

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 726**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2013 PCT/US2013/065821**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14099121**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2013 E 13865596 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2935583**

54 Título: **Formulaciones para la estabilización de ácidos nucleicos en sustratos sólidos**

30 Prioridad:

20.12.2012 US 201213721948

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

04.12.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BALES, BRIAN CHRISTOPHER;
KVAM, ERIK LEEMING y
DAVIS, JASON LOUIS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 692 726 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

Formulaciones para la estabilización de ácidos nucleicos en sustratos sólidos

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud de Patente de Estados Unidos número 13/721,948 presentada el 20 de Diciembre de 2012, que es una continuación, en parte, de la solicitud de Patente de Estados Unidos No. de serie 13/460,076, presentada el 30 de Abril de 2012, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

Investigación y desarrollo patrocinado federalmente

Esta invención se hizo con el apoyo del gobierno bajo el número de contrato (HR0011-11-C0127) otorgado por la Defense Advanced Research Projects Agency. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10 Campo de la invención

La presente descripción se refiere generalmente a sustratos sólidos secos y a métodos para su uso para la extracción, estabilización, y conservación a temperatura ambiente de ácidos nucleicos, particularmente RNA, a partir de una muestra biológica en un formato seco. También se describen métodos para la extracción, recogida, conservación, y recuperación de ácidos nucleicos a partir de sustratos sólidos secos.

15 Antecedentes

20 El RNA es una de las biomoléculas más difíciles de estabilizar como consecuencia tanto de la auto hidrólisis química como de la degradación mediada por enzimas. Por consiguiente, la extracción y conservación del RNA derivado de una muestra biológica es sensible a una serie de factores medioambientales que incluyen pero no se limitan a, el tampón utilizado para extraer o recoger el RNA, pH, temperatura, y particularmente la presencia ubicua de ribonucleasas robustas (RNAsas). Como resultado, el RNA en estados tanto purificados como no purificados ha requerido típicamente almacenamiento a -80°C para prevenir la hidrólisis y degradación enzimática y conservar la integridad de la muestra de RNA. La capacidad para extraer, recoger, y conservar el RNA bajo condiciones ambientales es económicamente deseable para evitar los costos y los requisitos de espacio asociados con la refrigeración o la congelación de las muestras a -80°C.

25 Las metodologías actuales para conservar el RNA bajo condiciones ambientales en estado líquido se han centrado en la desactivación de las RNAsas mediante el uso de, por ejemplo, detergentes, compuestos caotrópicos, agentes reductores, metales de transición, disolventes orgánicos, agentes quelantes, proteasas, inhibidores de péptido RNasa, y anticuerpos anti-RNasa. Esfuerzos adicionales se han centrado en modificar el RNA químicamente para evitar la transesterificación y la auto hidrólisis. La mayoría de los productos de conservación del RNA disponibles comercialmente solo pueden conservar el RNA en estado líquido durante días o semanas a temperatura ambiente. 30 Las tecnologías actuales que reivindican la recogida y conservación exitosa del RNA en un formato seco requieren típicamente que el RNA primero se "prepurifique" y se concentre a partir del material biológico (por ejemplo, muestras biológicas tales como sangre, suero, tejido, saliva, etc.) antes del almacenamiento del RNA.

35 Las tecnologías actuales para la conservación del RNA en un formato seco requieren instalaciones de secado adicionales. Estos métodos no son, por lo tanto, propicios para la recogida directa de RNA de una muestra (por ejemplo, una muestra biológica) sin un tratamiento significativo de la muestra.

40 Por consiguiente, las composiciones y métodos que integran la extracción, estabilización, y almacenamiento/conservación de RNA de una muestra (por ejemplo, una muestra biológica) dentro de un proceso único son deseables y necesarios en la técnica. Tales composiciones y métodos permitirían el almacenamiento a largo plazo de RNA en condiciones ambientales y permitirían recuperar el RNA intacto para un análisis posterior.

Breve descripción

45 Se describe una matriz sólida seca para la extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos de una muestra, tal como una muestra biológica como se define aquí a continuación, en donde una composición que comprende un desnaturizante de proteínas, un agente reductor, un tampón, y opcionalmente una trampa de radicales libres o un inhibidor de RNasa está presente en la matriz sólida en un formato seco. En una realización, las matrices sólidas secas de la presente solicitud permiten el almacenamiento prolongado de una muestra biológica que comprende ácidos nucleicos (por ejemplo, RNA, DNA) en un formato seco bajo condiciones ambientales. La matriz sólida seca de la invención comprende al menos una sal de tiocianato metálico que comprende un catión metálico del Grupo 1 o Grupo 2, un agente reductor, un tampón, y opcionalmente una trampa de radicales libres o un inhibidor de RNasa.

50 Los ácidos nucleicos (por ejemplo, RNA, DNA) almacenados en un estado ambiental en matrices sólidas secas se pueden someter a un proceso para liberar los ácidos nucleicos de la matriz sólida en un formato intacto que es adecuado para un análisis posterior de las muestras de ácido nucleico recogidas. También se proporcionan métodos para usar las matrices sólidas de la invención para extraer y almacenar ácidos nucleicos de una muestra biológica.

Dibujos

Estas y otras características, aspectos, y ventajas de las membranas porosas modificadas químicamente se entenderán mejor cuando se lea la siguiente descripción detallada con referencia a los dibujos adjuntos en los que caracteres similares representan partes similares en todos los dibujos, en lo que:

5 La Fig. 1 proporciona un electroforetograma representativo de ácidos nucleicos recuperados de celulosa mediante electroelución después de detectar células humanas cultivadas en matrices sólidas de diferentes composiciones. Se indican DNA genómico de alto peso molecular y bandas de rRNA 28s/18s. Se proporciona adicionalmente la cuantificación de DNA y RNA utilizando Imagne J. Se trazó una línea vertical desde la parte superior de cada carril de gel hasta la inferior en el panel A, y la intensidad de pixel (unidades arbitrarias de valores de gris) se trazó en función de la distancia de línea (cm) utilizando la función Plot Profile. Los picos correspondientes al DNA genómico y rRNA 28s/18s se muestran en los recuadros. Se detallan detalles experimentales adicionales a continuación en la sección de Ejemplos.

15 La Fig. 2 proporciona las intensidades de píxeles de gel, presentadas como unidades arbitrarias de valores de gris, para rRNA 28s y 18s para cada una de las composiciones representadas. Las muestras de celulosa se almacenaron durante 10 días a temperatura ambiente en una cámara de desecación antes del análisis. La relación de rRNA 28s a 18s se establece por encima de cada barra en el gráfico. Se detallan detalles experimentales adicionales a continuación en la sección de Ejemplos.

20 La Fig. 3 proporciona las intensidades de píxeles de gel para rRNA 28s y 18s para cada una de las composiciones representadas. Los sustratos de celulosa se almacenaron durante 13 días a temperatura ambiente en una cámara de desecación antes del análisis. La relación de rRNA 28s a 18s para cada una de las condiciones experimentales aparece sobre cada barra en el gráfico. Se detallan detalles experimentales adicionales a continuación en la sección de Ejemplos.

25 La Fig. 4 proporciona las intensidades de píxeles de gel para rRNA 28s y 18s para cada una de las composiciones representadas. Las muestras de celulosa se almacenaron durante 10 días a temperatura ambiente en una cámara de desecación antes del análisis. La relación de rRNA 28s a 18s para cada una de las condiciones experimentales aparece sobre cada barra en el gráfico. Se detallan detalles experimentales adicionales a continuación en la sección de Ejemplos.

30 La Fig. 5 proporciona las intensidades de píxeles de gel para las bandas de rRNA 28s y 18s para cada una de las composiciones mostradas. Las muestras de celulosa se almacenaron durante 30 días a temperatura ambiente en una cámara de desecación antes del análisis. La relación de rRNA 28s a 18s para cada una de las condiciones experimentales aparece sobre cada barra en el gráfico. Se detallan detalles experimentales adicionales a continuación en la sección de Ejemplos.

35 La Fig. 6 proporciona los números de integridad de RNA (RIN) medidos a partir de manchas de sangre secas en sustratos de celulosa, como se determina en un bioanalizador Agilent 2100 utilizando RNA 6000 Pico LabChips, para cada una de las condiciones listadas. Se detallan detalles experimentales adicionales a continuación en la sección de Ejemplos.

40 La Fig. 7 proporciona la evidencia para la protección de mRNA frente al daño solar en sustratos de celulosa. Cada barra en el gráfico representa la diferencia en los umbrales del ciclo de qRT-PCR entre las muestras tratadas con UV y las muestras no tratadas que comprenden las composiciones indicadas en la figura. Se detallan detalles experimentales adicionales a continuación en la sección de Ejemplos.

La Fig. 8 proporciona la actividad TCEP en papeles basados en celulosa en presencia de diferentes tampones y a diferentes temperaturas durante un periodo de tiempo de 4 semanas. Se detallan detalles experimentales adicionales a continuación en la sección de Ejemplos.

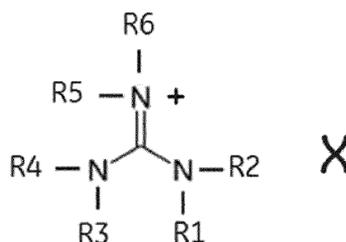
45 La Fig. 9 proporciona los números de integridad de RNA (RIN) para células humanas cultivadas que se encuentran sobre sustratos de celulosa impregnados químicamente. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente durante al menos una semana antes del análisis de RNA en un bioanalizador Agilent 2100. Se detallan detalles experimentales adicionales a continuación en la sección de Ejemplos.

50 La Fig. 10 proporciona los números de integridad de RNA (RIN) para manchas de sangre secas en sustratos de celulosa impregnados químicamente. Las manchas de sangre secas se almacenaron a temperatura ambiente durante 19 días antes del análisis de RNA en un bioanalizador Agilent 2100. Se detallan detalles experimentales adicionales a continuación en la sección de Ejemplos.

Descripción detallada

55 Se describen aquí matrices sólidas secas para la extracción y almacenamiento a temperatura ambiente de ácidos nucleicos (por ejemplo, RNA, DNA, o una combinación de los mismos) de una muestra (por ejemplo, una muestra biológica), en la que una composición que comprende un desnaturalizante de proteínas, un agente reductor, un

- tampón, y opcionalmente una trampa de radicales libres o un inhibidor de RNasa se incorpora en la matriz sólida en un estado seco. Los sustratos sólidos para extracción y almacenamiento en seco de ácidos nucleicos (por ejemplo, RNA, DNA, o una combinación de los mismos) bajo condiciones ambientales comprenden al menos una sal de tiocianato que comprende un catión metálico del Grupo 1 o Grupo 2, un agente reductor, un tampón, y
- 5 opcionalmente una trampa de radicales libres o un inhibidor de RNasa presentes en la matriz sólida en un formato seco. La "incorporación" de las composiciones descritas anteriormente incluye pero no se limita al procedimiento de "inmersión" que se describe a continuación. Un experto en la técnica apreciará que existen muchos de tales métodos para lograr la incorporación de la composición en la matriz sólida seca. Después de la incorporación de la composición en la matriz sólida seca, la matriz sólida se seca de acuerdo con un método apropiado.
- 10 Las composiciones de la invención permiten la conservación seca prolongada de ácidos nucleicos de una muestra bajo condiciones de almacenamiento ambientales. Esta observación es de particular importancia con respecto al RNA, que es ampliamente conocido por ser inestable bajo condiciones ambientales. El término "matriz sólida" como se utiliza aquí incluye productos basados en celulosa, celulosa, acetato de celulosa, fibras de vidrio, o cualquier combinación de las mismas. Una matriz sólida de la presente solicitud es porosa. En realizaciones particulares, la
- 15 matriz sólida es un papel de celulosa poroso de Whatman™, tal como 903, 31-ETF, FTA™ o FTA™ Elute. Los términos membrana, papel, papel de celulosa, matriz sólida, y sustrato se pueden utilizar indistintamente a lo largo de esta descripción. Un experto en la técnica reconocería inmediatamente que estos se utilizan en la técnica para referirse al mismo tipo de composición.
- 20 El término "extracción" se refiere a cualquier método para separar y aislar los ácidos nucleicos de una muestra, más particularmente una muestra biológica. Los ácidos nucleicos tales como RNA y DNA se pueden liberar, por ejemplo, durante la lisis de células de muestras evaporativas en el aire o por la presencia de compuestos en una matriz sólida modificada químicamente que al ponerse en contacto con las muestras da como resultado la lisis celular y la liberación de los ácidos nucleicos (por ejemplo, papeles de celulosa FTA™ Elute). Un experto en la técnica apreciará que cualquier método que de como resultado la extracción de ácidos nucleicos, particularmente RNA, de una
- 25 muestra (por ejemplo, una muestra biológica no purificada) de modo que los ácidos nucleicos puedan capturarse en la matriz sólida para su estabilización, y conservación de los ácidos nucleicos se pueden utilizar en las composiciones y métodos descritos. Los ejemplos anteriores de métodos para la extracción de ácidos nucleicos de una muestra se proporcionan solo con fines ilustrativos. Los términos "almacenamiento" o "conservación" se pueden utilizar indistintamente aquí con respecto al mantenimiento de los ácidos nucleicos extraídos en un formato
- 30 adecuado para un análisis posterior.
- Los expertos en la técnica en el campo de los ácidos nucleicos, particularmente RNA, evalúan tradicionalmente la estabilidad y calidad del RNA en base a: (1) la amplificación RT-PCR cuantitativa de las dianas de mRNA; (2) el análisis de los números de integridad del RNA (RIN) en un bioanalizador Agilent 2100; y (3) la relación de RNA ribosomal (rRNA) 28s:18s, que comprende la mayor parte del RNA celular total. El RNA celular de alta calidad
- 35 muestra generalmente una relación de rRNA 28s:18s mayor que 1 y un valor de RIN cercano a 10. En la práctica, un valor de RIN deseable es generalmente mayor que 5. Además, el RNA celular de alta calidad admite una amplificación eficiente de mRNAs tanto de baja como de gran abundancia (por ejemplo, mayor que 1 kB). Para fines de conveniencia, la intensidad de señal del rRNA y la relación de rRNA 28s:18s se utilizan frecuentemente para seleccionar e identificar rápidamente muestras con propiedades robustas de almacenamiento de RNA mediante electroforesis en gel.
- 40 Como se define aquí, una "muestra biológica" incluye pero no se limita a sangre, suero, tejidos, mucosa nasal, y saliva obtenida de cualquier organismo, incluyendo un ser humano. Las muestras biológicas se pueden obtener de un individuo sometido a una prueba de autodiagnóstico (por ejemplo, monitorización de glucosa en sangre) o por un profesional médico entrenado a través de una variedad de técnicas que incluyen, por ejemplo, aspirar sangre
- 45 utilizando una aguja o raspar o frotar un área particular, como una lesión en la piel de un paciente. Los métodos para recoger diversas muestras biológicas son bien conocidos en la técnica. El término "muestra" incluye muestras biológicas como se definió anteriormente, pero también incluye, por ejemplo, células cultivadas de tejido y ácidos nucleicos purificados.
- 50 Una composición que comprende un desnaturizante de proteínas, un agente reductor, y un tampón está presente en la matriz sólida seca de esta descripción. La composición puede comprender además opcionalmente un inhibidor de ultravioleta (UV), una trampa de radicales libres, un inhibidor de RNasa, un quelante, o cualquier combinación de los mismos. Numerosos desnaturizantes de proteínas son conocidos en la técnica incluyendo tiocianato de guanidina, clorhidrato de guanidina, arginina, dodecil sulfato de sodio (SDS), urea, o cualquier combinación de los mismos. A continuación se expone un esquema de un ejemplo de desnaturizante de proteínas:



en donde R puede ser independientemente un miembro seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, un heteroátomo que contiene un radical o un radical hidrocarbonado.

- 5 El heteroátomo que contiene un radical es un grupo que comprende un miembro o miembros seleccionados de nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, silicio, y boro. Es un objetivo unir un compuesto que contiene guanidina utilizando grupos funcionales reactivos. Los grupos reactivos típicos que llevan heteroátomos incluyen epoxi, acrilato, maleimida, haluro de acilo, haluro de alquilo, azida, éster de cianato, isocianato, haluro de arilo, aldehído, amina, oxima, tiol, alcohol, ácido, aziridina, azo, isotiocianato, anhídrido, anhídrido mixto, lactona, sulfona, y cetona.
- 10 El radical hidrocarbonado es un grupo que comprende tanto carbono como hidrógeno, aunque también puede contener heteroátomos para mejorar la hidrofiliidad. Es un objetivo unir un compuesto que contiene guanidina utilizando grupos funcionales reactivos. Grupos reactivos típicos que llevan hidrocarburos incluyen alilo, estirilo, vinilo, y alquino. Heteroátomos que contienen grupos hidrocarbonados incluyen 2, 3 o 4-oxiestirilo, aminoalilo, oxialilo, oxivinilo, aminovinilo.
- 15 X es un anión, que es un radical que contiene una o más carga(s) formales negativas. Un miembro o miembros seleccionados del grupo que consiste en cloruro, tiocianato, sulfato, fosfato, bromuro, clorito, clorato, tiosulfato, carbonato, hidrógeno carbonato, acetato, formiato, hidrógeno fosfato, dihidrógeno fosfato. Se pueden utilizar uno o más aniones y se pueden utilizar combinaciones de aniones que tengan diversos niveles de carga formal (divalentes, monovalentes, trivalentes). El peso molecular del anión puede variar de 10 a 100.000.
- 20 El término "agente reductor" se refiere a una especie química que proporciona electrones a otra especie química. De nuevo, se conocen en la técnica una variedad de agentes reductores incluyendo ditiotreitól (DTT), 2-mercaptoetanol (2-ME), y tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y sus sales relacionadas (por ejemplo, clorhidrato de TCEP). El agente reductor de la presente invención es TCEP. En realizaciones particulares, la TCEP se puede añadir como su sal de clorhidrato, TCEP-HCl.
- 25 Un "tampón" como se utiliza aquí incluye, por ejemplo, 2-amino-2-hidroxi metilpropan-1,3-diol (Tris), ácido 2-(*N*-morfolin) etano sulfónico (MES), ácido 3-(*N*-morfolin) propano sulfónico (MOPS), tampones de citrato, ácido 4-(2-hidroxi etil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), y tampones fosfato. Esta lista de posibles tampones es solo con fines ilustrativos. Los expertos en la técnica reconocerían que el pH del tampón seleccionado para su uso en las composiciones y métodos descritos aquí es relevante. El pH del tampón estaría típicamente en el intervalo de 3 a 8.
- 30 Como se indicó anteriormente, la composición presente en la matriz sólida puede comprender opcionalmente un protector de UV o una trampa de radicales libres. En ciertos aspectos de la invención, se requiere un protector de UV o una trampa de radicales libres en la composición del incorporado en la matriz sólida seca para la extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos. Sin pretender limitarse a ningún protector de UV específico, los ejemplos de agentes incluyen, por ejemplo, hidroquinona monometil éter (MEHQ), hidroquinona (HQ), toluhidroquinona (THQ), y ácido ascórbico o vitamina C. En ciertos aspectos, la trampa de radicales libres es MEHQ o THQ. Los términos "protector de UV" y "trampa de radicales libres" se pueden utilizar aquí indistintamente con respecto al
- 35 mantenimiento de los ácidos nucleicos extraídos en un estado no modificado para un análisis posterior. La composición en la matriz sólida puede incluir también inhibidores de RNasa tales como complejo vanadil ribonucleósido (VRC) o uno cualquiera de los inhibidores de RNasa disponibles comercialmente (por ejemplo, SUPERasa-In™). Ejemplos de inhibidores de RNasa adicionales se describen en Kumar y colaboradores, (2003)
- 40 Biochemical and Biophysical Research Communications 300:81-86.
- Se proporcionan además métodos para utilizar las composiciones descritas aquí anteriormente. En una realización, un método para extraer y conservar los ácidos nucleicos (por ejemplo, RNA, DNA, o una combinación de los mismos) comprende las etapas de: a) proporcionar la matriz sólida de la invención; b) aplicar una muestra (por ejemplo, una muestra biológica) a la matriz sólida para extraer los ácidos nucleicos; c) secar la matriz sólida; y d)
- 45 almacenar los ácidos nucleicos en la matriz sólida en un estado seco bajo condiciones ambientales. En ciertos aspectos del método, la matriz sólida es un papel poroso basado en celulosa tal como el 903, 31-ETF, o FTA Elute™ disponibles comercialmente. La realización de este método permite el almacenamiento de ácidos nucleicos, particularmente RNA que es ampliamente conocido por ser una biomolécula inestable para almacenar, en un formato seco (por ejemplo, en una matriz sólida) bajo temperatura ambiente. Las muestras utilizadas en este método

incluyen pero no se limitan a muestras biológicas tales como sangre, suero, tejidos, mucosa nasal, y saliva obtenidas de cualquier organismo, incluyendo un ser humano.

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

10 En ciertos aspectos, la sal de tiocianato metálico incluye pero no se limita a tiocianato de sodio, tiocianato de potasio, tiocianato de magnesio, tiocianato de calcio, tiocianato de bario, y tiocianato de zinc.

15 En ciertos aspectos del método, la matriz sólida es un papel poroso basado en celulosa tal como 903, 31-ETF, o FTA Elute™ disponibles comercialmente. La realización de este método permite el almacenamiento de los ácidos nucleicos, particularmente RNA que es ampliamente conocido por ser una biomolécula inestable para almacenar, en un formato seco (por ejemplo, en una matriz sólida) bajo temperatura ambiente. Las muestras utilizadas en este método incluyen pero no se limitan a muestras biológicas tales como sangre, suero, tejidos, mucosa nasal, y saliva obtenidas de cualquier organismo, incluyendo un ser humano.

20 El término “ácido nucleico” se refiere a todas las formas de RNA (por ejemplo, mRNA, miRNA, rRNA, tRNA, piRNA, ncRNA), DNA (por ejemplo, DNA genómico, mtDNA), así como moléculas de RNA y DNA recombinantes o análogos de DNA o RNA generados utilizando análogos de nucleótidos. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser monocatenarias o bicatenarias. Las cadenas pueden incluir la cadena codificante o no codificante. Los fragmentos de ácidos nucleicos de moléculas de RNA y DNA naturales se abarcan en la presente invención y se pueden recuperar utilizando las composiciones y métodos descritos. Un “fragmento” se refiere a una porción del ácido nucleico (por ejemplo, RNA o DNA).

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no como limitación:

25 Ejemplos

Ejemplo 1: Análisis de RNA general

30 Una línea celular de linfocitos humanos cultivados (es decir, células Jurkat) se utilizó como fuente de RNA celular total. Las células se secaron en discos de celulosa de 7 mm impregnados con los reactivos indicados, se almacenaron a temperatura ambiente durante 10 días en una cámara de desecación, y los ácidos nucleicos celulares se electroeluyeron de acuerdo con los protocolos estándar. Brevemente, los discos se rehidrataron con 15 µL de proteinasa K 2 mg/mL en agua libre de nucleasas para eliminar el exceso de proteína y se secaron durante ~30 min. Los pinchazos se colocaron en pocillos individuales de un gel de agarosa Tris-borato-EDTA (TBE) al 1% y se suspendieron en 1X Gel Loading Buffer II que contiene formamida (Ambion). Los ácidos nucleicos celulares se sometieron a electroforesis a 110 voltios durante 1-2 horas, y el RNA y DNA se tiñeron posteriormente con SYBR Gold (Invitrogen) y se detectaron utilizando un Typhoon Imager (GE Healthcare). Todos los equipos y superficies se trataron con RNAZap (Ambion) para conservar la integridad del RNA celular durante y después de la electroelución de la celulosa. Estándares internos, incluyendo RNA 6000 Nano Ladder (Agilent Technologies) y RNA total humano purificado de músculo (Origene) se incluyeron en geles de agarosa tanto para controlar la contaminación de RNasa como identificar las bandas de rRNA de control.

40 Los electroforetogramas se cuantificaron digitalmente utilizando el software Image J. Brevemente, se dibujó una línea vertical desde la parte superior a la inferior de cada carril de gel, y se trazó la intensidad de píxeles (en unidades arbitrarias de valor de gris) como función de la distancia de línea (cm) utilizando la función Plot Profile. Los picos correspondientes al DNA genómico y rRNA 28s/18s se identificaron y utilizaron para calcular la relación de rRNA 28s/18s.

45 La Fig. 1 proporciona un electroforetograma representativo de los ácidos nucleicos recuperados de la celulosa utilizando electroelución. Se indican las bandas del DNA genómico de alto peso molecular y de rRNA 28s/18s.

50 La Fig. 1 proporciona además la cuantificación de DNA y RNA utilizando Image J. Se dibujó una línea vertical desde la parte superior de cada carril a la inferior en el panel A, y se trazó la intensidad de píxeles (en unidades arbitrarias de valor de gris) como función de la distancia de línea (cm) utilizando la función Plot Profile. Los picos correspondientes al DNA genómico y rRNA 28s/18s se “encuadraron”.

Ejemplo 2: Determinación empírica de las condiciones favorables para la extracción y almacenamiento del RNA

La finalidad principal de este ejemplo fue evaluar el efecto de cada factor individual y el efecto de la combinación de los factores ensayados (por ejemplo, agente quelante, tampón, pH, desnaturizante de proteínas, agente reductor, e inhibidor de la RNasa peptídica) en la conservación del RNA en el papel de celulosa. Un aspecto adicional de este

ejemplo fue evaluar la presencia de un agente reductor (DTT) para mejorar potencialmente el efecto del desnaturizante de la proteína.

Las células Jurkat se utilizaron otra vez como la fuente del RNA celular total, y las células se aplicaron directamente sobre las muestras de papel de celulosa y se secaron al aire para imitar una aplicación típica de usuario final. El RNA celular total se recuperó por electroelución, siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el Ejemplo 1, en un gel de agarosa al 1% y se analizaron para el contenido en rRNA 28s/18s basándose en estándares conocidos. Las muestras que contenían los componentes listados debajo cada barra en el gráfico de la Fig. 2 se almacenaron durante 10 días a temperatura ambiente en una cámara de desecación antes del análisis.

Los resultados del Ejemplo 2 se exponen en la Fig. 2. Los números sobre cada barra corresponden a la relación de rRNA 28s a 18s. Una relación 28s:18s > 1 indica generalmente un RNA intacto. Varias composiciones no lograron estabilizar el rRNA, incluyendo las muestras que carecen del agente reductor (DTT) o SUPERasa-In para inactivar RNasa, o muestras que poseen un pH alcalino. Las muestras que contienen GITC, DTT, y tampón neutro superaron a todas las demás combinaciones de reactivos ensayados.

Ejemplo 3: Determinación empírica continuada de condiciones favorables para la extracción y almacenamiento de RNA

Después de que los componentes clave para conservar el RNA se identificaran en el Ejemplo 2, el Ejemplo 3 se diseñó para investigar el efecto de DTT y SDS solos o en combinación sobre la capacidad para conservar el RNA, y el efecto de una trampa de radicales libres y un agente quelante en el rendimiento de combinaciones de GITC/DTT que mostraban propiedades de estabilización del RNA favorables en el Ejemplo 2.

Las células Jurkat se aplicaron directamente sobre muestras de papel de celulosa y se secaron al aire para imitar una aplicación típica de usuario final. El RNA celular total se recuperó por electroelución, siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el Ejemplo 1, en un gel de agarosa al 1% y se analizaron para el contenido de rRNA 28s:18s basándose en estándares conocidos.

Las muestras de celulosa se almacenaron durante 13 días a temperatura ambiente en una cámara de desecación antes del análisis. Los números sobre cada barra corresponden a la relación de rRNA 28s a 18s. Una relación 28s:18s > 1 indica generalmente un RNA intacto. Los resultados del Ejemplo 3 se proporcionan en la Fig. 3. Las combinaciones GITC/DTT muestran generalmente mejores propiedades de estabilización del RNA que las combinaciones SDS/DTT. La suplementación de cualquier combinación con un agente quelante (EDTA) dio como resultado una calidad del RNA comparativamente más baja.

Ejemplo 4: Determinación empírica continuada de condiciones favorables para la extracción y almacenamiento de RNA

Después de que se identificaron los componentes clave adicionales para el almacenamiento de RNA en el Ejemplo 3, el Ejemplo 4 se diseñó para investigar si un agente reductor alternativo (TCEP), que tiene una estabilidad mejor y mucho menos olor, podría ser sustituido por DTT. Otro factor introducido en este ejemplo fue el complejo vanadil ribonucleósido (VRC), un inhibidor de RNasa de molécula pequeña. Estas sustituciones se compararon y evaluaron para determinar la capacidad de estabilizar el rRNA.

Las células Jurkat se aplicaron directamente sobre muestras de papel de celulosa y se secaron al aire para imitar una aplicación típica de usuario final. El RNA celular total se recuperó por electroelución, siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el Ejemplo 1, en un gel de agarosa al 1% y se analizaron para determinar el contenido de rRNA 28s:18s basándose en estándares conocidos. Las muestras de celulosa se almacenaron durante 10 días a temperatura ambiente en una cámara de desecación antes del análisis. Los números encima de cada barra corresponden a la relación de rRNA 28s a 18s. Una relación de 28s:18s > 1 indica generalmente un RNA intacto. Los resultados del Ejemplo 4 se proporcionan en la Fig. 4. TCEP y DTT se pueden utilizar indistintamente para estabilizar el RNA en varias composiciones de sustrato.

Ejemplo 5: Rendimiento a largo plazo de composiciones seleccionadas para el almacenamiento de RNA en celulosa

El Ejemplo 5 se diseñó para evaluar el rendimiento a largo plazo de composiciones seleccionadas después de 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente. Las células Jurkat se aplicaron directamente sobre las muestras de papel de celulosa y se secaron al aire para imitar una aplicación típica de usuario final. El RNA celular total se recuperó por electroelución, siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el Ejemplo 1, en un gel de agarosa al 1% y se analizaron para determinar el contenido de rRNA 28s:18s basándose en estándares conocidos. Las muestras de celulosa se almacenaron durante 30 días a temperatura ambiente en una cámara de desecación antes del análisis. Los números encima de cada barra corresponden a la relación de rRNA 28s a 18s. Una relación de 28s:18s > 1 indica generalmente un RNA intacto. Los resultados del Ejemplo 5 se exponen en la Fig. 5.

Ejemplo 6: Análisis de estabilidad de RNA en manchas de sangre seca

El ejemplo 6 se diseñó para evaluar el rendimiento de una composición de papel estabilizadora de RNA seleccionado (GITC/TCEP/MEHQ) con sangre total fresca en una variedad de condiciones de tampón. Aproximadamente 50 µL de sangre total de rata se recogieron de la vena de la cola de un sujeto de ensayo y se colocaron en el papel FTA o papel estabilizador de RNA preparado con los componentes de tampón indicados. Las tarjetas se secaron y se almacenaron a temperatura ambiente pero con la humedad controlada (~20% de humedad relativa) durante 5 a 22 días. El RNA se extrajo de un punzón central de 7 mm en un tampón de lisis y se purificó a través de una columna de centrifugado de membrana de sílice de acuerdo con los protocolos conocidos en la técnica. Después de la purificación y elución, los Números de Integridad del RNA (RIN) se midieron en un Bioanalizador Agilent 2100 utilizando RNA 6000 Pico LabChips. Por convención, RIN > 5 son buenos pero RIN > 6 son los mejores para los análisis cuantitativos posteriores tales como aplicaciones RT-PCR o de micromatrices. Los resultados del Ejemplo 6 se presentan en la Fig. 6. La calidad general del RNA de esta composición de papel seleccionada (GITC/TCEP/MEHQ) en todas las composiciones de tampón ensayadas superó el rendimiento del papel FTA.

Ejemplo 7: Impacto de la protección UV en la estabilidad del RNA

El Ejemplo 7 se diseñó para demostrar la protección del mRNA mediante inhibidores de UV y trampas de radicales libres presentes en la matriz seca seleccionada (GITC/TCEP/Tris). El RNA Jurkat total libre de DNA (1 µg) se encontró por duplicado en un papel estabilizador de RNA que contenía los componentes indicados. Cada tarjeta se dividió y una mitad se mantuvo en la oscuridad a 35°C durante 20 horas, mientras que la otra se trató en una cámara de ensayo Q-SUN Xe-1 Xenon durante 20 horas (35°C, 0,3 W/cm², 340 nm) para replicar todo el espectro de energía de la luz solar (21,7 KJ/m² de energía total). Se tomó una punción de 1,2 mm de cada muestra y se dejó caer directamente en las reacciones de transcriptasa inversa para crear una biblioteca de cDNA, que después se sondó frente a cebadores específicos para HPRT1 y mRNA de clatrina mediante qPCR. Los umbrales de ciclo (C_T) para las muestras expuestas a UV se restaron de las C_T de las parejas de compañeros sin tratar almacenadas en la oscuridad. Los resultados del Ejemplo 7 se presentan en la Fig. 7. La Vitamina C se utiliza como sinónimo en la figura para el ácido ascórbico.

Ejemplo 8: Estabilidad del agente reductor en papel bajo condiciones ambientales

El papel basado en celulosa 31ETF de Whatman™ se sumergió en concentraciones crecientes de TCEP o DTT en presencia de GITC en tampón Tris, pH 7,4. Los papeles basados en celulosa se almacenaron a temperatura ambiente sin regulación de la humedad. A los días 5, 19, y 105 se colocó ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) ("DTNB") en cada muestra de papel. En presencia de un agente reductor activo, se observó un cambio instantáneo de color a amarillo. Hasta 105 días de almacenamiento bajo condiciones ambientales, el papel de celulosa recubierto de la solución de TCEP, en todas las concentraciones, estaba todavía activo y podía reducir el DTNB, según lo indicado por un cambio visible en el color del papel de blanco a amarillo. Las muestras de papel sumergidas en DTT no pudieron reducir el DTNB y, en consecuencia, el color del papel permaneció blanco. Estas figuras no transmiten su significado en blanco y negro y, como tales, no se han incluido aquí pero están disponibles a solicitud del Examinador. La reacción química relevante para la reducción de DTNB se proporciona en Cline y colaboradores (2004) Biochemistry 43: 15195-15203.

Ejemplo 9: Análisis cualitativo del envejecimiento de los agentes reductores

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

Al día 0, 1, 6, y 25, una muestra de 10 mg de papel de celulosa bajo cada condición se colocó en una solución de DTNB, se agitó brevemente y se tomaron imágenes en color. En el día 1, todas las muestras de TCEP en cada una de las condiciones ambientales pudieron cambiar el color de la solución de DTNB a amarillo, lo que indica que aún podía funcionar como un agente reductor. A diferencia, la DTT no logró que las muestras se volvieran amarillas en presencia de DTNB, incluso a 21°C y 10% de humedad relativa. En el día 25, el papel de TCEP almacenado a 21°C y 10% de humedad relativa continuó mostrando una actividad reductora funcional. Sin embargo, un aumento en la humedad o en la temperatura dio como resultado una disminución notable en la actividad de TCEP como agente reductor, lo que indica que tanto la temperatura como la humedad son factores relevantes en la función de TCEP como agente reductor.

Ejemplo 10: Análisis cualitativo de la actividad de TCEP en el papel basado en celulosa

Se prepararon composiciones de TCEP que comprenden además GITC y MEHQ en diferentes tampones (Tris, pH 7,4; MES, pH 6,2; y MOPS, pH 7,0) y una muestra de control que no comprende tampón. El papel basado en celulosa se recubrió después, cada uno con una de las disoluciones anteriores, se secó rápidamente a 50°C en un horno con soplado de aire, se selló con desecantes en bolsas de papel de aluminio para mantener baja la humedad y después se almacenó a 4°C, temperatura ambiente, o 41°C.

En las semanas indicadas en la Figura (0, 1 y 4), la actividad de TCEP se analizó utilizando un ensayo colorimétrico de DTNB en el que se añadió DTNB a cada perforación de papel de 3,6 mm, se agitó durante 30 minutos, y después se midió la absorbancia del líquido a 412 nm.

5 Todas las muestras se mantuvieron estables a 4°C con aproximadamente una actividad del 100% a un mes. Después de un mes a temperatura ambiente, la actividad de TCEP mostró una variabilidad basada en el tampón utilizado (por ejemplo, MOPS (100%) > Sin tampón (90%) > MES (86%) > Tris (81%)). Después de un mes a 41°C, todavía se observó la variabilidad en la actividad de TCEP (por ejemplo, MOPS (67%) > MES (63%) > Tris (48%) > Sin tampón (39%)). En general, el poder reductor de TCEP en la celulosa fue más alto en presencia de tampón MOPS en las condiciones ambientales ensayadas.

10 Ejemplo 11: Condiciones para la preparación de un sustrato robusto, almacenamiento en seco a temperatura ambiente, y extracción y análisis del RNA

15 Se utilizó una línea celular de linfocitos humanos cultivados, más particularmente la línea celular Jurkat, para proporcionar una muestra de RNA celular total. Las células se pusieron en discos de celulosa de 7 mm impregnados con los reactivos indicados en la siguiente tabla en las concentraciones especificadas. Los discos que contienen los reactivos que se exponen a continuación se prepararon mediante un protocolo de "inmersión" en el que piezas (~ 25,81 cm². (~4 pulgadas²)) de papel de celulosa (papel Whatman™ 31-ETF) se saturaron al colocar el papel Whatman™ 31-ETF en placas de Petri de las disoluciones de inmersión que contenían las cantidades de los reactivos indicados en la Tabla 1. Las disoluciones de inmersión se prepararon añadiendo agua desionizada a la sal de tiocianato indicada (por ejemplo, NaSCN, KSCN, NH₄SCN, Ca(SCN)₂, Mg(SCN)₂, Ba(SCN)₂, Co(SCN)₂, Zn(SCN)₂, o NaClO₄), MOPS, TCEP-HCl, y MEHQ o THQ para lograr las concentraciones deseadas de cada uno de estos reactivos en las disoluciones de inmersión. Las disoluciones de inmersión se agitaron en un vórtice para asegurar la disolución completa de los reactivos sólidos, y el pH de cada una de las disoluciones de inmersión final se determinó de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

Tabla 1: Concentraciones de reactivos en las disoluciones de revestimiento por inmersión

Sal	[-SCN] (mM)	[TCEP-HCl] (mM)	[MOPS] (mM)	[MEHQ] (mM)	[THQ] (mM)	pH
NaSCN	420	35	96	40	0	2,0
NaSCN	420	35	88	40	0	4,5
NaSCN	420	35	88	40	0	7,0
NaSCN	308	35	88	40	0	4,6
NaSCN	208	35	88	40	0	4,3
NaSCN	104	35	88	40	0	5,0
KSCN	420	35	88	40	0	4,5
NH ₄ SCN	420	35	88	40	0	4,5
Ca(SCN) ₂	424	35	96	0	40	3,3
Mg(SCN) ₂	424	35	96	0	40	3,3
Ba(SCN) ₂	424	35	96	0	40	3,3
Co(SCN) ₂	424	35	96	0	40	3,2
Zn(SCN) ₂	424	35	96	0	40	3,2
NaClO ₄	424	35	96	0	40	3,2

25 Una vez que el papel de celulosa se saturó, el exceso de solución se eliminó con un rodillo de presión y el papel se secó a 50°C bajo una corriente de gas N₂. Se aplicaron células Jurkat (por ejemplo, una fuente de RNA celular total) al sustrato de papel seco que comprende la combinación de los reactivos indicados en la Tabla 1. Los sustratos de celulosa que comprenden el RNA celular total de las células Jurkat junto con los reactivos como en la tabla anterior se secaron y se almacenaron a temperatura ambiente durante 7-17 días en una cámara de desecación mantenida a -20% de humedad relativa (RH).

El RNA celular se extrajo de cada muestra de celulosa y se midió de acuerdo con los protocolos estándar. Brevemente, las muestras de celulosa se rehidrataron con 15 µL de proteinasa K 4mg/mL y el RNA celular se extrajo de la matriz de celulosa en un tampón de lisis y se purificó en columnas de centrifugado de membrana de sílice de acuerdo con los protocolos conocidos en la técnica. Después de la purificación y elución en agua libre de nucleasas, los Números de Integridad del RNA (RIN) se midieron en un Bioanalizador Agilent 2100 utilizando RNA 6000 Pico LabChips. Por convención, RIN > 5 se consideran buenos pero RIN > 6 se consideran preferibles para los análisis cuantitativos posteriores tales como aplicaciones RT-PCR o de micromatrices.

Los resultados del Ejemplo 11 se exponen en la Fig. 9. Se observó que el NaSCN podía sustituirse directamente por GuSCN para extraer y estabilizar el RNA celular a temperatura ambiente. A diferencia del caso de GuSCN, este fenómeno fue independiente del pH de la disolución final utilizado para impregnar el papel de celulosa (pH 4 o pH 7). Debido a que GuSCN contiene un catión guanidinio que actúa como una base débil a un pH neutro, se supone que GuSCN puede provocar la hidrólisis alcalina del RNA a un pH 7. También se observaron fuertes propiedades de estabilización del RNA para sales de tiocianato relacionadas que contenían cationes de metal o de amonio, pero no para una sal de perclorato utilizada comúnmente para extraer ácidos nucleicos. De estas sales inorgánicas relacionadas, las sales de tiocianato con los cationes metálicos del Grupo 1 y Grupo 2 (por ejemplo, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺) demostraron ser más efectivas en la estabilización del RNA (RIN > 5). Un experto en la técnica apreciaría que los cationes metálicos, especialmente cationes divalentes, son cofactores estimuladores de las enzimas RNasa y RNAs catalíticos (por ejemplo, ribozimas). Por lo tanto, la aplicabilidad de las sales de tiocianato basadas en Mg²⁺ o Ca²⁺ a la conservación del RNA no habría sido anticipada por los expertos en la técnica.

Ejemplo 12: Análisis de estabilidad de RNA de manchas de sangre secas

El ejemplo 12 se diseñó para evaluar el rendimiento de tres diferentes sales inorgánicas para estabilizar el RNA celular total de la sangre total. Se recogieron aproximadamente 50 µL de sangre total de rata de la vena de la cola de un sujeto de ensayo y se colocaron sobre papel tratado químicamente que contenía las sales indicadas en concentraciones equimoleculares en combinación con un agente reductor (por ejemplo, TCEP), un tampón (por ejemplo, Tris), y un antioxidante (por ejemplo, THQ) en un formato seco. Los papeles de celulosa secos tratados químicamente se prepararon esencialmente como se describió anteriormente en el Ejemplo 11. Las manchas de sangre en los papeles de celulosa impregnados químicamente se secaron y almacenaron a temperatura ambiente a una humedad controlada de aproximadamente 20% de humedad relativa durante 19 días. El RNA se extrajo de una punción central de 7 mm en un tampón de lisis y se purificó a través de una columna de centrifugado de membrana de sílice de acuerdo con los protocolos conocidos en la técnica. Después de la purificación y elución, los Números de Integridad del RNA (RIN) se midieron para cada muestra en un Bioanalizador Agilent 2100 RNA 6000 Pico LabChips. Otra vez, un RIN > 5 se considera bueno pero un RIN > 6 se considera preferible para los análisis cuantitativos posteriores tales como aplicaciones RT-PCR o de micromatrices.

Los resultados del Ejemplo 12 se exponen en la Fig. 10. Las sales de tiocianato indicadas impregnadas en los sustratos de papel de celulosa en el Ejemplo 11 fueron igualmente eficaces para extraer y estabilizar el RNA de la sangre de rata a temperatura ambiente. Sobre la base de estos resultados el experto en la técnica apreciaría que se pueden utilizar sales de tiocianato relacionadas para practicar los métodos descritos.

Las formas singulares “un”, “una” y “el” incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El lenguaje de aproximación, como se utiliza aquí a lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, se puede aplicar para modificar cualquier representación cuantitativa que pueda variar de manera permisible sin dar lugar a un cambio en la función básica con la que está relacionada. En consecuencia, un valor modificado por un término como “aproximadamente” no se limita al valor preciso especificado. En algunos casos, el lenguaje aproximado puede corresponder a la precisión de un instrumento para medir el valor. Donde fue necesario, se suministraron rangos, y esos rangos incluyen todos los subrangos entre ellos.

REIVINDICACIONES

1. Una matriz sólida seca para la extracción y el almacenamiento de ácidos nucleicos de una muestra, en donde una composición comprende al menos un tiocianato metálico que comprende un catión metálico del Grupo 1 o Grupo 2, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), y se incorpora un tampón en la matriz sólida seca, y la matriz se seca después, en donde la matriz sólida es una matriz porosa que comprende celulosa, acetato de celulosa, fibra de vidrio o cualquier combinación de los mismos.
2. La matriz sólida seca de la reivindicación 1, en donde dicho catión metálico del Grupo 1 o Grupo 2 se selecciona del grupo que consiste en Na⁺, K⁺, Li⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, y Ba²⁺.
3. La matriz sólida seca de la reivindicación 1, en donde la composición presente en la matriz sólida comprende además un inhibidor de UV, una trampa de radicales libres, un quelante, o cualquier combinación de los mismos.
4. La matriz sólida seca de la reivindicación 1, en donde la composición incorporada en la matriz sólida seca comprende además un inhibidor de RNasa.
5. La matriz sólida seca de la reivindicación 1, en donde los ácidos nucleicos son RNA.
6. La matriz sólida seca de la reivindicación 1, en donde el tampón se selecciona del grupo que consiste en 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), un tampón citrato, y un tampón fosfato.
7. La matriz sólida seca de la reivindicación 3, en donde el protector de UV o la trampa de radicales libres se selecciona del grupo que consiste en hidroquinona monometil éter (MEHQ), hidroquinona (HQ), toluhidroquinona (THQ), y ácido ascórbico.
8. La matriz sólida seca de la reivindicación 4, en donde el inhibidor de RNasa es el complejo vanadil ribonucleósido (VRC), un análogo de nucleótido, o un inhibidor de RNasa disponible comercialmente y dicha matriz sólida comprende además una trampa de radicales libres, en donde la trampa de radicales libres comprende MEHQ o THQ.
9. La matriz sólida seca de la reivindicación 1, en donde la matriz sólida es una matriz porosa basada en celulosa y:
 - a) la sal de tiocianato metálico se compone de un catión metálico del Grupo 1 o Grupo 2;
 - b) el agente reductor es TCEP; y
 - c) el tampón es MOPS.
10. Un método para extraer y almacenar ácidos nucleicos de una muestra que comprende:
 - a) proporcionar una matriz sólida seca para extraer y almacenar los ácidos nucleicos de una muestra, en donde una composición se incorpora en la matriz sólida seca que comprende un tiocianato metálico que comprende un catión metálico del Grupo 1 o Grupo 2, TCEP, y un tampón en donde la matriz sólida seca es una matriz porosa que comprende celulosa, acetato de celulosa, fibra de vidrio o cualquier combinación de los mismos;
 - b) secar la matriz sólida después de la incorporación de la composición en la matriz sólida seca;
 - c) aplicar una muestra a una matriz sólida seca para recoger los ácidos nucleicos;
 - d) secar la matriz sólida que comprende los ácidos nucleicos; y
 - e) almacenar los ácidos nucleicos en la matriz sólida en un estado seco bajo condiciones ambientales.
11. El método de la reivindicación 10, en donde dicho catión metálico se selecciona del grupo que consiste en Na⁺, K⁺, Li⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, y Ba²⁺.

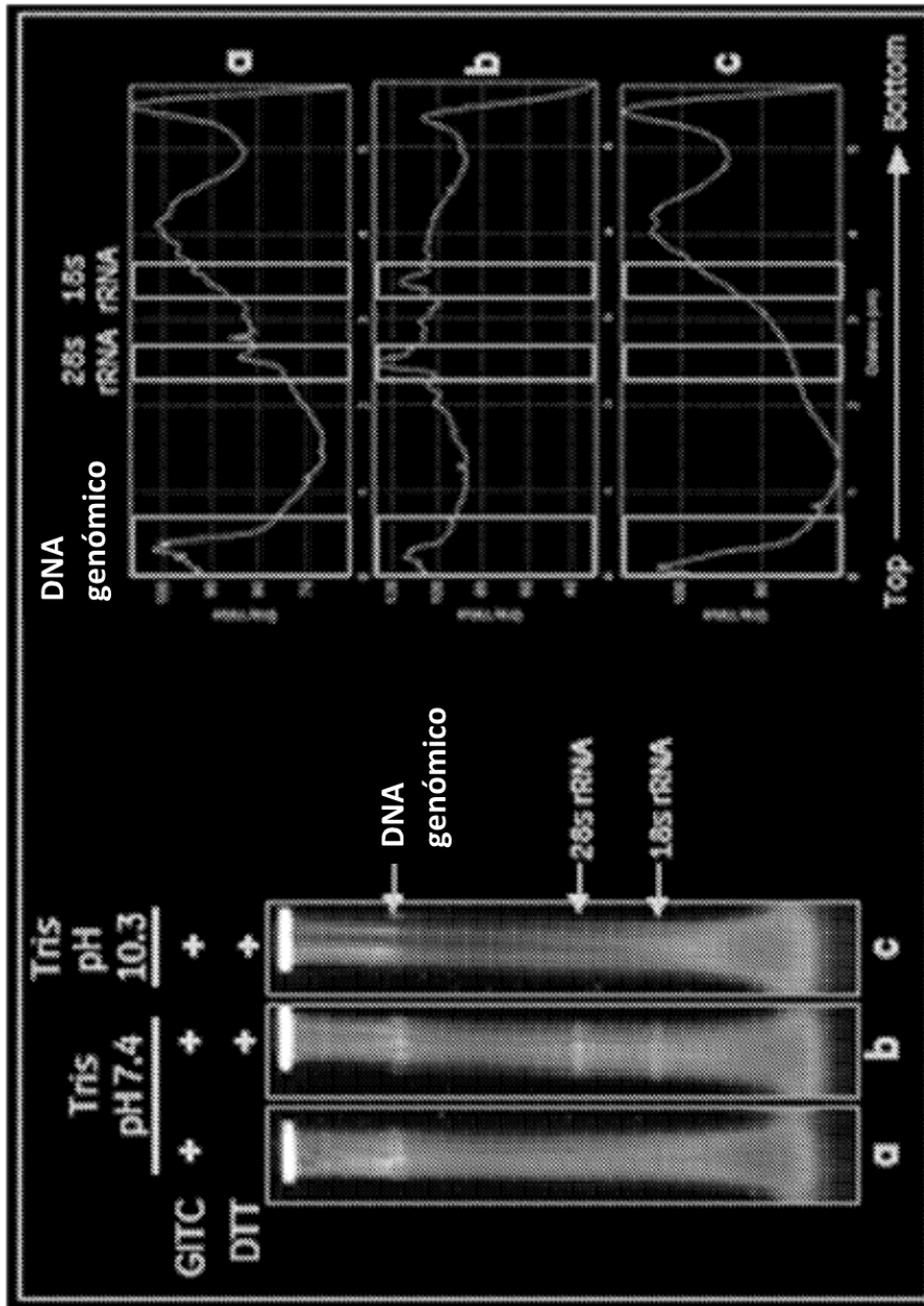


Fig. 1

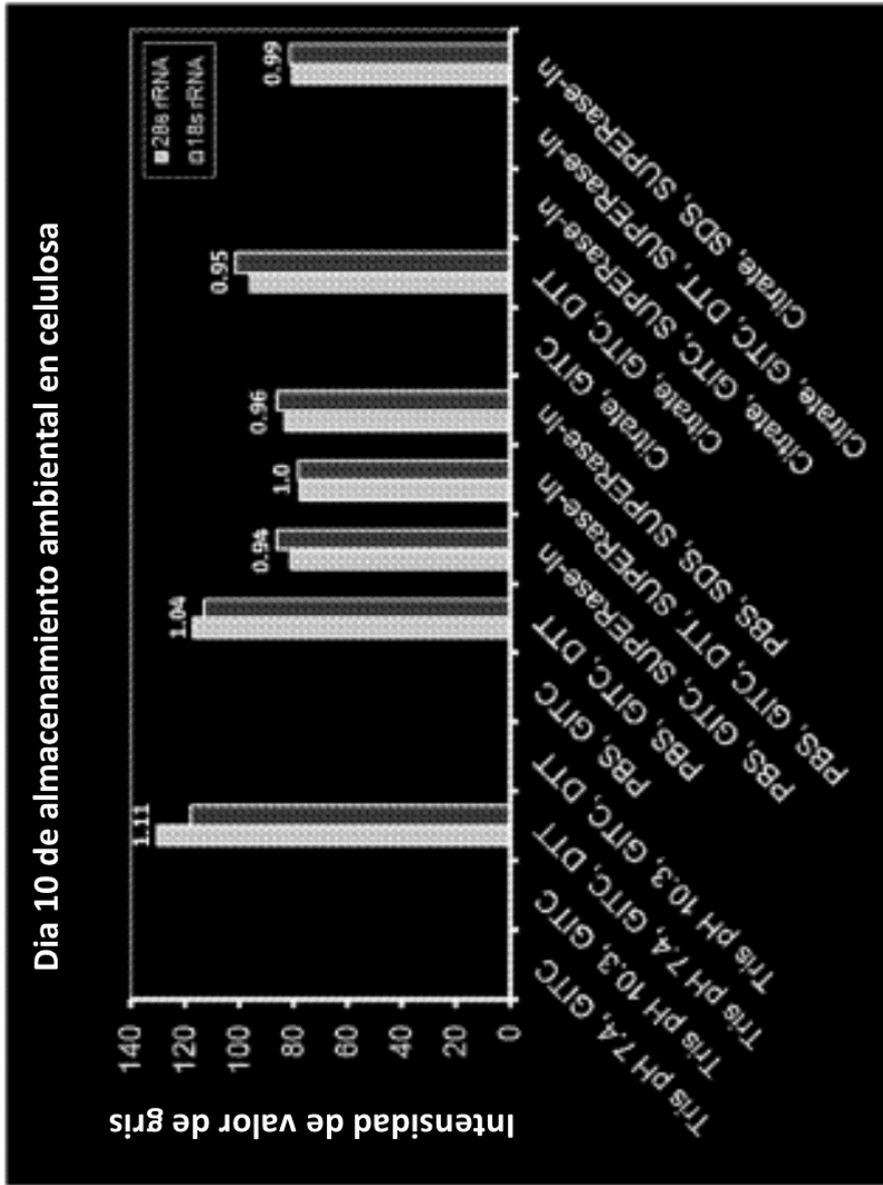


Fig. 2

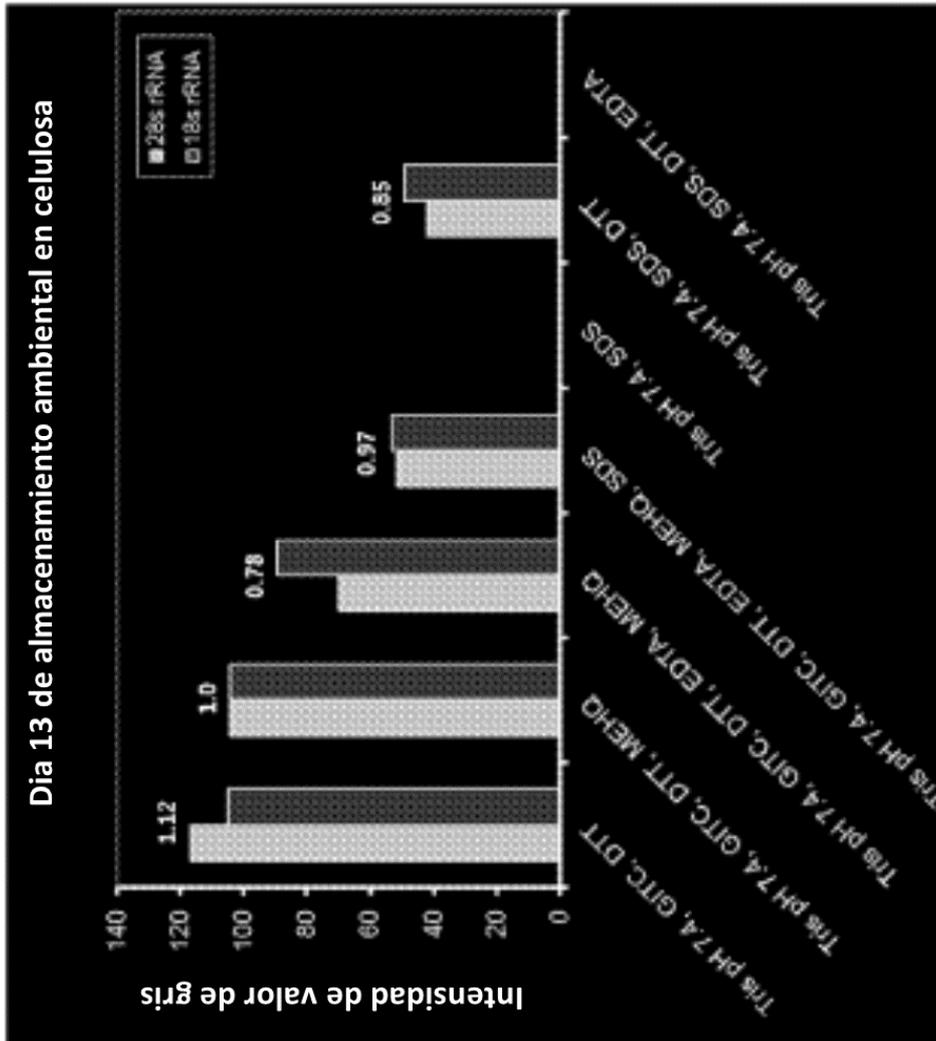


Fig. 3

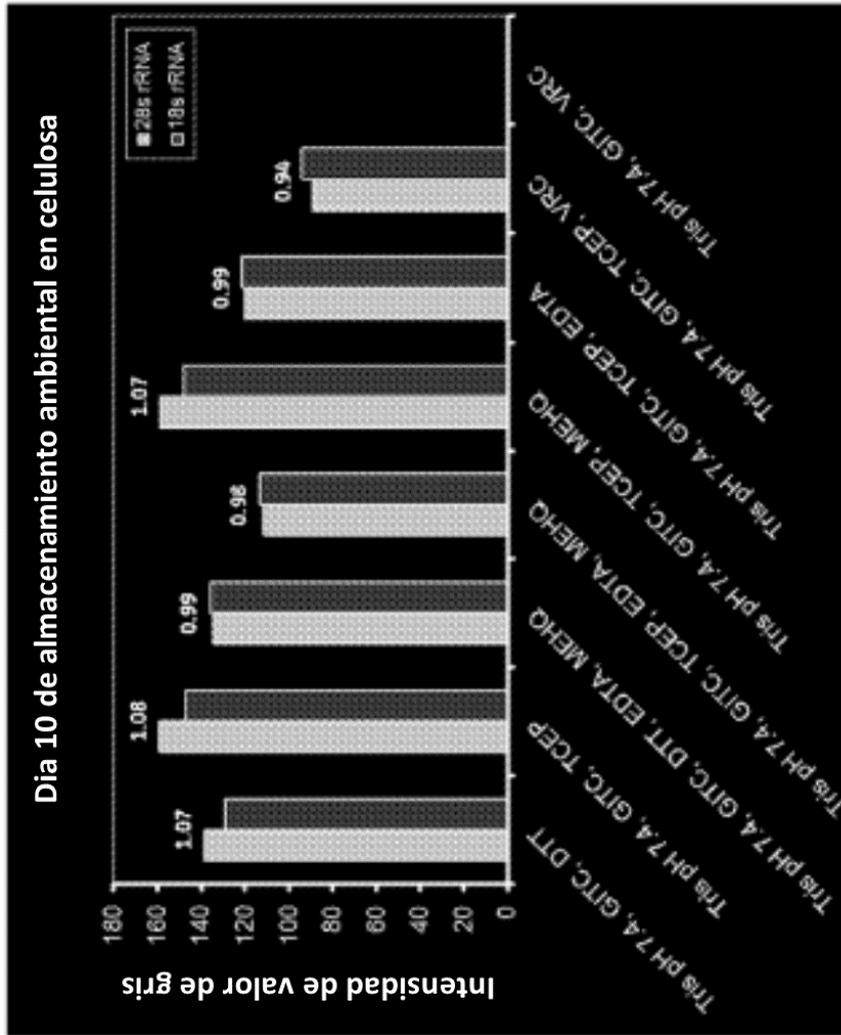


Fig. 4

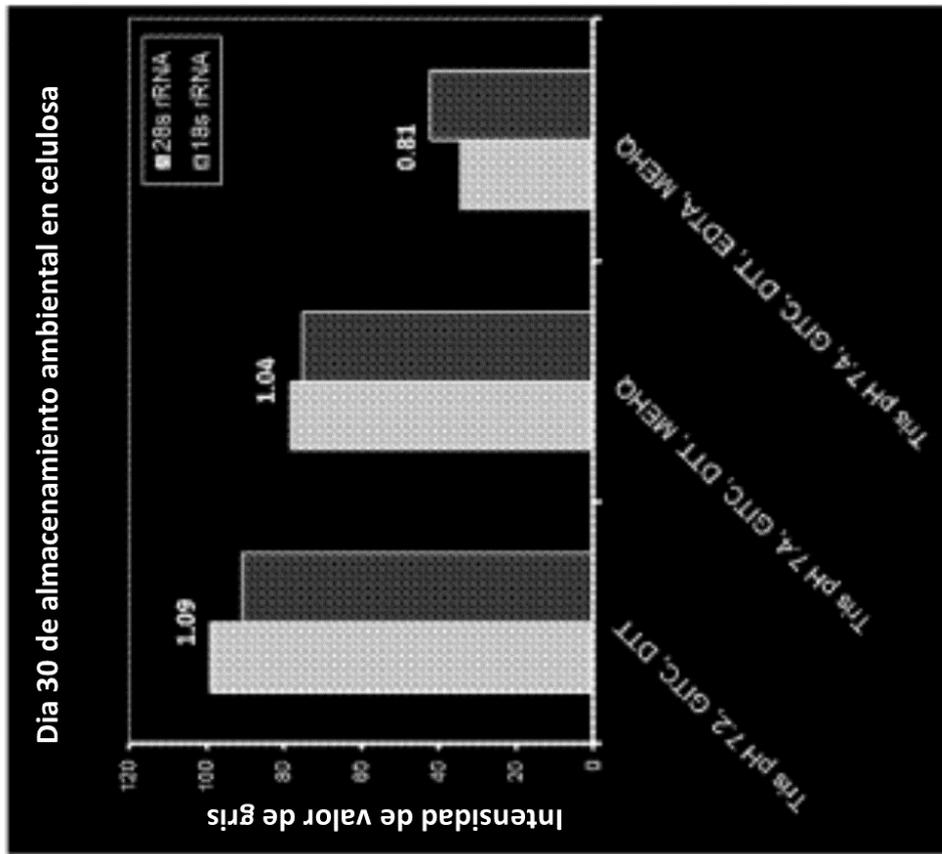


Fig. 5

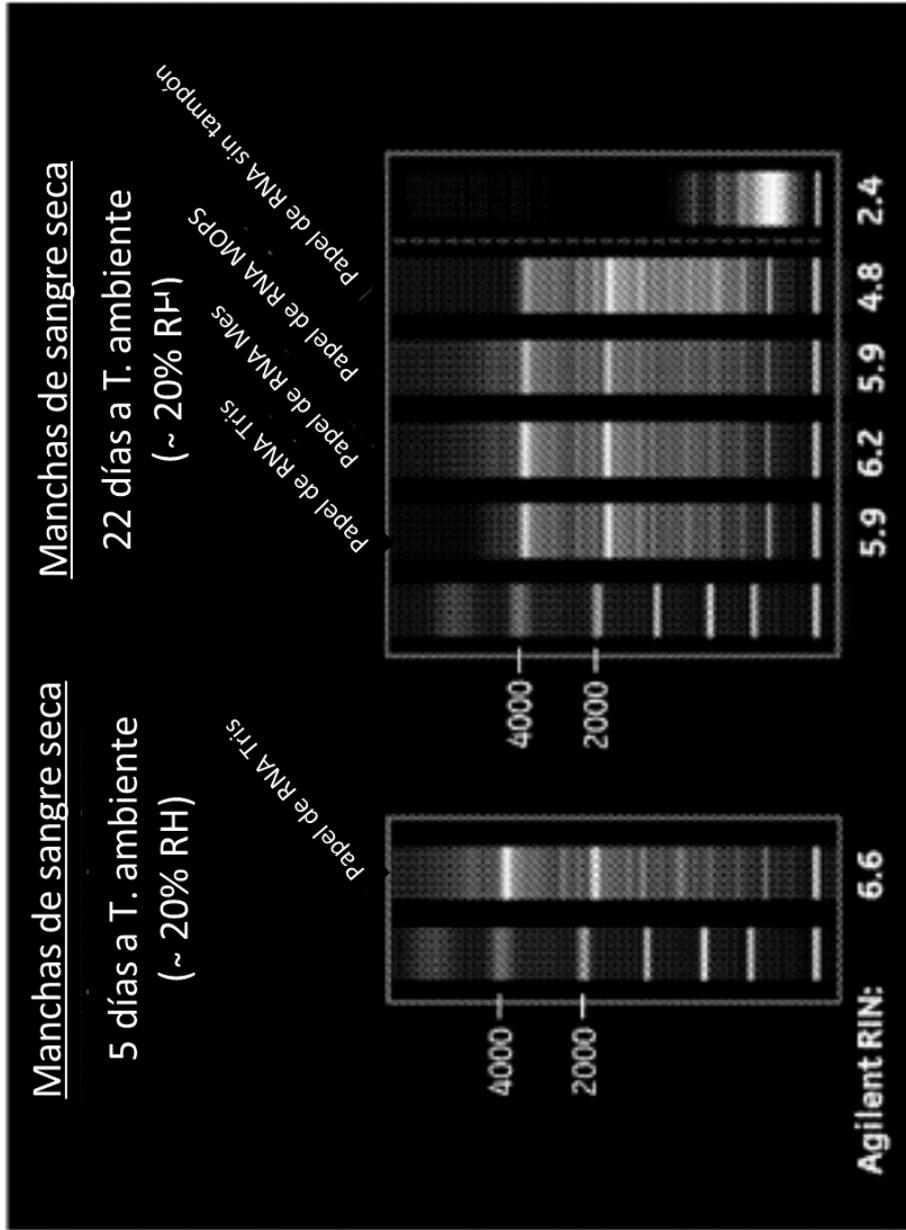


Fig. 6

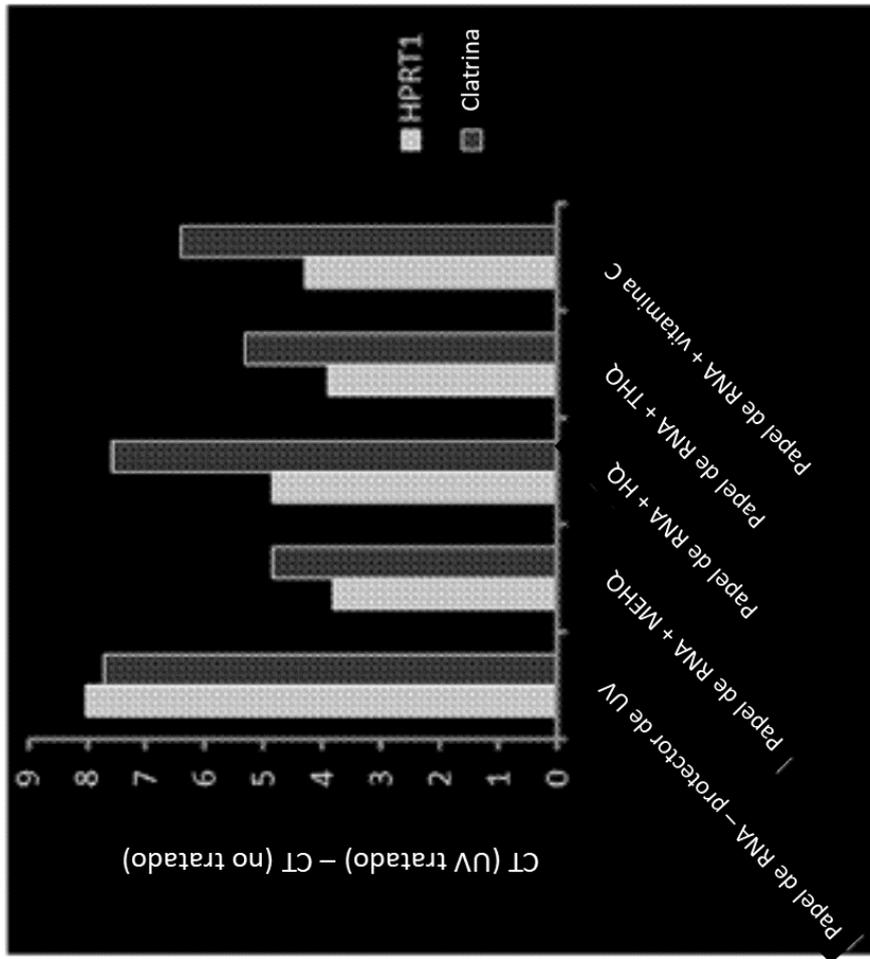


Fig. 7

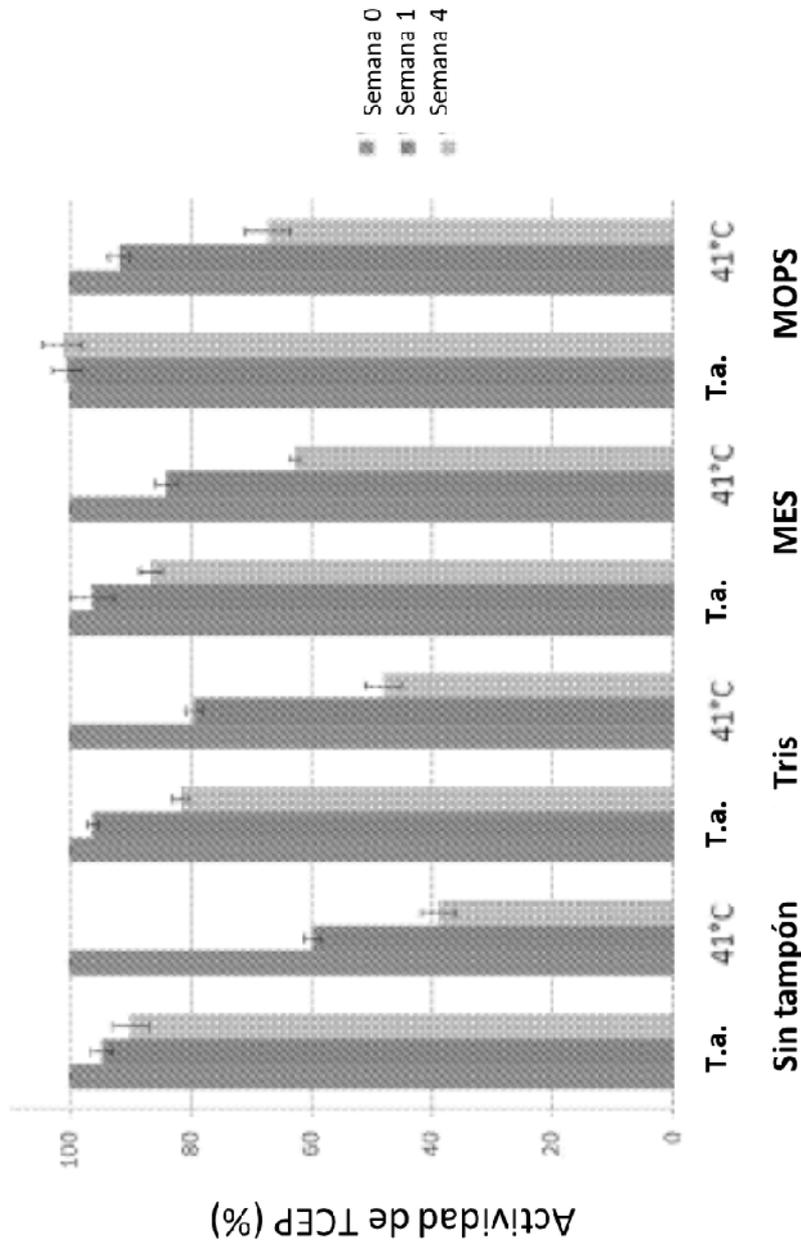


Fig. 8

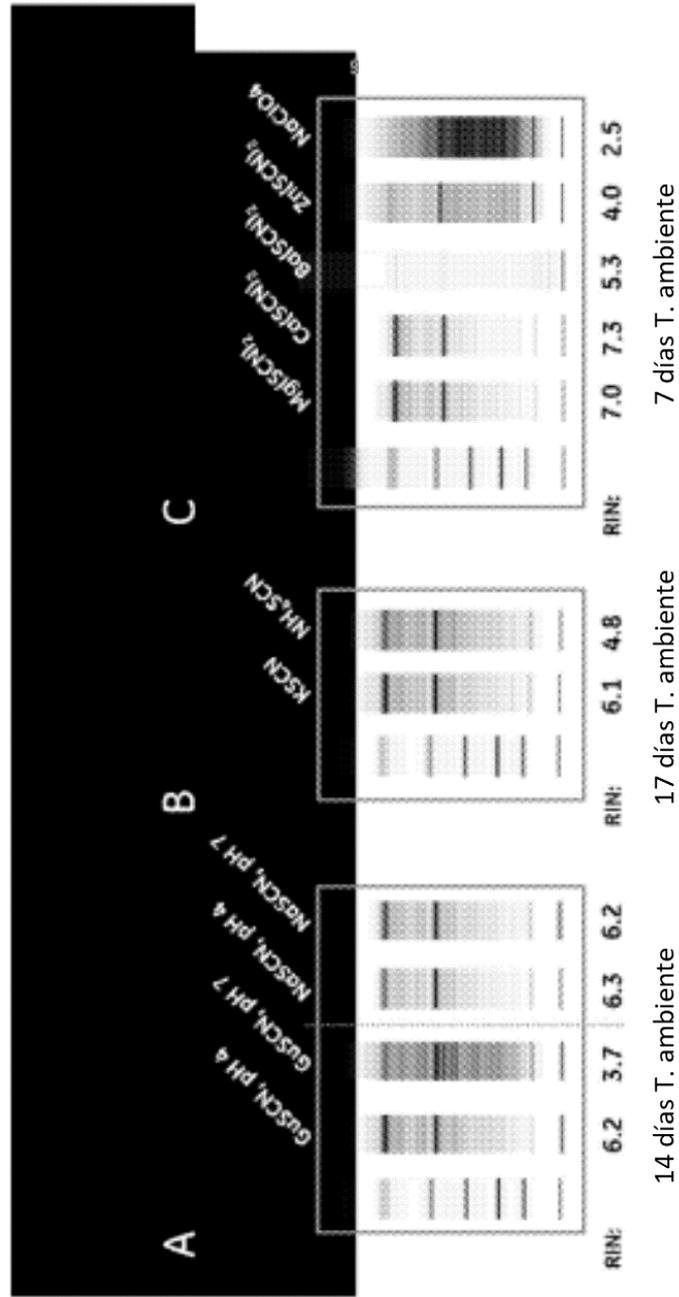
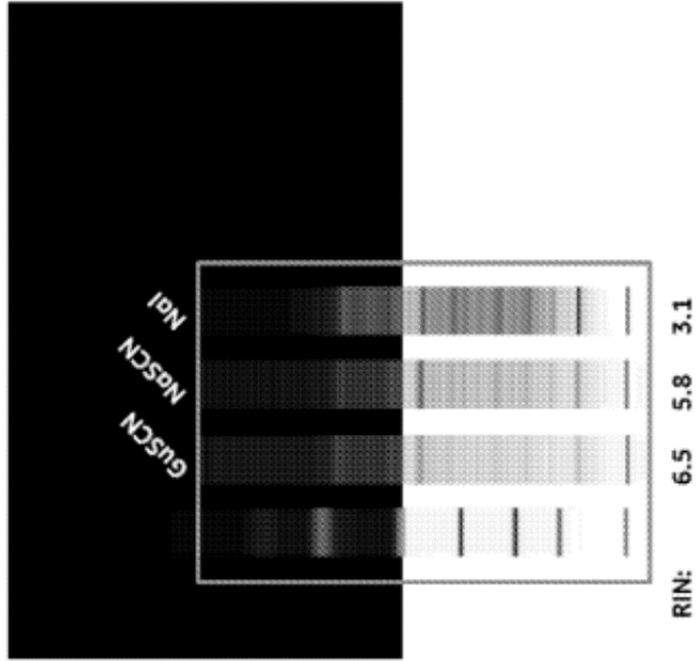


Fig. 9



19 días T. ambiente

Fig. 10