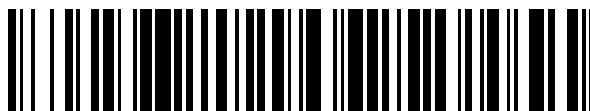


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 964**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2011 PCT/JP2011/068620**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2012 WO12023569**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2011 E 11818210 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2607482**

54 Título: **Solución para la extracción de ARN**

30 Prioridad:

18.08.2010 JP 2010183280

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

10.07.2017

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC (100.0%)
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome Chuo-ku
Tokyo 103-8666, JP**

72 Inventor/es:

**YOSHIMOTO, MAKIKO;
AKIYAMA, HIDEO y
NOBUMASA, HITOSHI**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 622 964 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Solución para la extracción de ARN

5 **SECTOR TÉCNICO**

La presente invención se refiere a una solución para la extracción de ARN sustancialmente puro a partir de una muestra biológica.

10 **ANTECEDENTES TÉCNICOS**

La información genética escrita en el ADN se transcribe en ARN en diversas combinaciones, para producir fenotipos complicados de organismos. Es conocida que la contribución del ARN a los fenotipos de los organismos es dependiente de los tipos y niveles de expresión del ARN, y la extracción de ARN altamente puro a partir de diversos materiales biológicos es importante para la realización de análisis de la expresión génica. Para la consecución de este objetivo, se han desarrollado hasta la fecha muchos procedimientos para la extracción de ARN. Entre los ejemplos de procedimientos para el aislamiento de ARN utilizados con frecuencia, se incluyen la extracción con fenol, la precipitación a partir de soluciones de sales caotrópicas y la adsorción a membranas de sílice.

20 El documento de patente 1 da a conocer una solución para la extracción de ARN que comprende guanidina de 2 a 5 M y del 40 al 60% de fenol. Anteriormente, la extracción de ARN había requerido no menos de 2 días de operación utilizando una ultracentrífuga, pero la utilización de esta solución ha permitido la extracción eficiente de ARN en 3 horas. Este procedimiento se denomina el procedimiento de una sola etapa.

25 Como mejora del procedimiento descrito en el documento de patente 1 anterior, el documento de patente 2 da a conocer una solución de extracción para la extracción y la separación simultánea de ARN, ADN y proteínas de una muestra que comprende estos componentes. Más específicamente, la literatura describe la extracción y la separación de ARN en una fase acuosa mediante la utilización de una solución de fenol del 30 al 50% que contenía guanidina de 0,5 a 2 M.

30 Aunque las soluciones descritas en los documentos de patente 1 y 2 tienen diferentes composiciones, el ARN se puede extraer mediante operaciones similares utilizando las soluciones. Es decir, cada solución se utiliza para la homogeneización de un tejido biológico y se utiliza un disolvente orgánico hidrófobo, tal como cloroformo, después de la centrifugación del homogeneizado para conseguir la separación de fases. Posteriormente, se recupera la fase acuosa en la parte superior que comprende el ARN. A continuación, se precipita el ARN con alcohol y se lava con el fin de extraer el ARN.

35 Sin embargo, el ARN aislado utilizando las soluciones y los procedimientos descritos en los documentos de patente 1 y 2 todavía muestran contaminación con ADN genómico (residual) en una cantidad que puede ser detectada mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), dando lugar a problemas tales como la pérdida de cuantitatividad de ARN en los casos de RT-PCR (documento de patente 3, por ejemplo, párrafo 0005). Por lo tanto, el ARN aislado mediante estos procedimientos tiene que ser purificado para la eliminación de ADN como un contaminante.

45 Un procedimiento utilizado de forma habitual para la eliminación de ADN, contenido como impureza en una muestra de ARN extraído, es el tratamiento de la muestra de ARN con desoxirribonucleasa (DNasa). Sin embargo, en los casos en los que el tratamiento con DNasa se lleva a cabo en una fase líquida, es necesario llevar a cabo la extracción con fenol/cloroformo y la desnaturalización de las proteínas de nuevo para la eliminación de la DNasa después del tratamiento. Además, en los casos en los que la extracción se realiza utilizando una combinación de columnas de membrana de sílice, la operación de lavado de las columnas debe llevarse a cabo de forma repetida. Aunque la contaminación con ADN se reduce por este tratamiento con DNasa, se requiere este trabajo adicional y se produce la pérdida de ARN, lo que da como resultado una disminución en la cantidad de ARN extraído, lo cual es problemático.

55 Como un procedimiento para evitar la contaminación de una muestra de ARN con ADN sin realizar tratamiento con DNasa, el documento de patente 3 da a conocer un procedimiento que utiliza un reactivo de extracción de ARN a un pH de menos de 4. Sin embargo, es bien conocido que el ácido nucleico sufre despurinación y se degrada en condiciones ácidas y, por lo tanto, es difícil aislar ARN sustancialmente intacto. Además, dado que el equilibrio de la solución de ADN en la fase acuosa/orgánica en condiciones ácidas está desplazado hacia su distribución en la fase orgánica, se puede esperar hasta cierto punto el efecto de suprimir la contaminación de la fase acuosa con ADN genómico, mediante la utilización de un reactivo para la extracción de ARN a un pH de menos de 4, pero la supresión completa de la contaminación con fragmentos de ADN pequeños con un número pequeño de bases es imposible.

DOCUMENTOS DE LA TÉCNICA ANTERIOR

[Documentos de patente]

5 Documento de patente 1: US 4.843.155 B

Documento de patente 2: JP 5-344.886 A

10 Documento de patente 3: Solicitud de patente PCT abierta a Inspección pública No. 2007-532.140 traducida al japonés.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

15 PROBLEMAS A RESOLVER POR LA INVENCION

20 Tal como se ha descrito anteriormente, el ARN sustancialmente puro libre de contaminación con ADN no puede extraerse con las soluciones convencionales para la extracción de ARN a partir de muestras biológicas, incluso en casos en los que se requiere cuantitatividad, lo que ha resultado problemático. Por lo tanto, para la eliminación de ADN como contaminante, ha sido necesaria una etapa adicional, tal como tratamiento con DNasa. La presente invención tiene como objetivo resolver estos problemas y da a conocer una solución para la extracción de ARN sustancialmente puro a partir de una muestra biológica.

MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS

25 Los inventores de la presente invención estudiaron las composiciones de las soluciones convencionales para la extracción de ARN y descubrieron que la concentración de fenol tiene una relación especialmente fuerte con el efecto de prevención de la contaminación con ADN, completando así la presente invención.

30 Es decir, la presente invención da a conocer lo siguiente:

[1] Una solución para la extracción de ARN de una muestra biológica que contiene ARN y, como mínimo, ADN, comprendiendo la solución:

35 (a) fenol en una cantidad de no menos del 53% en volumen basada en la cantidad total de la solución;

(b) un poliol en una cantidad del 3 al 10% en volumen basada en la cantidad total de la solución;

(c) una sal de guanidinio a una concentración de 0,5 a 2,0 M basada en la cantidad total de la solución;

40 (d) un tiocianato a una concentración de 0,1 a 0,5 M basada en la cantidad total de la solución, en la que en los casos en los que la solución comprenda tiocianato de guanidinio, la concentración de tiocianato de guanidinio está incluida en la concentración de la sal de guanidinio y no está incluida en la concentración de tiocianato; y

45 (e) un tampón para mantener el pH de la solución entre 4 y 6.

[2] La solución, según el punto [1], en la que la concentración de fenol es del 55 al 65% en volumen basada en la cantidad total de la solución.

50 [3] La solución, según los puntos [1] ó [2], que comprende además un disolvente orgánico para separar una fase acuosa.

[4] La solución, según uno cualquiera de los puntos [1] a [3], en la que la muestra biológica es un líquido de cultivo de células cultivadas.

55 [5] La solución, según uno cualquiera de los puntos [1] a [3], en la que la muestra biológica es un componente de un fluido corporal de un organismo.

[6] La solución, según uno cualquiera de los puntos [1] a [3], en la que la muestra biológica es un componente de la sangre de un organismo

60 [7] Un procedimiento para la extracción de ARN de una muestra biológica que contiene ARN y, como mínimo, ADN, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

homogeneizar la muestra biológica junto con una solución que comprende:

65 (a) fenol en una cantidad de no menos del 53% en volumen basada en la cantidad total de la solución;

(b) un poliol en una cantidad del 3 al 10% en volumen basada en la cantidad total de la solución;

(c) una sal de guanidinio a una concentración de 0,5 a 2,0 M basada en la cantidad total de la solución;

(d) un tiocianato a una concentración de 0,1 a 0,5 M basada en la cantidad total de la solución, en la que en los casos en los que la solución comprenda tiocianato de guanidinio, la concentración de tiocianato de guanidinio está incluida en la concentración de la sal de guanidinio y no está incluida en la concentración de tiocianato; y

(e) un tampón para mantener el pH de la solución entre 4 y 6;

mezclar el homogeneizado obtenido con un disolvente orgánico para la separación de una fase acuosa;

centrifugar la mezcla obtenida; y

recuperar una fase acuosa producida mediante la centrifugación, que contiene el ARN.

[8] Un procedimiento para la extracción de ARN de una muestra biológica que contiene ARN y, como mínimo, ADN, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

homogeneizar la muestra biológica junto con una solución que comprende:

(a) fenol en una cantidad de no menos del 53% en volumen basada en la cantidad total de la solución;

(b) un poliol en una cantidad del 3 al 10% en volumen basada en la cantidad total de la solución;

(c) una sal de guanidinio a una concentración de 0,5 a 2,0 M basada en la cantidad total de la solución;

(d) un tiocianato a una concentración de 0,1 a 0,5 M basada en la cantidad total de la solución, en la que en los casos en los que la solución comprenda tiocianato de guanidinio, la concentración de tiocianato de guanidinio está incluida en la concentración de la sal de guanidinio y no está incluida en la concentración de tiocianato; y

(e) un tampón para mantener el pH de la solución entre 4 y 6; y

(f) un disolvente orgánico para la separación de una fase acuosa;

centrifugar el homogeneizado obtenido; y

recuperar una fase acuosa producida mediante la centrifugación, que contiene el ARN.

[9] El procedimiento según la reivindicación 7 ó 8, en el que la concentración de fenol es del 55 al 65% en volumen basada en la cantidad total de la solución de (a) a (e).

EFFECTO DE LA INVENCION

Mediante la utilización de la solución de la presente invención, se puede extraer de forma sencilla ARN sustancialmente puro libre de contaminación con ADN de una muestra biológica. Además, mediante la presente invención, el ARN se puede obtener sin un tratamiento adicional, tal como tratamiento con DNasa que puede causar pérdida de recuperación, ARN que tiene una pureza que permite la utilización del ARN tal como está, incluso en utilizaciones en las que se requiere cuantitatividad. En particular, un ARN de interés puede extraerse con elevada pureza incluso a partir de, entre las muestras biológicas, fluidos corporales tales como la sangre, que contienen cantidades muy grandes de RNasa y otros contaminantes.

DESCRIPCION BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra electroferogramas de ácido nucleico extraído a partir de suero en el ejemplo 1, utilizando una solución de la presente invención.

La figura 2 muestra electroferogramas de ácido nucleico extraído a partir de suero en el ejemplo comparativo 1, utilizando una solución descrita en el documento de patente 2.

La figura 3 muestra un electroferograma de ácido nucleico extraído a partir de suero en el ejemplo comparativo 2, utilizando una solución descrita en el documento de patente 1.

La figura 4 muestra electroferogramas de ácido nucleico extraído a partir de suero en los ejemplos 2 a 5, utilizando soluciones de la presente invención.

La figura 5 muestra electroferogramas de ácido nucleico extraído a partir de suero en los ejemplos 6 a 12, utilizando las soluciones de la presente invención.

5 La figura 6 muestra electroferogramas de ácido nucleico extraído a partir de suero en el ejemplo 13 y el ejemplo comparativo 3, utilizando una solución de la presente invención y una solución que se describe en el documento de patente 3.

10 La figura 7 muestra electroferogramas de ácido nucleico extraído de células cultivadas en el ejemplo 14, utilizando una solución de la presente invención.

La figura 8 muestra electroferogramas de ácido nucleico extraído a partir de suero en los ejemplos 15 y 16, utilizando soluciones de la presente invención.

15 La figura 9 muestra electroferogramas de ácido nucleico extraído a partir de suero en el ejemplo comparativo 4, utilizando una solución descrita en el documento de patente 3.

La figura 10 muestra electroferogramas de ácido nucleico extraído a partir de suero en los ejemplos 17 y 18, utilizando soluciones de la presente invención.

20 MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

La presente invención es una solución para la extracción de ARN a partir de una muestra biológica, solución que comprende, como sus componentes, los siguientes (a) a (e):

25 (a) fenol en una cantidad de no menos del 53% en volumen basada en la cantidad total de la solución;

(b) un poliol en una cantidad del 3 al 10% en volumen (no menos del 3% en volumen y no más del 10% en volumen), basada en la cantidad total de la solución;

30 (c) una sal de guanidinio a una concentración de 0,5 a 2,0 M (no menos de 0,5 M y no más de 2,0 M) basada en la cantidad total de la solución;

35 (d) un tiocianato a una concentración de 0,1 a 0,5 M (no menos de 0,1 M y no más de 0,5 M) basada en la cantidad total de la solución, en la que en los casos en los que la solución comprenda tiocianato de guanidinio, la concentración de tiocianato de guanidinio está incluida en la concentración de la sal de guanidinio y no está incluida en la concentración de tiocianato; y

40 (e) un tampón para mantener el pH de la solución entre 4 y 6.

La muestra biológica utilizada en la presente invención comprende ARN y, como mínimo, ADN. Además, utilizando la solución de la presente invención, se puede extraer el ARN sustancialmente puro de la muestra biológica. En el presente documento, el término "ARN sustancialmente puro" significa ARN del que el ADN contenido en la muestra biológica original se ha separado y que está sustancialmente libre de la contaminación con ADN. Si el ARN es sustancialmente puro o no, se puede juzgar observando si el ADN se detecta por electroforesis o no. Por ejemplo, dado que se puede utilizar el dispositivo "Agilent RNA 6000 pico kit" fabricado por Agilent Technologies Inc. (número de modelo, 5067-1513) para la detección de ácido nucleico en una cantidad de 50 pg/μl a 5000 pg/μl (recomendación), el kit puede ser utilizado para la evaluación de la presencia/ausencia de contaminación por ADN. Más específicamente, el ácido nucleico extraído puede tratarse con RNasa y someterse a electroforesis utilizando "Agilent RNA 6000 pico kit". En los casos en los que no se detectó ningún pico, se puede decir que la contaminación por ADN fue suprimida suficientemente y se pudo obtener ARN sustancialmente puro. Además, mediante el análisis de la cantidad de contaminación por ADN mediante PCR cuantitativa, se puede evaluar la pureza del ARN. Por ejemplo, en los casos en los que se utiliza un aparato de PCR en tiempo real y "SYBR Green" (colorante fluorescente), se puede detectar el ADN de doble cadena en una cantidad de 60 pg, de modo que la evaluación puede llevarse a cabo utilizando estos componentes. Más específicamente, se añade ácido nucleico extraído a una solución de reacción de PCR que contenía cebadores, ADN polimerasa y "SYBR Green" para llevar a cabo la amplificación por PCR, y el resultado se compara con una curva de calibración preparada de forma preliminar. Mediante este proceso, puede analizarse cuantitativamente la cantidad de contaminación por ADN.

60 En la presente invención, la cantidad total de una solución significa el volumen total que comprende la totalidad de los (a) a (e) descritos anteriormente. Por ejemplo, "fenol en una cantidad de más de 50% en volumen basada en la cantidad total de la solución" significa que más de 500 ml de fenol están contenidos en 1 l de la solución después de la mezcla de todos los componentes. Además, por ejemplo, "una sal de guanidinio a una concentración de 0,5 a 2,0 M basada en la cantidad total de la solución" significa que la concentración final en la solución no es inferior a 0,5 M y no más de 2,0 M, es decir, la sal de guanidinio está contenida en una cantidad de no menos de 0,5 moles y no más de 2 moles en 1 l de la solución después de la mezcla de todos los componentes.

La solución de la presente invención comprende (a) fenol en una cantidad de no menos del 53% en volumen basada en la cantidad total de la solución. Se descubrió que la utilización de una concentración de fenol de más del 50% en volumen, que es diferente de la concentración utilizada en las técnicas convencionales, produce el efecto de reducir la contaminación de la fase acuosa, en la que se extrae el ARN, con el ADN como una impureza. Por ejemplo, la solución de la presente invención comprende fenol en una cantidad de no menos del 53% en volumen, no menos del 54% en volumen o no menos del 55% en volumen. Preferentemente, la solución de la presente invención comprende fenol en una cantidad de no menos del 55% en volumen. Además, la concentración de fenol es preferentemente no más del 75% en volumen en vista de la preparación de la solución de la presente invención en el estado en el que los otros componentes de la solución de la presente invención, (b) polialcohol, (c) 0,5 a 2,0 M de la sal de guanidinio y (d) de 0,1 a 0,5 M del tiocianato se mezclan uniformemente a las respectivas concentraciones predeterminadas. Además, la concentración de fenol es más preferentemente no más del 65% en volumen en vista de la reducción de la influencia de la oxidación del fenol. El intervalo de concentraciones de fenol es, preferentemente, uno determinado por una combinación arbitraria de estos límites superiores y límites inferiores, y es, más preferentemente, no menos del 53% en volumen y no más del 65% en volumen, de forma especialmente preferente, no menos del 55% en volumen y no más del 65% en volumen.

La solución de la presente invención comprende (b) un poliol en una cantidad del 3 al 10% en volumen basada en la cantidad total de la solución. El poliol en la presente invención puede ser un alcohol alifático que tiene una pluralidad de grupos hidroxilo, lo que permite la mezcla del componente (a) fenol y las soluciones acuosas de (c) y (d) en la solución de la presente invención, para mantener la solución de la presente invención uniforme. Como poliol, es preferente un alcohol alifático C₂-C₆ que tiene de 2 a 4 grupos hidroxilo. Entre los ejemplos del poliol se incluyen glicerol, etilenglicol, propilenglicol y eritritol, y el poliol es más preferentemente glicerol. El poliol se puede utilizar en una cantidad del 3 al 10% en volumen basada en la cantidad total de la solución de la presente invención con el fin de mantener la solución de la presente invención como una solución uniforme y para evitar la distribución excesiva del componente fenol en la fase acuosa.

La solución de la presente invención comprende (c) una sal de guanidinio a una concentración de 0,5 a 2,0 M basada en la cantidad total de la solución. Entre los ejemplos específicos preferentes de la sal de guanidinio se incluyen tiocianato de guanidinio y clorhidrato de guanidinio. Las sales de guanidinio tienen un efecto de proteger el ARN de la degradación y mantener el fenol en estado de solución en una solución acuosa.

La solución de la presente invención comprende (d) un tiocianato a una concentración de 0,1 a 0,5 M basada en la cantidad total de la solución. Como tiocianato, se puede utilizar preferentemente una sal inorgánica del ácido tiocianico y se puede utilizar más preferentemente tiocianato de amonio y tiocianato de sodio. Además, el tiocianato puede ser una mezcla de una pluralidad de diferentes sales inorgánicas de ácido tiocianico y, por ejemplo, se puede utilizar preferentemente una mezcla de tiocianato de amonio y tiocianato de sodio. Se considera que el tiocianato mejora la extracción de ARN de una muestra biológica. En los casos en los que la solución de la presente invención comprende tiocianato de guanidinio, la concentración de tiocianato de guanidinio está incluida en la concentración de la sal de guanidinio descrita anteriormente y no se incluye en la concentración de tiocianato.

La solución de la presente invención comprende (e) un tampón para mantener el pH de la solución entre 4 y 6. Como tampón, se pueden utilizar sales orgánicas y sales inorgánicas que se utilizan convencionalmente para mantener el pH dentro de un intervalo deseado y muestran capacidad de tamponamiento. Entre los ejemplos específicos de tampón se incluyen sales orgánicas y sales inorgánicas, tales como fosfato, acetato, citrato, ftalato, tartrato y lactato de sodio, potasio, litio y amonio. Entre las combinaciones de éstas, se utilizan más preferentemente acetato de sodio y citrato de sodio. Además, pueden utilizarse en combinación una pluralidad de estas sales orgánicas y/o sales inorgánicas. La concentración del tampón no se limita, siempre que sea suficiente para mantener el pH dentro del intervalo deseado entre 4 y 6, y la concentración es preferentemente de 0,02 a 0,2 M basada en la cantidad total de la solución de la presente invención. Con el fin de ajustar el pH de la solución de la presente invención, se puede añadir en su caso una solución ácida o alcalina acuosa apropiada, tal como una solución de ácido clorhídrico o de hidróxido de sodio además del tampón.

La solución de la presente invención puede contener uno o más agentes surfactantes, tales como sorbitán polioxiethylénico, dodecilsulfato de sodio y/o sarcosina para la purificación del ARN de interés mediante la desnaturalización de las proteínas en la muestra biológica. Además, la solución de la presente invención puede contener uno o más antioxidantes tales como aminofenol y/o quinolina impedidos, para la prevención de la oxidación del fenol.

En los casos en los que la muestra biológica está en estado líquido cuando el ARN de interés se va a extraer, la solución de la presente invención se puede utilizar en una cantidad de no menos de 1 volumen, preferentemente no menos de 3 volúmenes de la muestra.

A continuación, se muestra un ejemplo del procedimiento para la extracción del ARN de interés utilizando la solución de la presente invención. En primer lugar, la muestra biológica se homogeneiza en la solución de la presente invención para formar un homogeneizado. El procedimiento de homogeneización no está restringido, y entre los

ejemplos del procedimiento se incluyen agitación mediante vórtice o similar, aplastamiento con una aguja de inyección o similar y la utilización de un homogeneizador convencional. Posteriormente, se añade un disolvente orgánico al homogeneizado para la separación de la fase acuosa y la mezcla resultante se somete a centrifugación. El disolvente orgánico que se añade en esta etapa se utiliza preferentemente en una cantidad de, aproximadamente, el 2% en volumen a, aproximadamente, el 40% en volumen basado en el homogeneizado. La centrifugación se puede llevar a cabo habitualmente de 6000 x G a 20.000 x g durante 3 minutos a 30 minutos, por ejemplo, a una velocidad de 12.000 x G durante 10 minutos a temperatura ambiente. Sin embargo, la velocidad, la temperatura y el tiempo no se restringen siempre que la fase acuosa se pueda separar. Mediante la centrifugación, se extrae en la fase acuosa el ARN de interés sustancialmente puro. Por otro lado, el ADN, proteínas y similares se separan en la fase orgánica o, en los casos en los que se produjo una fase intermedia, el ADN, proteínas y similares se separan en la fase orgánica y la fase intermedia.

El disolvente orgánico para la separación de la fase acuosa es un compuesto orgánico líquido que se va a utilizar para lograr la separación en la fase acuosa que comprende el ARN de interés extraído por medio de la solución de la presente invención y la fase orgánica y/o la fase intermedia (si se produce) que comprende el ADN y similares. Como este disolvente orgánico, se puede utilizar uno que tenga el mismo grado de hidrofiliicidad que el fenol, o que sea más hidrófobo que éste. Por ejemplo, en términos del coeficiente de ClogP de distribución de agua/octanol que se utiliza de forma habitual como un índice de hidrofiliicidad, se puede utilizar un compuesto orgánico que tenga un valor de no menos de 1,4 (valor de ClogP para el fenol), y se puede utilizar preferentemente un compuesto orgánico que tiene un valor dentro del intervalo de 1,4 a 5. Se puede calcular un valor estimado del valor ClogP, por ejemplo, utilizando un programa como "Chem Draw" (marca registrada). Entre los ejemplos del disolvente orgánico que se puede utilizar en la presente invención se incluyen, sin que constituyan limitación, cloroformo (1,952), p-bromoanisol (3,064), 1-bromo-3-cloropropano (1,847), 4-bromoveratrol (2,7345), 6-bromo-1,4-benzodioxano (3,0005), 1-bromo-4-trifluorometoxibenceno (4,173), 1-bromo-2,4-dimetoxibenceno (2,8545), 4-fluoroanisol (2,344), 4-bromotolueno (3,504) y 4-bromobutirato de etilo (1,772). El valor entre paréntesis para cada uno de los disolventes orgánicos anteriores indica el valor de ClogP calculado con "Chem Draw".

El disolvente orgánico para la separación de la fase acuosa se puede utilizar mediante la formación utilizando la solución de la presente invención que comprende los (a) a (e) tal como se ha descrito anteriormente y la adición del homogeneizado, pero el disolvente orgánico también puede estar contenido de forma preliminar en la solución de la presente invención que comprende los (a) a (e) descritos anteriormente. En los casos de una solución convencional, cuya concentración de fenol no es mayor que el 50%, la inclusión de este disolvente orgánico con antelación provoca la separación de la solución en la fase acuosa y la fase orgánica antes de la mezcla con una muestra biológica, de modo que ha sido difícil utilizar la solución como una solución de extracción. En contraste, a la concentración de fenol de la solución de la presente invención, el disolvente orgánico se puede mezclar uniformemente con la solución de la presente invención y la solución resultante se puede almacenar como una única solución. En los casos en los que la solución de la presente invención contiene el disolvente orgánico de forma preliminar, es posible la separación de la fase acuosa que contiene el ARN añadiendo una muestra biológica a la disolución y homogeneizando la mezcla resultante para proporcionar un homogeneizado, y sometiendo inmediatamente a continuación el homogeneizado a centrifugación. Por consiguiente, en comparación con los casos en los que la adición del disolvente orgánico al homogeneizado se lleva a cabo más tarde, el procedimiento puede ser muy sencillo, lo que es preferente.

En los casos en los que el disolvente orgánico para la separación de la fase acuosa está contenido de forma preliminar en la solución de la presente invención que comprende los (a) a (e) descritos anteriormente, el contenido del disolvente orgánico se puede seleccionar dependiendo del tipo del disolvente orgánico que se añada y la concentración de fenol en la solución, dentro del intervalo en el que el disolvente orgánico se puede mezclar uniformemente en la solución de la presente invención. Por ejemplo, en los casos en los que la concentración de fenol en la solución de la presente invención es del 65% y se selecciona cloroformo como disolvente orgánico, el cloroformo está contenido preferentemente en un volumen arbitrario de hasta el 27% en volumen basado en la cantidad total, 100%, de la solución que comprende los (a) a (e) descritos anteriormente. Más específicamente, es preferente añadir cloroformo en un volumen arbitrario de hasta 27 ml, a 100 ml de la solución que comprende los (a) a (e) descritos anteriormente. Más preferentemente, el cloroformo está contenido en una cantidad del 5 al 25% en volumen, aún más preferentemente del 10 al 20% en volumen basada en la cantidad total, 100%, de la solución que comprende los (a) a (e) descritos anteriormente. Además, en los casos en los que la concentración de fenol es del 58%, el cloroformo está contenido preferentemente en un volumen arbitrario de hasta el 14%, más preferentemente en una cantidad del 6 al 13% en volumen, aún más preferentemente en una cantidad del 8 al 12% en volumen basada en la cantidad total, 100%, de la solución que comprende los (a) a (e) descritos anteriormente. Además, en los casos en los que la concentración de fenol en la solución es del 65% y se selecciona p-bromoanisol como disolvente orgánico, el p-bromoanisol está contenido preferentemente en un volumen arbitrario de hasta el 22% en volumen, más preferentemente en una cantidad del 5 al 20% en volumen, aún más preferentemente en una cantidad del 10 al 18% en volumen basada en la cantidad total, 100%, de la solución que comprende los (a) a (e) descritos anteriormente. Además, de manera similar, en los casos en los que la concentración de fenol es del 58%, el p-bromoanisol está contenido preferentemente en un volumen arbitrario de hasta el 13% en volumen, más preferentemente en una cantidad del 3 al 11% en volumen y, aún más preferentemente, en una cantidad del 5 al 9% en volumen basada en la cantidad total, 100%, de la solución que comprende los (a) a (e) descritos anteriormente.

Para purificar y concentrar adicionalmente el ARN que se ha extraído en la fase acuosa utilizando la solución de la presente invención, se puede añadir un alcohol inferior a la fase acuosa que comprende el ARN con el fin de precipitar el ARN y el ARN precipitado se puede recuperar. Como alternativa, el ARN que se ha precipitado mediante la adición de un alcohol inferior a la fase acuosa que comprende el ARN, puede adsorberse a un portador al que el ARN se pueda adsorber, tal como una columna de membrana de sílice y el ARN se puede eluir y se recuperar del portador (columna). Entre los ejemplos del alcohol inferior que se van a utilizar en esta etapa se incluyen etanol e isopropanol. La concentración del alcohol inferior se puede determinar de acuerdo con la utilizada en técnicas convencionales, tales como precipitación con etanol y precipitación con isopropanol, o de acuerdo con las concentraciones recomendadas por los fabricantes de portadores, tales como columnas de membrana de sílice.

La solución de la presente invención se puede producir mezclando los (a) a (e) descritos anteriormente de manera que se alcancen sus concentraciones respectivas. El procedimiento de mezcla no está restringido. Dependiendo de la composición de la solución, se pueden preparar soluciones respectivas a concentraciones más elevadas con antelación antes de mezclar las soluciones. Por ejemplo, se puede preparar con antelación una solución acuosa de tiocianato de guanidinio 6 M, una solución acuosa de tiocianato de amonio 6 M, y acetato de sodio 1 M y después mezclarlas para alcanzar las concentraciones de interés, seguido de la adición de glicerol, fenol y una cantidad necesaria de agua a la misma, para preparar la solución de la presente invención. La solución de la presente invención en la que un disolvente orgánico para la separación de la fase acuosa está contenido de forma preliminar en la solución, que comprende los (a) a (e) descritos anteriormente, se puede producir también de manera similar mediante la mezcla de los (a) a (e) y el disolvente orgánico de manera que se alcancen sus concentraciones deseadas.

La muestra biológica que se va a utilizar en la presente invención no está limitada en tanto que comprenda ARN y, como mínimo, ADN. Por ejemplo, la muestra biológica puede comprender, además de ADN, proteínas tales como componentes de impurezas que preferentemente se separan del ARN de interés. Entre los ejemplos específicos de la muestra biológica se incluyen células cultivadas; líquidos de cultivo de células cultivadas; tejidos corporales, tales como secciones quirúrgicas y muestras de biopsia; células vivas; sangre; componentes de la sangre (suero, plasma); orina y fluidos corporales tales como saliva y lágrimas. La muestra biológica no se limita a éstas y se puede utilizar una muestra arbitraria que contenga ARN. Cuando se aplica la solución de la presente invención a estas muestras biológicas, en los casos en los que la muestra biológica es una muestra líquida tal como un fluido corporal, la muestra recogida se puede mezclar tal como está con la solución de la presente invención o se puede diluir con PBS o agua antes de mezclarla con la solución de la presente invención. En los casos en los que la muestra biológica es un sedimento celular o un trozo de tejido, la muestra recogida se puede mezclar tal como está con la solución de la presente invención o se puede diluir con PBS o agua antes de mezclarla con la solución de la presente invención y, en los casos en los que se diluye la muestra, se prepara preferentemente un homogeneizado de la muestra biológica antes de la dilución con agua o PBS con el fin de evitar la degradación del ARN.

Entre las muestras biológicas, los fluidos corporales, especialmente la sangre, contienen a veces una cantidad muy grande de RNasa y otros contaminantes y, en este caso, es muy difícil la extracción de ARN substancialmente puro mediante un procedimiento convencional. Con una concentración de fenol de más de 50% en volumen, la solución de la presente invención permite la extracción eficaz de los contaminantes, tales como proteínas, en una fase orgánica, de modo que el ARN de interés puede ser obtenido con pureza elevada. Además, se reduce la fase intermedia que aparece después de la centrifugación y se puede lograr separación clara entre fases, de manera que la fase acuosa que comprende el ARN de interés se puede separar fácilmente.

El ARN extraído utilizando la solución de la presente invención es ácido ribonucleico en el que una pluralidad de ribonucleótidos están unidos por enlaces fosfodiéster, y el peso molecular, el número de bases y el origen del ARN no están restringidos. En general, el ARN se clasifica en muchos tipos según su clasificación funcional, y entre los ejemplos de los tipos se incluyen ARNm (ARN mensajero), ARNt (ARN de transferencia), ARNr (ARN ribosómico), ARNnc (ARN no codificante), ARNsn (ARN nuclear pequeño) y ARNsno (ARN nucleolar pequeño). Sin embargo, en vista de la estructura química, la única diferencia conocida es el peso molecular (número de bases), y queda incluido en la presente invención ARN que tiene cualquier peso molecular. ARN que tienen un número de bases de, aproximadamente, 15 a 500 bases, que reciben generalmente el nombre de ARN pequeños, y ARN que tienen generalmente un número de bases de, aproximadamente, 18 a 25, que son ARNmi (microARN), también están incluidos en el ARN de la presente invención.

En general, la diferencia principal en la estructura química primaria entre el ARN y el ADN es la presencia/ausencia del grupo hidroxilo (-OH) en la posición 2' de la ribosa como el azúcar constituyente. Cuanto menor es el número de bases, menor es la diferencia estructural entre el ARN y el ADN y es más difícil la separación de ARN y ADN por extracción. Sin embargo, mediante la utilización de la solución de la presente invención, el ARN que tiene un número relativamente pequeño de bases, tal como ARN pequeño, se puede extraer también con pureza elevada.

En el estado en el que ADN y ARN coexisten, habitualmente es difícil distinguir entre ellos y cuantificar cada uno de ellos utilizando un medidor de absorción o luminómetro. Sin embargo, mediante la utilización de la solución de la presente invención, se puede obtener ARN sustancialmente puro, por lo que es posible la cuantificación de ARN

utilizando un absorciómetro o luminómetro. Además, en los casos en los que se utiliza la solución de la presente invención en el análisis de ARN utilizando qRT-PCR o una micromatriz, el análisis se puede realizar de manera sencilla sin necesidad de tratamiento con DNasa, en ausencia de ruido debido a la coexistencia de ADN.

5 EJEMPLOS

A continuación, la presente invención se describirá concretamente por medio de los siguientes ejemplos. Sin embargo, el alcance de la presente invención no queda limitado por estos ejemplos.

10 <Ejemplo 1>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

15 Se mezclaron los componentes respectivos de la solución, de manera que sus concentraciones finales fueron como se describe a continuación, para preparar una solución para la extracción de ARN.

- fenol al 58% en volumen
- glicerol al 5% en volumen
- tiocianato de guanidinio 0,8 M (mezclado como una solución acuosa)
- 20 • tiocianato de amonio 0,4 M (mezclado como una solución acuosa)
- tampón de acetato de sodio 0,1 M (mezclado como una solución acuosa), ajustado a pH 5.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

25 Se utilizó suero como muestra biológica que contiene ARN, así como ADN y proteínas, para la extracción de ARN. Se homogeneizó la muestra mediante la mezcla de 900 µl de la solución preparada anteriormente en (1) y 300 µl de suero por agitación con vórtice. Se añadieron 60 µl de p-bromoanisol al homogeneizado resultante y la mezcla resultante se mezcló, seguida de centrifugación de la mezcla a temperatura ambiente a 12.000 x G durante 10 minutos. Mediante esto, se formó una fase acuosa que contenía el ARN, y una fase orgánica y una fase intermedia que contenían el ADN y las proteínas. De estas, se separaron 400 µl de la fase acuosa en otro tubo.

30

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

35 A la fase acuosa que contenía ARN separado en (2) se añadieron 1,5 volúmenes de etanol al 100%, y se colocaron 700 µl de la mezcla resultante en una columna para la purificación de ácido nucleico, "RNeasy Mini Spin Column" contenida en un "mini kit miRNeasy" (fabricado por QIAGEN), seguido por centrifugación de la columna a 8.000 x G durante 15 segundos para permitir la adsorción del ácido nucleico a la columna. Se desechó el líquido que pasó a través de la columna. Al repetir esta operación hasta que no quedó muestra de ARN mezclado con etanol, todo el ácido nucleico contenido en la fase acuosa se adsorbió a la columna. Posteriormente, según el protocolo para el

40 "mini kit miRNeasy", la columna se lavó dos veces con 700 µl de tampón RWT y 500 µl de tampón RPE, y a continuación se secó la columna, seguida de elución con 30 µl de agua libre de RNasa, para obtener una muestra de ARN purificada y concentrada.

40

(3b) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - Con tratamiento con RNasa -

45

Con el fin de confirmar que el ácido nucleico extraído era ARN, la muestra que se separó en (2) se sometió a tratamiento con RNasa. A la fase acuosa que contiene ARN separado en (2), se añadieron 1,5 volúmenes de etanol al 100%, y se dejó que el ácido nucleico se adsorbiera a la columna de la misma manera que en (3a). Después de lavar la columna con 350 µl de tampón RWT, se añadió RNasa diluida a la misma para realizar el tratamiento de

50 RNasa del ácido nucleico adsorbido en la columna, y la columna se lavó dos veces con 350 µl de tampón RWT y 500 µl de tampón RPE, seguido de secado de la columna. Posteriormente, la elución se llevó a cabo con 30 µl de agua libre de RNasa, para obtener una muestra de ARN purificada y concentrada.

50

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

55

Después de desnaturalización por calor de 1 µl de cada una de las muestras de ARN obtenidas en (3a) y (3b) a 70°C durante 2 minutos, se enfrió rápidamente cada muestra. A continuación las muestras se sometieron a electroforesis utilizando "Agilent RNA 6000 pico kit" fabricado por Agilent Technologies Inc. (número de modelo, 5.067-1.513). Los resultados se muestran en la figura 1. Además, mediante la función de análisis de mancha del

60 "Bioanalyzer 2100", se calculó el área del pico de 25 a 500 nt para confirmar el tamaño máximo y la cantidad (concentración) de ácido nucleico detectado.

60

En la muestra (3a) en la que el tratamiento enzimático no se llevó a cabo, se encontró sólo un único pico que tenía un tamaño de menos de 200 bases (carril 1). La cantidad de ácido nucleico calculado en este caso fue de 816 pg/µl. Por otro lado, en el patrón electroforético de la muestra tratada con RNasa (3b), no se detectó ningún pico (carril 2).

65

La cantidad de ácido nucleico calculado en este caso fue de 61 pg/μl. Con el fin de confirmar el ruido en el sistema de detección, se llevó a cabo la misma operación que en el ejemplo 1 utilizando PBS que no contiene ácido nucleico, en lugar de suero (carril 3, BLANCO). Dado que la cantidad de ácido nucleico calculado en este caso fue de 63 pg/μl, se consideró que la cantidad de ácido nucleico calculada para carril 2 era debida al ruido. De los resultados anteriores, se pudo confirmar que el ácido nucleico extraído era ARN que no contenía ADN. Dado que el ARN que tiene de 22 a 25 bases y el pico obtenido en el presente ejemplo mostraron distancias de migración similares en la electroforesis, se consideró que el ARN que se encontró en el carril 1 tenía de 22 a 25 bases.

Los resultados anteriores se resumen en la tabla 1.

<Ejemplo comparativo 1>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

Se preparó la solución descrita en el documento de patente 2 con la misma composición que en el ejemplo 1, excepto porque la concentración de fenol fue del 50% en volumen en términos de concentración final de la solución.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

Se llevó a cabo la operación de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica.

(3a) purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(3b) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - Con tratamiento con RNasa -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(3c) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa – Con tratamiento con DNasa -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en (3b) en el ejemplo 1 excepto porque la fase acuosa que contenía el ARN se trató con DNasa en lugar de RNasa en (3b), para obtener una muestra purificada y concentrada. Otras condiciones fueron las mismas que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la figura 2.

En la muestra en la que no se llevó a cabo el tratamiento enzimático, se detectaron dos picos intensos (correspondientes al número de bases de, aproximadamente, 200 y, aproximadamente, 500) y un pico débil (correspondiente al mismo número de bases que en el ejemplo 1) (carril 1). En la muestra tratada con RNasa, los picos de 200 bases y 500 bases apenas variaron y, por lo tanto, se descubrió que los dos picos no se debían a ARN (carril 2). Por otra parte, el pico débil único había desaparecido y, por lo tanto, se confirmó que este pico era debido a ARN como en el caso del ejemplo 1. En la muestra tratada con DNasa, los dos picos intensos habían desaparecido, y se detectaron fragmentos muy cortos debido a la degradación (carril 3). Por lo tanto, se descubrió que estos dos picos intensos eran debidos a la contaminación con fragmentos de ADN.

De este modo, cuando se utilizó la solución que contenía el 50% en volumen de fenol, se observó contaminación con ADN y no se pudo extraer ARN puro. Los resultados anteriores se resumen en la tabla 3.

<Ejemplo comparativo 2>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

Se preparó la misma solución que la solución de extracción que se describe en el documento de patente 1, excepto porque la concentración de fenol fue del 60% en volumen. Es decir, la solución contenía el 60% en volumen de fenol, tiocianato de guanidinio 2 M, acetato de sodio 0,1 M y el 0,2% en volumen de 2-mercaptoetanol en términos de concentraciones finales, y el pH de la solución fue de 4.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

5 (4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. El resultado se muestra en la figura 3.

10 Se observaron tres picos similares a los del ejemplo comparativo 1. Por lo tanto, se pudo confirmar la contaminación con fragmentos de ADN.

El resultado anterior se resume en la tabla 3.

<Ejemplo 2>

15

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

Se preparó una solución de manera que la composición de la solución fue la misma que en el ejemplo 1 excepto porque la concentración de fenol fue del 55% en volumen en términos de concentración final.

20

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica.

25 (3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

30 (3b) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - con tratamiento con RNasa -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

35 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la figura 4.

Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1 (carril 1) y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada. Dado que el pico en la muestra tratada con RNasa (carril 5; RNasa(+)) era tan débil como en el BLANCO, se pudo confirmar que el ácido nucleico extraído sólo contenía ARN.

40

Los resultados anteriores se resumen en la tabla 1.

<Ejemplo 3>

45 (1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

Se preparó una solución de manera que la composición de la solución fue la misma que en el ejemplo 1 excepto porque la concentración de fenol fue del 65% en volumen en términos de concentración final.

50 (2) Extracción de ARN de la muestra biológica

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica.

55 (3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

60 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. El resultado se muestra en el carril 2 en la figura 4.

Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1 y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada.

65 El resultado anterior se resume en la tabla 1.

<Ejemplo 4>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

5 Se preparó una solución de manera que la composición de la solución fue la misma que en el ejemplo 1 excepto porque la concentración de fenol fue del 53% en volumen en términos de concentración final.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

10 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

15 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

20 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. El resultado se muestra en el carril 3 de la figura 4.

Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1 y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada.

El resultado anterior se resume en la tabla 1.

25 <Ejemplo 5>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

30 Se preparó una solución que tenía la misma composición que en el ejemplo 1.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

35 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica, excepto porque se añadieron 240 µl de cloroformo en lugar de 60 µl de p-bromoanisol al homogeneizado.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

40 (4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. El resultado se muestra en el carril 4 en la figura 4.

45 Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1 y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada.

El resultado anterior se resume en la tabla 1.

50 <Ejemplo 6>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

Se preparó una solución que tenía la misma composición que en el ejemplo 1.

55 (2) Extracción de ARN de la muestra biológica

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica, excepto que se añadieron 100 µl de 4-bromoveratrol en lugar de 60 µl de p-bromoanisol al homogeneizado.

60 (3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

65

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. El resultado se muestra en el carril 1 en la figura. 5.

Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1 y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada.

El resultado anterior se resume en la tabla 1.

<Ejemplo 7>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

Se preparó una solución que tenía la misma composición que en el ejemplo 1.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica, excepto porque se añadieron 100 µl de 6-bromo-1,4-benzodioxano en lugar de 60 µl de p-bromoanisol al homogeneizado.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. El resultado se muestra en el carril 2 en la figura 5.

Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1 y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada.

El resultado anterior se resume en la tabla 1.

<Ejemplo 8>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

Se preparó una solución que tenía la misma composición que en el ejemplo 1.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica, excepto porque se añadieron 100 µl de 1-bromo-4-trifluorometoxibenceno en lugar de 60 µl de p-bromoanisol al homogeneizado.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. El resultado se muestra en el carril 3 de la figura 5.

Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1 y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada.

El resultado anterior se resume en la tabla 1.

<Ejemplo 9>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

Se preparó una solución que tenía la misma composición que en el ejemplo 1.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica, excepto porque se añadieron 100 µl de 1-bromo-2,4-dimetoxibenceno en lugar de 60 µl de p-bromoanisol al homogeneizado.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. El resultado se muestra en el carril 4 en la figura 5.

Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1 y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada.

El resultado anterior se resume en la tabla 1.

<Ejemplo 10>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

Se preparó una solución que tenía la misma composición que en el ejemplo 1.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica, excepto porque se añadieron 100 µl de 4-fluoroanisol en lugar de 60 µl de p-bromoanisol al homogeneizado.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. El resultado se muestra en el carril 5 en la figura 5.

Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1 y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada.

El resultado anterior se resume en la tabla 2.

<Ejemplo 11>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

Se preparó una solución que tenía la misma composición que en el ejemplo 1.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica, excepto porque se añadieron 100 µl de 4-bromotolueno en lugar de 60 µl de p-bromoanisol al homogeneizado.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. El resultado se muestra en el carril 6 en la figura 5.

Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1, y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada.

El resultado anterior se resume en la tabla 2.

<Ejemplo 12>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

5 Se preparó una solución que tenía la misma composición que en el ejemplo 1.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

10 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica, excepto porque se añadieron 100 µl de 4-bromobutirato de etilo en lugar de 60 µl de p-bromoanisol al homogeneizado.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

15 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

20 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. El resultado se muestra en el carril 7 en la figura 5.

Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1, y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada.

25 El resultado anterior se resume en la tabla 2.

<Ejemplo 13>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

30 Se preparó una solución mediante la adición de ácido clorhídrico a la solución preparada en el ejemplo 1 de manera que el pH de la solución se ajustó a 4,2.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

35 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

40 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

45 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. El resultado se muestra en el carril 1 en la figura. 6.

Se detectó también el mismo pico que en el ejemplo 1 en el caso en que el pH de la solución fue 4,2, y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada.

50 El resultado anterior se resume en la Tabla 2.

<Ejemplo comparativo 3>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

55 Se preparó una solución mediante la adición de ácido clorhídrico a la solución preparada en el ejemplo comparativo 1 de manera que el pH de la solución se ajustó a 3,6.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

60 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

65 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. El resultado se muestra en el carril 2 en la figura 6. Se observaron los mismos tres picos que en el ejemplo comparativo 1. Por esto, se pudo confirmar que, en los casos en los que se utiliza la solución que contiene el 50% en volumen de fenol, se produce también la contaminación con fragmentos de ADN a un pH de 3,6.

El resultado anterior se resume en la tabla 3.

<Ejemplo 14>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

Se preparó una solución que tenía la misma composición que en el ejemplo 1.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto porque se utilizaron células cultivadas (células HEK293) suspendidas en 300 µl de PBS como muestra biológica, en lugar de 300 µl de suero.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto porque se añadieron 1,25 volúmenes de etanol a la fase acuosa, en lugar de 1,5 volúmenes.

(3b) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - con tratamiento con RNasa –

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto porque se añadieron 1,25 volúmenes de etanol a la fase acuosa, en lugar de 1,5 volúmenes.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto porque se utilizó "ARN Agilent 6000 nano kit" (número de modelo, 5067-1511) (fabricado por Agilent Technologies Inc.) como el kit, en lugar de "Agilent ARN 6000 pico kit". Los resultados se muestran en la figura 7.

Se pudo confirmar que, en la muestra sin tratamiento enzimático en (3a), se extrajo casi sin degradación ARN ribosómico 18S y 28S (valor RIN: 2,3) (carril 1). La cantidad de ácido nucleico calculado en este caso fue 79 ng/µl. En el resultado obtenido con la muestra tratada con RNasa (3b), no se detectó en absoluto el mismo pico que en el ejemplo 1 (carril 2). La cantidad de ácido nucleico calculado en este caso fue 4 ng/l. Se investigó el ruido producido en el sistema de detección cuando ninguna muestra se sometió a electroforesis (carril 3) y, como resultado, la cantidad de ácido nucleico en este caso fue 2 ng/µl. De este modo, se consideró que la cantidad de ácido nucleico en el carril 2 era debida al ruido. Basándose en estos resultados, se confirmó que el ácido nucleico extraído era enteramente ARN.

Los resultados anteriores se resumen en la tabla 2.

<Ejemplo 15>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

Se mezclaron los componentes respectivos de la solución de manera que sus concentraciones finales fueron tal como se describe a continuación, para preparar una solución para la extracción de ARN. Es decir, se añadieron 60 µl adicionales de p-bromoanisol a 900 µl de la solución que tenía la misma composición que en el ejemplo 1, para preparar la solución.

- Fenol al 58% en volumen
- Glicerol al 5% en volumen
- Tiocianato de guanidinio 0,8 M de (mezclado como una solución acuosa)
- Tiocianato de amonio 0,4 M (mezclado como una solución acuosa)
- Tampón de acetato de sodio 0,1 M (mezclado como una solución acuosa), ajustado a pH 5.
- p-Bromoanisol al 6,6% en volumen de basado en la cantidad total (100%) de los componentes anteriores

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

Se homogeneizó la muestra mediante mezcla de 900 µl de la solución preparada en el punto (1) anterior y 300 µl de suero por agitación con vórtice. El homogeneizado resultante se centrifugó a temperatura ambiente a 12.000 x G durante 10 minutos. Por esto, se formó una fase acuosa que contenía el ARN, y una fase orgánica y una fase intermedia que contenían el ADN y las proteínas. De éstas, se separaron 350 µl de la fase acuosa en otro tubo.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(3b) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - con tratamiento con RNasa -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en los carriles 1, 3 y 5 en la figura 8.

Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1, y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada (carril 1). Dado que el pico en la muestra tratada con RNasa (carril 3; RNasa(+)) era tan débil como en el BLANCO (carril 5), se pudo confirmar que el ácido nucleico extraído sólo contenía ARN.

Los resultados anteriores se resumen en la tabla 2.

<Ejemplo 16>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

Se mezclaron los componentes respectivos de la solución de manera que sus concentraciones finales fueron tal como se describe a continuación, para preparar una solución para la extracción de ARN. Es decir, se añadieron 90 µl adicionales de cloroformo a 900 µl de la solución que tenía la misma composición que en el ejemplo 1, para preparar la solución.

- Fenol al 58% en volumen
- Glicerol al 5% en volumen
- Tiocianato de guanidinio 0,8 M de (mezclado como una solución acuosa)
- Tiocianato de amonio 0,4 M (mezclado como una solución acuosa)
- Tampón de acetato de sodio 0,1 M (mezclado como una solución acuosa), ajustado a pH 5.
- Cloroformo al 10% en volumen de sobre la base de la cantidad total (100%) de los componentes anteriores

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

Se homogeneizó la muestra mediante mezcla de 900 µl de la solución preparada en el punto (1) anterior y 300 µl de suero por agitación con vórtice. El homogeneizado resultante se centrifugó a temperatura ambiente a 12.000 x G durante 10 minutos. Por esto, se formó una fase acuosa que contenía el ARN, y una fase orgánica y una fase intermedia que contenían el ADN y las proteínas. De éstas, se separaron 350 µl de la fase acuosa en otro tubo.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(3b) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - con tratamiento con RNasa -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en los carriles 2, 4 y 5 en la figura 8.

Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1, y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada (carril 2). Dado que el pico en la muestra tratada con RNasa (carril 4; RNasa(+)) era tan débil como en el BLANCO (carril 5), se pudo confirmar que el ácido nucleico extraído sólo contenía ARN.

Los resultados anteriores se resumen en la tabla 2.

<Ejemplo comparativo 4>

- 5 (1) Preparación de la solución para la extracción de ARN
- Se preparó la solución que tenía la misma composición que en el ejemplo comparativo 3 excepto porque la concentración de fenol fue del 55% en volumen.
- 10 (2) Extracción de ARN de la muestra biológica
- La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica.
- 15 (3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -
- La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.
- (3b) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - con tratamiento con RNasa -
- 20 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.
- (4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis
- 25 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la figura 9.
- En la muestra sin tratamiento enzimático de (3a), se detectó un pico bastante más ancho en comparación con el pico del ejemplo 1 (carril 1) y la muestra tratada con RNasa (3b) también mostró un pico (carril 2). Dado que el pico obtenido con la muestra tratada con RNasa (RNasa(+)) fue también más ancho que el pico en BLANCO (carril 2), se pudo confirmar la contaminación con ácido nucleico distinto del ARN (ADN).
- 30

Los resultados anteriores se resumen en la tabla 3.

<Ejemplo 17>

- 35 (1) Preparación de la solución para la extracción de ARN
- Se preparó una solución que tenía la misma composición que en el ejemplo 1 en términos de concentraciones finales, excepto porque el pH se ajustó a 4.
- 40 (2) Extracción de ARN de la muestra biológica
- La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica.
- 45 (3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -
- La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.
- (3b) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - con tratamiento con RNasa -
- 50 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.
- (4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis
- 55 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la figura 10 (carriles 1, 2 y 5).
- Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1, y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada (carril 1). Dado que el pico en la muestra tratada con RNasa (carril 2; RNasa (+)) era tan débil como en el BLANCO (carril 5), se pudo confirmar que el ácido nucleico extraído sólo contenía ARN.
- 60

Los resultados anteriores se resumen en la tabla 2.

<Ejemplo 18>

(1) Preparación de la solución para la extracción de ARN

5 Se preparó una solución que tenía la misma composición que en el ejemplo 1 en términos de concentraciones finales, excepto porque el pH se ajustó a 6.

(2) Extracción de ARN de la muestra biológica

10 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1 utilizando suero como muestra biológica.

(3a) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - sin tratamiento enzimático -

15 La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

(3b) Purificación y concentración de ARN a partir de la fase acuosa - con tratamiento con RNasa -

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1.

20 (4) Evaluación de la pureza mediante electroforesis

La operación se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la figura 10 (carriles 3, 4 y 5).

25 Se detectó el mismo pico que en el ejemplo 1, y se pudo confirmar que sólo se extrajo ARN con pureza elevada (carril 3). Dado que el pico en la muestra tratada con RNasa (carril 4; RNasa(+)) era tan débil como en el BLANCO (carril 5), se pudo confirmar que el ácido nucleico extraído sólo contenía ARN.

30 Los resultados anteriores se resumen en la tabla 2.

Tabla 1

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo 6	Ejemplo 7	Ejemplo 8	Ejemplo 9
Composición de la solución									
Fenol (% en volumen)	58	55	65	53	58	58	58	58	58
Tiocianato de guanidinio (M)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Tiocianato de amonio (M)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Glicerol (% en volumen)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Acetato de sodio (M)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
2-Mercaptoetanol (% en volumen)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH de la solución	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Disolvente orgánico (añadido después)	Bromoanisol	Bromoanisol	Bromoanisol	Bromoanisol	Cloroformo	Bromoveratrol	Benzodioxano	Trifluorometoxibenceno	Dimetoxibenceno
Disolvente orgánico (contenido anteriormente)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muestra biológica	Suero	Suero	Suero	Suero	Suero	Suero	Suero	Suero	Suero
Cantidad de ácido nucleico extraído (pg/ul)									
Sin tratamiento enzimático	816	421							
Con tratamiento con RNasa	61	37							
Con tratamiento con DNasa	-	-							
Blanco	63	41							
Electroferograma	Figura 1	Figura 4	Fig. 4	Figura 4	Figura 4	Figura 5	Figura 5	Figura 5	Figura 5
Número de figura/ número de carril	Carril 1, 2	Carril 1, 5	Carril 2	Carril 3	Carril 4	Carril 1	Carril 2	Carril 3	Carril 4
Pureza del ARN extraído	buena	buena	buena	buena	buena	buena	buena	buena	buena

Tabla 2

	Ejemplo 10	Ejemplo 11	Ejemplo 12	Ejemplo 13	Ejemplo 14	Ejemplo 15	Ejemplo 16	Ejemplo 17	Ejemplo 18
Composición de la solución									
Fenol (% en volumen)	58	58	58	58	58	58	58	58	58
Tiocianato de guanidinio (M)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Tiocianato de amonio (M)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Glicerol (% en volumen)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Acetato de sodio (M)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
2-Mercaptoetanol (% en volumen)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH de la solución	5	5	5	4,2	5	5	5	4	6
Disolvente orgánico (añadido después)	Fluoroanisol	Bromotolueno	Bromobutirato de etilo	Bromoanisol	Bromoanisol	-	-	Bromoanisol	Bromoanisol
Disolvente orgánico (contenido anteriormente)	-	-	-	-	-	Bromoanisol	Cloroformo	-	-
Muestra biológica	Suero	Suero	Suero	Suero	Células cultivadas	Suero	Suero	Suero	Suero
Cantidad de ácido nucleico extraído (pg/ul)									
Sin tratamiento enzimático						274	209	193	174
Con tratamiento con RNasa						24	29	25	22
Con tratamiento con DNasa						-	-	-	-
Blanco						41	41	38	38
Electroferograma	Figura 5	Figura 5	Figura 5	Figura 6	Figura 7	Figura 8	Figura 8	Figura 10	Figura 10
Número de figura/ número de carril	Carril 5	Carril 6	Carril 7	Carril 1	Carril 1, 2	Carril 1, 3	Carril 2, 4	Carril 1, 2	Carril 3, 4
Pureza del ARN extraído	buena	buena	buena	buena	buena	buena	buena	buena	buena

Tabla 3

	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo comparativo 4
Composición de la solución				
Fenol (% en volumen)	50	60	50	55
Tiocianato de guanidinio (M)	0,8	2	0,8	0,8
Tiocianato de amonio (M)	0,4	-	0,4	0,4
Glicerol (% en volumen)	5	-	5	5
Acetato de sodio (M)	0,1	0,1	0,1	0,1
2-Mercaptoetanol (% en volumen)	-	0,2	-	-
pH de la solución	5	4	3,6	3,6
Disolvente orgánico (añadido después)	Bromoanisol	Bromoanisol	Bromoanisol	Bromoanisol
Disolvente orgánico (contenido anteriormente)	-	-	-	-
Muestra biológica	Suero	Suero	Suero	Suero
Cantidad de ácido nucleico extraído (pg/μl)				
Sin tratamiento enzimático	4796			302
Con tratamiento con RNasa	784			78
Con tratamiento con DNasa	499			-
Blanco	42			54
Electroferograma	Figura 2	Figura 3	Figura 6	Figura 9
Número de figura/ número de carril	Carril 1-3	Carril 1	Carril 2	Carril 1, 2
Pureza del ARN extraído	Insatisfactoria	Insatisfactoria	Insatisfactoria	Insatisfactoria

REIVINDICACIONES

1. Solución para la extracción de ARN de una muestra biológica que contiene ARN y, como mínimo, ADN, comprendiendo dicha solución:
- 5 (a) fenol en una cantidad de no menos del 53% en volumen basada en la cantidad total de dicha solución;
- (b) un poliol en una cantidad del 3 al 10% en volumen basada en la cantidad total de dicha solución;
- 10 (c) una sal de guanidinio a una concentración de 0,5 a 2,0 M basada en la cantidad total de dicha solución;
- (d) un tiocianato a una concentración de 0,1 a 0,5 M basada en la cantidad total de dicha solución, en la que en los casos en los que la solución comprenda tiocianato de guanidinio, la concentración de tiocianato de guanidinio está incluida en la concentración de la sal de guanidinio y no está incluida en la concentración de tiocianato; y
- 15 (e) un tampón para mantener el pH de dicha solución entre 4 y 6.
2. Solución, según la reivindicación 1, en la que la concentración de fenol es del 55 al 65% en volumen basada en la cantidad total de dicha solución.
- 20 3. Solución, según las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende además un disolvente orgánico para separar una fase acuosa.
4. Solución, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha muestra biológica es un líquido de cultivo de las células cultivadas.
- 25 5. Solución, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha muestra biológica es un componente de un fluido corporal de un organismo.
- 30 6. Solución, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha muestra biológica es un componente de la sangre de un organismo
7. Procedimiento para la extracción de ARN de una muestra biológica que contiene ARN y, como mínimo, ADN, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 35 homogeneizar dicha muestra biológica junto con una solución que comprende:
- (a) fenol en una cantidad de no menos del 53% en volumen basada en la cantidad total de la solución;
- 40 (b) un poliol en una cantidad del 3 al 10% en volumen basada en la cantidad total de la solución;
- (c) una sal de guanidinio a una concentración de 0,5 a 2,0 M basada en la cantidad total de la solución;
- 45 (d) un tiocianato a una concentración de 0,1 a 0,5 M basada en la cantidad total de la solución, en la que en los casos en los que la solución comprenda tiocianato de guanidinio, la concentración de tiocianato de guanidinio está incluida en la concentración de la sal de guanidinio y no está incluida en la concentración de tiocianato; y
- (e) un tampón para mantener el pH de la solución entre 4 y 6;
- 50 mezclar el homogeneizado obtenido con un disolvente orgánico para la separación de una fase acuosa;
- centrifugar la mezcla obtenida; y
- 55 recuperar una fase acuosa producida mediante la centrifugación, que contiene el ARN.
8. Procedimiento para la extracción de ARN de una muestra biológica que contiene ARN y, como mínimo, ADN, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 60 homogeneizar dicha muestra biológica junto con una solución que comprende:
- (a) fenol en una cantidad de no menos del 53% en volumen basada en la cantidad total de la solución;
- (b) un poliol en una cantidad del 3 al 10% en volumen basada en la cantidad total de la solución;
- 65 (c) una sal de guanidinio a una concentración de 0,5 a 2,0 M basada en la cantidad total de la solución;

(d) un tiocianato a una concentración de 0,1 a 0,5 M basada en la cantidad total de la solución, en la que en los casos en los que la solución comprenda tiocianato de guanidinio, la concentración de tiocianato de guanidinio está incluida en la concentración de la sal de guanidinio y no está incluida en la concentración de tiocianato; y

5 (e) un tampón para mantener el pH de la solución entre 4 y 6; y

(f) un disolvente orgánico para la separación de una fase acuosa;

centrifugar el homogeneizado obtenido; y

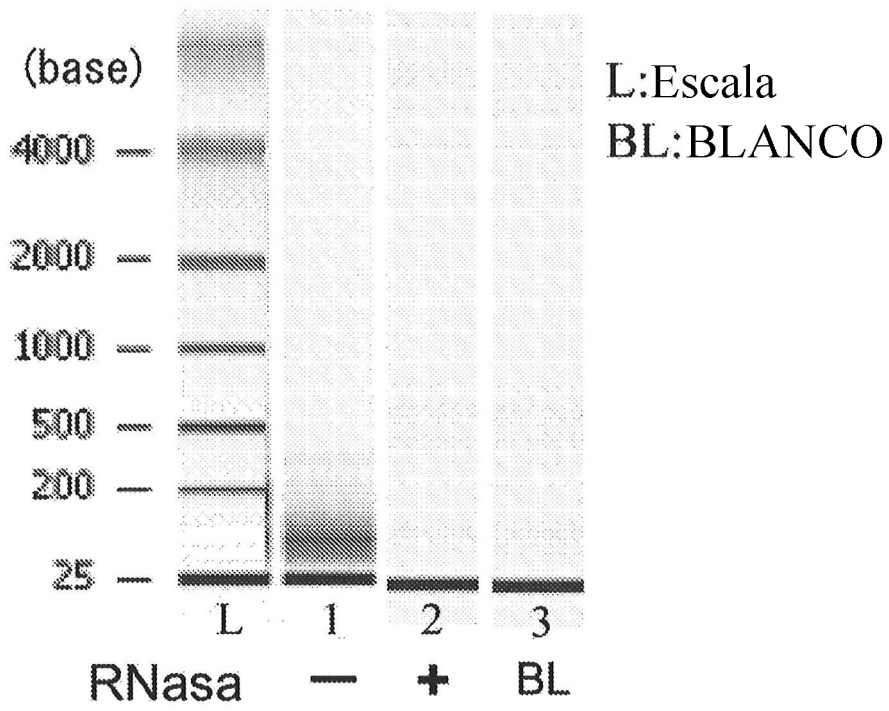
10

recuperar una fase acuosa producida mediante la centrifugación, que contiene el ARN.

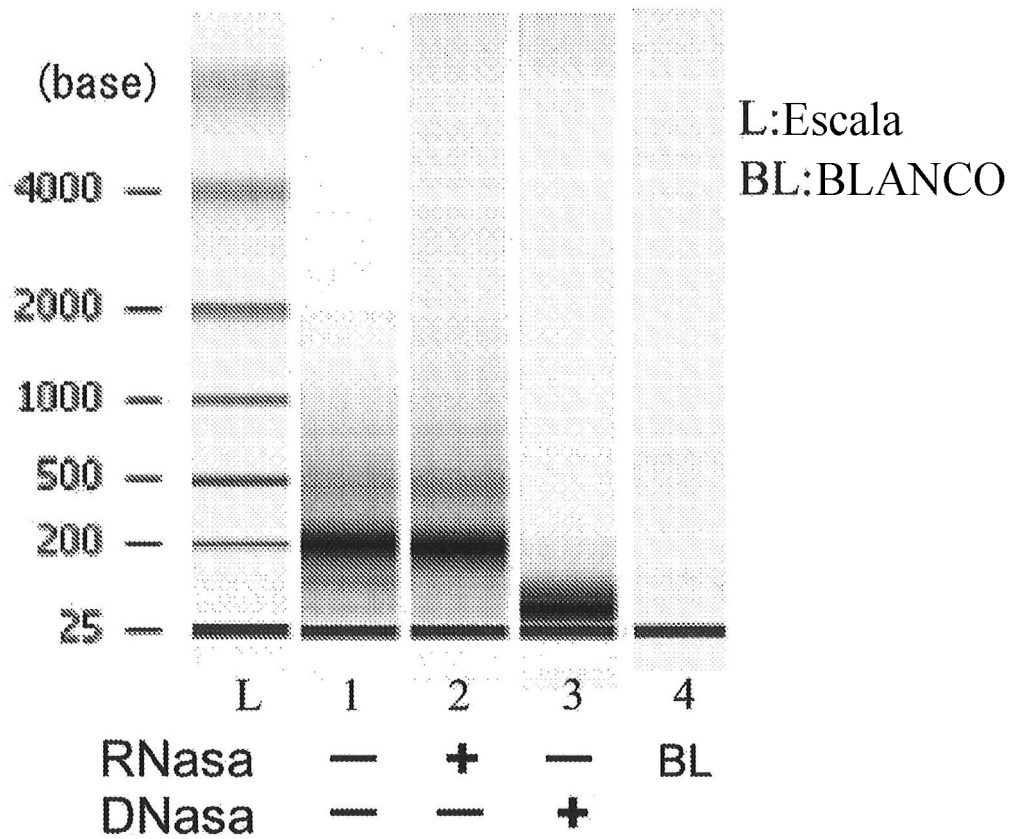
9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en el que la concentración de fenol es del 55 al 65% en volumen basada en la cantidad total de dicha solución de (a) a (e).

15

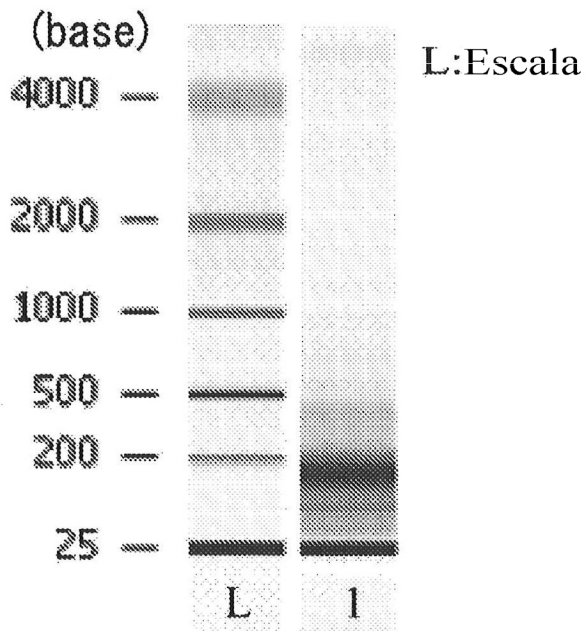
[Fig.1]



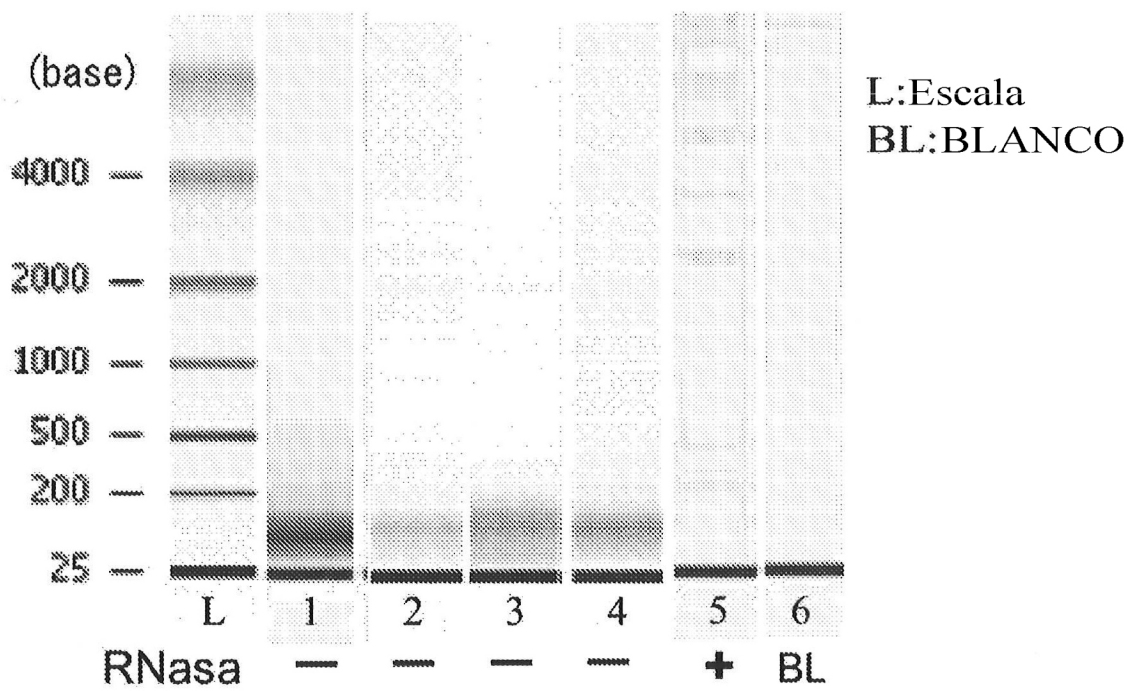
[Fig.2]



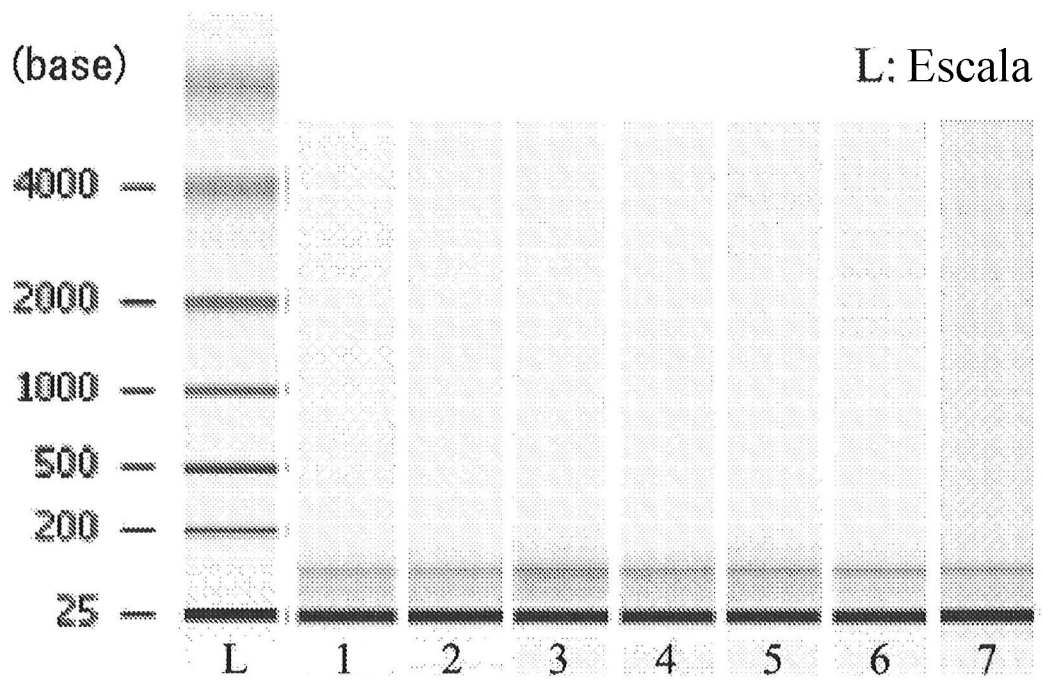
[Fig.3]



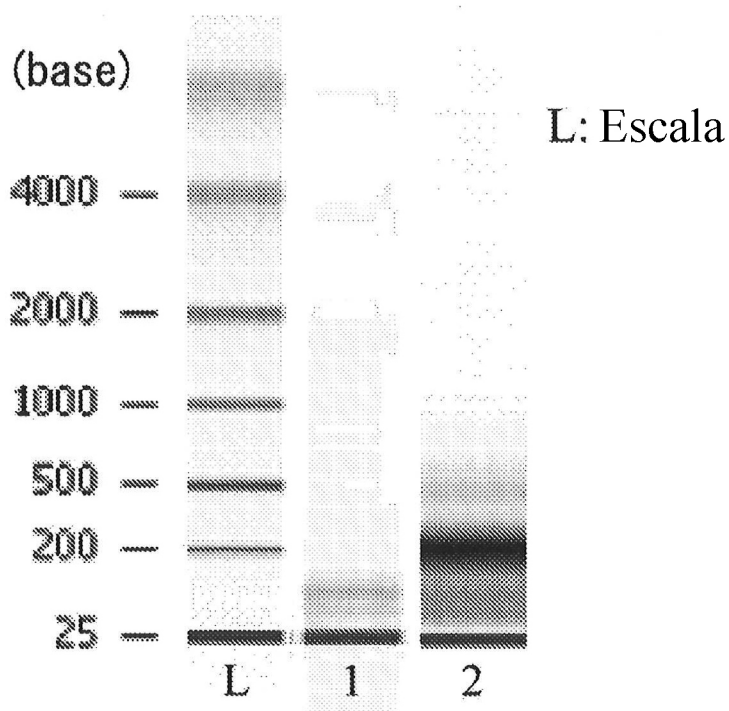
[Fig.4]



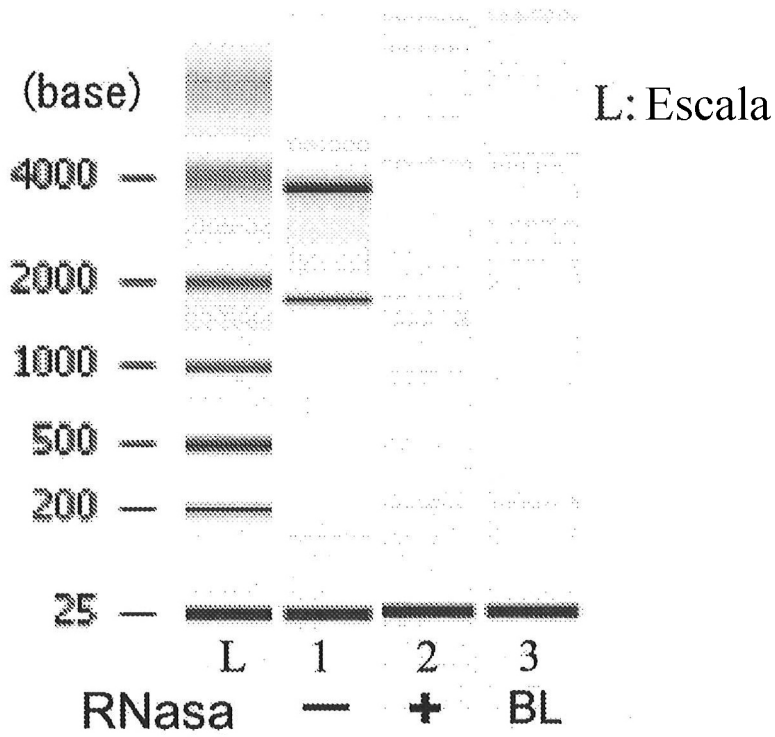
[Fig.5]



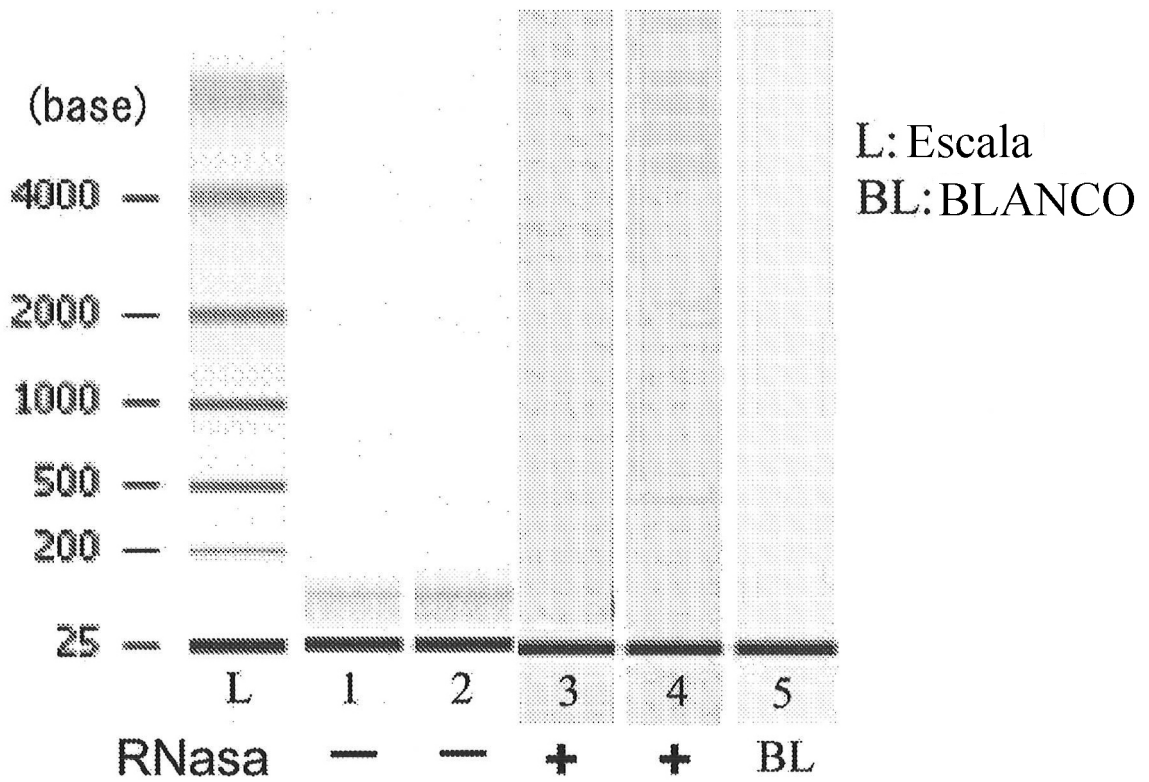
[Fig.6]



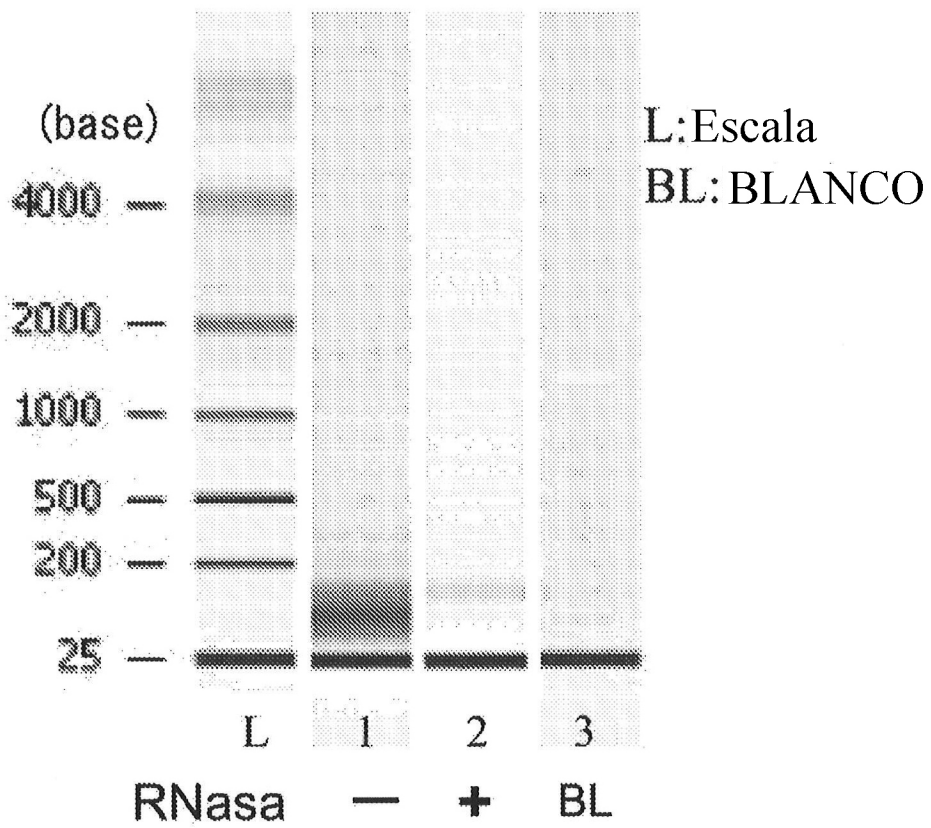
[Fig.7]



[Fig.8]



[Fig.9]



[Fig.10]

