(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 729 164**

(51) Int. CI.:

C12N 15/10 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2006 E 16157978 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3064583**

(54) Título: **Procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos de cadena corta**

(30) Prioridad:

09.12.2005 DE 102005059315

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2019

(73) Titular/es:

QIAGEN GMBH (100.0%)
Qiagen Str. 1
40724 Hilden, DE

(72) Inventor/es:

RITT, CHRISTOPH;
HIMMELREICH, RALF y
WEBER, MARTIN

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos de cadena corta

La presente invención se refiere a un procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos y al uso de un kit para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos. Se dan a conocer también el kit y el uso de una matriz de intercambio de aniones, así como un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad.

Desde que se descubrió hace pocos años que pequeños ácidos ribonucleicos (ARN) asumen una función reguladora esencial en la expresión génica, centran cada vez más interés en investigaciones científicas ARN pequeños que son más cortos de 300 nucleótidos, en particular más cortos de 100 nucleótidos. En particular, los micro-ARN (mi-ARN) han despertado la atención de muchos investigadores. Los mi-ARN son una clase evolutivamente conservada de pequeños ARN no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, cuyo papel complejo se evidencia cada vez más en la regulación de la expresión génica. Los mi-ARN se encontraron en todo organismo eucariota investigado y casi en cualquier tejido, así, entre otros, en hongos, plantas, insectos y mamíferos. Junto a los mi-ARN se descubrieron, además, otros ARN pequeños que asimismo juegan un papel fundamental en las funciones celulares. A estos pertenecen, p. ej., ARN pequeños de interferencia (ARNip), ARN pequeños nucleares (ARNnp) y ARN pequeños nucleolares (ARNnop).

Con el fin de poder investigar el papel celular de estos ARN cortos, que son más cortos de 300 nucleótidos, estos tienen que ser purificados lo más puros posible y con un elevado rendimiento a partir de los sistemas biológicos a investigar. Por lo tanto, existe una gran necesidad de indicar un procedimiento con el que se puedan purificar o bien aislar ARN cortos de este tipo a partir de sistemas biológicos complejos, en particular a partir de lisados celulares.

Con el fin de aislar en general ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas, estos deben ser separados de los componentes celulares restantes, tales como proteínas, azúcares, lípidos y otros componentes. Del estado de la técnica se conocen muchos métodos para la separación de ácidos nucleicos a partir de los más diversos materiales de partida tal como, por ejemplo, a partir de cultivos celulares, a partir de tejidos de origen vegetal y animal, así como a partir de líquidos corporales. Un método incluye, por ejemplo, la extracción de las soluciones de partida, por norma general acuosas, con ayuda de disolventes orgánicos tales como fenol y cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987), seguido de una precipitación de los ácidos nucleicos con ayuda de alcoholes, tales como etanol o isopropanol, a partir de la fase acuosa (Sambrook, J., Fritsch, E. F. en T. Maniatis, CSH, "*Molecular Cloning"*, 1989). Otro método incluye la inmovilización de los ácidos nucleicos a una fase sólida, p. ej., mediante tecnología de adsorción de sílice. Todos estos métodos tienen el inconveniente de que ácidos nucleicos pequeños no pueden o solo pueden aislarse, o al menos purificarse, en una medida insuficiente.

Para la solución de este problema se conocen del estado de la técnica procedimientos para el enriquecimiento específico de poblaciones de ARN pequeñas que se basan en la tecnología de la membrana de sílice. En el caso de estos procedimientos, después de la lisis de las células se añade al lisado celular una determinada cantidad relativamente pequeña de alcohol, y al menos una parte de los ácidos nucleicos largos se unen, bajo condiciones de unión caotrópicas, a la membrana de sílice. La cantidad de alcohol es en los procedimientos de purificación descritos en el estado de la técnica, sin embargo, demasiado pequeña como para unir de manera eficaz también pequeños ácidos nucleicos a la membrana de sílice, de modo que estos pequeños ARN están presentes en el material roto. En el material roto se aumenta entonces la concentración de alcohol y el material roto se une a una segunda membrana de sílice. Después de etapas de lavado, se eluye el ARN pequeño junto con todos los otros ácidos nucleicos que no se unieron a la primera columna (véase, p. ej., el kit mirVana® de la razón social Ambion, Austin, EE.UU. o el Mini kit de tejido lipídico RNeasy® de la razón social QIAGEN, Hilden, Alemania, por medio de *"protocolos desarrollados por el usuario"*).

Tanto el método QIAGEN como el método Ambion tienen el inconveniente de que se deben utilizar dos fases sólidas y que no es posible obtener con una única etapa de unión solo el ARN pequeño deseado. Además, con este método no es posible aislar, por ejemplo, exclusivamente mi-ARN con un tamaño de aproximadamente 22 nucleótidos, sin aislar además al mismo tiempo ARNt y otros ácidos nucleicos mayores. Bajo determinadas circunstancias, con este método se puede enriquecer en un determinado grado y bajo determinadas circunstancias ciertamente el ARN pequeño, en particular el mi-ARN, pero éste sigue estando contaminado con otros ácidos nucleicos, en particular con ARN de transferencia (ARNt).

Guenther R. H. et al. ("Purification of transfer RNA species by single-step ion-exchange high-performance liquid chromatography", Journal of chromatograpy 1 de julio de 1988, Vol. 444, 1 de julio de 1988 (01-07-1988), páginas 79-87) describen la purificación de determinadas especies de ARNt mediante columnas de intercambio de aniones DEAE.

El documento US 5.990.301 A1 describe un procedimiento para el aislamiento y la purificación de oligonucleótidos a partir de sistemas bacterianos y víricos mediante columnas de intercambio de aniones. El documento WO 03/080834 A describe un procedimiento basado en columna, con el fin de separar oligonucleótidos de impurezas. Drager R. et al. ("High-performance anion-exchange chromatography of oligonucleotides", Analytical Biochemistry 1985, EE.UU.,

Vol. 145, Nº 1, 1985, páginas 47 - 56) describen un procedimiento basado en columna para la separación de oligonucleótidos y especies de ARNt. Chiang et al. ("Application of supermagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells", Journal of chromatography B: Biomedical, Sciences & Applications, Elsevier, Amsterdam, NL, Vol. 822, Nº 1-2, 5 de agosto de 2005 (05-08-2005, páginas 54-60) describen la preparación de nanopartículas de Fe_3O_4 superparamagnéticas que están revestidas con polietilenimina. Las partículas se utilizan para la purificación de ADN plasmídico. El documento US 2005/106589 A1 describe procedimientos para el aislamiento de ácidos nucleicos. En este caso, para la purificación de ADN plasmídico pasan a emplearse un tampón de lisado, partículas magnéticas revestidas con una matriz intercambiadora de aniones y un tampón de elución. El documento US 2005/130196 A1 describe el uso de partículas magnéticas con una matriz intercambiadora de aniones para la purificación de amplicones de PCR.

La presente invención tuvo por misión superar los inconvenientes que resultan del estado de la técnica.

En particular, la presente invención tenía por misión indicar un procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos pequeños, en particular de mi-ARN, con el cual se puedan enriquecer ácidos nucleicos pequeños a partir de composiciones biológicas complejas, tales como, por ejemplo, de lisados celulares, con las menores etapas de procedimiento posibles.

También era misión de la presente invención indicar un procedimiento para la purificación de ácidos nucleicos pequeños, con el cual sea posible separar en particular ácidos nucleicos con una longitud de 25 nucleótidos o menos, tales como, por ejemplo, mi-ARN, no solo de ácidos nucleicos con una longitud mayor que 300 nucleótidos de otros componentes en una composición biológica compleja, tal como, por ejemplo, un lisado celular, sino separar de manera preestablecida estos ácidos nucleicos pequeños también de otros ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 y mayor que 25 nucleótidos, por ejemplo de ARNt.

También debería indicarse un procedimiento con el que se puedan generar de la manera más individual posible una exclusión por tamaño deseada para el ARN a purificar.

Otra misión de la presente invención es indicar un procedimiento que pueda llevarse a cabo sin el cambio del recipiente de reacción – como la denominada “reacción en un solo recipiente” – y, con ello, reducir a un mínimo el riesgo de confusión de las muestras a analizar.

Además, la presente invención tenía por misión indicar un kit con ayuda del cual se pueda llevar a cabo la purificación ventajosa, precedentemente descrita, de pequeños ácidos nucleicos, en particular de ARN pequeño a partir de composiciones biológicas complejas.

Una aportación a la solución de los problemas mencionados al comienzo la proporciona un procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 1-14. Además, la presente invención se refiere al uso de un kit de acuerdo con las reivindicaciones 16 y 17.

Una aportación a la solución de los problemas mencionados al comienzo la ofrece un procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos, preferiblemente menor que 200 nucleótidos, de manera particularmente preferida menor que 100 nucleótidos, además de ello, de manera preferida menor que 50 nucleótidos y lo más preferiblemente menor que 25 nucleótidos, a partir de una muestra que se elige del grupo consistente en plasma, suero, un fluido corporal, un frotis y un lisado celular, que comprende las etapas de procedimiento

i) proporcionar una fase P_1 fluida, preferiblemente acuosa, que contiene

   (α1) al menos un ácido nucleico con una longitud menor que 300 nucleótidos, preferiblemente menor que 200 nucleótidos, de manera particularmente preferida menor que 100 nucleótidos, además de ello, preferiblemente menor que 50 nucleótidos y lo más preferiblemente menor que 25 nucleótidos, así como

   (α2) al menos un componente distinto de este ácido nucleico (α1),

ii) puesta en contacto de la fase P_1 con una matriz de intercambio de aniones para la unión del ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones, presentando la matriz de intercambio de aniones grupos funcionales elegidos del grupo que contiene grupos amino, grupos hidrazina y grupos imina, que están presentes, al menos en parte, en forma catiónica en las condiciones bajo las cuales se pone en contacto la fase P_1 acuosa con la matriz de intercambio de aniones, y la matriz de intercambio de aniones está presente en forma de un revestimiento sobre partículas magnéticas,

   y la unión del ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones tiene lugar a un valor del pH en un intervalo de 2 a 7,

   y en donde las partículas magnéticas se separan de la fase P1 como agregados magnéticos,

iii) lavado de la matriz de intercambio de aniones con un tampón de lavado, permaneciendo unido el ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones, así como

(iv) elución del ácido nucleico (α1) unido a la matriz de intercambio de aniones de la matriz de intercambio de aniones, obteniéndose una fase P_2 fluida, preferiblemente acuosa, que contiene el ácido nucleico (α1).

De manera totalmente sorprendente se comprobó que ácidos nucleicos pequeños con una longitud menor que 300 nucleótidos de composiciones biológicas complejas, las cuales, junto a estos ácidos nucleicos pequeños, pueden contener numerosos otros componentes, se pueden enriquecer mediante la unión a una matriz de intercambio de aniones y subsiguiente lavado y elución, sin que sea necesario empobrecer primeramente ácidos nucleicos largos tal como se requiere en el caso de los métodos QIAGEN y Ambion descritos al comienzo.

De acuerdo con una forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, en el caso del ácido nucleico (α1) a purificar se trata de un ARN de cadena sencilla o de cadena doble, preferiblemente de cadena doble. En particular, se prefiere que en el caso del ARN con una longitud menor que 300 nucleótidos se trate de un ARN elegido del grupo que contiene mi-ARN, pre-mi-ARN, ARNip, ARNnp, ARNnop, ARNt, ARNr 5S, ARNr 5,8S o mezclas a base de al menos dos de los mismos, en particular de una mezcla a base de mi-ARN y ARNt, siendo el más preferido mi-ARN con una longitud en un intervalo de 15 a 30 nucleótidos, además de ello preferiblemente 17 a 24 nucleótidos y todavía más preferiblemente con una longitud de 20 a 23 nucleótidos como ácido nucleico (α1).

Por las expresiones “ARNr 5S” o bien “ARNr 5,8S” se entienden ácidos ribonucleicos no codificantes que se pueden encontrar en ribosomas eucarióticos. Por el término “ARNt” se entiende un ácido ribonucleico que se compone de aproximadamente 80 nucleótidos y en el que se manifiestan apareamientos de bases conjugadas (adenina y uracilo; citosina y guanina). Estos apareamientos son el origen de la estructura a modo de hoja de trébol del ARNt. Por el término “ARNip” se entienden ácidos ribonucleicos con una longitud de aproximadamente 22 nucleótidos que se forman por disociación de un ARN de doble cadena (ARNdc) mediante la enzima “Dicer” y se incorporan en el complejo enzimático “RISC” (siglas inglesas de complejo de silenciamiento inducido por ARN). Por el término “ARNnp” se entienden ARN de aproximadamente 100 a 300 pares de bases de tamaño, catalíticamente activos, en el núcleo celular de eucariotas. Estos ARNnp se encuentran siempre asociados con proteínas en los denominados snRNP (siglas inglesas de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas) y son los responsables del corte y empalme de los intrones de pre-ARNm para formar ARNm. Por el término “ARNnop” se entiende una clase de ácidos ribonucleicos que participan en la modificación química de ARN ribosomal (ARNr) y otros genes de ARN, por ejemplo en su metilación. Forman un componente de la denominada snoRNP (siglas inglesas de ribonucleoproteína nucleolar pequeña). Por el término “mi-ARN” se entienden ácidos nucleicos pequeños que sirven para la regulación de procesos de desarrollo en plantas y animales. Se unen específicamente a ARNm e impiden su actividad en la traducción, de modo que no se preparan en una cantidad excesiva, p. ej., factores de crecimiento. Los mi-ARN son moléculas de ARN de cadena sencilla que se forman a partir de un precursor de doble cadena.

En el caso del componente (α2) distinto de los ácidos nucleicos con una longitud de a lo sumo 300 nucleótidos (α1) se trata, en particular, de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 300 nucleótidos (α2’), así como de ácidos nucleicos de diferentes componentes (α2”).

Ácidos nucleicos con una longitud de al menos 300 nucleótidos (α2’) comprenden, en particular, moléculas de ADN de cadena sencilla o de doble cadena o de ARN de cadena sencilla o de doble cadena, por ejemplo ARNm, ARNr 18S o ARNr 28S.

Como componentes (α2”) diferentes de los ácidos nucleicos entran en consideración, en particular, aquellos componentes que se liberan durante la lisis de una célula. Según ello, estos componentes comprenden, en particular, proteínas, lípidos, polipéptidos o polisacáridos.

En el caso de la fase P_1 fluida, preferiblemente acuosa, proporcionada en la etapa i) del procedimiento se puede tratar de un plasma, de un suero, de un fluido corporal tal como, por ejemplo, sangre, orina, esperma, saliva, líquido cerebroespinal, esputo o un frotis, o bien de un lisado celular, por ejemplo de un lisado de células de tejidos animales o vegetales, de microorganismos tales como, por ejemplo, bacterias, hongos o levaduras, de cultivos tisulares o celulares, o de células de líquidos corporales, tales como, por ejemplo, la sangre.

De acuerdo con una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, en el caso de la fase P_1 fluida, preferiblemente acuosa, proporcionada en la etapa i) del procedimiento se trata de un lisado celular que se puede obtener mediante un procedimiento, que comprende las etapas de procedimiento:

I) provisión de células,

II) lisis de las células, obteniéndose un lisado celular, así como

III) eventualmente, al menos separación parcial del al menos un componente (α2) distinto del ácido nucleico (α1) a partir del lisado celular.

En el caso de las células que se proporcionan en la etapa I) del procedimiento se puede tratar de un corte de tejido eventualmente fijado o de un fragmento de tejido eventualmente fijado, de células adherentes cultivadas, de células cultivadas en suspensión o bien de una célula en un fluido corporal.

En la medida en que en el caso de las células se trate de células adherentes o de células que se encuentran en una asociación tisular, la etapa I) del procedimiento puede comprender eventualmente el lavado de las células adheridas o bien del tejido, el desprendimiento de las células adheridas o bien la eliminación de las células de la asociación tisular con soluciones enzimáticas adecuadas, con soluciones que contienen compuestos complejantes, tal como, por ejemplo, EDTA, o mezclas de los mismos, eventualmente la separación de determinadas poblaciones celulares a partir de las suspensiones celulares así obtenidas, por ejemplo mediante un clasificador de células, la granulación de las células desprendidas o bien eliminadas, el lavado del gránulo celular así obtenido, así como, eventualmente, la re-suspensión en un tampón de suspensión adecuado. Sin embargo, también es imaginable lisar las células adherentes, eventualmente después de una etapa de lavado, sin un previo desprendimiento.

En la medida en que en el caso de las células se trate de células cultivadas en suspensión o de células en un fluido corporal, la etapa I) del procedimiento comprende preferiblemente la granulación de las células suspendidas, eventualmente después de una separación de determinadas poblaciones celulares, por ejemplo mediante un clasificador de células, el lavado del gránulo celular así obtenido, así como, eventualmente la re-suspensión en un tampón de suspensión adecuado.

El tampón de suspensión en el que se re-suspenden eventualmente las células granuladas contiene preferiblemente una o varias sustancias tampón, así como, eventualmente, uno o varios compuestos complejantes. El valor del pH del tampón de suspensión puede variar a lo largo de un amplio intervalo, y para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención, se encuentra preferiblemente en un intervalo de pH de 3 a 11, además de ello, preferiblemente en un intervalo de 5 a 10 y lo más preferiblemente en un intervalo de pH de 7 a 9. En este caso, para el ajuste del valor del pH pueden utilizarse los sistemas tampón conocidos por el experto en la materia. De acuerdo con la invención, se utilizan sistemas tampón basados preferiblemente en tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS), ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) o ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazino]etanosulfónico (HEPES), los cuales contienen el componente tampón en una concentración en un intervalo de 0,5 a 100 mmol/l, además de ello preferiblemente en un intervalo de 1 a 50 mmol/l y lo más preferiblemente en un intervalo de 2,5 a 25 mmol/l. Son imaginables también un sistema tampón basado en acetato alcalino/ácido acético o mezclas a base de un sistema tampón acetato alcalino/ácido acético y un sistema tampón tris(hidroximetil)amino-metano. Como compuestos complejantes pueden emplearse asimismo todos los compuestos que estén en condiciones de complejar particularmente iones calcio. Un compuesto complejante preferido es tetraacetato de etilendiamina (EDTA) que está presente en el tampón de suspensión, preferiblemente en una cantidad en un intervalo de 0,01 a 20 mmol/l, además de ello preferiblemente de 0,1 a 15 mmol/l y lo más preferiblemente de 0,5 a 5 mmol/l.

La cantidad de tampón de suspensión a emplear depende del número de las células proporcionadas. Habitualmente, el tampón de suspensión se emplea en una cantidad en un intervalo de 10 a 2.000 µl, de manera particularmente preferida de 50 a 1.000 µl y lo más preferiblemente de 100 a 500 µl por cada 10^6 células.

Un tampón de suspensión particularmente adecuado de acuerdo con la invención es un tampón que contiene 0,5 a 100 mmol/l, de manera particularmente preferida 1 a 50 mmol/l y de la manera más preferida aproximadamente 2,5 a 25 mmol/l de tris(hidroximetil)aminometano y 0,01 a 20 mmol/l, de manera particularmente preferida 0,1 a 15 mmol/l y lo más preferiblemente 0,5 a 5 mmol/l de EDTA y que presenta un valor del pH en un intervalo de 7 a 9, de manera particularmente preferida de aproximadamente 8.

En la etapa II) del procedimiento se lisan las células proporcionadas, pudiendo emplearse para la lisis de las células todos los procedimientos de lisis conocidos por el experto en la materia que sean adecuados para liberar particularmente material de ARN de las células. Como procedimientos de lisis entran en consideración, en particular, la lisis mediante la acción de calor, la lisis mediante la acción mecánica de fuerza, la lisis mediante enzimas, tales como, por ejemplo, proteína quinasa K, o la lisis mediante la puesta en contacto de las células con un tampón de lisis que contiene un detergente o un compuesto caotrópico o mediante soluciones hipotónicas. Eventualmente, las medidas precedentemente mencionadas pueden también combinarse entre sí disgregando mecánicamente, por ejemplo, las células en un tampón de lisis que contiene un detergente o un compuesto caotrópico o empleando, por ejemplo, un tampón de lisis que contiene proteína quinasa K junto con un compuesto caotrópico.

De manera particularmente preferida, de acuerdo con la invención la lisis de las células tiene lugar mediante un tampón de lisis que contiene un detergente, una enzima, un compuesto caotrópico o una mezcla a base de al menos dos de estos componentes.

Detergentes adecuados son conocidos en gran número del estado de la técnica. Detergentes particularmente preferidos de acuerdo con la invención se eligen del grupo que contiene dodecilsulfato de sodio (SDS), polietilenglicol-fenoléter, tal como, por ejemplo, Triton-X-100, Tween, NP-40 o mezclas de los mismos, siendo SDS y Triton-X-100 particularmente preferidos como detergentes. En la medida en que se emplee SDS como detergente se prefiere, además, de acuerdo con la invención que por cada mol de SDS se empleen 1 a 30 moles, preferiblemente 2 a 20 moles y lo más preferiblemente 3 a 6 moles de NaOH o KOH, de manera particularmente preferida NaOH

para la lisis de las células. En la medida en que el tampón de lisis contenga detergentes, se prefiere además en el procedimiento de acuerdo con la invención, que la lisis de las células en la etapa II) del procedimiento tenga lugar en presencia de 0,01 a 100 µmol, de manera particularmente preferida de 0,1 a 50 µmol y lo más preferiblemente de 0,25 a 5 µmol de detergente por cada 10^6 células. Habitualmente, en el caso del uso de un detergente para la lisis de las células, la lisis de las células tiene lugar en presencia de una concentración de detergente de 0,005 a 5 % (v/v), de manera particularmente preferida de 0,01 a 1 % (v/v) y lo más preferiblemente de 0,025 a 0,5 % (v/v), en la medida en que el caso del detergente se trate de un compuesto líquido a la temperatura ambiente y a la presión atmosférica, o bien en presencia de una concentración de detergente de 0,01 a 1 % en peso, de manera particularmente preferida de 0,25 a 5 % en peso y lo más preferiblemente de 0,05 a 0,4 % en peso, en la medida en que en el caso del detergente se trate de un compuesto sólido a la temperatura ambiente y a la presión atmosférica.

Como compuesto caotrópico se prefieren particularmente sales caotrópicas. Por una sal caotrópica se entiende en el sentido de la invención preferiblemente una sal que tiene una elevada afinidad (demanda, atracción) por el agua y, por lo tanto, configura una envuelta de hidrato sólida grande (agregación a modo de envoltura de moléculas de agua). Sales caotrópicas preferidas son, en particular, isotiocianato de guanidinio o hidrocloruro de guanidinio, siendo particularmente preferido isotiocianato de guanidinio. En la medida en que para la lisis de las células se empleen sales caotrópicas, se prefiere, además, en el procedimiento de acuerdo con la invención que la lisis de las células en la etapa II) del procedimiento tenga lugar a una concentración de la sal caotrópica de 0,5 a 10 mol/l, de manera particularmente preferida de 1 a 5 mol/l y lo más preferiblemente de 2 a 3,5 mol/l. En la medida en que el tampón de lisis contenga sales caotrópicas, puede ser eventualmente también ventajoso que el tampón de lisis contenga un disolvente orgánico miscible con agua, por ejemplo un alcohol miscible con agua tal como etanol o isopropanol, en una cantidad en un intervalo de 10 a 60 % en vol., de manera particularmente preferida de 20 a 50 % en vol.

Como enzimas son particularmente preferidas proteasas, siendo particularmente preferidas entre éstas tripsina, proteinasa K, quimotripsina, papaína, pepsina, pronasa y endoproteinasa Lys-C y siendo la más preferida proteinasa K. La concentración de la enzima en el tampón de lisis se encuentra preferiblemente en un intervalo de 0,01 a 10 % en peso, de manera particularmente preferida de 0,1 a 5 % en peso y lo más preferiblemente de 0,2 a 1 % en peso, en cada caso referido al peso total del tampón de lisis.

La concentración en detergente, en sal caotrópica o en enzima en el tampón de lisis depende, entre otros, de la cantidad de las células a lisar, así como del tipo y modo de la provisión de las células en la etapa I) del procedimiento. Si las células a lisar se suspenden primeramente en un tampón de suspensión, entonces el tampón de lisis contiene el detergente, la sal caotrópica o la enzima en una concentración que es mayor que la concentración de estos componentes que debe estar presente durante la lisis de las células. De este tampón de lisis concentrado se añade entonces a la suspensión de células una cantidad tal que sea suficiente para ajustar en la suspensión de células una concentración de sal caotrópica, detergente o bien enzima, necesaria y precedentemente descrita para una lisis lo más completa posible de las células. Por el contrario, si el tampón de lisis se aplica, por ejemplo, directamente sobre células adherentes o se pone en contacto con un sedimento celular, entonces el tampón de lisis contiene el detergente, la sal caotrópica o la enzima preferiblemente en la concentración que se presenta también durante la lisis de las células.

De acuerdo con una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, la lisis de las células tiene lugar en presencia de 0,1 a 1 mol/l, de manera particularmente preferida de 0,2 a 0,8 mol/l y lo más preferiblemente de 0,3 a 0,7 mol/l de una sal alcalina, siendo preferidos cloruro de sodio, cloruro de potasio o cloruro de litio, y siendo particularmente preferido cloruro de sodio. Si las células a lisar se suspenden primeramente en un tampón de suspensión, entonces se puede añadir ya al tampón de suspensión una cantidad correspondiente de la sal alcalina, o se añade un tampón de lisis al tampón de suspensión que contiene la sal alcalina en una concentración correspondientemente elevada. Por el contrario, si el tampón de lisis se aplica, por ejemplo, directamente sobre células adherentes o se pone en contacto con un sedimento celular, entonces se prefiere que el tampón de lisis contenga la sal alcalina en los intervalos de concentraciones precedentemente descritos.

Un tampón de lisis particularmente adecuado de acuerdo con la invención, que puede ser añadido a una suspensión de células, es un tampón que contiene 1 a 200 mmol/l, de manera particularmente preferida 5 a 150 mmol/l y lo más preferiblemente de aproximadamente 10 a 100 mol/l de NaOH y 0,01 a 1 % (v/v), de manera particularmente preferida 0,025 a 0,5 % (v/v) y lo más preferiblemente 0,05 a 0,4 % (v/v) de SDS y que presenta un valor del pH en un intervalo de 5 a 7, de manera particularmente preferida de aproximadamente 5,5. En este caso, se prefiere que este tampón de lisis se añada a la suspensión de células en una relación en volumen de preferiblemente 3:1 a 1 :3, de manera particularmente preferida de 2:1 a 1:2 y lo más preferiblemente en una relación en volumen de aproximadamente 1:1.

Un tampón de lisis particularmente adecuado de acuerdo con la invención, que puede ser añadido a un sedimento celular, a células adherentes o a un corte de tejido o bien fragmento de tejido es

- un tampón que contiene 0,1 a 1 mol/l, de manera particularmente preferida 0,25 a 0,75 mol/l y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,4 a 0,6 mol/l de NaCl y 0,1 a 10 % (v/v), de manera particularmente preferida

de 0,5 a 5 % (v/v) y lo más preferiblemente 0,75 a 1,5 % (v/v) de Triton-X-100 y que presenta un valor del pH en un intervalo de 6 a 8, de manera particularmente preferida de aproximadamente 7, o

- un tampón que contiene 0,5 a 10 mol/l, de manera particularmente preferida 1 a 5 mol/l y lo más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a 3 mol/l de isotiocianato de guanidinio, 1 a 50 mmol/l, de manera particularmente preferida 5 a 40 mmol/l y lo más preferiblemente 10 a 20 mmol/l de citrato de sodio, así como 10 a 60 % (v/v), de manera particularmente preferida 20 a 50 % (v/v) y lo más preferiblemente 30 a 40 % (v/v) de etanol y que presenta un valor del pH en un intervalo de 6 a 8, de manera particularmente preferida de aproximadamente 7,

añadiéndose este tampón de lisis a las células a lisar preferiblemente en una cantidad en un intervalo de 50 a 2.000 µl, de manera particularmente preferida de 100 a 1.000 µl y lo más preferiblemente de 150 a 300 µl por cada 10^6 células.

Si en el caso de las células se trata de un corte de tejido o de un fragmento de tejido, entonces la provisión de las células en la etapa I) del procedimiento comprende preferiblemente la puesta en contacto del corte de tejido o bien del fragmento de tejido con nitrógeno líquido inmediatamente después de la toma de una planta o de un animal. El corte de tejido o el fragmento de tejido se pone entonces en contacto, preferiblemente de forma directa, con el tampón de lisis y se homogeneiza eventualmente mediante un dispositivo de homogeneización adecuado.

Después de haber puesto en contacto las células con el tampón de lisis, la lisis de las células tiene lugar en un intervalo de temperaturas de 15 a 40ºC, pero de manera particularmente preferida a la temperatura ambiente durante un intervalo de tiempo de 1 a 60 minutos, de manera particularmente preferida de 2 a 15 minutos.

Antes de que entonces el lisado celular como fase P_1 acuosa en la etapa ii) del procedimiento se ponga en contacto con la matriz de intercambio de aniones, de acuerdo con una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención puede ser además ventajoso separar del lisado celular previamente uno o varios de los componentes (α2) distintos del ácido nucleico (α1). Para esta separación pueden pasar a utilizarse básicamente todos los procedimientos de separación conocidos por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, reacciones de precipitación, una separación mediante diálisis o cromatografía o bien una extracción, siendo particularmente preferida una extracción, en particular una extracción con fenol ácido o mezclas a base de fenol y cloroformo, y siendo la más preferida una extracción con fenol ácido. En este caso, el fenol ácido se pone en contacto con el lisado celular preferiblemente en una relación en volumen en un intervalo de 3:1 a 1:3, de manera particularmente preferida de 2:1 a 1:2 y lo más preferiblemente en una relación en volumen de aproximadamente 1:1, y se mezcla a fondo, por ejemplo con un vórtice. A continuación, la composición se centrifuga y la fase acuosa se separa de la fase orgánica. En la fase acuosa separada, que se aporta entonces como fase P_1 a la etapa ii) del procedimiento, se han empobrecido de esta manera uno o varios de los componentes distintos del ácido nucleico (α1).

En la etapa ii) del procedimiento de acuerdo con la invención, la fase P_1 acuosa se pone entonces en contacto con una matriz de intercambio de aniones con el fin de unir el ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones.

De acuerdo con la reivindicación 1, la etapa ii) comprende la puesta en contacto de la fase P_1 con una matriz de intercambio de aniones para la unión del ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones, presentando la matriz de intercambio de aniones grupos funcionales elegidos del grupo que contiene grupos amino, grupos hidrazina y grupos imina, los cuales, en las condiciones bajo las cuales la fase P_1 acuosa se pone en contacto con la matriz de intercambio de aniones, se presentan al menos en parte en forma catiónica, y en donde la matriz de intercambio de aniones se presenta en forma de un revestimiento sobre partículas magnéticas y tiene lugar la unión del ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones a un valor del pH en un intervalo de 2 a 7, y en donde las partículas magnéticas se separan como agregados magnéticos de la fase P_1.

Como matriz de intercambio de aniones pueden emplearse en este caso, básicamente, todos los materiales reivindicados que presenten grupos funcionales reivindicaos que, en las condiciones bajo las cuales se pone en contacto la fase P_1 acuosa con la matriz de intercambio de aniones, en particular bajo las condiciones de pH, se presentan al menos en parte en forma catiónica.

En el caso de la matriz de intercambio de aniones se trata preferiblemente de un sólido que comprende una estructura fundamental eléctricamente neutra. Esta estructura fundamental está definida por el tamaño, la forma, la porosidad, las propiedades mecánicas y los grupos funcionales cargados positivamente, unidos preferiblemente de manera covalente a la estructura del sólido. Las clases de materiales de la estructura fundamental más frecuentes son ácido silícico, polisacáridos y poliolefinas sintéticas, pasando a emplearse como poliolefinas principalmente resinas de poliestireno o poli(met)acrílicas. Resinas poli(met)acrílicas comprenden polímeros de numerosas amidas del ácido (met)acrílico sustituidas (= poli(met)acrilamidas) y ésteres del ácido (met)acrílico (= poli(met)acrilatos), en donde el monómero de ácido (met)acrílico puede portar sustituyentes alquilo en el átomo C-2 o en el átomo C-3. Como grupos funcionales que están unidos a la estructura fundamental se prefieren grupos funcionales elegidos del grupo que contiene grupos amino primarios, secundarios o terciarios, grupos hidrazina y grupos imina. En calidad de matriz de intercambio de aniones los más preferidos son materiales de la estructura a los que están unidos de manera covalente grupos dietilaminoetilo (DEAE, $[(CH_3CH_2)_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}]_n$, en particular DEAE-celulosa, así como polietileniminas lineales o ramificadas que comprenden grupos $[\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH\text{-}]$ y/o grupos $[\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}$

$N(CH_2CH_2NH_2)$-]. De acuerdo con la invención, la matriz de intercambio de aniones está presente en forma de un revestimiento sobre partículas magnéticas, lo más preferiblemente sobre partículas superparamagnéticas, ferrimagnéticas o ferromagnéticas. Las partículas magnéticas presentan, frente a partículas no magnéticas, la ventaja de que forman agregados magnéticos y, por lo tanto, pueden ser separados de la fase P_1 acuosa de manera cuidadosa, rápida y eficaz.

Partículas magnéticas preferidas que pueden ser revestidas con la matriz de intercambio de aniones se pueden adquirir, por ejemplo de las razones sociales Dynal, Advanced Magnetics Inc., Biotechnologies Ltd., Amersham, Promega, Scigen, Advanced Genetic Technologies y Seradyn. Partículas magnéticas adecuadas son particularmente aquellas que se describen en el documento WO-A-83/03920, así como las partículas comercializadas como DYNA-BEADS por la razón social Dynal AS (Oslo, Noruega). Cuando como matriz de intercambio de aniones se emplean polietileniminas, entonces son particularmente preferidas partículas magnéticas funcionalizadas con epóxido, por ejemplo aquellas que se pueden obtener bajo la denominación “M-PVA E0x” de la razón social Chemagen AG, Baesweiler, Alemania. También es imaginable el empleo de partículas funcionalizadas con carboxilato, que también se pueden obtener de la razón social Chemagen AG bajo las denominaciones de productos “M-PVA C11” o “M-PVA C12”. Preferiblemente, las partículas magnéticas presentan un diámetro medio de partícula en un intervalo de 0,1 a 100 µm, de manera particularmente preferida de 0,5 a 50 µm y lo más preferiblemente de 1 a 10 µm, mientras que la superficie específica se encuentra preferiblemente en un intervalo de 0,5 a 250 m^2/g, de manera particularmente preferida en un intervalo de 1 a 50 m^2/g.

De acuerdo con la invención la unión de los ácidos nucleicos (α1) a la matriz de intercambio de aniones en la etapa ii) del procedimiento tiene lugar a un valor del pH en un intervalo de 2 a 7 o de 3 a 7 y lo más preferiblemente en un intervalo de 4 a 6.

En la medida en que la fase P_1 acuosa empleada en la etapa ii) del procedimiento presente un valor del pH que se desvíe de estos valores de pH, lo cual puede ser el caso particularmente al utilizar un tampón de lisis con contenido en SDS alcalino, puede ser entonces necesario ajustar al valor deseado, antes o durante la puesta en contacto de la fase P_1 acuosa con la matriz de intercambio de aniones, el valor del pH en la fase acuosa, por ejemplo mediante la adición de un tampón de neutralización. Preferiblemente, este tampón de neutralización contiene una sal alcalina del ácido acético de manera particularmente preferida acetato de potasio, en una concentración en un intervalo de 10 a 10.000 mmol/l, de manera particularmente preferida en un intervalo de 50 a 5.000 mmol/l y lo más preferiblemente en un intervalo de 100 a 1.000 mmol/l, presentando la solución de neutralización preferiblemente un valor del pH en un intervalo de 2 a 8, de manera particularmente preferida en un intervalo de 4 a 6. El ajuste del valor del pH a un valor dentro de los intervalos precedentemente descritos en la solución de la sal alcalina del ácido acético tiene lugar preferiblemente mediante la adición de ácido acético.

Además, de acuerdo con una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención puede preferirse que la unión del ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones en la etapa ii) del procedimiento tenga lugar en presencia de una sal alcalina, preferiblemente en presencia de cloruro de potasio, cloruro de sodio o cloruro de litio, pero de manera particularmente preferida en presencia de cloruro de sodio, encontrándose la concentración de estas sales alcalinas durante la unión preferiblemente en un intervalo de 0,01 a 10 mol/l, de manera particularmente preferida en un intervalo de 0,05 a 5 mol/l y lo más preferiblemente en un intervalo de 0,25 a 0,75 mol/l. El ajuste de estas concentraciones salinas durante la unión puede tener lugar debido a que en la fase P_1 acuosa ya presente, por ejemplo se añada a un lisado celular una solución salina correspondientemente concentrada, o bien al suspender células en presencia de un tampón de suspensión o bien lisar células en presencia de un tampón de lisis que presenta una concentración salina correspondiente.

Además, de acuerdo con una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención puede preferirse que la unión del ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones en la etapa ii) del procedimiento tenga lugar en presencia de una sustancia caotrópica, en particular de una sal caotrópica, tal como, por ejemplo, isotiocianato de guanidinio, encontrándose la concentración de estas sales caotrópicas durante la unión preferiblemente en un intervalo de 0,1 a 10 mol/l, de manera particularmente preferida en un intervalo de 0,5 a 5 mol/l y lo más preferiblemente en un intervalo de 1 a 3 mol/l. Además, en el caso de esta forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, puede ser también ventajoso llevar a cabo la unión en presencia de disolventes orgánicos miscibles con agua, en particular en presencia de alcoholes, tales como etanol o isopropanol, en una concentración en un intervalo de 10 a 70 % en vol. de manera particularmente preferida de 20 a 60 % en vol.

En el caso del empleo de partículas revestidas con la matriz de intercambio de aniones, la unión tiene lugar preferiblemente debido a que la fase P_1 acuosa, puesta en contacto con las partículas, es movida de forma continua, por ejemplo mediante un agitador, teniendo lugar también en este caso la unión preferiblemente a temperaturas en un intervalo de 1 a 30ºC, de manera particularmente preferida de 2 a 25ºC, por ejemplo a la temperatura ambiente.

Después de la unión de los ácidos nucleicos (α1) a la matriz de intercambio de aniones, ésta se lava en la etapa iii) del procedimiento mediante un tampón de lavado. En el caso de emplear partículas magnéticas revestidas con una matriz de intercambio de aniones, el lavado tiene lugar preferiblemente debido a que el recipiente de reacción, en el que se encuentran las partículas magnéticas puestas en contacto con la fase P_1 acuosa, se pone en contacto con un

imán, de modo que en virtud del campo magnético las partículas magnéticas permanecen adheridas a las paredes internas del recipiente de reacción. La fase P_1 acuosa puede ser fácilmente retirada bajo estas condiciones y reemplazada por el tampón de lavado. Dispositivos adecuados para ello se pueden adquirir, por ejemplo, de la razón social Dynal, Oslo, Noruega.

En el caso del tampón de lavado se puede tratar, por ejemplo, de agua exenta de RNasa, de mezclas a base de agua y disolventes orgánicos hidrosolubles, tales como, por ejemplo, mezclas a base de agua con 1 a 80 % en vol. de un alcohol hidrosoluble, por ejemplo con 1 a 80 % en vol. de etanol o isopropanol, o de soluciones salinas acuosas, en particular soluciones de acetato acuosas, por ejemplo solución de acetato de sodio acuosa con una concentración de acetato de sodio en un intervalo de 1 a 50 mmol/l, de manera particularmente preferida de 5 a 25 mmol/l, en donde el tampón de lavado preferiblemente un valor del pH en un intervalo de 4 a 9, particularmente preferido.

La etapa del lavado puede repetirse, en caso necesario, una, dos, tres veces, eventualmente también con mayor frecuencia, bajo el empleo de un tampón de lavado en cada caso reciente.

Después de la unión del ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones en la etapa ii) del procedimiento y del lavado en la etapa iii) del procedimiento, en la etapa iv) del procedimiento tiene lugar la elución del ácido nucleico (α1) unido a la matriz de intercambio de aniones, obteniéndose una fase P_2 fluida, preferiblemente acuosa, que contiene el ácido nucleico (α1).

Preferiblemente, la elución tiene lugar poniendo en contacto la matriz de intercambio de aniones con un tampón de elución que disuelve los grupos funcionales de la matriz de intercambio de aniones y del ácido nucleico (α1) de modo que se obtiene un material eluido con contenido en ácido nucleico (α1) como fase P_2 fluida.

En el caso de emplear partículas magnéticas revestidas con una matriz de intercambio de aniones, la elución tiene lugar preferiblemente debido a que el recipiente de reacción, en el que se encuentran las partículas magnéticas puestas en contacto con la fase P_1 acuosa o con el tampón de lavado, se pone en contacto con un imán de modo que, en virtud del campo magnético, las partículas magnéticas permanecen adheridas a las paredes internas del recipiente de reacción. La fase P_1 acuosa o bien el tampón de lavado pueden ser retirados fácilmente bajo estas condiciones y ser reemplazados por el tampón de elución.

En el caso del tampón de elución se trata preferiblemente de una solución salina acuosa, en particular de soluciones acuosas que contienen haluros alcalinos, tales como, por ejemplo, NaCl, KCl o LiCl, haluros alcalinotérreos, tales como, por ejemplo, $CaCl_2$ o $MgCl_2$, sales de amonio, tales como, por ejemplo, cloruro de amonio o sulfato de amonio, o mezclas a base de al menos dos de estas sales, pudiendo contener el tampón de elución eventualmente también sistemas tampón, tales como, por ejemplo, acetato alcalino/ácido acético o sistemas tampón basados en tris(hidroximetil)amino-metano.

De acuerdo con una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, el tampón de elución contiene sales de calcio hidrosolubles tales como $CaCl_2$, sales de magnesio tales como $MgCl_2$, sales de amonio hidrosolubles tales como sulfato de amonio o cloruro de amonio o mezclas a base de al menos dos de estas sales. Si el tampón de elución contiene $CaCl_2$, entonces esta sal está presente preferiblemente en una concentración en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l, de manera particularmente preferida de 5 a 500 mmol/l y lo más preferiblemente de 10 a 100 mmol/l. Si el tampón de elución contiene $MgCl_2$, entonces esta sal está presente preferiblemente en una concentración en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l, de manera particularmente preferida de 5 a 500 mmol/l y lo más preferiblemente de 10 a 100 mmol/l. Si el tampón de elución contiene sulfato de amonio y/o cloruro de amonio, entonces estas sales están presentes preferiblemente en una concentración global en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l, de manera particularmente preferida de 5 a 500 mmol/l y lo más preferiblemente de 20 a 300 mmol/l. El valor del pH del tampón de elución se encuentra preferiblemente en un intervalo de 5 a 12, preferiblemente de 6 a 10 y de manera particularmente preferida de 7 a 10.

Particularmente, tampones de elución que contienen como sales de preferencia exclusivamente sales de calcio, en particular $CaCl_2$, y/o sales de amonio, preferiblemente sulfato de amonio y/o cloruro de amonio, son particularmente adecuados para enriquecer selectivamente mi-ARN en comparación con ARNt. Así, con tampones de elución consistentes en agua y $CaCl_2$ en una concentración de preferiblemente hasta 60 mmol/l y también con tampones de elución consistentes en agua y sulfato de amonio y cloruro de amonio en una concentración de preferiblemente hasta 170 a 200 mmol/l se puede alcanzar un buen enriquecimiento de mi-ARN con un empobrecimiento simultáneo de ARNt, de modo que estos tampones de elución son particularmente adecuados para el enriquecimiento selectivo de mi-ARN a partir de composiciones con contenido en mi-ARN y ARNt.

Tampones de elución particularmente adecuados de acuerdo con la invención son

- un tampón de elución EP_1 que contiene 1 a 10.000 mmol/l, de manera particularmente preferida 10 a 5.000 mmol/l y lo más preferiblemente 50 a 1.000 mmol/l de TRIS, 1 a 1.000 mmol/l, preferiblemente 5 a 800 mmol/l y lo más preferiblemente 10 a 500 mmol/l de una sal alcalina, preferiblemente NaCl o KCl, 1 a 400 mmol/l, de manera particularmente preferida 10 a 300 mmol/l y lo más preferiblemente 50 a 200 mmol/l de una sal de amonio, preferiblemente sulfato de amonio o cloruro de amonio, así como 0,1 a 200 mmol/l, de

manera particularmente preferida 0,5 a 100 mmol/l y lo más preferiblemente 1 a 50 mmol/l de una sal de magnesio, preferiblemente cloruro de magnesio, disuelta en agua y que presenta preferiblemente un valor del pH en un intervalo de 7 a 11, de manera particularmente preferida de 8 a 10;

- un tampón de elución EP_2 que contiene 1 a 1.000 mmol/l, de manera particularmente preferida 5 a 500 mmol/l y lo más preferiblemente 10 a 100 mmol/l de una sal de magnesio, preferiblemente cloruro de magnesio, disuelta en agua y que presenta preferiblemente un valor del pH en un intervalo de 6 a 10, de manera particularmente preferida de 7 a 9;

- un tampón de elución EP_3 que contiene 1 a 1.000 mmol/l, de manera particularmente preferida 5 a 500 mmol/l y lo más preferiblemente 10 a 100 mmol/l de una sal de calcio, preferiblemente cloruro de calcio, disuelta en agua y que presenta preferiblemente un valor del pH en un intervalo de 6 a 10, de manera particularmente preferida de 7 a 9;

- un tampón de elución EP_4 que contiene 1 a 1.000 mmol/l, de manera particularmente preferida 5 a 500 mmol/l y lo más preferiblemente 20 a 300 mmol/l de una sal de amonio, preferiblemente cloruro de amonio o sulfato de amonio, disuelta en agua y que presenta preferiblemente un valor del pH en un intervalo de 6 a 10, de manera particularmente preferida de 7 a 9;

- un tampón de elución EP_5 que contiene 1 a 2.000 mmol/l, de manera particularmente preferida 10 a 1.000 mmol/l y lo más preferiblemente 100 a 500 mmol/l de una sal de alcalina, preferiblemente cloruro de potasio, cloruro de sodio o cloruro de litio, disuelta en agua y que presenta preferiblemente un valor del pH en un intervalo de 6 a 10, de manera particularmente preferida de 7 a 9.

En particular, los tampones de elución EP_1 a EP_4 son adecuados con el fin de purificar mi-ARN a partir de composiciones con contenido en mi-ARN y ARNt, mientras que el tampón de elución EP_5 es particularmente adecuado para purificar en general ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos, en particular menor que 100 nucleótidos, a partir de composiciones que, junto a estos nucleótidos, contienen además ácidos nucleicos de cadena larga. Con una concentración creciente de Mg^{2+}, Ca^{2+} o bien NH_4^+ en los tampones de elución EP_2 a EP_4 puede regularse además de manera selectiva el enriquecimiento de mi-ARN con respecto a ARNt a partir de composiciones con contenido en mi-ARN y ARNt.

De acuerdo con una forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, se prefiere que la cantidad relativa de ARN con una longitud menor que 300 nucleótidos, preferiblemente menor que 100 nucleótidos y lo más preferiblemente menor que 25 nucleótidos en la fase P_2 acuosa, referida a la cantidad total de ARN en la fase P_2 acuosa, sea en un factor de al menos 2, de manera particularmente preferida de al menos 4, además de ello preferiblemente de al menos 6, además de ello todavía más preferiblemente de al menos 10 y lo más preferiblemente de al menos 20 mayor que la cantidad relativa de ARN con una longitud menor que 300 nucleótidos, preferiblemente menor que 100 nucleótidos y lo más preferiblemente menor que 25 nucleótidos en la fase P_1 acuosa, referida a la cantidad total de ARN en la fase P_1 acuosa.

En otra forma de realización particular del procedimiento de acuerdo con la invención, en particular en aquella forma de realización en la que se emplea uno de los tampones de elución EP_1 a EP_4, se prefiere que la cantidad relativa de mi-ARN en la fase P_2 acuosa, referida a la cantidad total de mi-ARN y ARNt en la fase P_2 acuosa, sea en un factor de al menos 2, de manera particularmente de al menos 4, además de ello preferiblemente de al menos 6, además de ello todavía más preferiblemente de al menos 10 y lo más preferiblemente de al menos 20 mayor que la cantidad relativa de mi-ARN en la fase P_1 acuosa, referida a la cantidad total de mi-ARN y ARNt en la fase P_1 acuosa.

Se da a conocer también un kit para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos, preferiblemente menor que 100 nucleótidos y lo más preferiblemente menor que 25 nucleótidos, que comprende:

(β1) un tampón de lisis o un concentrado de tampón de lisis,

(β2) una matriz de intercambio de aniones,

(β3) un tampón de elución,

(β4) eventualmente un tampón de suspensión,

(β5) eventualmente un tampón de neutralización,

(β6) eventualmente un tampón de lavado, así como

(β7) eventualmente una sustancia de extracción, por ejemplo fenol, un alcohol, tal como, por ejemplo, etanol, o mezclas de los mismos.

Con un kit de este tipo se puede llevar a cabo el procedimiento precedentemente descrito.

Como tampón de suspensión (β4), tampón de lisis (β1), tampón de neutralización (β5), tampón de lavado (β6) y tampón de elución (β3) se prefieren aquellos tampones que ya han sido mencionados en relación con el procedimiento de acuerdo con la invención como tampones preferidos. En el caso del concentrado de tampón de lisis se trata de un tampón que contiene al compuesto eficaz para la lisis, en particular el detergente o la sal caotrópica, en una concentración que es mayor que la concentración presente en la lisis de las células. Un concentrado de tampón de lisis de este tipo se emplea particularmente cuando como material de partida, a partir del cual se deben aislar los ácidos nucleicos de cadena corta, se deben emplear suspensiones celulares en las que entonces, mediante la adición de cantidades definidas del concentrado del tampón de lisis, se pueden ajustar las condiciones de lisis requeridas para la lisis.

Como matriz de intercambio de aniones (β2) entran en consideración asimismo como materiales los ya mencionados en relación con el procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos como matriz de intercambio de aniones preferida, así como, por ejemplo, en particular, también partículas magnéticas o no magnéticas revestidas con una matriz de intercambio de aniones.

De acuerdo con una forma de realización particular del kit, éste contiene, como matriz de intercambio de aniones (β2), partículas magnéticas revestidas con una matriz de intercambio de aniones, y como tampón de elución (β3), uno de los tampones elegidos del grupo que contiene EP_1, EP_2, EP_3 y EP_4.

Se da conocer, además, el uso del kit precedentemente descrito en el procedimiento descrito al comienzo para la purificación de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos, preferiblemente menor que 200 nucleótidos, de manera particularmente preferida menor que 100 nucleótidos, además de ello preferiblemente menor que 50 nucleótidos y lo más preferiblemente menor que 25 nucleótidos.

La presente invención se refiere, además, al uso de un kit de acuerdo con las reivindicaciones 16 y 17.

Se da a conocer también el uso de una matriz de intercambio de aniones para la purificación de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos, preferiblemente menor que 200 nucleótidos, de manera particularmente preferida menor que 100 nucleótidos, además de ello preferiblemente menor que 50 nucleótidos y lo más preferiblemente menor que 25 nucleótidos, siendo preferidos como matriz de intercambio de aniones y como nucleótidos aquellos compuestos que ya se mencionaron al comienzo en relación con el procedimiento de acuerdo con la invención para la purificación de ácidos nucleicos como componentes preferidos.

Se da a conocer también un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad, que comprende las etapas de procedimiento:

(γ1) diagnóstico de la enfermedad mediante un procedimiento de diagnóstico que comprende el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos, preferiblemente menor que 200 nucleótidos, de manera particularmente preferida menor que 100 nucleótidos, además de ello preferiblemente menor que 50 nucleótidos y lo más preferiblemente menor que 25 nucleótidos de acuerdo con el procedimiento de purificación descrito al comienzo, así como

(γ2) el tratamiento terapéutico de la enfermedad diagnosticada.

Como enfermedad a tratar entran en consideración todas las enfermedades cuyo origen o transcurso se correlacione de alguna manera con el tipo y la cantidad de los ácidos nucleicos presentes en determinadas células del cuerpo o líquidos corporales, con una longitud menor que 300 nucleótidos, preferiblemente menor que 200 nucleótidos, de manera particularmente preferida menor que 100 nucleótidos, además de ello preferiblemente menor que 50 nucleótidos y lo más preferiblemente menor que 25 nucleótidos, pero en particular con el tipo y la cantidad del mi-ARN, ya sea que una modificación del tipo y la cantidad de estos ácidos nucleicos, en comparación con un paciente sano, sea el origen de la enfermedad o que una modificación del tipo y la cantidad de estos ácidos nucleicos, en comparación con un paciente sano, sea una consecuencia de la enfermedad.

La invención se explica ahora con mayor detalle con ayuda de figuras y ejemplos no limitantes.

La Figura 1 muestra un gel de poliacrilamida al 15 %, teñido con nitrato de plata, con el que se separaron los materiales eluidos obtenidos en el Ejemplo 1 (aplicación doble en el gel; a = tampón de lavado después del primer lavado, b = tampón de lavado después del segundo lavado, c = material eluido).

La Figura 2 muestra un gel de poliacrilamida al 15 %, teñido con nitrato de plata, con el que se separaron los materiales eluidos obtenidos en el Ejemplo 2 (aplicación doble en el gel).

La Figura 3 muestra un gel de poliacrilamida al 15 %, teñido con nitrato de plata, con el que se separó el material eluido obtenido en el Ejemplo 3 (aplicación doble en el gel).

La Figura 4 muestra un gel de poliacrilamida al 15 %, teñido con nitrato de plata, con el que se separó el material eluido obtenido en el Ejemplo 4 (aplicación doble en el gel).

La Figura 5 muestra un gel de poliacrilamida al 15 %, teñido con nitrato de plata, con el que se separó el material eluido obtenido en el Ejemplo 5 (aplicación doble en el gel).

Se dan a conocer los siguientes objetos:

1. Un procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos, que comprende las etapas de procedimiento

   (i) provisión de una fase P_1 fluida, preferiblemente acuosa, que contiene

   (α1) al menos un ácido nucleico con una longitud menor que 300 nucleótidos, así como

   (α2) al menos un componente distinto de este ácido nucleico (α1),

   (ii) puesta en contacto de la fase P_1 con una matriz de intercambio de aniones para la unión del ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones,

   (iii) eventualmente, lavado de la matriz de intercambio de aniones con un tampón de lavado, manteniéndose unido el ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones, así como

   (iv) separación, preferiblemente elución del ácido nucleico (α1) unido a la matriz de intercambio de aniones de la matriz de intercambio de aniones, obteniéndose una fase P_2 fluida, preferiblemente acuosa, que contiene el ácido nucleico (α1).

2. Procedimiento según el objeto 1, en el que en el caso del ácido nucleico (α1) se trata de un ARN.

3. Procedimiento según el objeto 2, en el que el ARN se elige de el grupo que contiene mi-ARN, pre-mi-ARN, ARNip, ARNnp, ARNnop, ARNt, ARNr 5S, ARNr 5,8S o mezclas a base de al menos dos de los mismos.

4. Procedimiento según el objeto 3, en el que en el caso del ARN se trata de mi-ARN, pre-mi-ARN, ARNt o mezclas a base de mi-ARN y ARNt.

5. Procedimiento según uno de los objetos precedentes, en el que la matriz de intercambio de aniones presenta grupos funcionales elegidos del grupo que contiene grupos amino, grupos fosfina, grupos hidrazina y grupos imina.

6. Procedimiento según uno de los objetos precedentes, en el que la matriz de intercambio de aniones está presente en forma de un revestimiento sobre una partícula, un filtro, una membrana, un monolito, una placa de microtitulación u otros recipientes de reacción.

7. Procedimiento según el objeto 6, en el que la partícula es una partícula magnética, preferiblemente superparamagnética, ferrimagnética o ferromagnética.

8. Procedimiento según uno de los objetos precedentes, en el que la unión del ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones en la etapa ii) del procedimiento tiene lugar en presencia de 0,01 a 10 mol/l de NaCl.

9. Procedimiento según uno de los objetos precedentes, en el que en el caso del tampón de lavado se trata de agua exenta de ARNasa.

10. Procedimiento según uno de los objetos precedentes, en el que la separación en la etapa iv) del procedimiento tiene lugar mediante un tampón de elución.

11. Procedimiento según el objeto 10, en el que el tampón de elución contiene sales de calcio hidrosolubles, sales de magnesio hidrosolubles, sales de amonio hidrosolubles o mezclas de las mismas.

12. Procedimiento según el objeto 10 u 11, en el que el tampón de elución contiene cloruro de calcio en una concentración en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l.

13. Procedimiento según uno de los objetos 10 a 12, en el que el tampón de elución contiene cloruro de magnesio en una concentración en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l.

14. Procedimiento según uno de los objetos 10 a 13, en el que el tampón de elución contiene sulfato de amonio o cloruro de amonio en una concentración en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l.

15. Procedimiento según uno de los objetos precedentes, en el que la fase P_1 acuosa, proporcionada en la etapa i) del procedimiento, es un lisado celular.

16. Procedimiento según el objeto 15, en el que el lisado celular se puede obtener mediante un procedimiento que comprende las etapas de procedimiento:

I) provisión de células,

II) lisis de las células, obteniéndose un lisado celular, así como

III) eventualmente, al menos separación parcial del al menos un componente (α2) distinto del ácido nucleico (α1) del lisado celular.

17. Procedimiento según uno de los objetos 2 a 16, en el que la cantidad relativa de ARN con una longitud menor que 300 nucleótidos en la fase P_2, referida a la cantidad total de ARN en la fase P_2, es mayor en un factor de al menos 2 que la cantidad relativa de ARN con una longitud menor que 300 nucleótidos en la fase P_1, referida a la cantidad total de ARN en la fase P_1.

18. Procedimiento según uno de los objetos 4 a 17, en el que la cantidad relativa de mi-ARN en la fase P_2 acuosa, referida a la cantidad total de mi-ARN y ARNt en la fase P_2 acuosa, es mayor en un factor de al menos 2 que la cantidad relativa de mi-ARN en la fase P_1 acuosa, referida a la cantidad total de mi-ARN y ARNt en la fase P_1 acuosa.

19. Un kit para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos, que comprende:

(β1) un tampón de lisis o un concentrado de tampón de lisis,

(β2) una matriz de intercambio de aniones,

(β3) un tampón de elución,

(β4) eventualmente un tampón de suspensión,

(β5) eventualmente un tampón de neutralización,

(β6) eventualmente un tampón de lavado, así como

(β7) eventualmente una sustancia de extracción, por ejemplo fenol, un alcohol, tal como, por ejemplo, etanol, o mezclas de los mismos.

20. Kit según el objeto 19, en el que la matriz de intercambio de aniones (β2) presenta grupos funcionales elegidos del grupo que contiene grupos amino, grupos fosfina, grupos hidrazina y grupos imina.

21. Kit según el objeto 19 o 20, en el que la matriz de intercambio de aniones (β2) está presente en forma de un revestimiento sobre una partícula, un filtro, una membrana, un monolito o una placa de microtitulación.

22. Kit según el objeto 21, en el que la matriz de intercambio de aniones (β2) está presente en forma de un revestimiento sobre una partícula magnética, preferiblemente una particular superparamagnética, ferrimagnética o ferromagnética.

23. Kit según uno de los objetos 19 a 22, en el que el tampón de elución (β3) contiene cloruro de calcio en una concentración en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l.

24. Kit según uno de los objetos 19 a 22, en el que el tampón de elución (β3) contiene cloruro de magnesio en una concentración en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l.

25. Kit según uno de los objetos 19 a 22, en el que el tampón de elución (β3) contiene sulfato de amonio o cloruro de amonio en una concentración en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l.

26. Uso del kit según uno de los objetos 19 a 25 para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos.

27. Uso del kit según uno de los objetos 19 a 25 en un procedimiento según uno de los objetos 1 a 18.

28. Uso de una matriz de intercambio de aniones para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos.

29. Un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad, que comprende las etapas de procedimiento:

(γ1) diagnóstico de la enfermedad mediante un procedimiento de diagnóstico que comprende el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos de acuerdo con un procedimiento según uno de los objetos 1 a 18, así como

(γ2) tratamiento terapéutico de la enfermedad diagnosticada.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos mi-ARN se insertaron en un fondo celular

Ejemplo 1

10^6 células Jurkat se mezclaron con 1 µg de mi-ARN antisentido mi-R177 y se lisaron con ayuda de 550 µl de un tampón de lisis que contenía NaCl 0,5 M, Triton-X-100 al 1 % (v/v). Después de incubación durante 10 minutos en hielo se añadieron 550 µl de fenol ácido. Después de someter a vórtice, se centrifugó durante 5 minutos a 20.800 x g, la fase acuosa se retiró y se mezcló con 652 µg de partículas magnéticas, revestidas con polietilenimina.

Las partículas se obtuvieron suspendiendo 4 g de partículas magnéticas funcionalizadas con epóxido (partículas M-PVA E0x de la razón social Chemagen AG, Baesweiler, Alemania) en 50 ml de una solución de polietilenimina de elevado peso molecular al 10 % (Sigma-Aldrich, Aldrich Cat. Nº 40,872-7) en agua, pH 10, se transfirieron a un matraz redondo y, con agitación, se calentaron durante 10 horas a 60ºC. Después, esta mezcla se lavó seis veces con agua desalada bajo separación magnética.

Después de agitar durante 5 minutos en un agitador de placas, se desechó el sobrenadante y se lavó dos veces con 500 µl de agua que había sido ajustada al pH 4,7, 5,5, 7,0 o bien 8,5 (pistas a y b en el gel de la Figura 1). Se eluyó con 20 µl de un tampón que contenía 1 mol/l de Tris/Cl, pH 9,5, 400 mmol/l de KCl, 100 mmol/l de sulfato de amonio y 30 mmol/l de $MgCl_2$. Partes alícuotas de los materiales eluidos se cargaron en un gel de poliacrilamida al 15 % y se tiñeron con nitrato de plata (pistas c en la Figura 1).

Con 0,5 mol/l de NaCl como tampón de lisis se pueden purificar mi-ARN de manera eficiente, en los materiales eluidos están presentes durante la elución ya solo mi-ARN y ARNt, todas las restantes especies de ácidos nucleicos han sido empobrecidas mediante el proceso de purificación.

Ejemplo 2

10^6 células Jurkat se mezclaron con 1 µg de ARN antisentido let7a, se lisaron y se unieron a partículas magnéticas tal como se indica en el Ejemplo 1. Después de dos etapas de lavado con agua, se eluyó con 20 µl de tampón, utilizándose como tampón de elución 100 mmol/l de NaCl, 250 mmol/l de NaCl, 400 mmol/l de NaCl, 100 mmol/l de KCl, 250 mmol/l de KCl y 400 mmol/l de KCl. Partes alícuotas de los materiales eluidos se cargaron sobre un gel de poliacrilamida al 15 % y se tiñeron con nitrato de plata (Figura 2).

En el caso de este ensayo resulta claro que para la elución se adecuan sales en diferentes molaridades. En el caso de utilizar NaCl, KCl y LiCl (datos no mostrados) como tampón de elución se pueden purificar tanto ARNt como mi-ARN en una elevada cantidad.

Ejemplo 3

Se procedió como en el Ejemplo 2, empleándose como tampón de elución tampón con 10 a 100 mmol/l de $MgCl_2$. Partes alícuotas de los materiales eluidos se cargaron sobre un gel de poliacrilamida al 15 % y se tiñeron con nitrato de plata (Figura 3).

Este ensayo demuestra que también con ayuda de $MgCl_2$ como tampón de elución se pueden purificar mi-ARN. Si como tampón de elución se utilizan molaridades bajas de $MgCl_2$, los ARNt, así como ácidos nucleicos más largos son empobrecidos relativamente, mientras que los mi-ARN se pueden encontrar de nuevo con muy buenos rendimientos.

Ejemplo 4

Se procedió como en el Ejemplo 2, empleándose como tampón de elución tampón con 10 a 85 mmol/l de $CaCl_2$. Partes alícuotas de los materiales eluidos se cargaron sobre un gel de poliacrilamida al 15 % y se tiñeron con nitrato de plata (Figura 4).

Hasta una molaridad de $CaCl_2$ de aproximadamente 50 mmol/l se pueden eluir con una muy buena tasa de reencuentro mi-ARN, mientras que en los materiales eluidos solo están presentes trazas de ARNt. Si se continúa aumentando la molaridad, también se pueden eluir ARNt adicionalmente con una buena tasa de reencuentro.

Ejemplo 5

Se procedió como en el Ejemplo 2, empleándose como tampón de elución tampón con 25 a 400 mmol/l de sulfato de amonio o bien 25 a 400 mmol/l de cloruro de amonio. Partes alícuotas de los materiales eluidos se cargaron sobre un gel de poliacrilamida al 15 % y se tiñeron con nitrato de plata (Figura 5).

Junto con cloruro de calcio, ante todo las sales de amonio muestran en el caso de la elución las mejores propiedades como para alcanzar un elevado rendimiento de mi-ARN con un rendimiento de ARNt lo más bajo posible simultáneo. Hasta una concentración de sal de amonio en el material eluido de hasta aproximadamente 170

a 200 mmol/l, el rendimiento en ARNt se mantiene relativamente bajo, mientras que el rendimiento en mi-ARN en el caso de estas molaridades es muy bueno. A partir de una concentración de aproximadamente 400 mmol/l, también se puede encontrar en los materiales eluidos mucho ARNt.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos a partir de una muestra que se elige del grupo consistente en plasma, suero, un fluido corporal, un frotis y un lisado celular, que comprende las etapas de procedimiento

i) provisión de una fase P_1 fluida, preferiblemente acuosa, que contiene

(α1) al menos un ácido nucleico con una longitud menor que 300 nucleótidos, así como

(α2) al menos un componente distinto de este ácido nucleico (α1),

ii) puesta en contacto de la fase P_1 con una matriz de intercambio de aniones para la unión del ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones, presentando la matriz de intercambio de aniones grupos funcionales elegidos del grupo que contiene grupos amino, grupos hidrazina y grupos imina, que están presentes, al menos en parte, en forma catiónica en las condiciones bajo las cuales se pone en contacto la fase P_1 acuosa con la matriz de intercambio de aniones, y la matriz de intercambio de aniones está presente en forma de un revestimiento sobre partículas magnéticas,

y la unión del ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones tiene lugar a un valor del pH en un intervalo de 2 a 7,

y en donde las partículas magnéticas se separan de la fase P1 como agregados magnéticos,

iii) lavado de la matriz de intercambio de aniones con un tampón de lavado, permaneciendo unido el ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones, así como

(iv) elución del ácido nucleico (α1) unido a la matriz de intercambio de aniones de la matriz de intercambio de aniones, obteniéndose una fase P_2 fluida, preferiblemente acuosa, que contiene el ácido nucleico (α1).

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en el caso del ácido nucleico (α1) se trata de un ARN, en donde, opcionalmente

(i) el ARN se elige del grupo que contiene mi-ARN, pre-mi-ARN, ARNip, ARNnp, ARNnop, ARNt, ARNr 5S, ARNr 5,8S o mezclas a base de al menos dos de los mismos, o

(ii) en el caso del ARN se trata de mi-ARN, pre-mi-ARN, ARNt o mezclas a base de mi-ARN y ARNt.

3. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que los ácidos nucleicos se enriquecen a partir de una muestra que se elige del grupo consistente en plasma, suero, un fluido corporal y un lisado celular, en donde, opcionalmente, el fluido corporal es sangre, orina, esperma, saliva, líquido cerebroespinal o esputo.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que en el caso de la fase fluida P_1 proporcionada en la etapa i) del procedimiento se trata de un material que se elige del grupo consistente en plasma, suero y un fluido corporal.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la partícula es una partícula superparamagnética, ferrimagnética o ferromagnética.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-5, en el que el procedimiento abarca una o varias de las siguientes características:

a) para la unión de los ácidos nucleicos, la fase P_1 puesta en contacto con las partículas se mueve continuamente;

b) el ácido nucleico (α1) unido a la matriz de intercambio de aniones se eluye de la matriz de intercambio de aniones mediante reemplazo del tampón de lavado con un tampón de elución,

c) el procedimiento se puede llevar a cabo sin cambiar el recipiente de reacción.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la elución en la etapa iv) del procedimiento tiene lugar mediante un tampón de elución, en donde opcionalmente como tampón de elución se emplea una solución salina acuosa.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el tampón de elución es una solución acuosa que contiene haluros alcalinos, haluros alcalinotérreos, sales de amonio o mezclas a base de al menos dos de estas sales, y en el que el tampón de elución puede contener también sistemas tampón, y/o

el tampón de elución contiene sales de calcio hidrosolubles, preferiblemente $CaCl_2$, sales de magnesio hidrosolubles, preferiblemente $MgCl_2$, sales de amonio hidrosolubles, preferiblemente sulfato de amonio o cloruro de amonio o mezclas a base de al menos dos de estas sales.

9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, caracterizado por que

a) el tampón de elución contiene $CaCl_2$ y presenta una de las siguientes características:

aa) el $CaCl_2$ está presente en una concentración en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l;

ab) el $CaCl_2$ está presente en una concentración en un intervalo de 5 a 500 mmol/l;

ac) el $CaCl_2$ se está presente en una concentración en un intervalo de 10 a 100 mmol/l; o

b) el tampón de elución contiene $MgCl_2$ y presenta una de las siguientes características:

ba) el $MgCl_2$ está presente en una concentración en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l;

bb) el $MgCl_2$ está presente en una concentración en un intervalo de 5 a 500 mmol/l;

bc) el $MgCl_2$ está presente en una concentración en un intervalo de 10 a 100 mmol/l; o

c) el tampón de elución contiene sulfato de amonio y/o cloruro de amonio y presenta una de las siguientes características:

ca) estas sales están presentes en una concentración global en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l;

cb) estas sales están presentes en una concentración global en un intervalo de 5 a 500 mmol/l;

cc) estas sales están presentes en una concentración global en un intervalo de 20 a 300 mmol/l.

10. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado por que el valor del pH del tampón de elución se encuentra en un intervalo de 5 a 12.

11. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que se emplea un tampón de elución que contiene exclusivamente sales de calcio, preferiblemente $CaCl_2$, y/o sales de amonio, preferiblemente sulfato de amonio y/o cloruro de amonio, en el que opcionalmente se emplea un tampón de elución que consiste en agua y $CaCl_2$ en una concentración de hasta 60 mmol/l o que consiste en agua y sulfato de amonio o cloruro de amonio en una concentración de hasta 170 a 200 mmol/l.

12. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que el tampón de elución se elige de:

a) tampón de elución EP_1 que contiene, disueltos en agua,

i) 1 a 10.000 mmol/l, 10 a 5.000 mmol/l o 50 a 1.000 mmol/l de TRIS,

ii) 1 a 1.000 mmol/l, 5 a 800 mmol/l o 10 a 500 mmol/l de una sal alcalina, preferiblemente NaCl o KCl,

iii) 1 a 400 mmol/l, 10 a 300 mmol/l o 50 a 200 mmol/l de una sal de amonio, preferiblemente sulfato de amonio o cloruro de amonio, y

iv) 0,1 a 200 mmol/l, 0,5 a 100 mmol/l o 1 a 50 mmol/l de una sal de magnesio, preferiblemente cloruro de magnesio, en donde el tampón de elución EP_1 presenta preferiblemente un valor del pH en un intervalo de 7 a 11, de manera particularmente preferida de 8 a 10;

b) tampón de elución EP_2 que contiene, disueltos en agua, 1 a 1.000 mmol/l, 5 a 500 mmol/l o 10 a 100 mmol/l de una sal de magnesio, preferiblemente cloruro de magnesio, en donde el tampón de elución EP_2 presenta preferiblemente un valor del pH en un intervalo de 6 a 10, de manera particularmente preferida de 7 a 9;

c) tampón de elución EP_3 que contiene, disueltos en agua, 1 a 1.000 mmol/l, 5 a 500 mmol/l o 10 a 100 mmol/l de una sal de calcio, preferiblemente cloruro de calcio, en donde el tampón de elución EP_3 presenta preferiblemente un valor del pH en un intervalo de 6 a 10, de manera particularmente preferida de 7 a 9;

d) tampón de elución EP_4 que contiene, disueltos en agua, 1 a 1.000 mmol/l, 5 a 500 mmol/l o 20 a 300 mmol/l de una sal de amonio, preferiblemente cloruro de amonio o sulfato de amonio, en donde el tampón de elución EP_4 presenta preferiblemente un valor del pH en un intervalo de 6 a 10, de manera particularmente preferida de 7 a 9;

e) tampón de elución EP_5 que contiene, disueltos en agua, 1 a 2.000 mmol/l, 10 a 1.000 mmol/l o 100 a 500 mmol/l de una sal alcalina, preferiblemente cloruro de potasio, cloruro de sodio o cloruro de litio, en donde el tampón de elución EP_5 presenta preferiblemente un valor del pH en un intervalo de 6 a 10, de manera particularmente preferida de 7 a 9.

13. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la fase P_1 fluida proporcionada en la etapa i) del procedimiento es un lisado celular que se puede obtener mediante un procedimiento, que comprende las etapas de procedimiento:

I) provisión de células,

II) lisis de las células, obteniéndose un lisado celular, así como

III) eventualmente, al menos separación parcial del al menos un componente (α2) distinto del ácido nucleico (α1) a partir del lisado celular.

14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 13, en el que la cantidad relativa de ARN con una longitud menor que 300 nucleótidos en la fase P_2, referida a la cantidad total de ARN en la fase P_2 acuosa, es en un factor de al menos 2 mayor que la cantidad relativa de ARN con una longitud menor que 300 nucleótidos en la fase P_1, referida a la cantidad total de ARN en la fase P_1, o

en el que la cantidad relativa de mi-ARN en la fase P_2 acuosa, referida a la cantidad total de mi-ARN y ARNt en la fase P_2 acuosa, es en un factor de al menos 2 mayor que la cantidad relativa de mi-ARN en la fase P_1 acuosa, referida a la cantidad total de mi-ARN y ARNt en la fase P_1 acuosa.

15. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado por que la unión del ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones en la etapa ii) del procedimiento tiene lugar en presencia de una sal alcalina, preferiblemente cloruro de sodio, encontrándose la concentración de la sal alcalina durante la unión en un intervalo de 0,01 a 10 mol/l, preferiblemente de 0,05 a 5 mol/l, de manera particularmente preferida de 0,25 a 0,75 mol/l, y/o

por que la unión del ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio de aniones en la etapa ii) del procedimiento tiene lugar a un valor del pH en un intervalo de 4 a 6.

16. Uso de un kit para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud menor que 300 nucleótidos en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el kit comprende:

(β1) un tampón de lisis o un concentrado de tampón de lisis,

(β2) una matriz de intercambio de aniones, presentando la matriz de intercambio de aniones grupos funcionales elegidos del grupo que contiene grupos amino, grupos hidrazina y grupos imina, y estando presente la matriz de intercambio de aniones en forma de un revestimiento sobre partículas magnéticas,

(β3) un tampón de elución, en donde, opcionalmente, el tampón de elución es un tampón de elución conforme a la reivindicación 12,

(β4) eventualmente un tampón de suspensión,

(β5) eventualmente un tampón de neutralización,

(β6) eventualmente un tampón de lavado, así como

(β7) eventualmente una sustancia de extracción.

17. Uso según la reivindicación 16, en donde la partícula magnética es una partícula superparamagnética, ferrimagnética o ferromagnética.

Fig. 1/5

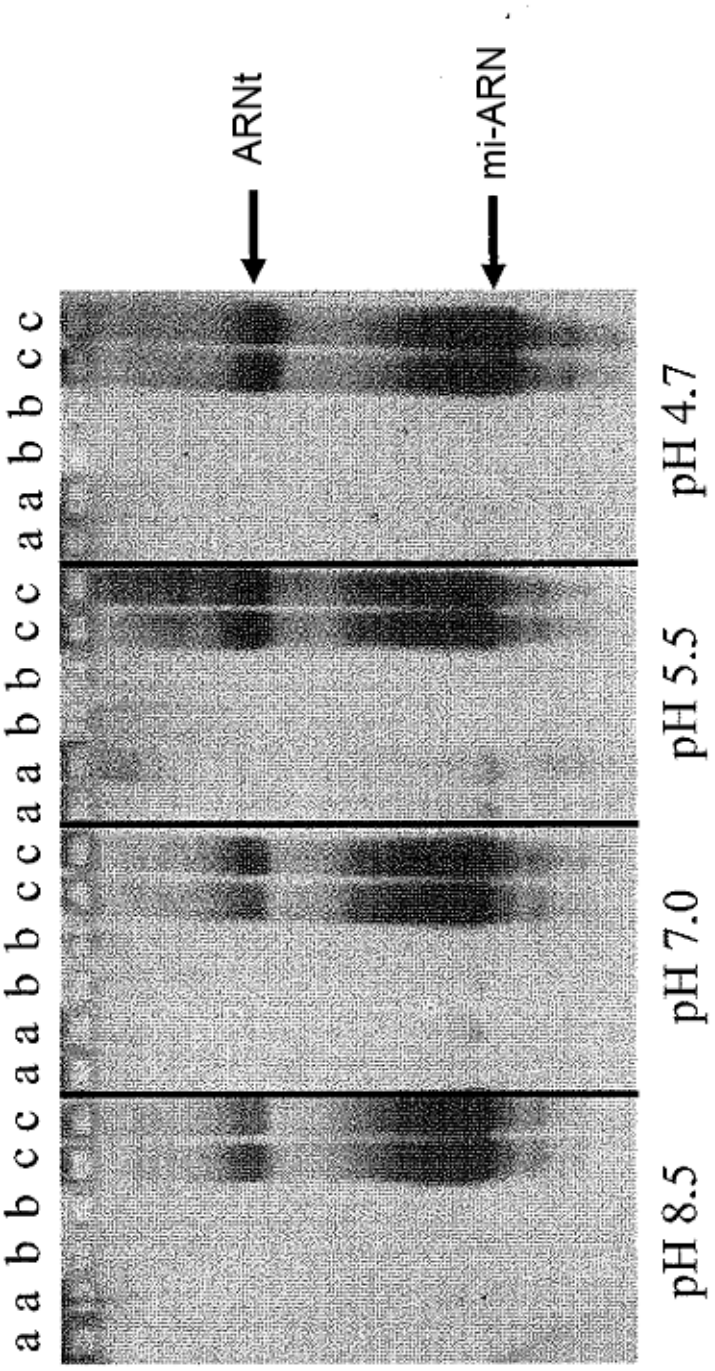


Fig. 2/5

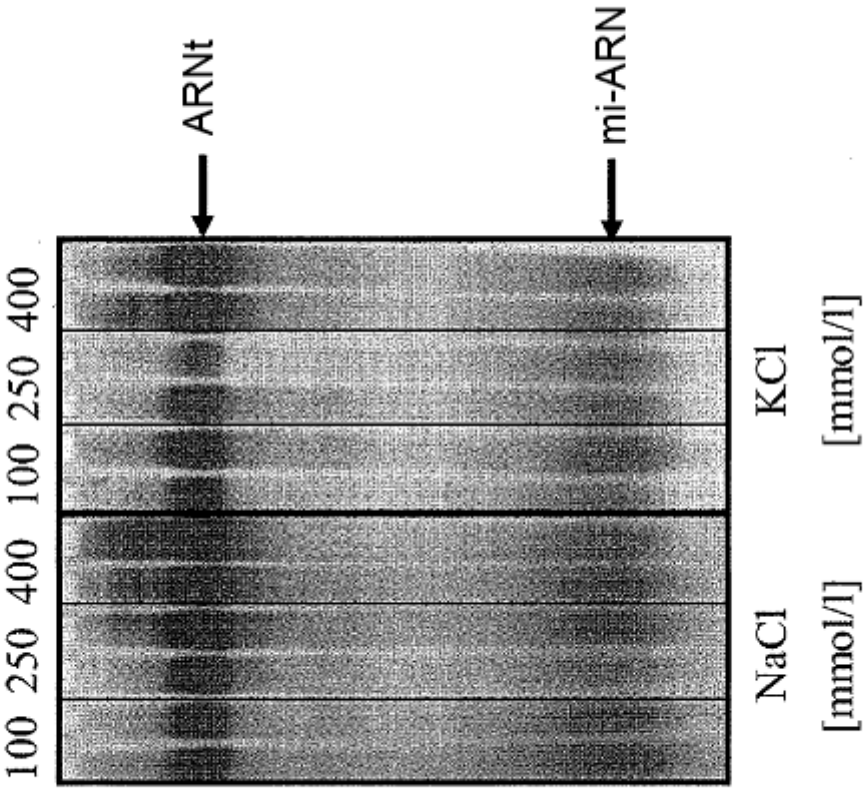


Fig. 3/5

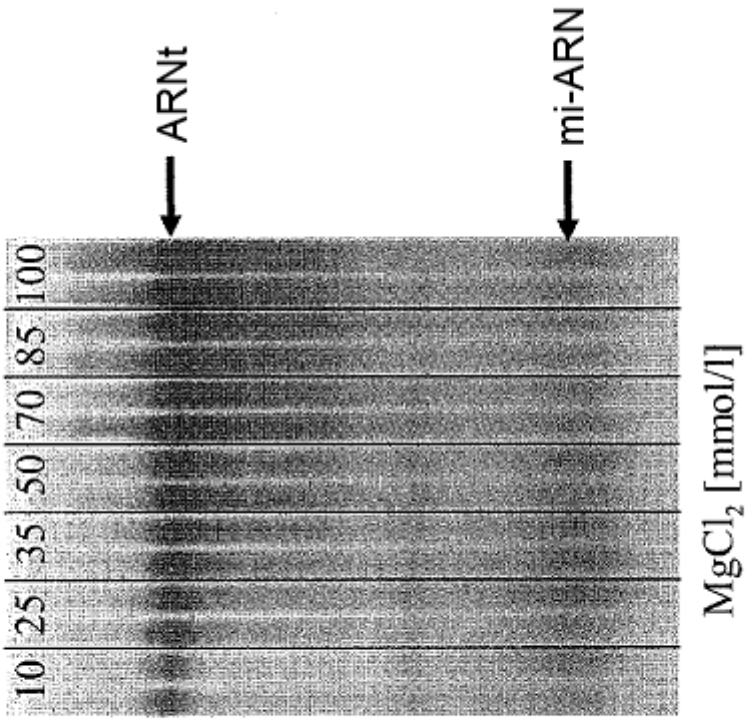


Fig. 4/5

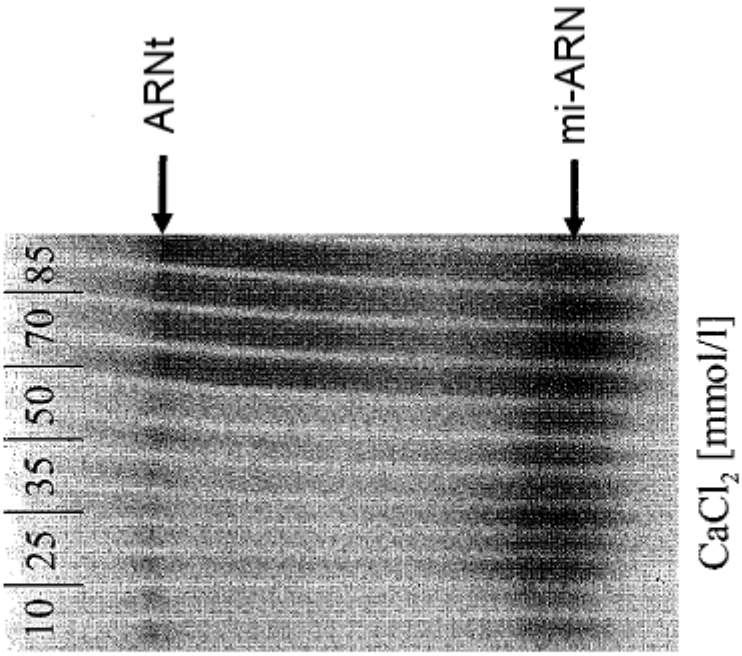
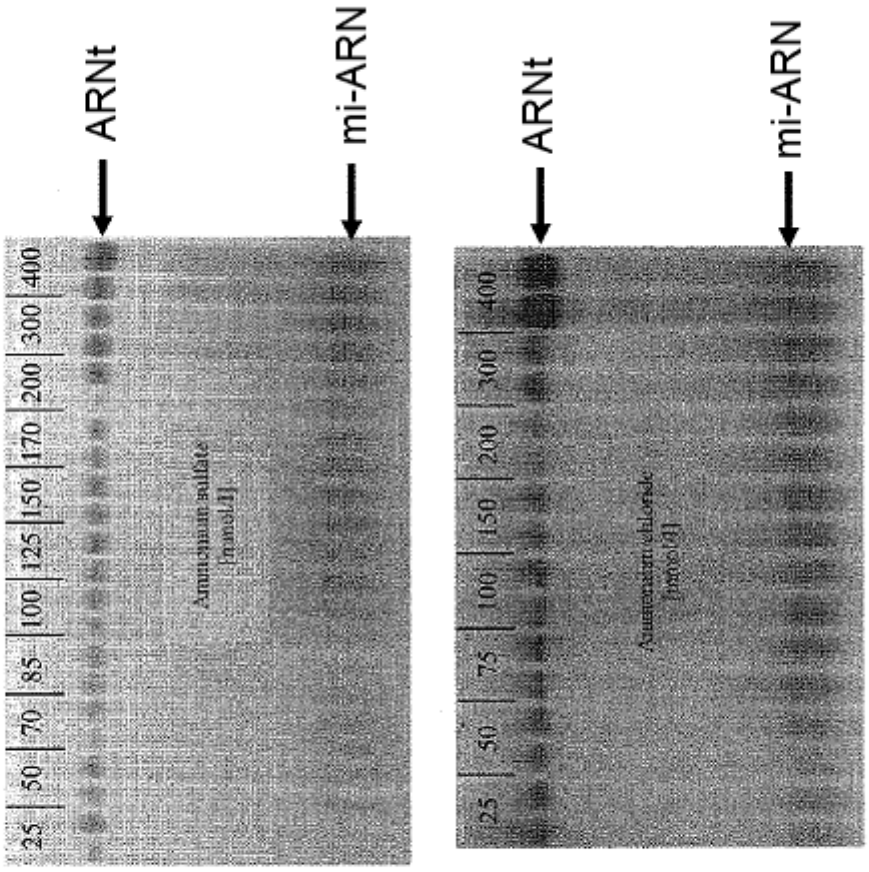


Fig. 5/5


ARNt
mi-ARN
25
50
70
85
100
125
150
170
200
300
400
ARNt
mi-ARN
25
50
75
100
150
200
300
400