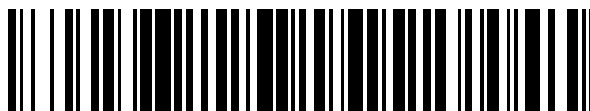


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 220**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2014** **PCT/EP2014/067453**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2015** **WO15022410**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2014** **E 14752322 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020** **EP 3033421**

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

30 Prioridad:

16.08.2013 US 201313968497

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

04.08.2020

73 Titular/es:

**GLOBAL LIFE SCIENCES SOLUTIONS
OPERATIONS UK LTD (100.0%)
19 Jessops Riverside, 800 Brightside Lane
Sheffield, S9 2RX, GB**

72 Inventor/es:

**KVAM, ERIK, LEEMING;
LI, BING y
BALES, BRIAN, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 777 220 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos

Campo

- 5 La invención se refiere a sustratos sólidos y métodos para extracción y estabilización ambiental de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica en un formato seco. Se describen también métodos para recoger, extraer, preservar, y recuperar ácidos nucleicos a partir del sustrato sólido seco.

Antecedentes

- 10 La preservación de la integridad estructural y funcional de las biomoléculas durante el aislamiento o purificación de una muestra biológica es esencial para diversas aplicaciones situadas aguas abajo. Las aplicaciones de aguas abajo de biomoléculas purificadas pueden incluir aplicaciones de detección de analitos, de sensibilización, forenses, diagnósticas o terapéuticas, secuenciación, amplificación, y análogas. El éxito de estas aplicaciones de aguas abajo puede depender del mantenimiento de la estructura integral y función de biomoléculas diana. Diversos factores, tales como temperatura, presión, pH, hidrólisis química o enzimática, o la presencia de contaminantes pueden causar degradación de biomoléculas tales como DNA, RNA o proteínas.

- 15 El RNA es una de las biomoléculas más inestables debido a autohidrólisis química y degradación mediada por enzimas. La extracción y estabilización del RNA derivado de una muestra biológica es sensible a numerosos factores ambientales que incluyen, pero sin limitación, el tampón utilizado para extraer o recoger el RNA, pH de la solución, temperatura, y particularmente la presencia ubicua de ribonucleasas (RNasas) fuertes. El RNA se almacena típicamente bajo refrigeración (v.g. 4°C, -20°C, o -80°C) en formas tanto purificadas como no purificadas para prevenir la hidrólisis y degradación enzimática y preservar así la integridad de la muestra de RNA. Los métodos y artículos para extracción y estabilización del RNA a las temperaturas del ambiente son deseables a fin de evitar los costes y requerimientos de espacio asociados con la refrigeración para mantenimiento de la integridad de las muestras de RNA.

- 25 Las metodologías actuales para estabilización del RNA a la temperatura ambiente han puesto el foco en la desactivación de las RNasas en exceso de soluciones líquidas de, por ejemplo, detergentes, compuestos caotrópicos, agentes reductores, metales de transición, disolventes orgánicos, agentes quelantes, proteasas, inhibidores peptídicos de RNasas y anticuerpos anti-RNasas. Esfuerzos adicionales se han enfocado en la modificación química del RNA para restringir la trans-esterificación y la autohidrólisis. Las tecnologías de estado seco que reivindican la recogida y preservación con éxito del RNA en formatos secos requieren típicamente que el RNA se "pre-purifique" y se concentre partir de una muestra antes del almacenamiento del RNA. Otras tecnologías de estado seco para la preservación de RNA en formatos secos requieren medios de secado adicionales (v.g. flujo de aire forzado, liofilización, o tratamiento térmico). Estos métodos, por tanto, no conducen a la recogida directa del RNA a partir de una muestra (v.g., una muestra biológica) sin procesamiento importante de la muestra.

- 35 Conforme a ello, se necesitan composiciones y métodos que hagan posible la extracción y estabilización de RNA en estado seco a partir de una muestra biológica en las condiciones ambientales en un proceso de un solo paso. Además, es sumamente deseable la capacidad de almacenar una muestra biológica secada durante un periodo sustancial a la temperatura ambiente y recuperar después de ello el RNA intacto para análisis ulterior.

Descripción breve

- 40 Una realización de una matriz sólida comprende al menos un desnaturalizante de proteínas, y al menos un ácido o reactivo tampón valorado con ácido impregnado en ella en estado seco; en donde la matriz está configurada para proporcionar un pH ácido por hidratación, extraer los ácidos nucleicos de una muestra y preservar los ácidos nucleicos en un estado sustancialmente seco a la temperatura ambiente.

- 45 En otra realización, una matriz de extracción de RNA comprende una desnaturalizante de proteínas que comprende un agente caotrópico, un detergente o combinación de los mismos; y un ácido o reactivo tampón valorado con ácido impregnado en ella en estado seco, en donde la matriz es un material seco poroso e insoluble configurado para proporcionar un pH entre 3 y 6 después de hidratación para extracción del RNA y estabilización del RNA extraído con un Número de Integridad del RNA (RIN) de al menos 4.

- 50 En una realización, una matriz de extracción de RNA comprende un desnaturalizante de proteínas que comprende un agente caotrópico, un detergente o combinación de los mismos; un ácido o reactivo tampón valorado con ácido; y un inhibidor de RNasas que comprende una sal trifosfato o sal pirofosfato impregnada en él en estado seco, en donde la matriz comprende un material seco poroso e insoluble configurado para proporcionar un pH entre 3 y 6 después de hidratación y estabilizar el RNA con un Número de Integridad del RNA (RIN) de al menos 4.

- 55 Un ejemplo de un método para extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos a partir de una muestra comprende los pasos de proporcionar la muestra a una matriz sólida seca que comprende una desnaturalizante de proteínas y un ácido o reactivo tampón valorado con ácido; generar un pH ácido después de hidratación para extracción de los ácidos

nucleicos de la muestra; secado de la matriz que comprende los ácidos nucleicos extraídos; y almacenamiento de los ácidos nucleicos extraídos en la matriz en un estado sustancialmente seco a la temperatura ambiente.

Dibujos

Estas y otras características, aspectos, y ventajas de la presente invención se comprenderán mejor cuando la descripción detallada que sigue se lea con referencia a los dibujos que se acompañan, en los cuales caracteres iguales representan partes iguales a todo lo largo de los dibujos, en donde:

FIG. 1 es un perfil de NMR P^{31} que muestra la oxidación de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y preparación de Óxido de TCEP (TCEP-O).

FIG. 2 muestra un gráfico de barras derivado de un ensayo colorimétrico con ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) para actividad reductora de TCEP y TCEP-O en muestras de celulosa.

FIG. 3 muestra Números de Integridad del RNA (RIN) para manchas de sangre secas recogidas sobre papel de celulosa tratado químicamente que contiene TCEP y TCEP-O.

FIG. 4 muestra Números de Integridad del RNA (RIN) para manchas de sangre secas recogidas sobre diversas matrices de celulosa tratadas químicamente y almacenadas a la temperatura ambiente durante 5, 6, o 12 días antes del análisis del RNA en un Bioanalizador Agilent 2100.

Descripción detallada

Las realizaciones de la presente invención proporcionan matrices y métodos adecuados para extracción y preservación ambiental de ácidos nucleicos, tales como RNA. Es de conocimiento general que el RNA es una molécula inestable que es difícil de preservar en forma intacta. Una o más realizaciones de la invención se refieren a una matriz de extracción de ácido nucleico, en donde la matriz está configurada para recoger, extraer y almacenar ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica durante un periodo prolongado en un solo paso de proceso, seguido por uso en diversas aplicaciones. La matriz está configurada para almacenar ácidos nucleicos en un estado sustancialmente seco a la temperatura ambiente y retener sustancialmente la integridad de los ácidos nucleicos.

Para describir con mayor claridad y concisamente la materia que constituya el objeto de la invención que se reivindica, se proporcionan las definiciones siguientes para términos específicos, que se utilizan en la descripción siguiente y las reivindicaciones adjuntas. A lo largo de la memoria descriptiva, la ejemplificación de términos específicos debería considerarse como ejemplos no limitantes.

Las formas singulares “un”, “uno” y “el/la” incluyendo los plurales correspondientes a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa. El lenguaje aproximativo, como se utiliza aquí a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, puede aplicarse para modificar cualquier representación cuantitativa que pudiera variar permisiblemente sin dar como resultado un cambio en la función básica a la que se hace referencia. de acuerdo con ello, un valor modificado por un término tal como “aproximadamente” no debe considerarse limitado al valor preciso especificado. En algunos casos, el lenguaje aproximativo puede corresponder a la precisión de un instrumento para la medida del valor. En caso necesario, se han proporcionado intervalos, y tales intervalos son inclusivos de todos los sub-intervalos entre ellos.

La expresión “ácido nucleico” a la que se hace referencia en esta memoria comprende todas las formas de RNA (v.g., mRNA, miRNA, rRNA, tRNA, piRNA, ncRNA), DNA (v.g. DNA genómico, mtDNA), así como moléculas de RNA y DNA recombinante o análogos de DNA o RNA generados utilizando análogos nucleotídicos. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Los ácidos nucleicos pueden incluir las cadenas codificantes o no codificantes. El término comprende también fragmentos de ácidos nucleicos, tales como RNA o DNA existente naturalmente que pueden recuperarse utilizando los métodos de extracción descritos. “Fragmento” se refiere a una porción de un ácido nucleico (v.g., RNA o DNA).

La expresión “muestra biológica” a la que se hace referencia en esta memoria incluye, pero no se limita a, sangre, suelo, tejido, y saliva obtenida de cualquier organismo, con inclusión de un humano. Las muestras biológicas pueden ser obtenidas por un individuo que se está sometiendo a un test de autodiagnóstico (v.g., monitorización de glucosa en sangre) o por un profesional médico entrenado por una diversidad de técnicas que incluyen, por ejemplo, aspiración de sangre utilizando una aguja o raspado o frotis de un área particular, tal como una lesión en la piel de un paciente. Métodos para la recogida de diversas muestras biológicas son bien conocidos en la técnica. El término “muestra” incluye muestras biológicas como se definen anteriormente, pero incluye también, por ejemplo, células de cultivo de tejidos y ácidos nucleicos purificados.

La expresión “agentes reductores” a la que se hace referencia en esta memoria incluye cualquier especie química que proporciona electrones a otra especie química. En la técnica se conocen una diversidad de agentes reductores. Agentes reductores ilustrativos incluyen ditiotreitól (DTT), 2-mercaptoetanol (2-ME), y tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP). Además, puede utilizarse cualquier combinación de estos u otros agentes reductores. En realizaciones particulares, el agente reductor es TCEP.

El término “tampón” como se utiliza en esta memoria incluye, por ejemplo, 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris), ácido 2-(*N*-morfolino) etanosulfónico (MES), ácido 3-(*N*-morfolino) propanosulfónico (MOPS), tampones citrato, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES), y tampones fosfato. Esta lista de tampones potenciales se da únicamente para propósitos ilustrativos. El pH del tampón seleccionado para uso en las composiciones y métodos descritos en esta memoria está valorado típicamente con ácido en el intervalo de 3 a 6.

Una o más realizaciones de una matriz sólida comprenden al menos un desnaturalizante de proteínas y al menos un ácido o reactivo tampón valorado con ácido impregnado en un estado seco en ella, en donde la matriz está configurada para proporcionar un pH ácido después de hidratación. La matriz está configurada también para extraer ácidos nucleicos de una muestra y preservar los ácidos nucleicos en un estado sustancialmente seco a la temperatura ambiente. Como se utiliza en esta memoria, la expresión “estado sustancialmente seco” se refiere a secado ulterior de la muestra a fin de que tenga un contenido de agua aproximadamente inferior a 2%.

Las matrices sólidas para la extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos de una muestra comprenden al menos un ácido o tampón valorado con ácido y un desnaturalizante de proteínas en estado seco. El término “matriz” se utiliza intercambiabilmente en esta memoria como “matriz de extracción”. La expresión “matriz sólida” como se utiliza en esta memoria se refiere a una matriz insoluble. La matriz hace posible la recogida, extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos sin solubilización del material matriz. La matriz sólida incluye, pero no se limita a, materiales tales como celulosa, acetato de celulosa, nitrocelulosa, fibras de vidrio o combinaciones de los mismos. La “Incorporación” de las composiciones en la matriz incluye, pero no se limita al procedimiento de “baño” descrito más adelante. En algunas realizaciones, tales métodos implican 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 utilizando cualquier método apropiado.

Como se ha indicado, la matriz sólida comprende la composición en un estado seco y preserva también los ácidos nucleicos extraídos en condiciones secas. El uso de una matriz sólida seca para extracción y almacenamiento es ventajoso sobre la extracción en base líquida, debido a que la matriz seca asegura una dilución volumétrica mínima de la muestra aplicada a la matriz. Una persona con experiencia en la técnica apreciaría que la extracción en base líquida diluye la concentración de la muestra en un volumen excesivo de reactivo estabilizador. El uso de matriz sólida seca para la recogida, extracción, y preservación de una muestra mantiene la concentración de la muestra y elimina problemas, tales como degradación de la muestra, que están relacionados con una dilución inadecuada de la muestra en un conservante líquido. Adicionalmente, la matriz sólida comprende una composición fija de los reactivos secos, lo que hace posible la extracción eficiente de los ácidos nucleicos, tales como RNA, después de hidratación, seguida por estabilización del RNA extraído a la temperatura ambiente.

Las expresiones “condición ambiente” o “temperatura ambiente” se utilizan intercambiabilmente de aquí en adelante. Como se utiliza en esta memoria, la expresión “temperatura ambiente” se refiere a una temperatura comprendida en un intervalo entre 0°C y 60°C. En una o más realizaciones, la temperatura ambiente es la temperatura de la sala. En algunas realizaciones, la matriz está configurada para almacenar o preservar ácidos nucleicos a la temperatura ambiente en estado seco.

Como se ha indicado, la matriz sólida está configurada para almacenar o preservar ácidos nucleicos en estado seco durante un periodo prolongado. La expresión “configurada a” o “configurada para” se emplea en esta memoria como la estructura o composición de la matriz que hace posible que la matriz extraiga y almacene ácidos nucleicos durante periodos de tiempo a la temperatura ambiente. Los términos “almacenamiento” o “preservación” pueden utilizarse intercambiabilmente en esta memoria con respecto al mantenimiento de los ácidos nucleicos extraídos en un formato adecuado para análisis ulterior. Más específicamente, los ácidos nucleicos pueden almacenarse o preservarse en una matriz de extracción de ácido nucleico sólida, en donde la matriz asegura el mantenimiento de la integridad de las moléculas.

En algunas realizaciones, la matriz de extracción de ácido nucleico es una matriz de extracción en fase sólida. Una matriz, en la que se utiliza el método de extracción en fase sólida, se define en esta memoria como una matriz de extracción en fase sólida. La tecnología de extracción en fase sólida (SPE) ha sido apalancada para reducir los tiempos de extracción de ácidos nucleicos de alta pureza para secuenciación y otras aplicaciones. La extracción en fase sólida es un método de extracción que utiliza una fase sólida y una fase líquida para aislar una o más moléculas del mismo tipo, o tipos diferentes, a partir de un material. La matriz de extracción en fase sólida se utiliza, por ejemplo, para purificar una muestra aguas arriba de un método cromatográfico u otro método analítico, ejemplo de tono del método comprende cargar una muestra (v.g. una muestra biológica) en la matriz de extracción en fase sólida, almacenar la matriz a la temperatura ambiente para conseguir un estado sustancialmente seco, y rehidratar la matriz con un tampón adecuado para extraer diferencialmente el RNA de la matriz.

El término “extracción” se refiere a cualquier método para separación o aislamiento de los ácidos nucleicos de una muestra, más particularmente de una muestra biológica. Los ácidos nucleicos tales como RNA y DNA pueden liberarse, por ejemplo, por lisis celular. En una realización, los ácidos nucleicos pueden liberarse durante lisis celular evaporativa. En otra realización, las células se lisan por contacto con la matriz que comprende reactivos de lisis celular. El contacto de una muestra biológica que comprende células con la matriz da como resultado la lisis celular que libera los ácidos nucleicos, por ejemplo, por utilización de papeles de celulosa FTA™ Elute.

La matriz sólida puede ser porosa. En una realización, la matriz sólida es un papel de celulosa poroso, tal como una matriz de celulosa de Whatman™. En un ejemplo, la matriz celulosa de Whatman™ comprende 903-celulosa, FTA™ o FTA™ Elute.

En uno o más ejemplos, la matriz de extracción está impregnada con uno o más reactivos. Como se ha indicado, en una realización ilustrativa, la matriz comprende uno o más desnaturalizantes de proteínas impregnado(s) en estado seco. En una realización, la matriz comprende adicionalmente uno o más ácidos o reactivos tampón valorados con ácido. En otra realización, la matriz comprende además uno o más agentes reductores. En algunas realizaciones, los reactivos impregnados comprenden reactivos de lisis, reactivos estabilizadores de ácidos nucleicos, productos químicos de almacenamiento de ácidos nucleicos y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, los reactivos secados impregnados en la matriz se hidratan por adición de un tampón, agua o una muestra. En una realización, los reactivos secados impregnados son hidratados por una muestra, más específicamente una muestra biológica, que está dispuesta en la matriz para extracción o almacenamiento de ácidos nucleicos. En algunas otras realizaciones, además de una muestra, se añade agua o tampón para hidratar la matriz y reconstituir o activar los reactivos empapados en la matriz. En algunas realizaciones, la hidratación de la matriz genera un pH ácido en la matriz. En algunas realizaciones, la hidratación da adicionalmente como resultado la reconstitución de los reactivos, tales como desnaturalizante de proteínas, ácido o reactivos tampón valorados con ácido que están presentes en forma seca en la matriz.

En una o más realizaciones, la matriz comprende un desnaturalizante de proteínas. El desnaturalizante de proteínas puede comprender un agente caotrópico o detergente. Sin pretender quedar limitados a un desnaturalizante particular, los desnaturalizantes de proteínas pueden clasificarse como desnaturalizantes débiles o desnaturalizantes fuertes dependiendo de sus propiedades biofísicas y su capacidad para inhibir completamente la actividad de las enzimas biológicas (v.g. RNasas). En algunas realizaciones, los desnaturalizantes de proteínas débiles (v.g. detergentes) pueden utilizarse para la lisis celular e interrupción de las interacciones proteína-proteína sin desnaturalizar los ácidos nucleicos. En realizaciones adicionales, el uso de desnaturalizantes fuertes de las proteínas (v.g. sales caotrópicas) puede desnaturalizar también la estructura secundaria de los ácidos nucleicos además de desnaturalizar células y proteínas. En la técnica se conocen numerosos desnaturalizantes de proteínas y pueden seleccionarse para uso en las composiciones y métodos descritos en esta memoria. Sin pretender quedar limitados a un desnaturalizante de proteínas particular, desnaturalizantes de proteínas ilustrativos incluyen tiocianato de guanidinio, hidrocloreto de guanidinio, tiocianato de sodio, tiocianato de potasio, arginina, dodecilsulfato de sodio (SDS), urea o una combinación de los mismos. Detergentes ilustrativos pueden clasificarse como detergentes iónicos, detergentes no iónicos, o detergentes de ion dipolar. El detergente iónico puede comprender detergente aniónico tal como dodecilsulfato de sodio (SDS) o detergente catiónico, tal como bromuro de etil-trimetil-amonio. Ejemplos no limitantes de detergentes no iónicos para lisis celular incluyen Triton X-100, NP-40, Brij 35, Tween 20, octil-glucósido, octil-tioglucoído o digitonina. Algunos detergentes de ion dipolar pueden incluir 1-propanesulfonato de 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio] (CHAPS) y 1-propanesulfonato de 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-2-hidroxil (CHAPSO).

En una o más realizaciones, el desnaturalizante de proteínas comprende una sal tiocianato. Una o más realizaciones de la matriz comprenden una sal tiocianato valorada con ácido impregnada en estado seco. Sales tiocianato ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, tiocianato de guanidinio, tiocianato de sodio, tiocianato de potasio o combinaciones de los mismos.

La matriz de extracción mantiene la estabilidad e integridad del RNA a un nivel deseado después de la extracción del RNA de una muestra biológica. En una realización, la matriz está impregnada con reactivos estabilizadores de ácido nucleico. Estos reactivos estabilizadores pueden incluir inhibidores de RNasas, tampón valorado con ácido, o agentes quelantes (v.g. EDTA). La composición puede comprender adicionalmente un inhibidor ultravioleta (UV) o un agente eliminador de radicales libres.

Como se ha indicado, la matriz comprende adicionalmente un inhibidor de RNasas, en donde el inhibidor de RNasas comprende complejo de vanadil-ribonucleósido (VRC), un análogo de nucleótido, o un inhibidor de RNasas disponible comercialmente (v.g., SUPERase-In™). El inhibidor de RNasas puede comprender adicionalmente compuestos pirofosfato. En una realización, puede utilizarse pirofosfato de sodio dibásico como inhibidor de RNasas. Una o más realizaciones del inhibidor de RNasas pueden comprender adicionalmente sales trifosfato, tales como trifosfato de sodio. En un ejemplo, la adición de pirofosfato de sodio al tampón valorado con ácido mejora la estabilidad del RNA en ambos formatos de estado líquido y secos.

Realizaciones de la matriz comprenden reactivos tampón ácidos o valorados con ácido en estado seco, que pueden rehidratarse durante la extracción de los ácidos nucleicos. Ejemplos del ácido incluyen, pero no se limitan a, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, Tris(2-carboxietil) fosfina-ácido clorhídrico (TCEP-HCl), Tris(2-carboxietil)fosfina-ácido clorhídrico oxidado (TCEP-O-HCl), ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido vainillínico, ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico, o combinaciones de los mismos. Como se ha indicado, la matriz proporciona un pH ácido después de hidratación, que extrae y estabiliza los ácidos nucleicos extraídos, en donde la

hidratación puede lograrse por adición de una muestra, agua o cualquier otra solución (v.g., una solución tampón). Una o más realizaciones de la matriz proporcionan un pH en un intervalo de 3-6 por hidratación.

Los ácidos nucleicos extraídos, particularmente RNA, se estabilizan en condición ácida, como se muestra en la Tabla IV. En una realización, el tampón valorado con ácido comprende tiocianato de guanidina. A pH ácido de 3 a 6, una mezcla en estado seco de tiocianato de guanidina y pirofosfato de sodio en el campo ácido sobre una matriz sólida seca estabiliza RNA de alta calidad en manchas de sangre secas a la temperatura ambiente. Como se muestra por el registro RIN en FIG. 4. En una realización, el tampón valorado con ácido comprende tiocianato de guanidina, en donde a pH ácido de 3 a 6, la presencia de trifosfato de sodio en una matriz sólida seca estabiliza RNA de alta calidad, como se muestra en FIG. 4 por el registro RIN.

Como se ha indicado, en algunas realizaciones, la matriz comprende adicionalmente un protector UV, un agente eliminador de radicales libres, un quelante o combinaciones de los mismos. Sin pretender quedar limitados a ningún protector UV específico, antioxidantes ilustrativos incluyen, por ejemplo, hidroquinona-monometil-éter (MEHQ), hidroquinona (HQ), toluhidroquinona (THQ), y ácido ascórbico. En algunas realizaciones, el Antioxidante es THQ.

En algunas realizaciones, la matriz comprende adicionalmente al menos un agente reductor, en donde el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol (2-ME), Tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP) y combinaciones de los mismos.

Los ácidos nucleicos extraídos comprenden ácidos ribonucleicos (RNA), ácidos desoxirribonucleicos (DNA) o una combinación de los mismos. En una realización, los ácidos nucleicos extraídos comprenden RNA. El RNA puede ser mRNA, tRNA, rRNA, RNA pequeño, siRNA, miRNA, RNA no codificante, RNA animal, RNA vegetal, RNA viral o RNA bacteriano.

La matriz está configurada para almacenar ácidos nucleicos en un formato seco a la temperatura ambiente en condición sustancialmente intacta. La condición del RNA se refiere a la calidad del RNA o integridad del RNA. La estabilidad y calidad del RNA pueden evaluarse sobre la base de: amplificación cuantitativa por RT-PCR de dianas de mRNA; la ratio de RNA ribosómico (rRNA) 28s:18s, que tiene en cuenta la mayor parte del total del RNA celular, y el análisis RIN en un Bioanalizador Agilent 2100. Como se ha indicado, la calidad del RNA se determina como una ratio de valores de intensidad de RNA ribosómico 28S y 18S, donde la ratio se calcula obteniendo la intensidad de rRNA 28S y 18S por electroforesis en gel del rRNA extraído, seguida por tinción con bromuro de etidio. El RNA celular de alta calidad exhibe generalmente una ratio de rRNA 28s: 18s mayor que 1. Además, el RNA celular de alta calidad soporta una amplificación eficiente de mRNAs tanto de abundancia escasa como grande (v.g., mayor que 1 kB). Para propósitos de conveniencia, se utilizan frecuentemente la intensidad de señal de rRNA y la ratio de rRNA 28s: 18s a fin de clasificar e identificar rápidamente muestras con propiedades de almacenamiento de RNA fuertes por electroforesis en gel.

Como se ha indicado, en una realización, la calidad del RNA se determina por electroforesis capilar del RNA extraído mediante un bioanalizador. Como es habitual, la calidad del RNA se cuantifica como un RIN, donde el RIN se calcula por una evaluación algorítmica de las cantidades de diversos RNAs presentes en el RNA extraído. El RNA celular de alta calidad exhibe generalmente un valor RIN que se aproxima a 10. En una o más realizaciones, el RNA extraído de la matriz seca tiene un valor RIN de al menos 4. En algunas realizaciones, la matriz proporciona extracción y estabilización ambiente de una biomuestra y produce RNA intacto de alta calidad con un valor RIN comprendido en un intervalo de 4 a 10, o en una realización, el valor RIN está dentro de un intervalo de 5 a 8.

Un ejemplo de un método para extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos de una muestra comprende los pasos de proporcionar la muestra sobre una matriz sólida que comprende un desnaturante de proteínas y ácido o reactivo tampón valorado con ácido, que genera un pH ácido para extracción de los ácidos nucleicos de la muestra después de hidratación de la matriz sólida con la muestra o cualquier líquido añadido externamente, secado de la matriz que comprende los ácidos nucleicos extraídos, y almacenamiento de los ácidos nucleicos extraídos sobre la matriz en un estado sustancialmente seco a la temperatura ambiente. Ejemplos no limitantes de la expresión "proporcionar una muestra" incluyen aplicar una muestra o disponer una muestra sobre la matriz de extracción utilizando una pipeta, catéter, jeringuilla o conducto. La muestra puede verse sobre la matriz.

El método comprende almacenar los ácidos nucleicos extraídos sobre la matriz en estado seco a la temperatura ambiente. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden almacenarse durante un periodo de tiempo superior a un mes. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden almacenarse durante un periodo de tiempo superior a 6 meses. Dado que el RNA es generalmente propenso a degradación, la extracción y preservación de RNA utilizando la matriz es útil y puede utilizarse adicionalmente para diversas aplicaciones aguas abajo.

Una o más realizaciones del método comprenden la recuperación de ácidos nucleicos de la matriz por técnica de extracción en fase sólida. En una o más realizaciones, los ácidos nucleicos se recuperan de la matriz sólida por rehidratación de la matriz en una solución acuosa, un tampón, o una solución orgánica, y en la que los ácidos nucleicos se someten a análisis ulterior. Puede emplearse cualquier método que dé como resultado la extracción de ácidos nucleicos, particularmente RNA de una muestra (v.g., una muestra biológica no purificada). El método delineado anteriormente puede incluir opcionalmente un paso de lavado de la matriz antes de la recuperación de los ácidos

nucleicos de la matriz sólida para análisis ulterior. Por ejemplo, la matriz puede lavarse una o más veces un tampón adecuado o agua antes de la recuperación de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos pueden recuperarse por rehidratación de la matriz sólida (v.g., papel de celulosa) en una solución acuosa, una solución tampón, como se ha definido anteriormente, o una solución orgánica. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se recuperan de la matriz sólida por electroelución.

En una realización, un método para extracción y preservación de los ácidos nucleicos (v.g., RNA, DNA, o una combinación de los mismos) comprende los pasos de: proporcionar una matriz sólida, en la cual una composición comprende al menos un desnaturalizante de proteínas, un ácido o reactivo tampón valorado con ácido, y opcionalmente un agente eliminador de radicales libres incorporado en la matriz sólida en un formato seco; aplicar una muestra (v.g., una muestra biológica) a la matriz sólida para extraer los ácidos nucleicos a pH ácido; secar la matriz sólida; y almacenar los ácidos nucleicos sobre la matriz sólida en un estado sustancialmente seco a la temperatura ambiente.

En ciertos ejemplos del método, la matriz permite el almacenamiento de ácidos nucleicos, particularmente RNA que, como es sabido generalmente, es una biomolécula inestable al almacenamiento, en un formato seco (v.g., sobre una matriz sólida) a las temperaturas del ambiente. Las muestras utilizadas en este método incluyen, pero no se limitan a, muestras biológicas tales como sangre, suero, tejido, y saliva obtenidas de cualquier organismo, con inclusión de un humano.

Ejemplo

Reactivos: 31-ETF era de GE Healthcare. TCEP era de Soltec Bio Science (Beverly MA, USA), MOPS se adquirió de Aldrich (MO, USA).

Ejemplo 1. Preparación de TCEP-O por oxidación de TCEP

Se oxidó TCEP a TCEP-O para analizar la contribución de la actividad reductora a la preservación del RNA en biomuestras secas. Se disolvió aproximadamente 1 g de TCEP en 25 mL de peróxido de hidrógeno al 30% y se ajustó el pH de la solución a 8,0 utilizando hidróxido de sodio. La mezcla de reacción se incubó durante 3 horas para completar la reacción de oxidación y los productos se secaron en una estufa para análisis subsiguiente. La NMR P^{31} confirmó la pérdida de TCEP en el producto de la reacción con relación a un TCEP de referencia. Esta reacción de oxidación se repitió en presencia del antioxidante THQ con resultados similares. Los resultados se indican en FIG. 1.

Ejemplo 2. Confirmación de la pérdida de actividad reductora en matrices secas recubiertas con TCEP-O

Se prepararon muestras de papel en soluciones que contenían TCEP o TCEP-O utilizando un proceso de recubrimiento simple por baño. Resumidamente, las soluciones de recubrimiento se prepararon como se describe en la Tabla I. Dado que la muestra de control, 25-1, daba como resultado una solución final que tenía pH de 3,5, todas las muestras restantes se ajustaron a pH 3,5 con HCl. Se sumergió papel de celulosa 31-ETF en cada solución de recubrimiento, y después de la saturación completa, el papel se pasó a través de un rodillo de presión para eliminar el exceso de solución. Las muestras de papel se secaron luego en una estufa, se empaquetaron en bolsas de lámina delgada Mylar con desecante, y se guardaron a 4°C hasta su utilización.

Tabla I. Preparación de las muestras de papel que contenían TCEP o TCEP-O

Muestra	MOPS (mg/mL)	GuSCN (mg/mL)	TCEP (mg/mL)	TCEP-O (mg/mL)	THQ (mg/mL)	Proceso
25-1	20	300	10		5	Preparar tampón MOPS de pH 7, añadir los restantes componentes; el pH final es 3,5
25-3	20	300		10	5	Preparar tampón MOPS de pH 7, añadir los restantes componentes; ajustar el pH a 3,5
27-5		300	10			Disolver GuSCN y TCEP en agua, y ajustar el pH a 3,5 con HCl
27-6		300		10		Disolver GuSCN y TCEP-O en agua, y ajustar el pH a 3,5 con HCl

Después de la preparación de la muestra, se analizó la actividad reductora del papel utilizando un ensayo colorimétrico con DTNB. Se preparó una solución de trabajo de DTNB 1 mM en PBS a partir de una solución stock 2,5 mM en agua. Se extrajeron con punzón testigos de muestra (de 3 mm de diámetro) de cada papel descrito en la Tabla I, se sumergieron en 5 ml de la solución de trabajo de DTNB, y se agitaron mediante sacudidas durante 30 minutos. Se

5 midió luego el TNB (ácido tiobis-2-nitrobenzoico) en las soluciones resultantes por absorbancia UV a 412 nm, presentándose los resultados en FIG. 2. Las muestras 25-3 y 27-6, que contenían TCEP-O, no mostraban reducción alguna de DTNB a TNB, lo que indicaba pérdida de poder reductor. Las muestras 25-1 y 27-5 que contenían TCEP mostraban actividad reductora fuerte por conversión de DTNB en TNB utilizando el ensayo colorimétrico de DTNB. Estos resultados confirmaban los análisis MMR anteriores en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3. *Análisis de Estabilidad del RNA a partir de Manchas de sangre Secas*

10 Las muestras del Ejemplo 2, descritas en la Tabla I, se aplicaron en forma de mancha con sangre entera y se ensayaron en cuanto a la capacidad de estabilizar el RNA a la temperatura ambiente. Se recogieron 50 µL de sangre entera de rata de la vena de la cola de un animal de test y se aplicaron en forma de mancha sobre las muestras 25-1, 25-3, 27-5, y 27-6. Las manchas de sangre se secaron al aire y se guardaron a la temperatura ambiente de la sala bajo humedad controlada (~20% RH) durante 5 días (25-1, 25-3) o 12 días (27-5, 27-6). Se extrajo el RNA de un testigo central de 7 mm extraído con punzón, utilizando tampón de lisis RLT (Qiagen) reforzado con beta-mercaptoetanol y se purificó utilizando columnas rotativas convencionales de membrana de sílice conforme a protocolos conocidos en la técnica (v.g. Kit de sangre Qiagen QIAamp RNA). El RNA purificado se eluyó de las columnas rotativas con agua exenta de nucleasas, y se midió el RIN para cada una de las muestras en un Bioanalizador Agilent 2100 utilizando Pico Lab Chips RNA 6000. Por convención, RIN > 6 es indicativo de RNA de alta calidad y es sumamente deseable para análisis cuantitativos aguas abajo tales como RT-PCR o aplicaciones de microrredes.

20 Como se ha indicado, el valor RIN se determinó mediante un Bioanalizador Agilent 2100 utilizando Pico Lab Chips RNA 6000 para cada composición incluida en la Tabla 1, y los datos se muestran en FIG. 3. Inesperadamente, las muestras que contenían TCEP-O proporcionaban una integridad del RNA comparable a las que contenían TCEP. Los registros RIN eran sólo ligeramente mayores en presencia de TCEP (muestras 25-1, 27-5) que el de TCEP totalmente oxidado (muestras 25-3, 27-6). Este fenómeno puede ser dependiente del pH ácido, dado que todas las muestras se prepararon a partir de soluciones de recubrimiento valoradas a un pH final de 3,5, a fin de reproducir el punto final de pH natural de la formulación de control, 25-1, que contenía TCEP-HCl.

Ejemplo 4. *Preparación de sustrato de químicas alternativas con perfiles de pH ácido o básico*

30 El Ejemplo 4 se diseñó para investigar los efectos de diferentes mezclas de ácido, antioxidante, sal caotrópica, detergente, y sales pirofosfato o polifosfato a pH diferente de la solución. Se prepararon muestras de papel utilizando el proceso de recubrimiento por baño simple descrito anteriormente. De manera resumida, se prepararon soluciones de recubrimiento como se describe en la Tabla II. Se sumergió papel de celulosa 31-ETF en cada solución de recubrimiento, y después de la saturación completa el papel se pasó a través de un rodillo de presión para eliminar el exceso de solución. Las muestras de papel se secaron luego en una estufa y se empaquetaron en bolsas de lámina delgada Mylar con desecante hasta su utilización.

Tabla II. Preparación de las muestras de papel a perfiles de pH ácido o básico: *Ácidos*

Muestra	MOPS (mg/ml)	GuSCN (mg/ml)	SDS (mg/ml)	Ácido p-cumárico (mg/ml)	Ácido vainillínico (mg/ml)	Ácido acético (mg/ml)	Ácido cítrico (mg/ml)	Ácido tartárico (mg/ml)	Ácido fosfórico (mg/ml)	Proceso
26-8	20	300			5.5					Preparar tampón de MOPS de pH 7,0, añadir los restantes componentes, ajustar el pH a 3,5 con HCl
26-7	20	300		3.5						Preparar tampón de MOPS de pH 7,0, añadir los restantes componentes, ajustar el pH a 3,5 con HCl
27-2	20	300								Preparar tampón de MOPS de pH 7,0, añadir los restantes componentes, ajustar el pH a 3,5 con HCl
28-9	20		20		5.5					Preparar tampón de MOPS de pH 7,0, añadir los restantes componentes, ajustar el pH a 3,5 con HCl

27-8		300			5.5					Disolver GuSCN y ácido vainillínico en agua, ajustar el pH a 3,5 con HCl
27-7		300		3.5						Disolver GuSCN y ácido p-cumárico en agua, ajustar el pH a 3,5 con HCl
28-2		300				20				Disolver GuSCN y ácido acético en agua, ajustar el pH a 3,5 con NaOH
28-5		300						20		Disolver GuSCN y ácido tartárico en agua, ajustar el pH a 3,5 con NaOH
28-4		300					20			Disolver GuSCN y ácido cítrico en agua, ajustar el pH a 3,5 con NaOH
28-3		300							20	Disolver GuSCN y ácido fosfórico en agua, ajustar el pH a 3,5 con NaOH

Tabla III. Preparación de muestras de papel a perfiles de pH ácido o básico: *Sales poli- y pirofosfato*

Muestra	GuSCN (mg/ml)	NaSCN (mg/ml)	Trifosfato de sodio (mg/ml)	Pirofosfato de sodio (mg/ml)	Proceso
27-10	300		20		Disolver GuSCN y trifosfato de sodio en agua, ajustar el pH a 3,5 con HCl
27-11	300			20	Disolver GuSCN y pirofosfato de sodio en agua, ajustar el pH a 3,5 con HCl
26-11	300		20		Disolver GuSCN y trifosfato de sodio en agua, ajustar el pH a 7,2 con HCl
26-12	300			20	Disolver GuSCN y pirofosfato de sodio en agua, ajustar el pH a 7,2 con HCl
28-6		206	20		Disolver NaSCN y trifosfato de sodio en agua, ajustar el pH a 3,5 con HCl
28-7		206	20		Disolver NaSCN y trifosfato de sodio en agua, ajustar el pH a 7,2 con HCl

Ejemplo 5. Análisis de Estabilidad del RNA a partir de Manchas de sangre Seca en Químicas Alternativas

- 5 Las muestras del Ejemplo 4, descritas en Tabla II y Tabla III, se aplicaron en forma de mancha con sangre entera y se ensayaron en cuanto a la capacidad de estabilizar el RNA a la temperatura ambiente. Se recogieron 50 µL de sangre entera de rata de la vena de la cola de un animal de test y se aplicaron directamente en forma de mancha sobre las muestras de papel. Las manchas de sangre se secaron y se guardaron a la temperatura ambiente, pero con humedad controlada (~ 20% RH) durante 5, 6 ó 12 días. Se extrajo el RNA de un testigo central de 7 mm extraído con punzón

en tampón de lisis y se purificó en columnas rotativas de membrana de sílice conforme a protocolos conocidos en la técnica. Después de purificación y elución, se midieron los valores RIN en un Bioanalizador Agilent 2100 utilizando Pico Lab Chip RNA 6000. Un RIN > 6 implica RNA de alta calidad y deseable para análisis cuantitativos aguas abajo tales como RT-PCR o aplicaciones de microrredes.

- 5 Los resultados del Ejemplo 5 se exponen en FIG. 4. Se descubrió que la sal caotrópica valorada con ácido o las composiciones detergentes producían RNA de calidad razonable a partir de manchas de sangre secas, aunque algunas formulaciones son preferibles a otras basándose en el registro RIN. Por ejemplo, las muestras 28-2 y 28-5 contienen tiocianato de guanidinio (GuSCN) y exhibían valores RIN de 7,8 y 7,0 a pH 3,5 en ácido acético y en ácido tartárico, respectivamente. Los valores RIN para ácido acético (7,8) y ácido tartárico (7,0) son mayores que la misma
- 10 composición en ácido cítrico (muestra 28-4, RIN 5,8) y ácido fosfórico (muestra 28-3, RIN 4,9) a pH 3,5. En particular, la eficacia de las sales pirofosfato o trifosfato mostraba una dependencia clara del pH para estabilización del RNA en presencia del agente caotrópico, proporcionando un pH ácido global registros RIN muy altos. Formulaciones idénticas valoradas a pH neutro daban como resultado una degradación fuerte del RNA. Por ejemplo, las muestras 27-10 y 28-6, recubiertas con tiocianato de guanidinio (GuSCN) o tiocianato de sodio (NaSCN) y trifosfato de sodio a pH 3,5,
- 15 exhibían valores RIN altos de 7,1 y 7,0, respectivamente, comparadas con las muestras 26-11 y 28-7, que contenían los mismos reactivos a pH 7,2. Análogamente, las muestras 27-11 y 26-12 contienen GuSCN y pirofosfato de sodio y exhibían valores RIN de 6,7 a pH 3,5 y 1,6 a pH 7,2 respectivamente. Generalmente se entiende que los restos pirofosfato y trifosfato son inhibidores de molécula pequeña de las RNasas, para los cuales no es intuitivo un mecanismo de acción dependiente del pH en estados secos.

20 *Ejemplo 6. Correlación del comportamiento de RIN con el pH de matriz sólida*

Los valores de pH de la matriz sólida utilizando las muestras del Ejemplo 1 (descritas en la Tabla I), y el Ejemplo 4 (descritas en Tabla II y Tabla III), se midieron y se compararon con la eficiencia biológica RIN. Para medir el pH de la matriz sólida, se extrajeron con punzón 9 testigos (redondos de 7 mm) de cada papel y se sumergieron en 1 mL de agua. Los testigos se homogeneizaron en pasta papelera utilizando un homogeneizador de laboratorio de alta

25 cizalladura, y se determinó el pH de la fase acuosa con tiras de test de pH.

Los resultados del Ejemplo 6 se muestran en la Tabla IV. El pH de cada matriz sólida seca se mantiene generalmente respecto al pH original de la solución, con la que se recubrieron las matrices sólidas, aunque algunas formulaciones son preferibles a otras. Sin limitarse a una teoría particular, los resultados confirman que las matrices sólidas que tienen pH ácido producen RNA de calidad razonable a partir de manchas de sangre secas, dado que los valores RIN

30 de las muestras de RNA derivadas de composiciones con pH ácido son mayores que o iguales a 4 después de varios días de almacenamiento en las condiciones del ambiente.

Tabla IV: Valores RIN para composiciones matriz diferentes a pH ácido o básico y en las condiciones del ambiente

Código de la muestra	Composición					pH		RIN	Almacenaje ambiente
	Desnaturalizante	Tampón	Ácido	Antioxidante	Sal fosfato	Solución de Inmersión	Papel		
25-1	GuSCN	MOPS	TCEP-HCl	THQ		3,6	4	6,5	5 días
25-3	GuSCN	MOPS	TCEP-O-HCl	THQ		3,6	4,5	6,3	5 días
27-5	GuSCN		TCEP-HCl			3,5	4	5,3	12 días
27-6	GuSCN		TCEP-O-HCl			3,5	4	5,3	12 días
26-8	GuSCN	MOPS	Ácido vainillínico			3,3	4	5,7	5 días
26-7	GuSCN	MOPS	Ácido p-cumárico			3,5	4,5	5,3	5 días
27-2	GuSCN	MOPS	HCl			3,5	5,5	4,9	5 días
28-9	SDS	MOPS	Ácido vainillínico			3,3	4	4,3	6 días
27-8	GuSCN		Ácido vainillínico			3,5	4	4,1	5 días
27-7	GuSCN		Ácido p-cumárico			3,5	4,5	3,3	5 días
28-2	GuSCN		Ácido acético			3,5	5,5	7,8	6 días
28-5	GuSCN		Ácido tartárico			3,5	4,5	7	6 días
28-4	GuSCN		Ácido cítrico			3,4	4,5	5,8	6 días
28-3	GuSCN		Ácido fosfórico			3,6	5	4,9	6 días
27-10	GuSCN		HCl		Trifosfato de sodio	3,5	5	7,1	12 días
27-11	GuSCN		HCl		Pirofosfato de sodio	3,5	5	6,7	12 días
26-11	GuSCN		HCl		Trifosfato de sodio	7,2	8	1,9	6 días
26-12	GuSCN		HCl		Pirofosfato de sodio	7,2	8	1,6	6 días
28-6	GuSCN		HCl		Trifosfato de sodio	3,5	5	7	6 días
28-7	GuSCN		HCl		Trifosfato de sodio	7,3	8,5	2,6	6 días

REIVINDICACIONES

1. Una matriz sólida, que comprende:
al menos un desnaturalizante de proteínas, y
al menos un ácido o reactivo tampón valorado con ácido impregnado en ella el estado seco;
- 5 en donde la matriz es una matriz sólida seca; y,
en donde la matriz está configurada para proporcionar un pH ácido en un intervalo de 3 a 6 después de hidratación, extraer los ácidos nucleicos de una muestra, y preservar los ácidos nucleicos en un estado seco a la temperatura ambiente.
- 10 2. La matriz de la reivindicación 1, en donde los ácidos nucleicos extraídos y preservados comprenden ácidos ribonucleicos (RNA), ácidos desoxirribonucleicos (DNA) o una combinación de los mismos.
3. La matriz de la reivindicación 1, en donde la matriz comprende el al menos un ácido, y en donde el al menos un ácido comprende ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, Tris(2-carboxietil)-fosfina-ácido clorhídrico (TCEP-HCl), Tris(2-carboxietil) fosfina oxidada- ácido clorhídrico (TCEP-O-HCl), ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido vainillínico, ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico o comerciales de los mismos.
- 15 4. La matriz de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente un protector UV, un eliminador de radicales libres, un formador de quelatos o combinaciones de los mismos en donde el protector UV o eliminador de radicales libres se selecciona del grupo que consiste en hidroquinona-monometil-éter (MEHQ), hidroquinona (HQ), toluhidroquinona (THQ), y ácido ascórbico.
- 20 5. La matriz de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente un inhibidor de RNasas en donde el inhibidor de RNasas comprende una sal trifosfato, sal pirofosfato o combinaciones de las mismas.
6. La matriz de la reivindicación 5, en donde el inhibidor de RNasas comprende complejo vanadil-ribonucleósido (VRC), pirofosfato de sodio, análogos de nucleótidos, o un inhibidor de RNasas disponibles comercialmente.
7. La matriz de la reivindicación 5, en donde el inhibidor de RNasas comprende trifosfato de sodio.
8. La matriz de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos un agente reductor en donde el al menos un agente reductor se selecciona del grupo que consiste en ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol (2-ME), tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP), hidrocloreto de tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP-HCl) y una combinación de los mismos.
- 25 9. La matriz de la reivindicación 1, en donde la matriz comprende celulosa, acetato de celulosa, nitrocelulosa, fibra de vidrio o cualquier combinación de los mismos.
10. La matriz de la reivindicación 1, en donde la matriz es porosa.
- 30 11. La matriz de la reivindicación 1, en donde el desnaturalizante de proteínas se selecciona de un grupo que consiste en hidrocloreto de guanidinio, tiocianato de guanidinio, tiocianato de sodio, tiocianato de potasio, arginina, dodecilsulfato de sodio (SDS), urea y combinaciones de los mismos.
12. Una matriz de extracción de RNA que comprende:
un desnaturalizante de proteínas que comprende un agente caotrópico, un detergente o combinaciones de los mismos; y
un ácido o reactivo tampón valorado con ácido impregnado en ella el estado seco;
en donde la matriz es una matriz sólida seca porosa configurada para proporcionar un pH comprendido en un intervalo de 3 a 6 después de hidratación para extracción de RNA y estabilización del RNA extraído con un número de Integridad del RNA (RIN) de al menos 4.
- 35 13. La matriz de la reivindicación 12 que comprende adicionalmente un protector UV o eliminador de radicales libres seleccionado del grupo que consiste en MEHQ, HQ, THQ, ácido ascórbico y combinaciones de los mismos.
14. Una matriz de extracción de RNA que comprende:
un desnaturalizante de proteínas que comprende un agente caotrópico, un detergente o combinaciones de los mismos;
un ácido o reactivo tampón valorado con ácido; y
- 45

un inhibidor de RNasas que comprende una sal trifosfato o sal pirofosfato impregnada en el en estado seco, en donde la matriz comprende una matriz sólida seca porosa configurada para proporcionar un pH entre 3 y 6 después de hidratación y estabilizar el RNA con un valor RIN de al menos 4.

15. Un método para extracción y almacenamiento de ácidos nucleicos a partir de una muestra, que comprende:

5 proporcionar la muestra sobre una matriz sólida seca que comprende un desnaturalizante de proteínas y un ácido o reactivo tampón valorado con ácido;

después de hidratación para extracción de ácidos nucleicos a partir de la muestra, en donde el pH ácido está comprendido en el intervalo de 3 a 6;

secar la matriz que comprende los ácidos nucleicos extraídos; y

10 almacenar los ácidos nucleicos extraídos en la matriz en estado seco a la temperatura ambiente

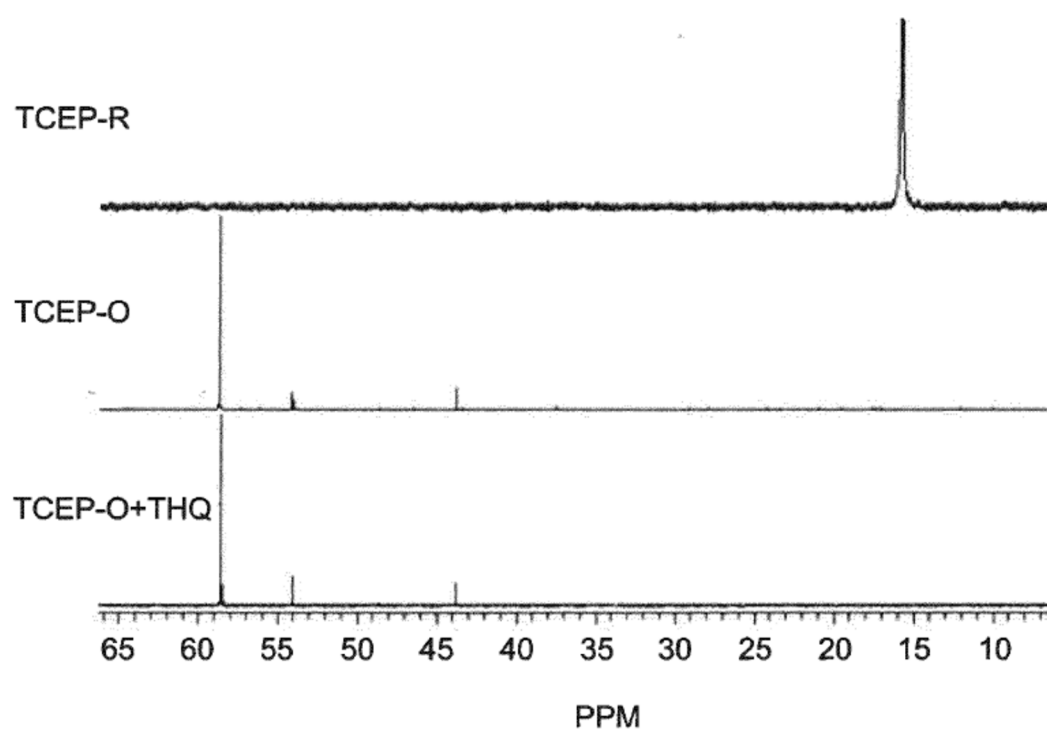


FIG. 1

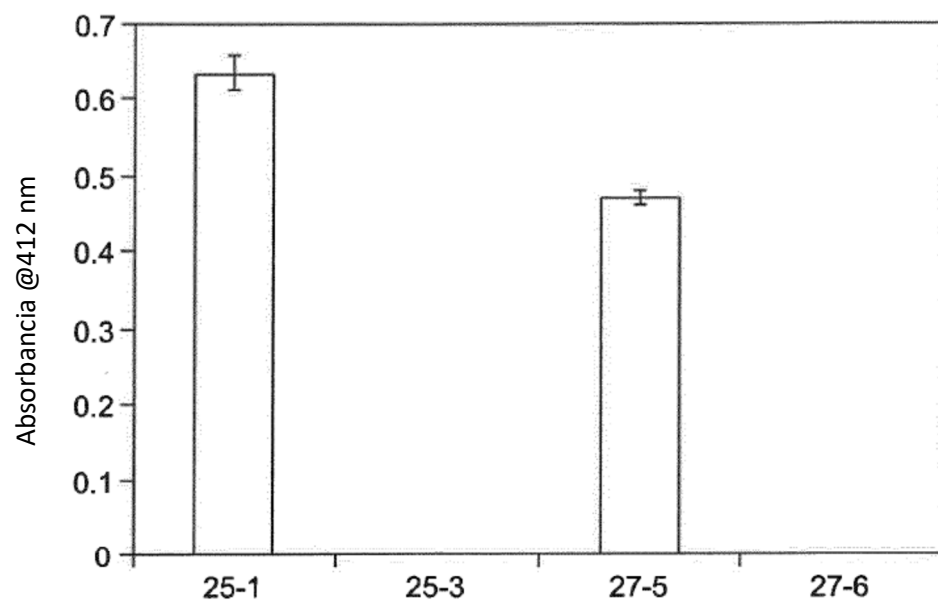


FIG. 2

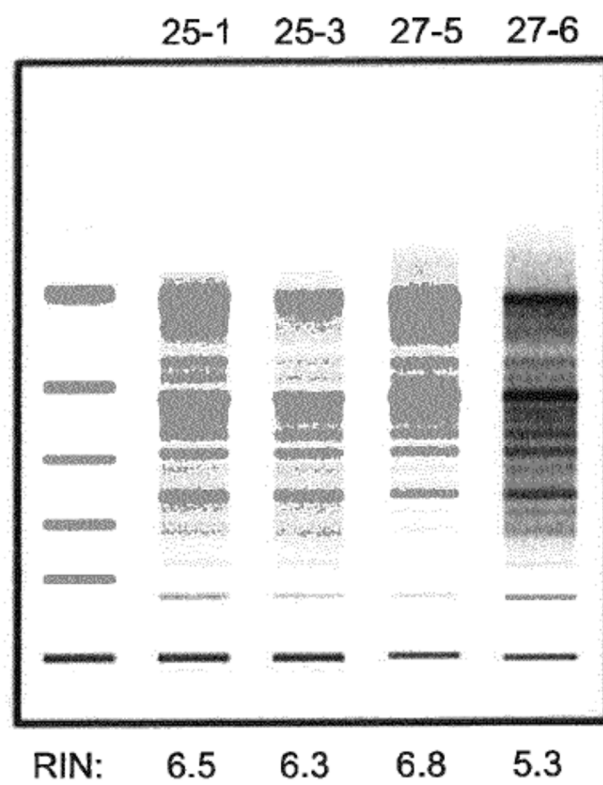


FIG. 3

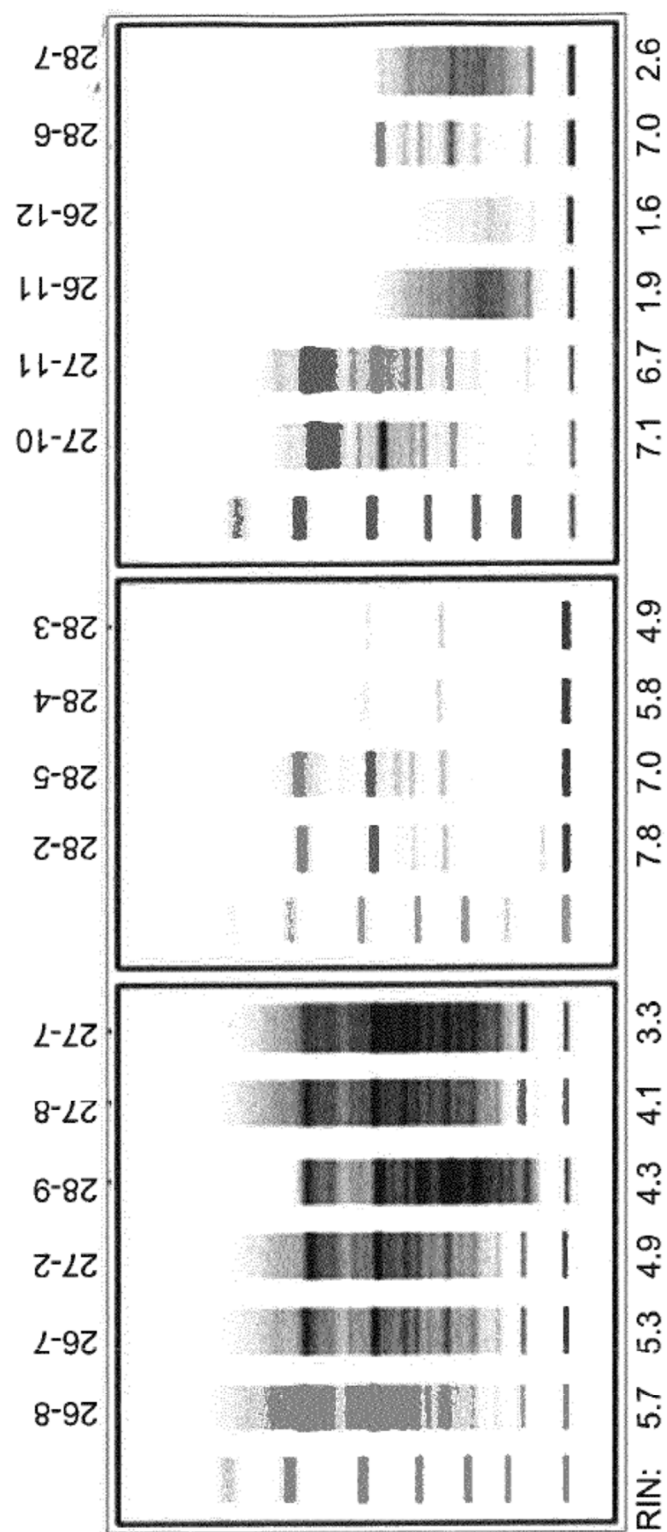


FIG. 4