de unión a ácido nucleico, que comprende un agente caotrópico y un alcohol;
- 15 c) una disolución de recuperación que comprende un agente caotrópico en una concentración de 0,1 M hasta el límite de saturación, preferiblemente 0,5 M hasta el límite de saturación y/o un alcohol en una concentración de al menos 50%; y
- d) instrucciones para llevar a cabo el método de acuerdo con la presente invención.

Se describen anteriormente detalles de la disolución de recuperación, de la fase sólida de unión a ácido nucleico, que preferiblemente es una membrana y del tampón de unión así como las ventajas asociadas, referirse a la descripción anterior.

## 20 Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento de ácidos nucleicos pequeños de acuerdo con la presente invención o el método de referencia

25 Se utilizaron muestras FFPE de riñón de rata (las muestras se almacenaron después de la fijación y la imbibición durante dos meses a temperatura ambiente) y muestras FFPE derivadas de pulmón de rata (las muestras se almacenaron después de la fijación y la imbibición durante 27 meses a temperatura ambiente). Se obtuvieron cortes que tienen un tamaño de 10 µm de grosor mediante el uso de un microtomo. Se utilizó un corte por muestra. Todas las muestras se procesaron dos veces. Para el subsecuente aislamiento de RNA de los cortes FFPE obtenidos, se utilizaron componentes del kit RNeasy FFPE (QIAGEN) y el kit QIAamp FFPE (QIAGEN).

30 Para eliminar la parafina de las muestras, las muestras se incubaron durante una hora en 1 ml de heptano. Se añadió 50 µl de metanol, se mezcló, se centrifugó la muestra, se recogió el sobrenadante y se secó la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente.

35 Los pellets de las muestras respectivamente derivados y desparafinados se mezclaron con 150 µl de un tampón de digestión de proteasa K (tampón PKD, QIAGEN) y además, se mezclaron con 10 µl de una disolución proteasa K (> 600 mAU/ml). La mezcla se incubó durante 15 minutos a 56°C con agitación a 1400 rpm. Las muestras se enfriaron en hielo durante 3 minutos y se centrifugaron durante 30 minutos para eliminar los componentes no disueltos. El pellet que contenía DNA se descartó (dicho pellet que contenía DNA puede opcionalmente utilizarse para aislar el DNA si se desea) y el sobrenadante se recogió para aislar el RNA contenido como ácido nucleico diana. Con el fin de excluir variaciones atribuibles a los materiales de muestra utilizados, se combinaron los sobrenadantes recogidos, se mezclaron y se dividieron en alícuotas de 150 µl.

40 Subsecuentemente, estas alícuotas se incubaron durante 15 minutos a 80°C para eliminar los enlaces cruzados en el RNA (que resultan de la preservación FFPE). Después, se añadió 300 µl de un tampón de lisis caotrópico (tampón RLT, QIAGEN), y la mezcla resultante se mezcló con 1.050 µl de etanol. La mezcla resultante se aplicó a una membrana de sílice (columna RNeasy MinElute, QIAGEN) y se pasó a través de la membrana mediante centrifugación durante 15 segundos a 10.000 rpm. La membrana a la cual se unieron los ácidos nucleicos diana, se lavó mediante el paso a través de la membrana de un tampón de lavado que contenía un agente caotrópico y etanol (RWT, QIAGEN). Después, se aplicó a la membrana 80 µl de una mezcla que comprendía 10 µl DNasa I y 70 µl de un tampón de reacción de DNasa (tampón RDD, QIAGEN) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de eliminar el DNA genómico restante.

50 Para aislar el RNA de acuerdo con el método de referencia tal y como se conoce en la técnica anterior, un tampón de lavado, que comprende un agente caotrópico y etanol (tampón RWT, QIAGEN) se añadió otra vez después de llevar a cabo la digestión DNasa en membrana para eliminar la disolución de reacción DNasa. El tampón de lavado RWT mejora, debido al agente caotrópico comprendido y al alcohol, la unión del RNA a la membrana. Después, la membrana se lavó dos veces mediante la adición y el paso a través de la membrana de 500 µl de un tampón de lavado que contiene alcohol (RPE, QIAGEN). La membrana se secó mediante centrifugación durante 5 minutos a

14.000 rpm. El RNA se eluyó mediante centrifugación después de aplicar 30 µl de agua y llevar a cabo una etapa de incubación de 1 minuto.

Para aislar el RNA de acuerdo con el método de la presente invención, después de llevar a cabo la digestión DNasa en membrana se aplicó y se pasó a través de la membrana mediante centrifugación una solución de recuperación que contiene entre 1 y 1,5 M GTC, 75% isopropanol, citrato de sodio pH7. El flujo de salida se recogió y se volvió a aplicar y a pasar a través de la membrana mediante centrifugación. De esta manera, en particular los ácidos nucleicos diana pequeños que se liberaron de la membrana durante la digestión DNasa en membrana se unen de nuevo a la membrana y por consiguiente se recuperan. Después, la membrana se lavó dos veces mediante la adición y el paso a través de la membrana de 500 µl de un tampón de lavado que contiene alcohol (RPE, QIAGEN). La membrana se secó mediante una etapa de centrifugación durante 5 minutos a 14.000 rpm. El RNA se eluyó mediante centrifugación después de aplicar 30 µl de agua y de llevar a cabo una etapa de incubación de 1 minuto.

La distribución de tamaños del RNA aislado a partir de tejido renal se analizó mediante la utilización de un Agilent Bioanalyzer para demostrar las mejoras conseguidas con el método de acuerdo con la presente invención. Se aplicó la misma cantidad de RNA (en ng) (determinada mediante una medida de OD). Los resultados se muestran en la Fig. 1, en donde “+” indica el RNA que se aisló utilizando el método de acuerdo con la presente invención y en donde “-” indica el RNA que se aisló utilizando el método de referencia. Como puede verse, llevar a cabo las etapas esenciales de recolección y replicación c) y d) de acuerdo con el método de la presente invención resulta en un aumento considerable del RNA pequeño diana en el RNA aislado. Esto puede deducirse a partir de las bandas considerablemente más oscuras en el rango de RNA pequeños que pueden detectarse en el RNA que se aisló de acuerdo con el método de la presente invención (estas bandas se marcan mediante una flecha en la Fig. 1). Por consiguiente, en el RNA aislado con el método de acuerdo con la presente invención se aumentó considerablemente la cantidad de RNA pequeño comparado con el método de referencia. El RNA aislado con el método de referencia solo comprendía una pequeña cantidad de RNA pequeño y por consiguiente, se pueden detectar más moléculas de RNA grande en la cantidad aplicada de RNA. Por lo tanto, este ejemplo muestra que el método de acuerdo con la presente invención aumenta considerablemente el rendimiento de RNA pequeños en el RNA aislado. Para evitar la duda se enfatiza que la cantidad total de moléculas de RNA más grande es básicamente idéntica cuando se lleva a cabo el método de acuerdo con la presente invención o el método de referencia, como se confirmó mediante detección por RT-PCR de amplicones de mRNA más largos.

También se analizó el RNA aislado mediante la utilización de RT-PCR cuantitativa en tiempo real con el fin de analizar los efectos ventajosos del método de acuerdo con la presente invención sobre el rendimiento de RNA pequeños específicos.

Para este propósito, el RNA aislado se utilizó para determinar un amplicón de los micro-RNA miR29a y miR30b utilizando el ensayo TaqMan® MicroRNA ABI (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En la reacción de transcripción reversa mediante la utilización del kit de transcripción reversa TaqMan® MicroRNA y los cebadores correspondientes has-miR30 y has-miR29b (Applied Biosystems) se utilizaron 20 ng de RNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La amplificación de los amplicones miRNA utilizando los sistemas mencionados anteriormente se llevó a cabo mediante la utilización de 2 µl de cDNA (dilución 1:20) en un sistema de amplificación en tiempo real (Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM 7900HT, Compañía ABI). Se determinaron los valores promedio (derivados de duplicados) de los valores ct observados y se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: detección de miRNA llevando a cabo el aislamiento de RNA de acuerdo con la presente invención o el método de referencia

		miR29a	miR30b
Riñón	Volviendo a unir	24,45	24,14
	Sin volver a unir	26,61	26,06
Pulmón	Volviendo a unir	24,5	25,08
	Sin volver a unir	26,52	26,83

Los resultados muestran que utilizar el método de acuerdo con la presente invención resulta en valores de ct que son considerablemente menores que los valores ct obtenidos a partir de las muestras correspondientes obtenidas mediante el método de referencia. Los valores menores de ct conseguidos con el método de acuerdo con la presente invención pueden atribuirse al hecho de que el RNA aislado respectivamente comprende cantidades más grandes de los miRNA detectados. Esto muestra que el RNA aislado de acuerdo con el método de la presente invención comprende más ácidos nucleicos pequeños que el RNA aislado con el método de referencia. El método de acuerdo con la presente invención mejora considerablemente el aislamiento de ácidos nucleicos pequeños a partir de muestras biológicas porque se aumenta el rendimiento de ácidos nucleicos diana pequeños. Como se muestra mediante el ejemplo de referencia, la simple adición de un tampón de lavado, que comprende un agente caotrópico y

etanol, que mejora la unión de ácidos nucleicos diana potencialmente liberados a la membrana (como se hace en la técnica anterior) no es suficiente para volver a capturar eficientemente los ácidos nucleicos diana pequeños. Como se discute anteriormente, esto se debe más probablemente al hecho de que los ácidos nucleicos diana pequeños liberados escapan de la superficie de unión a ácido nucleico de la membrana y por lo tanto, no pueden volverse a capturar mediante los métodos de acuerdo con la técnica anterior.

Ejemplo 2: Uso de diferentes concentraciones de agentes caotrópicos en la disolución de recuperación

En este ejemplo se utilizaron muestras FFPE de riñón de rata. Las muestras FFPE se almacenaron después de la fijación y la imbibición durante aproximadamente dos meses a temperatura ambiente. Se obtuvieron cortes de 10 µm de grosor de dichas muestras FFPE mediante la utilización de un microtomo. Se utilizó un corte por muestra. Todas las muestras se procesaron dos veces. Para el aislamiento subsecuente de RNA a partir de los respectivos cortes FFPE, se utilizaron componentes del kit RNeasy FFPE (QIAGEN) y del kit QIAamp FFPE (QIAGEN).

El aislamiento de RNA de acuerdo con el método de la presente invención y el método de referencia se hicieron como se describe en el ejemplo 1. Para volver a unir RNA pequeños “escapados” después de llevar a cabo la digestión DNAsa en membrana, se utilizaron como disolución de recuperación tres composiciones diferentes. Las disoluciones de recuperación analizadas comprendían 70% de etanol, citrato de sodio pH7 y

- A) 1,16 M GTC
- B) 1,5 M GTC
- C) 1,8 M GTC.

La distribución de los tamaños del RNA aislado a partir de la muestra renal se analizó utilizando un Agilent Bioanalyzer. Similar al resultado mostrado en Fig. 1, se volvió a encontrar que la proporción de RNA pequeños en el RNA total aislado con el método de referencia es considerablemente menor que en el RNA aislado con el método de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, el RNA aislado de acuerdo con el método de la presente invención comprendía RNA pequeños con mayor rendimiento. Como también se demuestra en la Fig. 2, todas las disoluciones de recuperación analizadas A) a C) eran apropiadas para volver a capturar eficientemente los ácidos nucleicos diana pequeños en donde el método de referencia, “-“, solo rendía cantidades bajas de RNA pequeño.

Con el fin de analizar el efecto de las diferentes disoluciones de recuperación analizadas sobre el aislamiento de los RNA pequeños, el RNA se analizó mediante la realización de una RT-PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en el ejemplo 1. Para este propósito, el RNA aislado se utilizó para detectar un amplicón de los micro RNA miR29a y miR16 utilizando el ensayo TaqMan® MicroRNA ABI (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se determinaron los valores medios de los valores ct medidos (derivados de los duplicados) y se resumen en la tabla 2.

	Composición	miR16	miR29a
Sin volver a unir	-	28,56	27,78
Volviendo a unir	A	26,46	26,06
Volviendo a unir	B	25,64	25,60
Volviendo a unir	C	26,71	25,90

Los resultados muestran que los valores ct son considerablemente menores cuando se utiliza el RNA aislado de acuerdo con el método de la presente invención comprando con el RNA aislado mediante el método de referencia. Esto se debe al hecho de que el método de acuerdo con la presente invención aumenta considerablemente el rendimiento de RNA pequeños en el RNA aislado. Como se muestra mediante los resultados, concentraciones diferentes de agentes caotrópicos pueden utilizarse con éxito en la disolución de recuperación.

Ejemplo 3: Idoneidad de diferentes alcoholes y diferentes concentraciones de alcohol en la disolución de recuperación

En este ejemplo, se utilizaron muestras FFPE de riñón de rata (las muestras se almacenaron después de la fijación y la imbibición durante dos meses a temperatura ambiente) y de pulmón de rata (las muestras se almacenaron después de la fijación durante aproximadamente 27 meses a temperatura ambiente). Se obtuvieron cortes que tienen un grosor de 10 µm mediante el uso de un microtomo; se utilizó un corte por muestra. Todas las muestras se procesaron dos veces. Para el aislamiento subsecuente de RNA a partir de los cortes FFPE, se utilizaron componentes del kit RNeasy FFPE (QIAGEN) y el kit QIAamp FFPE (QIAGEN).

El aislamiento de RNA utilizando el método de acuerdo con la presente invención o el método de referencia se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 1. Para capturar el RNA pequeño “escapado” después de llevar a cabo el tratamiento DNAsa en membrana, se analizaron disoluciones de recuperación que tienen cuatro composiciones diferentes. Las disoluciones de recuperación comprendían 1,5 M GTC, citrato de sodio pH7 y

- 5 A) 70% etanol
- B) 75% etanol
- C) 70% isopropanol
- D) 75% isopropanol.

10 La distribución de los tamaños del RNA aislado a partir de tejido renal se analizó utilizando un Agilent Bioanalyzer. Similar a los resultados mostrados en la Fig. 1 y Fig. 2, se encontró (ver Fig. 3) que se aumenta considerablemente la porción de RNA pequeños en el RNA total aislado cuando se utiliza el método de acuerdo con la presente invención. Todas las disoluciones de recuperación analizadas fueron básicamente igual de efectivas para volver a capturar eficientemente los RNA pequeños en donde el método de referencia, “-”, únicamente rindió cantidades bajas de RNA pequeño.

15 Con el fin de analizar el efecto de las diferentes disoluciones de recuperación sobre el aislamiento de RNA pequeños específicos, el RNA aislado se analizó utilizando los métodos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real descritos en el ejemplo 1. El RNA aislado se utilizó para determinar el amplicón de los micro-RNA miR29a mediante el uso del ensayo TaqMan® MicroRNA ABI (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 Se determinaron los valores medios de los valores ct medidos (derivados de los duplicados) y se resumen en la tabla 3.

Tabla 3: detección miR29a después del aislamiento de RNA utilizando el método de acuerdo con la presente invención o el método de referencia

	Composición	Riñón	Pulmón
Sin volver a unir	-	26,61	26,42
Volviendo a unir	A	25,41	25,40
Volviendo a unir	B	24,66	25,15
Volviendo a unir	C	24,74	25,22
Volviendo a unir	D	24,45	24,50

25 De nuevo, los resultados muestran que la utilización del método de acuerdo con la presente invención aumenta considerablemente el rendimiento de RNA pequeños en el RNA aislado como puede deducirse a partir de los valores ct menores. Pueden utilizarse diferentes alcoholes y concentraciones de alcohol en la disolución de recuperación.

Ejemplo 4: Aislamiento de ácidos nucleicos pequeños de acuerdo con la presente invención o el método de referencia a partir de muestras no fijadas

30 Para el aislamiento de RNA se utilizaron muestras de tejido pulmonar de ratas (las muestras se almacenaron después de la extirpación en RNAlater a -80°C) utilizando un tampón de lisis que comprende un agente caotrópico. Todas las muestras se procesaron dos veces. Para el subsecuente aislamiento de RNA, se utilizaron componentes del kit RNeasy (QIAGEN) y del kit miRNeasy (QIAGEN).

Lisis basada en fenol – cloroformo

35 Se homogeneizaron cada 10 mg de pulmón de rata en 700 µl de un tampón de lisis a base de fenol (tampón QIAzol, QIAGEN) con una bola de acero de 5 mm durante 5 min a 25 Hz utilizando un molinillo de bolas (TissueLyser, QIAGEN). Después, las muestras se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente antes de añadir 140 µl de cloroformo. Después de 2 minutos de incubación a temperatura ambiente los lisados se centrifugaron durante 15 min a 12.000xg a 4°C. La fase superior se eliminó y se mezcló con 525 µl de etanol. La mezcla resultante se aplicó a una membrana de sílice (columna RNeasy Mini, QIAGEN) y se pasó a través de la membrana mediante centrifugación durante 15 segundos a 13.000 rpm. La membrana a la cual los ácidos nucleicos diana se unieron, se lavó mediante el paso a través de la membrana de un tampón de lavado que contenía un agente caotrópico y etanol (RWT, QIAGEN).

40



Lisis basada en un agente caotrópico

5 Se homogeneizaron cada 10 mg de pulmón de rata en 350 µl de un tampón de lisis (tampón RLT que incluye β-mercaptoetanol, QIAGEN) con una bola de acero de 5 mm durante 5 min a 25 Hz utilizando un molinillo de bolas (TissueLyser, QIAGEN). Después, las muestras se centrifugaron durante 4 min a 14.000 rpm y el sobrenadante se mezcló con 525 µl de etanol. La mezcla resultante se aplicó a una membrana de sílice (columna RNeasy Mini, QIAGEN) y se pasó a través de la membrana mediante centrifugación durante 15 segundos a 10.000 rpm.

La membrana a la cual los ácidos nucleicos diana se unieron, se lavó mediante el paso a través de la membrana de un tampón de lavado que contenía un agente caotrópico y etanol (RWT, QIAGEN).

Procesamiento adicional de todas las muestras

10 Se aplicó a la membrana 80 µl de una mezcla que comprende 10 µl DNAsa I y 70 µl de tampón de reacción DNAsa (tampón RDD, QIAGEN) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de eliminar el DNA genómico restante.

15 Para aislar el RNA de acuerdo con el método de referencia o de acuerdo con el método de la presente invención, todas las etapas adicionales se hicieron como se describe en el ejemplo 1. El RNA se eluyó dos veces mediante centrifugación después de aplicar 50 µl de agua (lisis basada en fenol) o 40 µl de agua (lisis basada en agente caotrópico) y llevar a cabo una etapa de incubación durante 1 minuto.

Análisis de los eluidos

20 El RNA aislado se analizó utilizando métodos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real descritos en el ejemplo 1. El RNA aislado se utilizó para determinar el amplicón de los micro-RNA miR29a mediante el uso del ensayo TaqMan® MicroRNA ABI (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los valores medios de los valores ct medidos (derivados de los duplicados) se determinaron y se resumen en la tabla 4.

Tabla 4: detección de miR29a después del aislamiento de RNA utilizando el método de acuerdo con la presente invención o el método de referencia a partir de muestras no fijadas.

	Lisis	Valor ct
Sin volver a unir	Lisis basada en fenol	23,36
Volviendo a unir	Lisis basada en fenol	22,16
Volviendo a unir	Lisis basada en agente caotrópico	26,38
Volviendo a unir	Lisis basada en agente caotrópico	23,69

25 De nuevo, los resultados muestran que la utilización del método de acuerdo con la presente invención aumenta considerablemente el rendimiento de los RNA pequeños en el RNA aislado, también en las muestras no fijadas, como puede deducirse a partir de los menores valores de Ct.

Ejemplo 5: Aislamiento de DNA pequeño utilizando el método de acuerdo con la presente invención

30 Como muestras de DNA, se utilizaron un marcador de peso molecular de DNA de 10 bp y un marcador de peso molecular de DNA de 50 bp. Para el subsecuente aislamiento, se utilizaron componentes de los kits QIAamp MinElute (QIAGEN). Se mezclaron 2 µg del marcador de peso molecular de DNA de 10 bp y 5 µg del marcador de peso molecular de DNA de 50 bp con 180 µl de tampón de lisis (tampón ATL, QIAGEN). El DNA se purificó a partir de dicha muestra utilizando el método de referencia (con o sin un tratamiento en membrana del DNA) o el método de acuerdo con la presente invención.

35 Para el método de referencia sin un tratamiento en membrana (muestra (a)), la mezcla de lisis de DNA se mezcló con 4 µl de RNA (100 mg/ml) y se incubó durante 2 min a temperatura ambiente. Subsecuentemente, se añadió 200 µl de un tampón de unión que comprende un agente caotrópico (tampón AL, QIAGEN) y 200 µl de etanol. La mezcla resultante se aplicó a, y se pasó a través de, una membrana de sílice (columna QIAamp MinElute, QIAGEN) mediante centrifugación (1 min, 8.000 rpm). La membrana se lavó mediante el paso a través de la membrana de 500 µl de un tampón de lavado que contiene alcohol y un agente caotrópico (AW1, QIAGEN) y 500 µl de un tampón de lavado que contiene un alcohol (AW2). La membrana se secó mediante centrifugación (1 min, 14.000 rpm). El DNA se eluyó mediante centrifugación después de aplicar un tampón de elución (30 µl, ATE, QIAGEN) e incubar durante 1 min.

5 En el método de referencia en donde se llevó a cabo un tratamiento en membrana del DNA (muestras b, c, e, f) y en el método de acuerdo con la presente invención (muestras d, g), las mezclas que comprenden el tampón de lisis y la muestra de DNA se mezclaron con 200 µl de un tampón de unión que comprende un agente caotrópico (tampón AL, QIAGEN) y 200 µl de etanol. La mezcla resultante se aplicó a, y se pasó a través de, una membrana de sílice (columna QIAamp MinElute, QIAGEN) mediante centrifugación (1 min, 8.000 rpm).

Después, se llevaron a cabo diferentes tratamientos en membrana, mientras el DNA estaba unido a la membrana. Algunas muestras se trataron con RNasa (muestras b, c, d) las otras se trataron con una proteasa (muestras e, f, g).

10 Para llevar a cabo el tratamiento RNasa en membrana, se aplicaron a la membrana 80 µl de una mezcla de RNasa, que consiste en 4 µl de RNasa A (100 mg/ml) y 76 µl de un tampón de reacción RNasa (tampón RDD, QIAGEN) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente.

Para llevar a cabo el tratamiento proteasa en membrana, se aplicaron a la membrana 80 µl de una mezcla de proteasa, que consiste en 20 µl de proteasa K (>600 mAU/ml) y 60 µl de un tampón de reacción de proteasa (tampón RDD, QIAGEN) y se incubó durante 15 min q 56°C.

15 Para las muestras procesadas de acuerdo con el método de referencia (muestras b, c, e, f), se pasaron a través de la membrana 500 µl de un tampón que comprende un agente caotrópico y etanol (tampón AW1, QIAGEN (muestras b, e) o tampón RWT, QIAGEN (muestras c, d)) y 500 µl de un tampón de lavado que contiene alcohol AW2 (QIAGEN). La membrana se secó mediante centrifugación (1 min, 14.000 rpm). El DNA se eluyó mediante centrifugación después de aplicar un tampón de elución (30 µl, ATE, QIAGEN) e incubar durante 1 min.

20 Para las muestras procesadas de acuerdo con el método de acuerdo con la presente invención (muestras d y g), se aplicó a y se pasó a través de la membrana mediante centrifugación una disolución de recuperación (que comprende de 1 a 1,5 M GTC, 75% isopropanol, citrato de sodio pH7). El flujo de salida se volvió a aplicar a, y se pasó a través de, la membrana mediante centrifugación con el fin de volver a unir las moléculas de DNA pequeñas escapadas. Después la membrana se lavó mediante el paso a través de la membrana de 500 µl de un tampón de lavado que contiene alcohol (AW2). La membrana se secó mediante centrifugación (1 min, 14.000 rpm). EL DNA se eluyó mediante centrifugación después de aplicar un tampón de elución (30 µl ATE, QIAGEN) y de incubar durante 1 min.

25 El rendimiento del DNA aislado mediante los diferentes métodos analizados en el ejemplo 5 se determinó a 260 nm. La tabla 5 muestra los valores medios de los duplicados.

Tabla 5: Rendimiento en DNA después del aislamiento de DNA utilizando el método de acuerdo con la presente invención o los métodos de referencia con y sin tratamiento en membrana del DNA.

DNA	Muestra	Método de aislamiento de DNA	Tratamiento en membrana	Rendimiento (µg)
Marcador de peso molecular de 10 bp	a	Referencia	-	0,55
	b	Referencia	RNasa	0,08
	c	Referencia	RNasa	0,11
	d	De acuerdo con la invención	RNasa	0,67
	e	Referencia	proteasa	0,28
	f	Referencia	proteasa	0,27
	g	De acuerdo con la invención	proteasa	0,8
Marcador de peso molecular de 50 bp	a	Referencia	-	4,26
	b	Referencia	RNasa	0,66
	c	Referencia	RNasa	0,63
	d	De acuerdo con la invención	RNasa	3,58
	e	Referencia	proteasa	1,00
	f	Referencia	proteasa	0,54
	g	De acuerdo con la invención	proteasa	3,07

Como se demuestra mediante la tabla 5, el método de acuerdo con la presente invención aumenta considerablemente el rendimiento de DNA pequeño en los métodos de aislamiento de ácido nucleico en donde se lleva a cabo un tratamiento en membrana.

5 Ejemplo 6: Idoneidad de los diferentes agentes caotrópicos y diferentes agentes tampón en la disolución de recuperación.

Se utilizaron para el aislamiento de RNA muestras de tejido pulmonar de ratas (las muestras se almacenaron después de la extirpación en RNAlater a -80°C) utilizando un tampón de lisis que comprende un agente caotrópico. Para el aislamiento subsecuente de RNA, se utilizaron componentes del kit RNeasy (QIAGEN) y del kit miRNeasy (QIAGEN).

10 Con el fin de proporcionar un material de partida homogéneo para la comparación de diferentes disoluciones de recuperación, se preparó un lisado conjunto a partir de tejido pulmonar de rata. Se añadieron 350 µl de un tampón de lisis (tampón RLT que incluye β-mercaptoetanol, QIAGEN) por cada 10 mg de tejido, y el material se homogeneizó utilizando un homogeneizador de tipo rotor estátor. Después de la homogenización el lisado conjunto se separó en alícuotas de 350 µl de lisado y se utilizaron para todas las purificaciones subsecuentes de RNA. El  
15 lisado se mezcló con 525 µl de 96-100% etanol, se aplicó a una membrana de sílice (columna RNeasy Mini, QIAGEN) y se pasó a través de la membrana por centrifugación durante 15 segundos a 10.000 rpm.

Como referencia sin volver a unir (ver ref. en figura 4), la membrana, a la cual los ácidos nucleicos diana se unieron, se lavó mediante el paso a través de la membrana de un tampón de lavado que contiene un agente caotrópico y etanol (RWT, QIAGEN). Se aplicaron a la membrana 80 µl de una mezcla que comprende 10 µl de DNasa I y 70 µl de un tampón de reacción de DNasa (tampón RDD, QIAGEN) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de eliminar el DNA genómico restante. Luego, la membrana fue de nuevo lavada mediante el paso a través de la membrana de un tampón de lavado que contiene un agente caotrópico y etanol (RTW, QIAGEN). Después, la membrana se lavó dos veces mediante la adición y el paso a través de la membrana de 500 µl de un  
20 tampón de lavado que contiene alcohol (RPE, QIAGEN). La membrana se secó mediante centrifugación durante 3 minutos a 14.000 rpm. El RNA se eluyó dos veces mediante centrifugación después de aplicar 40 µl de agua y llevar a cabo una etapa de incubación durante 1 minuto.

Para aislar el RNA de acuerdo con el método de la presente invención, la membrana a la cual se unieron los ácidos nucleicos diana, se lavó mediante el paso a través de la membrana de una disolución de recuperación que contiene un agente caotrópico, un componente tamponador e isopropanol en diferentes composiciones (tabla 6). El flujo de salida se descartó. Se aplicaron a la membrana 80 µl de una mezcla que comprende 10 µl de DNasa I y 70 µl de un  
30 tampón de reacción de DNasa (tampón RDD, QIAGEN) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de eliminar el DNA genómico restante. Después de llevar a cabo la etapa de digestión DNasa en columna, una disolución de recuperación del mismo tipo se aplicó a, y se pasó a través de, la membrana mediante centrifugación. El flujo de salida se recogió, se volvió a aplicar y a pasar a través de la membrana mediante centrifugación. De esta manera, en particular los ácidos nucleicos diana pequeños que se liberaron de la membrana durante la digestión  
35 DNasa en membrana se unen de nuevo a la membrana y por consiguiente se recuperan. Después, el RNA se eluyó de la membrana como se describe anteriormente para el método de referencia. (Todas las muestras se procesaron dos veces).

Tabla 6: Composición de diferentes disoluciones de recuperación

Disolución de recuperación	Agente caotrópico	Componente tamponador	Isopropanol
A	1,25 M isotiocianato de guanidina	6,25 mM citrato de sodio pH 7	75%
B	1,25 M isotiocianato de guanidina	6,25 mM Tris pH 7	75%
C	1,25 M isotiocianato de guanidina	6,25 mM MOPS pH 7	75%
D	1,25 M isotiocianato de guanidina	6,25 mM MES pH 7	75%
E	1,75 M hidrocloreuro de guanidina	6,25 mM MOPS pH 7	75%
F	1,25 M hidrocloreuro de guanidina	6,25 mM MOPS pH 7	75%
G	0,2 M fluoracetato de sodio	20 mM Tris pH 8	80%
H	0,2 M perclorato de sodio	20 mM Tris pH 8	80%

40 El RNA aislado se analizó utilizando métodos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real descritos en el ejemplo 1. El RNA aislado se utilizó para determinar el amplicón del micro-RNA miR16 mediante el uso de miScript System (QIAGEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los valores medios de los valores ct medidos (derivados de los duplicados) se determinaron y se muestran en la figura 4. De nuevo, los resultados muestran que el uso del método de acuerdo con la presente invención aumenta considerablemente el rendimiento de los RNA pequeños en el RNA aislado como puede deducirse de los valores ct menores. Pueden utilizarse diferentes agentes caotrópicos y diferentes componentes tamponadores en la disolución de recuperación.

Ejemplo 7: Aislamiento de RNA y DNA utilizando el método de la presente invención o utilizando métodos basados en protocolos de la técnica anterior

Se utilizaron muestras FFPE derivadas a partir de hígado de rata (las muestras se almacenaron después de la fijación y la imbibición en parafina durante aprox. 2 meses a temperatura ambiente), a partir de riñón de rata (correspondientemente almacenadas e embebidas durante aprox. 19 meses) y a partir de pulmón de rata (correspondientemente almacenadas e embebidas durante aprox. 8 meses). Se obtuvieron cortes de tejido que tienen un tamaño de 10 µm de grosor mediante la aplicación de un microtomo. Se utilizaron dos cortes por muestra. Todas las muestras se procesaron por triplicado. Para el aislamiento subsecuente del RNA y el DNA, se emplearon componentes del kit RNeasy FFPE (QIAGEN) y del kit Allprep DNA RNA FFPE (QIAGEN) utilizando el método de la presente invención.

Alternativamente, para la comparación se utilizaron métodos basados en protocolos de kits de la técnica anterior. Se utilizaron los siguientes kits de diferentes proveedores:

- Kit de purificación FFPE RNA/DNA (NORGEN)
- Kit de aislamiento de ácido nucleico total optimizado para muestras FFPE RecoverAll™ (Ambion)
- Kit de extracción de RNA FFPE QuickExtract™ (EPICENTRE)
- Aislamiento de RNA y DNA a partir de muestras FFPE (Macherey-Nagel)

Método de acuerdo con la presente invención

Con el fin de eliminar la parafina de las muestras, las muestras se mezclaron mediante agitación vorticial durante 10 segundos con 1 ml de xilol y se centrifugaron (2 min 20.000 rpm). El sobrenadante se eliminó completamente. Luego la muestra se complementó con 1 ml de 96% etanol, se mezcló mediante agitación vorticial durante 10 s y se centrifugaron como anteriormente. El sobrenadante se eliminó completamente, y el pellet de la muestra se secó durante 10 minutos a 37°C.

Estos pellets de muestra desparafinados se mezclaron con 150 µl de un tampón de digestión de proteasa K (tampón PKD, QIAGEN) y, 10 µl de una disolución de proteasa K (> 600 mAU/ml). La mezcla se incubó durante 15 minutos a 56°C con agitación constante a 450 rpm. Las muestras se enfriaron en hielo durante 3 minutos y se centrifugaron durante 15 minutos a 20.000 g a temperatura ambiente. Los pellets que contienen DNA se utilizaron para aislar el DNA y el sobrenadante se recogió para aislar el RNA contenido.

Subsecuentemente, estos sobrenadantes que contienen RNA se incubaron durante 15 minutos a 80°C a 450 rpm en un agitador con control de temperatura. Después, se añadió en cada caso 320 µl de un tampón de lisis caotrópico (tampón RLT, QIAGEN), y la mezcla resultante se complementó con 1.120 µl de 96% etanol. Los reactivos se mezclaron mediante pipeteo y se aplicaron 700 µl a una membrana de sílice (columna RNeasy MinElute, QIAGEN). La muestra se pasó a través de la membrana mediante centrifugación durante 15 segundos a 10.000 rpm y el flujo de salida se descartó. Por consiguiente el resto de la muestra se aplicó a la membrana. La membrana a la cual los ácidos nucleicos diana se unieron, se lavó mediante el paso a través de la membrana de 350 µl de una disolución de recuperación, que consiste en una parte de 5 M GTC (+ 25 mM citrato de sodio) y tres partes de isopropanol, (denominada disolución de recuperación a continuación) (15 s centrifugación a 10.000 rpm). Después, se aplicó a la membrana una mezcla que comprende 10 µl de DNasa I y 70 µl de un tampón de reacción DNasa (tampón RDD, QIAGEN) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Después de llevar a cabo esta digestión DNasa en membrana, se aplicaron a y se pasaron a través de, la membrana 500 µl de la disolución de recuperación mediante centrifugación (15 s 10.000 rpm). El flujo de salida se recogió, se volvió a aplicar a y se pasó a través de la membrana mediante centrifugación como se describe anteriormente. De esta manera, en particular los ácidos nucleicos diana pequeños que se liberaron de la membrana durante la digestión DNasa en membrana se volvieron a unir a la membrana y por consiguiente se recuperaron. Subsecuentemente, la membrana se lavó dos veces mediante la adición y el paso a través de la membrana de 500 µl de un tampón de lavado que contiene alcohol (RPE, QIAGEN) mediante centrifugación, como anteriormente. La membrana se secó mediante una etapa de centrifugación durante 5 minutos a 14.000 rpm. El RNA total se eluyó mediante centrifugación durante 1 min a máxima velocidad después de aplicar 30 µl de agua libre de RNasa e incubar durante 1 minuto.

Para el aislamiento de DNA, se añadieron a cada uno de los pellets de las muestras 180 µl de tampón ATL (QIAGEN) y 40 µl de proteasa K. Después de la agitación vorticial, las muestras se incubaron durante 1 h a 56°C

con agitación constante. Luego, las muestras se incubaron durante 2 h a 90°C sin agitación. Se añadieron a la mezcla 4 µl de RNasa A (100 mg/ml), se mezclaron y se incubaron durante 2 min a temperatura ambiente. Las muestras se complementaron con 200 µl de tampón AL (QIAGEN) y se mezclaron. Se añadió 200 µl de 96% etanol y se mezcló inmediatamente. La mezcla se aplicó a una columna QIAamp MinElute y se centrifugó durante 1 min a 8.000 g. El flujo de salida se descartó. Las muestras se complementaron con 700 µl de tampón AW1 (QIAGEN) y se centrifugaron durante 1 min a 8.000 g. El flujo de salida se descartó. Las muestras se complementaron con 700 µl del tampón AW2 (QIAGEN) y se centrifugaron como se describe anteriormente. El flujo de salida se descartó. Las muestras se complementaron con 700 µl de 96% etanol y se centrifugaron como se describe anteriormente. El flujo de salida se descartó. Para secar la membrana, las columnas se centrifugaron durante 5 min a 14.000 rpm con la tapa abierta. Se pipetearon 30 µl de tampón ATE (QIAGEN) directamente sobre la membrana de la columna seguidamente se incubaron a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 1 min a 8.000 g. Se almacenaron 30 µl de los eluidos a -20°C hasta procedimientos adicionales.

#### Métodos basados en protocolos de la técnica anterior

El kit de purificación FPPE RNA/DNA (NORGEN) se utilizó para aislamiento de RNA y DNA total de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se incubaron con proteasa K durante aprox. 2 h y 24 h a 50°C para RNA y DNA respectivamente, las muestras se lisaron completamente. Solo en el caso de RNA se añadieron 10 µl de β-mercaptoetanol por ml de disolución de unión. La digestión de DNA adicional se llevó a cabo con 10 unidades de DNasa I (QIAGEN). Después de aplicar la DNasa en el correspondiente tampón de incubación a la columna y la subsecuente centrifugación, el flujo de salida se volvió a aplicar y se incubó durante 15 minutos.

Se emplearon para el aislamiento de RNA y DNA total – incluyendo digestión de DNA - el kit de aislamiento de ácido nucleico total optimizado para muestras FFPE RecoverAll™ (Ambion), el kit de extracción de RNA de FFPE QuickExtract™ (EPICENTRE) y el kit de aislamiento de RNA y DNA a partir de muestras FFPE (Macherey-Nagel) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Después, los ácidos nucleicos aislados con los diferentes protocolos se analizaron, entre otras cosas, con respecto a la calidad, la cantidad, las contaminaciones de DNA en el RNA aislado y en particular con respecto al rendimiento de los ácidos nucleicos pequeños aislados. Los resultados se muestran en las Fig. 5 a 9.

Los resultados muestran que el método de acuerdo con la presente invención permite el aislamiento paralelo pero separado de DNA y RNA a partir de la misma muestra. Aquí, el aislamiento del RNA y el DNA toma aprox. 6 h en total. Por lo tanto, se puede llevar a cabo en una jornada laboral. Los ácidos nucleicos aislados fueron de gran calidad. La contaminación de DNA en el RNA aislado fue mucho menor comparada con los métodos de la técnica anterior y el rendimiento del RNA pequeño aislado fue considerablemente mayor.

El protocolo de Epicentre es muy rápido (aprox. 1:10 h para RNA y DNA en total) y simple. Sin embargo, los "eluidos" obtenidos fueron lechosos, amarillentos y turbios. Además, la calidad del RNA aislado no fue aceptable y el contenido en ácidos nucleicos pequeños fue muy bajo. El protocolo de Mechery-Nagel permite el aislamiento en paralelo de DNA y RNA a partir de la misma muestra. Sin embargo, el RNA aislado estaba más degradado, lo que resultó en valores de ct de la RT-PCR más elevados para el RNA analizado dentro de este ejemplo 7 en comparación con el método de acuerdo con la presente invención. El aislamiento de RNA y DNA toma aprox. 8:30 h en total, cuando se utiliza este protocolo. El protocolo de NORGEN requiere mucho tiempo (aprox. 5:20 h para el RNA y aprox. 26 h para el DNA en la forma analizada), como resultado de una etapa muy larga de digestión de proteasa K (aprox. 2 h y 24 h respectivamente). Además, los resultados muestran que la contaminación de DNA en el RNA aislado es bastante elevada. Además, el rendimiento de RNA pequeños fue considerablemente menor. El protocolo de Ambion requiere mucho tiempo ya que la recuperación del DNA requiere una etapa de digestión de proteasa de 16 horas lo que es conflictivo en los flujos de trabajo del laboratorio. Además, las contaminaciones de DNA en el RNA aislado fueron más elevadas que con el método de acuerdo con la presente invención y el contenido de RNA pequeño fue menor.

#### Análisis de MicroRNA

La distribución de los tamaños del RNA aislado a partir de diferentes tejidos se analizó mediante la utilización de un Agilent Bioanalyzer para demostrar las mejoras conseguidas con el método de acuerdo con la presente invención. Se aplicó la misma cantidad de RNA (en ng) (determinada por una medida de OD). Los resultados para las muestras de tejido pulmonar (procesadas por triplicado) se muestran en la Fig. 5. Como puede verse, llevar a cabo el método de acuerdo con la presente invención en comparación con métodos basados en protocolos de kits de la técnica anterior, resultó en un rendimiento más elevado y más fiable de RNA diana pequeños en el RNA aislado. Esto puede deducirse a partir de las bandas en el rango de los RNA pequeños. La flecha en la fig. 5 marca estas bandas.

Además, se debe enfatizar que el método de acuerdo con la presente invención resultó con creces en el RNA aislado de pureza más elevada. La fig. 6 muestra los resultados obtenidos con mRNA cjun cuantificado mediante PCR en tiempo real del RNA aislado con (+) y sin (-) transcripción reversa (RT) respectivamente. Para todos los tejidos investigados, en el caso del método de acuerdo con la presente invención (QIAGEN), las diferencias

obtenidas (delta) en los valores ct representan con creces los valores más elevados, lo que indica la menor contaminación con DNA genómico.

5 El RNA aislado se sometió a RT-PCR cuantitativa en tiempo real con el fin de analizar los efectos ventajosos del método de acuerdo con la presente invención sobre el rendimiento de un RNA pequeño específico. Para este propósito, 20 ng de cada uno de los RNA totales aislados se utilizaron para detectar un amplicón del microRNA mi29a, de acuerdo con el procedimiento y dispositivos descritos en el ejemplo 1. Los valores medios (derivados de triplicados) de los valores ct medidos se determinaron y los resultados se muestran en la Fig. 7. Los resultados muestran que utilizar el método de acuerdo con la presente invención lleva a valores de ct que son considerablemente menores que los valores ct de las muestras obtenidas mediante métodos basados en protocolos de kits de la técnica anterior. Estos valores de ct menores conseguidos con el método de acuerdo con la presente invención son atribuibles al hecho de que correspondientemente el RNA aislado total comprende cantidades más grandes del microRNA miR29a. Otra vez de nuevo, estos resultados demuestran que el RNA total aislado de acuerdo con el método de la presente invención comprende más ácidos nucleicos pequeños, p. ej. el rendimiento de los ácidos nucleicos pequeños da partir de muestras biológicas aumenta. Los métodos basados en protocolos de kits de la técnica anterior son menos eficientes en volver a unir los ácidos nucleicos diana pequeños que el método de acuerdo con la presente invención.

20 El DNA aislado se sometió a PCR cuantitativa en tiempo real. Para prion 78 bp, los valores medios (derivados de triplicados) de los valores ct medidos se determinaron y se resumen en la figura 8a y b para volúmenes iguales y concentraciones iguales respectivamente de las muestras de DNA utilizadas. También para prion 78 bp los valores de ct son considerablemente menores utilizando el método de acuerdo con la presente invención.

El RNA aislado se sometió adicionalmente a RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Para Madh7, los valores medios (derivados de triplicados) de los valores ct medidos se determinaron y se resumen en la figura 9a y b para volúmenes iguales y concentraciones iguales respectivamente de las muestras de RNA utilizadas. Los valores ct para el Madh7 son considerablemente menores utilizando el método de acuerdo con la presente invención.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para aislar un ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños que tienen una longitud inferior a 500 nucleótidos a partir de una muestra, en donde el ácido nucleico diana comprende o consiste en ácidos nucleicos diana pequeños, comprendiendo dicho método al menos las siguientes etapas:
- 5 a) unir al menos una porción del ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños a una fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en una columna mediante el paso de la muestra a través de dicha columna de tal forma que el ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños se une a la fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en la columna,
- 10 b) llevar a cabo un tratamiento enzimático y/o químico sobre la fase sólida de unión a ácido nucleico mientras el ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños están unidos a dicha fase sólida,
- c) recoger al menos una porción de los ácidos nucleicos diana pequeños liberados de la fase sólida durante dicho tratamiento de la etapa b) como flujo de salida,
- 15 d) poner en contacto dicho flujo de salida que comprende ácidos nucleicos diana pequeños mezclados con una disolución de recuperación con una fase sólida de unión a ácido nucleico para unir los ácidos nucleicos diana pequeños contenidos a dicha fase sólida de unión a ácido nucleico,
- e) llevar a cabo una elución.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fase sólida de unión a ácido nucleico utilizada en la etapa a) es una membrana.
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde en la etapa c) se pasa una disolución de recuperación a través de dicha columna y se recoge el flujo de salida que comprende ácidos nucleicos diana pequeños y la disolución de recuperación y se utiliza en la etapa d), preferiblemente para volver a unir los ácidos nucleicos diana pequeños contenidos en el flujo de salida a la fase sólida de unión a ácido nucleico utilizada en la etapa a).
- 20 4. Un método para aislar un ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños que tienen una longitud inferior a 500 nucleótidos a partir de una muestra, en donde el ácido nucleico diana comprende o consiste en ácidos nucleicos diana pequeños, comprendiendo dicho método al menos las siguientes etapas
- 25 a) unir al menos una porción del ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños a una membrana de unión a ácido nucleico mediante el paso de la muestra a través de dicha membrana de tal forma que el ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños se une a la membrana,
- 30 b) llevar a cabo un tratamiento que involucra una disolución acuosa sobre la membrana mientras el ácido nucleico diana que incluye ácidos nucleicos diana pequeños está unido a dicha membrana,
- c) para una solución de recuperación a través de dicha membrana y recoger el flujo de salida que comprende ácidos nucleicos diana pequeños,
- 35 d) pasar dicho flujo de salida a través de la membrana de la etapa a) para volver a unir los ácidos nucleicos diana pequeños contenidos a dicha membrana,
- e) eluir el ácido nucleico diana incluido el ácido nucleico diana pequeño de dicha membrana.
5. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 4, en donde en la etapa b) se lleva a cabo un tratamiento enzimático y/o químico que comprende la utilización de una disolución acuosa y se selecciona del grupo que consiste en una etapa de digestión de nucleasa, una etapa de digestión de proteínas, una etapa de digestión de lipasa y una etapa de modificación de ácido nucleico diana.
- 40 6. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el tratamiento llevado a cabo en la etapa b) involucra condiciones que resultan al menos en la liberación parcial de los ácidos nucleicos diana, en particular de los ácidos nucleicos diana pequeños, de la fase sólida de unión a ácido nucleico.
7. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la disolución de recuperación tiene una o más de las siguientes características:
- 45 a) proporciona condiciones apropiadas para unir ácidos nucleicos pequeños a la fase sólida de unión a ácido nucleico utilizada en la etapa d);
- b) proporciona condiciones de unión más fuertes para unir ácidos nucleicos pequeños que las condiciones de unión utilizadas en la etapa a);
- 50 c) proporciona condiciones apropiadas para unir RNA pequeño a la fase sólida de unión de ácido nucleico utilizada

en la etapa d);

d) proporciona condiciones apropiadas para unir DNA pequeño a la fase sólida de unión a ácido nucleico utilizada en la etapa d);

e) comprende al menos un agente caotrópico y/o al menos un alcohol; y/o

5 f) comprende al menos un agente caotrópico en una concentración de 0,1 a 6 M, preferiblemente 0,5 a 6 M y/o al menos un alcohol seleccionado del grupo que consiste en etanol e isopropanol en una concentración de al menos 50% v/v.

y/o

en donde las condiciones de unión utilizadas en la etapa d) tienen una o más de las siguientes características:

10 a) son apropiadas para unir ácidos nucleicos pequeños a la fase sólida de unión a ácido nucleico utilizada en la etapa d);

b) proporcionan condiciones de unión más fuertes para unir ácidos nucleicos pequeños que las condiciones de unión utilizadas en la etapa a);

c) son apropiadas para unir RNA pequeño a la fase sólida de unión a ácido nucleico utilizada en la etapa d);

15 d) son apropiadas para unir DNA pequeño a la fase sólida de unión a ácido nucleico utilizada en la etapa d);

g) comprenden al menos un agente caotrópico y/o al menos un alcohol; y/o

h) comprenden al menos un agente caotrópico en una concentración de 0,1 a 6 M, preferiblemente 0,5 a 6 M y/o al menos un alcohol seleccionado del grupo que consiste en etanol e isopropanol en una concentración de al menos 50% v/v.

20 8. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 7, en donde en la etapa b) si el ácido nucleico diana es RNA se lleva a cabo una digestión DNasa o si el ácido nucleico diana es DNA se lleva a cabo una digestión de RNasa.

9. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 8, en donde en la etapa a) la unión se lleva a cabo bajo condiciones que tienen una o más de las siguientes características:

25 a) las condiciones son apropiadas para unir ácidos nucleicos totales a la fase sólida de unión a ácido nucleico;

b) las condiciones son apropiadas para unir RNA total incluidos los RNA pequeños a la fase sólida de unión a ácido nucleico;

c) las condiciones son apropiadas para unir DNA total incluidos los DNA pequeños a la fase sólida de unión a ácido nucleico; y/o

30 d) la unión ocurre en la presencia de al menos un agente caotrópico y/o al menos un alcohol.

10. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes 1 a 9, en donde la muestra se lisa o se procesa antes de o durante la etapa a).

11. El método de acuerdo con una o más de las etapas precedentes 1 a 10, en donde la muestra comprende ácidos nucleicos pequeños y/o ácidos nucleicos degradados.

35 12. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes 1 a 11, en donde la muestra se selecciona de y/o se deriva de una muestra seleccionada del grupo que consiste en células, muestras clínicas, fluidos corporales, tejido, sangre, productos sanguíneos, plantas, bacterias, virus, hongos, muestras de material humano y animal, muestras medioambientales, ácidos nucleicos aislados, lisados, eluidos, muestras fijadas, muestras con enlaces entrecruzados y muestras FFPE.

40 13. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes 1 a 12, en donde los ácidos nucleicos diana pequeños tienen una o más de las siguientes características:

a) tiene una longitud inferior a 300 nt, inferior a 250 nt, inferior a 200 nt, inferior a 100 nt o inferior a 70 nt;

45 b) se selecciona de miRNA, siRNA, ácidos nucleicos de interferencia cortos, snoRNA, snRNA, tRNA, piRNA, tnRNA, rRNA pequeño, hnRNA, ácidos nucleicos circulantes, fragmentos de DNA genómico o RNA, ácidos nucleicos degradados, ribozimas, RNA o DNA viral y ácidos nucleicos de origen infeccioso.

14. El uso de una disolución de recuperación capaz de unir ácidos nucleicos pequeños que tienen una longitud



inferior a 500 nucleótidos a una membrana de unión a ácido nucleico, en el método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 13 para volver a unir los ácidos nucleicos pequeños recogidos que tienen una longitud inferior a 500 nucleótidos que se liberaron de dicha membrana de unión a ácido nucleico durante un tratamiento en membrana.

- 5 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la disolución de recuperación tiene una o más de las características definidas en la reivindicación 7.

Fig. 1

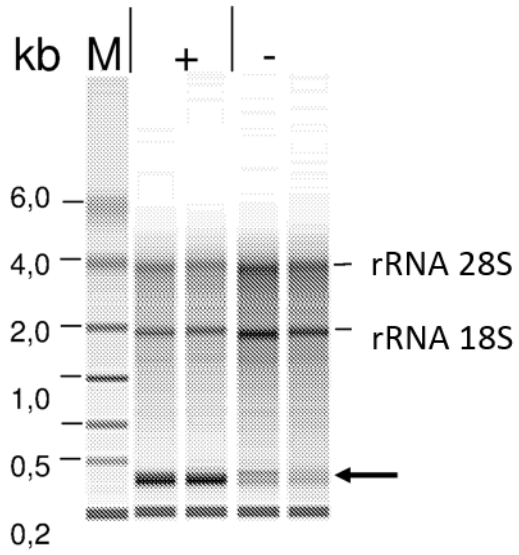


Fig. 2

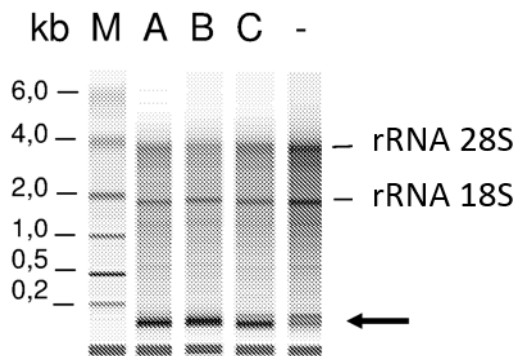


Fig. 3

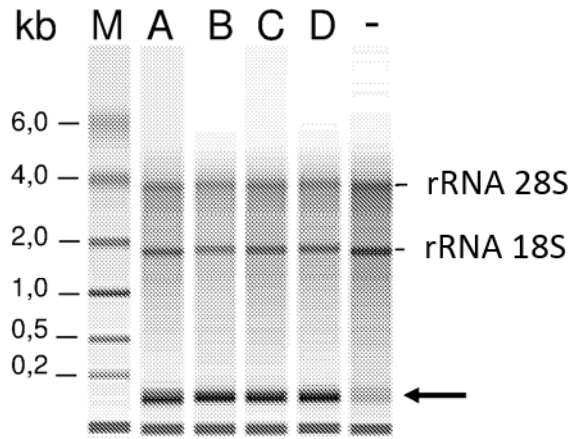


Fig. 4

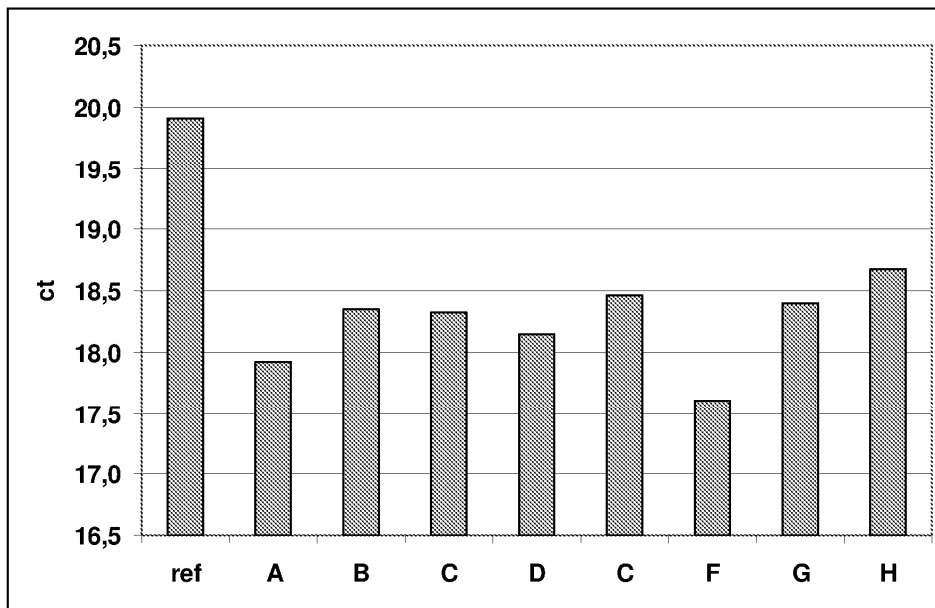


Fig. 5

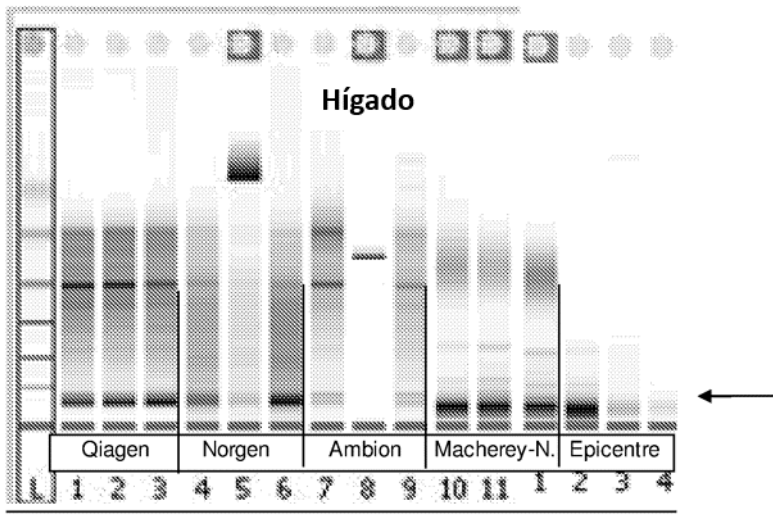


Fig. 6

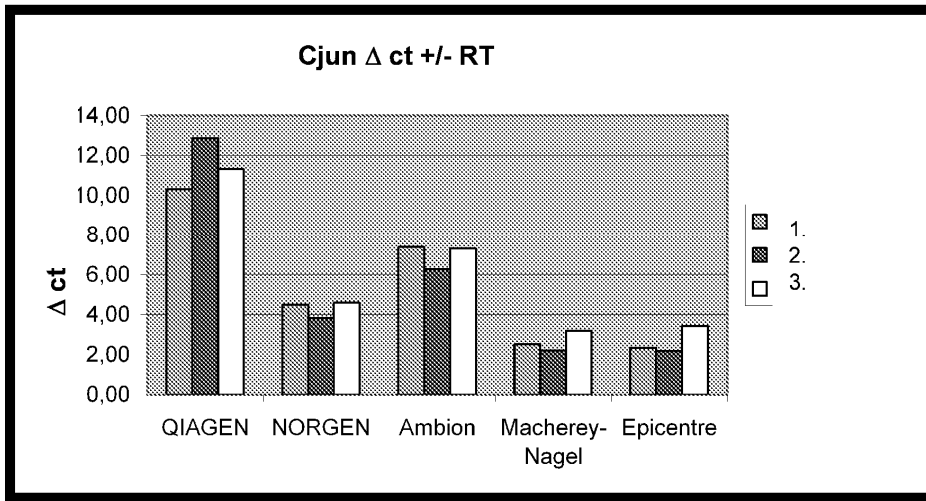


Fig. 7

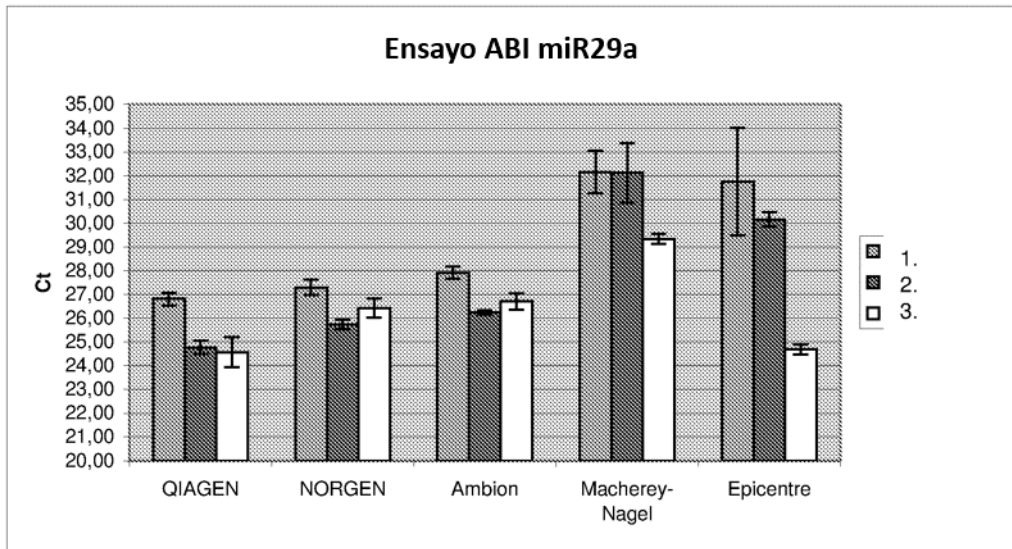


Fig. 8a

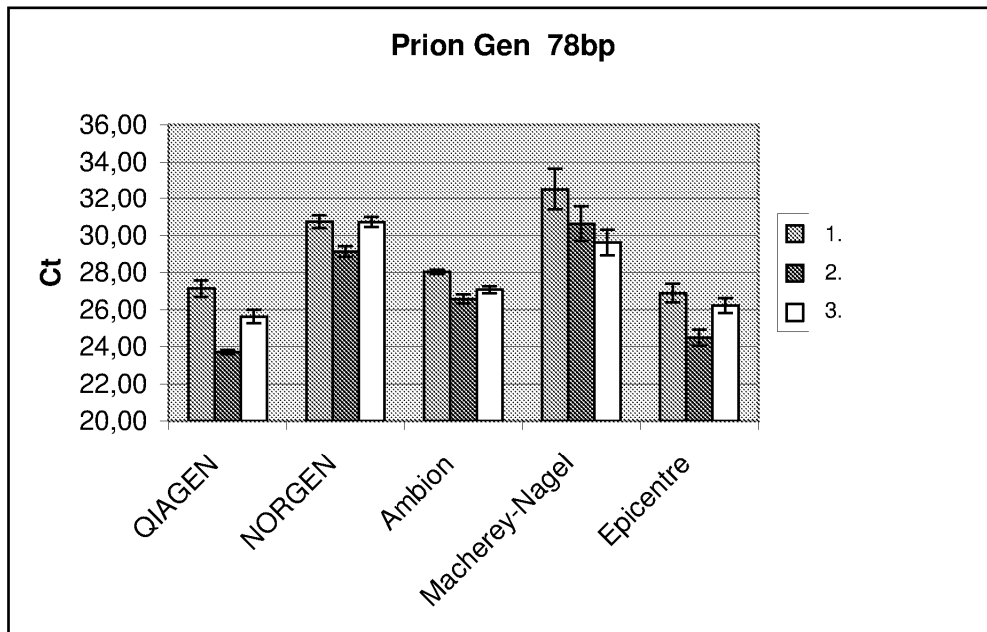


Fig. 8b

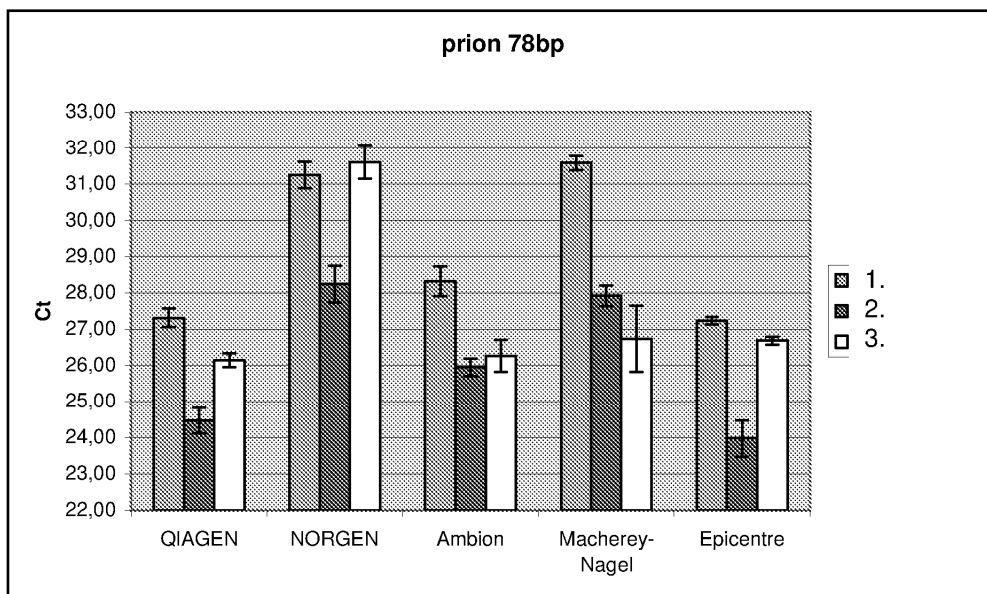


Fig. 9a

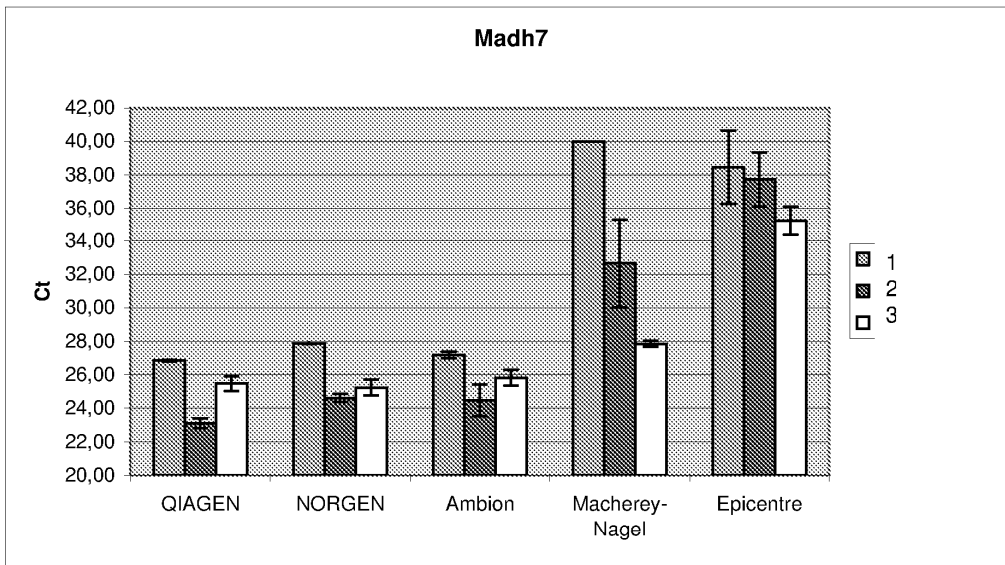


Fig. 9b

