

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 740**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2010 PCT/US2010/023900**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2010 WO2010093793**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2010 E 10741726 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2396405**

54 Título: **Medios porosos funcionalizados de forma espacialmente no homogénea y procedimiento para su uso en la eliminación selectiva de contaminantes**

30 Prioridad:

11.02.2009 US 151551 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF ROCHESTER (100.0%)
Office Of Technology Transfer 608 Hylan Building
Rochester, NY 14627, US**

72 Inventor/es:

**ROTHBERG, LEWIS y
STWERTKA, BARBARA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 613 740 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

Medios porosos funcionalizados de forma espacialmente no homogénea y procedimiento para su uso en la eliminación selectiva de contaminantes.

5

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para aislar biomoléculas deseadas a partir de una mezcla de biomoléculas. En una realización, la presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para aislar ácidos nucleicos bicatenarios a partir de mezclas que comprenden ácidos nucleicos bicatenarios, ácidos nucleicos monocatenarios y nucleótidos libres.

10

En el análisis de materiales biológicos, a menudo es necesario aislar o purificar en primer lugar moléculas de interés a partir de una mezcla de moléculas tales como las descubiertas en una muestra biológica. Aunque pueden separarse diferentes moléculas basándose en sus propiedades químicas, dichos procedimientos de separación pueden ser tediosos y requerir tiempo. En el análisis de moléculas de ácido nucleico, si las moléculas deseadas no

15 son suficientes para ser detectadas fácilmente, pueden usarse técnicas para incrementar su número de copias para una detección fácil.

Por ejemplo, el análisis y la secuenciación de ADN normalmente implica incrementar el número de copias de una parte diana del genoma mediante amplificación por PCR. La limpieza de productos de PCR para eliminar cebadores y dNTP es necesaria antes de la secuenciación, dado que los cebadores residuales pueden actuar como cebadores de extensión durante la secuenciación y producir fragmentos de secuencia marcados con colorante que pueden complicar la interpretación de datos o, peor, llevar a falsas conclusiones. Además, el fallo en la eliminación de dNTP puede dar como resultado proporciones subóptimas de dNTP con respecto a ddNTP (di-desoxinucleótidos) marcados usados para regular longitudes de lectura en reacciones de secuenciación. Consideraciones similares se

25

Las estrategias convencionales de limpieza de PCR generalmente dependen de la inmovilización de amplicones de ADN, cebadores y dNTP sobre soportes sólidos (por ejemplo, membranas o partículas magnéticas), normalmente usando sales caotrópicas, y a continuación eliminando selectivamente por elución componentes no deseados de estas superficies en diversos disolventes hasta que se eluye el componente deseado. Estos procesos de múltiples etapas requieren tiempo, son muy laboriosos e introducen componentes indeseables tales como disolventes orgánicos y sales caotrópicas que interfieren en reacciones posteriores y, por lo tanto, requieren una limpieza adicional.

30

35 Para mejorar la usabilidad de amplicones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para aplicaciones posteriores, es deseable eliminar el exceso de cebadores y desoxinucleótidos trifosfato no incorporados (dNTP) de manera más eficiente, mientras se retiene el ADN (ácidos nucleicos) bicatenario (ds) amplificado.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

40

En un aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos que separan biomoléculas a partir de una mezcla de biomoléculas. En una realización, la presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos para separar ácidos nucleicos bicatenarios de una mezcla que comprende ácidos nucleicos monocatenarios y/o libres (individuales). Como ejemplo, este procedimiento puede usarse para separar ADN

45

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para separar ácidos nucleicos bicatenarios a partir de una mezcla que comprende ácidos nucleicos bicatenarios (por ejemplo, ADN), ácidos nucleicos monocatenarios y/o nucleótidos libres en una solución acuosa. La mezcla también puede comprender enzimas. La

50

mezcla se pone en contacto con un material nanoporoso funcionalizado de forma espacialmente no homogénea, donde la superficie del material nanoporoso funcionalizado de forma espacialmente no homogénea comprende superficie de poro y superficie de no-poro y donde la superficie de poro tiene grupos superficiales de una funcionalidad y la superficie no de poro tiene grupos superficiales de una funcionalidad diferente. La solución acuosa y el material nanoporoso se incuban en condiciones tales que los ácidos nucleicos monocatenarios y/o nucleótidos

55

libres se adsorban selectivamente a la superficie de poro. El material nanoporoso se aísla a partir de la solución acuosa, separando de este modo los ácidos nucleicos bicatenarios de los ácidos nucleicos monocatenarios y/o de los nucleótidos libres.

Por ejemplo, los ácidos nucleicos bicatenarios se separan de modo que la solución acuosa comprenda menos del

60

10%, 5%, 2% o 1% de ácidos nucleicos monocatenarios y/o nucleótidos libres, y si están presentes enzimas en la mezcla, y/o enzimas.

La superficie de poro puede funcionalizarse con compuestos cargados positivamente seleccionados de entre el grupo que consiste en aminas, iminas, compuestos que contienen iones metálicos y combinaciones de los mismos y/o compuestos hidrófobos para proporcionar grupos superficiales de una funcionalidad, y la superficie de no-poro
 5 puede funcionalizarse con compuestos cargados negativamente seleccionados de entre el grupo que consiste en compuestos aniónicos, compuestos polianiónicos, polielectrolitos y combinaciones de los mismos, y/o compuestos hidrófobos y/o resistentes a la adsorción para proporcionar grupos superficiales de una funcionalidad diferente.

El material nanoporoso funcionalizado de forma espacialmente no homogénea está compuesto por al menos dos
 10 materiales nanoporosos funcionalizados de forma espacialmente no homogénea independientes, y los materiales nanoporosos funcionalizados de forma espacialmente no homogénea independientes muestran diferente funcionalidad de superficie de poro y/o diferente funcionalidad de no-poro.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende un material nanoporoso
 15 funcionalizado de forma no homogénea, donde la superficie del material nanoporoso funcionalizado de forma no homogénea comprende superficie de poro y superficie de no-poro, donde la superficie de poro tiene grupos superficiales de una funcionalidad y la superficie de no-poro tiene grupos superficiales de una funcionalidad diferente, donde el material nanoporoso tiene poros de 2 a 300 nm de diámetro. El material nanoporoso puede ser,
 20 por ejemplo, sílice porosa, alúmina porosa o zeolita.

En una realización, la superficie de poro del material nanoporoso funcionalizado de forma no homogénea está
 funcionalizada con compuestos cargados positivamente, tales como, por ejemplo, aminas, iminas, compuestos que
 contienen iones metálicos, y/o compuestos hidrófobos para proporcionar grupos superficiales de una funcionalidad, y
 la superficie de no-poro está funcionalizada con compuestos cargados negativamente tales como, por ejemplo,
 25 compuestos aniónicos, compuestos polianiónicos, polielectrolitos, y/o compuestos hidrófobos y/o compuestos resistentes a la adsorción para proporcionar grupos superficiales de una funcionalidad diferente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 Figura 1(a). Estrategia general para revestimientos espacialmente no homogéneos

Figura 1(b). Representación gráfica que muestra cómo son eliminados contaminantes a partir de mezclas explotando la funcionalización diferencial de superficies interior y exterior.

35 Figura 2. Espectros FTIR de sílice porosa no funcionalizada (línea negra continua) y sílice porosa modificada con aminopropiltrimetoxisiloxano (APTMS) (línea discontinua). Las vibraciones de tensión de OH y CH₂ están marcadas y la asignación de otras bandas se describe en el ejemplo 1.

Figura 3. Representación gráfica de datos de retención de una mezcla de cebador, dNTP modelo y un amplicón de
 40 PCR de 1956 pares de bases frente al peso de perlas porosas funcionalizadas de forma diferencial.

Figura 4a. Espectros de absorción de nucleótidos antes y después del tratamiento con perlas porosas
 funcionalizadas de forma diferencial. Los espectros de línea continua son espectros de solución de partida y los
 espectros de línea discontinua corta se toman después del tratamiento usando perlas porosas no funcionalizadas.
 45 Los espectros de línea discontinua larga son los resultados después del tratamiento con las perlas de APTMS/PAA descritas en el texto. Para la solución de dNTP, la línea discontinua de puntos presenta el espectro después del tratamiento con el kit de purificación de PCR PureLink (K3100-01) de Invitrogen.

Figura 4b. Representación gráfica de retención de amplicones (1956bp), "dímeros de cebadores" (ds 7 pb), cadenas
 50 sencillas (ss 20 pb) y dNTP de soluciones de partida.

Figura 5. Representación gráfica de la cinética de eliminación de dNTP y amplicones (1956 pb) a partir de una solución usando tratamientos mediante perlas porosas funcionalizadas con APTMS/PAA.

55 Figura 6. Resultados de electroforesis en gel para tres productos de PCR diferentes y un marcador de bajo peso molecular de referencia (NEB N3233S) después de tratamientos con las perlas porosas funcionalizadas de forma diferencial, el kit PureLink de Invitrogen ("columna de centrifugado") o controles.

Figura 7. (a) Representación gráfica de datos que demuestran que los materiales nanoporosos funcionalizados de la
 60 presente invención pueden eliminar rápidamente impurezas mientras retienen el dsADN diana en solución. La cinética se mide mezclando solución de ADN individuales con los materiales nanoporosos funcionalizados y

tomando alícuotas de pequeños volúmenes de solución en puntos temporales indicados para análisis en el Nanodrop1000. Las impurezas de dNTP (nucleótido) y ssADN (cebador) están en líneas discontinuas (rombo negro y cuadrado gris) mientras que la diana está representada con una línea negra continua y círculos. A los 60 segundos, el rendimiento típico muestra >90% de retención de la diana y >90% de eliminación de impurezas de ADN de menos de 50 pb. (b) La purificación de dsADN tiene un excelente rendimiento. Volúmenes iguales de producto de PCR no tratado (-) y tratado (con materiales nanoporosos funcionalizados) (+) (0,5 Kb, 1 Kb y 2 Kb) se hicieron pasar sobre un gel de agarosa al 1% junto con Plus Ladder (L) de 1 Kb de Invitrogen y se marcaron con SybrSafe.

Figura 8. Representación gráfica de datos de cinética de adsorción para materiales nanoporosos preparados mediante autoensamblaje electrostático.

Figura 9. Datos de secuenciación para solución de PCR tratada con materiales nanoporosos de la presente invención.

Figura 10. Tabla que resume varias de las aplicaciones de purificación y ensayo de ácido nucleico que pueden realizarse usando los materiales y protocolos descritos en el presente documento.

Figura 11. Datos que muestran la eliminación de una enzima (Taq ADN polimerasa) de la solución.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos que separan biomoléculas a partir de una mezcla de biomoléculas. En una realización, la presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos para separar ácidos nucleicos bicatenarios de una mezcla que comprende ácidos nucleicos monocatenarios y/o libres (individuales). En una realización, la presente divulgación proporciona composiciones y procedimientos para purificar ácidos nucleicos bicatenarios a partir de otros componentes de reacciones de amplificación de ácido nucleico típicas, tales como cebadores, dNTP, y/o enzimas (por ejemplo, polimerasa) y similares.

El procedimiento de separación de ácido nucleico bicatenario se basa en el uso de materiales nanoporosos en los que las superficies internas (superficies de poro) están funcionalizadas para adsorber pequeñas moléculas (cebadores y dNTP) y las superficies externas (superficies de no-poro) están funcionalizadas para inhibir la adsorción de las moléculas más grandes (amplicones de PCR bicatenarios) - ilustrados en la figura 1(a). Dado que el dsADN más grande está excluido del interior de los poros, solamente las moléculas pequeñas se adsorberán a los materiales nanoporosos y, por lo tanto, el ADN bicatenario puede purificarse a partir de las mezclas explotando la funcionalización diferencial de superficies interior y exterior, tal como se ilustra en la figura 1(a).

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para separar ácidos nucleicos bicatenarios de una mezcla que comprende ácidos nucleicos monocatenarios y/o nucleótidos libres usando material nanoporoso funcionalizado de forma espacialmente no homogénea. La superficie del material nanoporoso funcionalizado de forma espacialmente no homogénea comprende superficie de poro y superficie de no-poro. La superficie de poro tiene grupos superficiales de una funcionalidad y la superficie de no-poro tiene grupos superficiales de una funcionalidad diferente. El procedimiento comprende las etapas de: a) poner en contacto una mezcla que comprende ácidos nucleicos bicatenarios, ácidos nucleicos monocatenarios y/o nucleótidos libres en una solución acuosa con el material nanoporoso funcionalizado de forma espacialmente no homogénea; b) incubar la solución acuosa y el material nanoporoso de a) en condiciones tales que los ácidos nucleicos monocatenarios y/o nucleótidos libres se adsorben selectivamente sobre la superficie de poro; y c) aislar el material nanoporoso a partir de la solución acuosa separando de este modo los ácidos nucleicos bicatenarios (que quedan en solución) de los ácidos nucleicos monocatenarios y/o de los nucleótidos libres.

En la identificación de materiales nanoporosos adecuados a partir de los cuales pueden prepararse materiales nanoporosos funcionalizados de forma espacialmente no homogénea, el tamaño de las moléculas pequeñas que se desea eliminar (es decir, contaminantes tales como, por ejemplo los dímeros de cebadores y dNTP en una mezcla obtenida en una reacción de PCR) se tiene en consideración. Los poros comprenden una abertura en la superficie externa (es decir, orificio) del material nanoporoso y una superficie de poro interna. El material (por ejemplo, una solución) puede acceder al poro solamente mediante la abertura del poro.

Los poros adecuados también excluirán moléculas más grandes, tales como amplicones de ADN bicatenarios que pueden ser de varias decenas a cientos de pares de bases de longitud, y por lo tanto, varias decenas de nm de alcance espacial. Se cree que la longitud de persistencia más larga del ADN bicatenario (la distancia promedio a lo largo de la cual el ADN adopta una trayectoria rectilínea en el espacio tridimensional) también facilita la exclusión de dicho ADN con respecto al ADN monocatenario que se puede plegar más fácilmente y, por lo tanto, difundirse fácilmente al interior de materiales nanoporosos.

El material nanoporoso (también llamando en el presente documento perlas) es útil en la presente invención y tiene superficies que pueden funcionalizarse. Los materiales adecuados tienen un área superficial elevada. Pueden usarse materiales tales como gel o espumas (tales como, por ejemplo, materiales sol-gel, xerogeles y aerogeles).

5 Los materiales pueden ser particulados (tales como, por ejemplo, gel de sílice) o capas de gel o espuma sobre un sustrato sólido (tal como, por ejemplo, un sustrato esférico o sustrato plano). Los materiales particulados nanoporosos adecuados incluyen sílice porosa, alúmina porosa, óxido de titanio poroso y zeolitas. Los geles/espumas de área superficial elevada adecuados incluyen sílice, alúmina, óxido de titanio, óxido de hafnio, óxido de germanio y zeolitas. También pueden usarse óxidos mixtos.

10

En una realización, el material nanoporoso es partículas de sílice porosa. Los materiales nanoporosos adecuados son genes de sílice disponibles en el mercado. Las partículas de sílice son de aproximadamente 10 a 500 micrómetros, incluyendo todos los números enteros entre ambos, de diámetro.

15 En una realización, el índice de refracción del material nanoporoso se selecciona basándose en la elección de óxido metálico u óxido metálico mixto.

Los materiales nanoporosos están compuestos por poros. El tamaño de la abertura del poro, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la longitud del eje más largo de la abertura del poro. Por ejemplo, si la abertura del

20 poro es circular o puede aproximarse a un círculo, el tamaño de la abertura del poro es el diámetro del círculo. Los materiales nanoporosos adecuados tienen tamaños de poro de aproximadamente 2 nm a 300 nm. Por ejemplo, los poros de este tamaño permiten acceso adecuado para los contaminantes al interior de los poros. No es necesario que todos los poros en los materiales nanoporosos sean del mismo tamaño. En diversas realizaciones, el material nanoporoso comprende poros, donde la mayoría de los diámetros de poro, más preferentemente, el 70, 80, 90 o

25 95% están dentro del 10% o el 5% del tamaño de poro nominal. El tamaño de poro nominal puede ser de 2 a 300 nm, incluyendo todos los números enteros entre ambos.

Un ejemplo de un material particulado nanoporoso adecuado es sílice nanoporosa de calidad de cromatografía que puede obtenerse como una partícula sustancialmente esférica con un diámetro de 40 a 60 micrómetros, y un tamaño

30 de poro de aproximadamente 60 Å. Un material con estas características está disponible en el mercado, tal como gel de sílice Merck 9385.

Otros ejemplos de materiales nanoporosos adecuados incluyen Gel de sílice Davisil®, Grado 633, tamaño de poro 60 Å, malla 200-425, Gel de sílice Davisil®, Grado 634, tamaño de poro 60 Å, malla 100-200, Gel de sílice Davisil®,

35 Grado 635, tamaño de poro 60 Å, malla 60-100, Gel de sílice Davisil®, Grado 636, tamaño de poro 60 Å, malla 35-60, Gel de sílice Davisil®, Grado 643, tamaño de poro 150 Å, malla 200-425, Gel de sílice Davisil®, Grado 644, tamaño de poro 150 Å, malla 100-200, Gel de sílice Davisil®, Grado 645, tamaño de poro 150 Å, malla 60-100, Gel de sílice Davisil®, Grado 646, malla 35-60, tamaño de poro 150 Å, Gel de sílice Grado 12, tamaño de poro 22 Å, malla 28-200, Gel de sílice Grado 62, tamaño de poro 150 Å, malla 60-200, Gel de sílice Grado 62, tamaño de poro

40 150 Å, malla 60-200 y Gel de sílice Grado 923, tamaño de poro 30 Å, malla 100-200, todos los cuales están disponibles en el mercado.

La figura 1(a) proporciona una ilustración de funcionalización espacialmente no homogénea de un material nanoporoso. "funcionalizado de forma espacialmente no homogénea" o "funcionalización espacialmente no

45 homogénea" pretende significar que el material nanoporoso comprende al menos dos superficies, con cada superficie portando al menos un grupo funcional que es distinto de la otra u otras superficies y, por lo tanto, la una o varias superficies tienen diferente funcionalidad.

En una realización, los materiales nanoporosos comprenden una superficie de poro que porta un grupo superficial

50 que tiene una funcionalidad (y como resultado es decir, un carácter) y una superficie de no-poro que porta grupos superficiales que tienen una funcionalidad (es decir, un carácter) diferente. Por ejemplo, los grupos funcionales en la superficie dan como resultado que la superficie tenga un carácter cargado positivamente, un carácter cargado negativamente, un carácter hidrófilo, un carácter hidrófobo, un carácter resistente a la adsorción, o cualquier combinación de estos caracteres. Las superficies de poro son generalmente inaccesibles a los polímeros usados

55 para funcionalizar la superficie de no-poro.

En una realización, para conseguir la eliminación selectiva de contaminantes de reacciones de amplificación de ácido nucleico, los poros de los materiales nanoporosos están revestidos (es decir, funcionalizados de modo que la

60 superficie funcionalizada tenga grupos de una funcionalidad particular) para adsorber dNTP, cebadores y cadenas sencillas mientras que el exterior de los materiales nanoporosos (la superficie de no-poro) se hace resistente a la adsorción de amplicones. Esto da como resultado funcionalización espacialmente no homogénea de los materiales.

En otra realización, diferentes nanoporos se funcionalizan con diferentes materiales que proporcionan cierta superficie de nanoporo funcionalizada que es eficaz para eliminar dNTP y otra superficie funcionalizada que es eficaz para eliminar ssADN. En otra realización más, pueden usarse dos conjuntos de materiales nanoporosos
5 funcionalizados - un conjunto que está funcionalizado con un material (tal como para eliminar dNTP y cebadores) y otros conjunto que está funcionalizado con otro material (tal como para eliminar ssADN).

Una superficie nanoporosa, ya sea una superficie de poro o una superficie de no-poro, puede funcionalizarse de modo que tenga grupos superficiales que hacen a la superficie cargada positivamente, cargada negativamente,
10 hidrófila, hidrófoba o resistente a la adsorción. Una superficie nanoporosa también puede funcionalizarse de modo que tenga una combinación de estos caracteres/restos.

Cualquier compuesto con un grupo funcional capaz de tener una carga positiva puede usarse para funcionalizar la superficie de un material nanoporoso, de modo que se haga a la superficie cargada positivamente. Por ejemplo,
15 compuestos con grupos funcionales que tienen un pKa apropiado y, por lo tanto, retienen protones en solución, pueden usarse para funcionalizar la superficie de un material nanoporoso (por ejemplo, la superficie de poro de una nanopartícula) con grupos que tienen una funcionalidad de carga positiva. Como otro ejemplo, para impartir una carga positiva a la superficie del material nanoporoso (por ejemplo, una superficie de poro de una nanopartícula) pueden usarse compuestos que contienen iones amina, imina, tiol o metálicos.

Los compuestos que contienen amina incluyen, aunque sin limitarse a, cualesquiera compuestos con grupos amina primaria, secundaria o terciaria. Para compuestos con grupos amina sustituidos por alquilo, los grupos alquilo pueden ser, por ejemplo, ramificados o lineales y tener, por ejemplo, de 1 a 20 carbonos. Los ejemplos de
20 compuestos que contienen amina incluyen, por ejemplo, aminosilanos con aminas primarias, secundarias y terciarias. Los aminosilanos adecuados también incluyen aquellos con múltiples grupos amina. Un ejemplo de un aminosilano es aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), que está disponible en el mercado. Otro ejemplo de un compuesto que contiene amina es un polímero que tiene grupos amina.

Los compuestos que contienen imina incluyen, aunque sin limitarse a, cualquier compuesto con un grupo imina. Un
30 ejemplo de un compuesto que contiene imina es polietilenimina (PEI), que está disponible en el mercado, y polietilenimina modificada con dimetoximetilsililpropilo, que también está disponible en el mercado.

Un compuesto que contiene un ion metálico puede ser cualquier compuesto que contiene un ion metálico, tal como, por ejemplo, un compuesto organometálico (por ejemplo, ferroceno) o compuesto de coordinación (por ejemplo,
35 rutenio tris-bipiridilo o macrociclos que contienen metal).

El material nanoporoso puede funcionalizarse de modo que una superficie del material porte grupos funcionales que hacen a la superficie hidrófoba. Los ejemplos de grupos funcionales hidrófobos incluyen, por ejemplo, grupos hidrocarburo (tales como grupos alcano inferior (por ejemplo, de C₄ a C₄₀) que pueden ser ramificados o lineales,
40 grupos ciclohidrocarburo (tales como grupo ciclohexilo), grupos aromáticos (tales como grupos fenilo y bencilo) y similares). Estos grupos hidrófobos pueden estar fluorados (por ejemplo, politetrafluoroetileno). Por ejemplo, un compuesto con cualquiera de estos grupos puede usarse para funcionalizar una superficie nanoporosa que hace a la superficie hidrófoba. Por ejemplo, a superficies de poro se les puede dotar de funcionalidad con carácter hidrófobo desde el punto de vista de adsorber pequeñas especies hidrófobas y seguir teniendo aún un número suficiente de
45 grupos superficiales sin reaccionar (por ejemplo, grupos hidroxilo (-OH)) que son hidrófilos, de modo que las partículas preparadas de esta manera puedan seguir siendo solubles en agua.

En una realización, la superficie de poro se funcionaliza de modo que tenga carácter hidrófobo. Por ejemplo, la superficie de poro puede funcionalizarse con octadeciltriclorosilano (OTS) o politetrafluoroetileno (PTFE) lo que dará
50 como resultado que la superficie de poro porte grupos que hacen a la superficie hidrófoba. Otros ejemplos de compuestos que pueden usarse para funcionalizar una superficie proporcionando una superficie hidrófoba incluyen, aunque sin limitarse a, n-butyltrimetoxisilano (grupos superficiales de alcano C₄), ciclooctiltriclorosilano (grupos superficiales de ciclooctano), fenoxipropiltriclorosilano (grupos superficiales fenilo) y nonafluorohexiltrimetoxisilano (cadenas parcialmente fluoradas como grupos superficiales). Como un ejemplo específico, partículas de sílice
55 porosa modificadas con OTS, donde coberturas de OTS del 30-70% hacen a regiones de la superficie hidrófobas, de modo que éstas adsorban materiales hidrófobos tales como ADN monocatenario y enzimas en un amplio intervalo de condiciones tanto de sal como de pH, mientras que las partículas de sílice permanecen dispersadas en una solución acuosa.

60 En una realización, la superficie de poro puede estar funcionalizada con compuestos cargados positivamente y/o hidrófobos. Los compuestos cargados positivamente o hidrófobos adsorben contaminantes, tales como dNTP,

cebadores, ssADN y similares. Cuando estos compuestos se usan para funcionalizar la superficie de poro, estos se denominan "materiales funcionalizadores de poros".

Los compuestos que contienen aniones incluyen cualquier compuesto cargado negativamente o compuesto que porta un grupo/fracción cargada negativamente (por ejemplo, grupo carboxilato, grupo sulfonato, grupo fosfato, grupo hidróxido y similares). Los ejemplos de compuestos cargados negativamente incluyen, aunque sin limitarse a, 3(-cianobutil)dimetilclorosilano y metoxietoxiundeciltriclorsilano. Los compuestos polianiónicos incluyen compuestos que portan más de un grupo/resto cargado negativamente (por ejemplo grupo carboxilato, grupo sulfonato, grupo fosfato, grupo hidróxido y similares). Los polielectrolitos aniónicos incluyen polímeros (y copolímeros, donde el copolímero puede comprender monómeros que no tienen grupos cargados negativamente (por ejemplo, un copolímero de PAA-polietileno)) que comprenden monómeros con grupos cargados negativamente. Los ejemplos de polielectrolitos aniónicos incluyen ácido poliestirenosulfónico, ácido poliacrílico y similares.

Los compuestos de polielectrolito pueden modificarse para incluir grupos hidrófobos antes o después de funcionalizar una superficie. Por ejemplo, grupos carboxilato de PAA pueden hacerse reaccionar para formar grupos fluorocarburo u otros grupos hidrófobos antes de funcionalizar una superficie.

En una realización, se usa una sal sódica del ácido poliacrílico de alto peso molecular (PAA) como polielectrolito. En otra realización, se usa poliestireno sulfonado como polielectrolito.

La una o varias superficies del material nanoporoso pueden funcionalizarse con compuestos que resisten la adsorción de ácidos nucleicos ds, por ejemplo, amplicones de PCR de ADN, que se difunden mal en los nanoporos. Cuando dichos compuestos se usan para funcionalizar la superficie externa o de no-poro, estos se denominan "materiales funcionalizadores de superficie externa o de no-poro". Los materiales resistentes a la adsorción adecuados incluyen compuestos cargados (positivos o negativos) y/o hidrófilos, o cualquier compuesto que se sabe que es resistente a la adsorción de biomoléculas (por ejemplo, polietilenglicol). Los ejemplos de dichos compuestos incluyen, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), y compuestos que contienen polietilenglicol (por ejemplo, un siloxano funcionalizado con PEG), y compuestos que contienen flúor. El PEG y los compuestos que contienen PEG adecuados tienen de 1 a 100 grupos de etilenglicol. El PEG y los compuestos que contienen PEG adecuados para funcionalización de la superficie de no-poro tienen un peso molecular (o radios hidrodinámicos) tales que el PEG o el compuesto que contiene PEG no entra en el poro.

En una realización, la carga positiva y/o negativa en la superficie de poro y/o de no-poro resulta de la exposición de la superficie a una solución acuosa de un pH apropiado, de modo que el compuesto esté protonado (dando como resultado una superficie cargada positivamente) y/o sea negativo (dando como resultado una superficie cargada negativamente). Por ejemplo, un pH apropiado puede ser de 5 a 10, incluyendo todos los números enteros y valores hasta 0,1 entre ambos.

La superficie de no-poro puede funcionalizarse independientemente de qué propiedad de la superficie de poro se seleccione. Suponiendo que la superficie de poro tiene un carácter positivo (por ejemplo, la superficie de poro se funcionaliza con una amina), la superficie de no-poro puede modificarse para tener carácter negativo, hidrófobo, de resistencia a la adsorción o de reconocimiento selectivo).

La superficie de poro puede estar cargada negativamente y la superficie no de poro tener un carácter superficial diferente. Por ejemplo, en el caso de la sílice, las superficies de poro podrían hacerse negativas mediante unión covalente de silanos carboxilados o cualquiera de los compuestos cargados negativamente descritos en el presente documento. El posterior tratamiento de esta sílice con PAH o polilisina de alto PM (peso molecular) que no pueden penetrar en los poros harían a las superficies de no-poro exteriores positivas, mientras que las reacciones con PEG aminado o compuestos hidrófobos aminados como octadecilamina (ODA) podrían hacer a las superficies exteriores resistentes a la adsorción o hidrófobas respectivamente.

Un ejemplo es un caso donde hay dos materiales con elevado PM en una solución de analito, y es deseable eliminar solamente un analito y concentrar el otro. Esto puede conseguirse tratando la solución con un material nanoporoso funcionalizado, de modo que absorba selectivamente el componente de analito no deseado. Como un ejemplo específico, proteínas hidrófobas pueden separarse de ADN hidrófilo mientras se concentra el ADN usando materiales nanoporosos funcionalizados, de modo que la superficie de poro sea resistente a la adsorción y la superficie de no-poro sea hidrófoba. La proteína puede tener regiones cargadas positivamente que se adsorberían sobre una superficie exterior cargada negativamente mientras que el ADN no se adsorbería.

La superficie de no-poro puede estar funcionalizada con, por ejemplo, oligonucleótido de ADN sintético terminado en amina que puede conjugarse a grupos carboxilato en la superficie de no-poro funcionalizada con PAA, garantizando

que la fracción oligonucleotídica del ADN estaría presente solamente en la superficie de no-poro. La conjugación del oligonucleótido de ADN puede realizarse antes o después de la funcionalización de la superficie de no-poro con PAA.

- 5 La superficie de poro de un material nanoporoso también puede funcionalizarse con secuencias de ácido nucleico diana, y dicho material puede usarse, por ejemplo, para extraer un componente particular de una mezcla de moléculas pequeñas y grandes en solución (por ejemplo, eliminación de una secuencia de oligonucleótidos particular de una mezcla de oligonucleótidos pequeños).
- 10 Como un ejemplo específico, puede ser deseable para separar un miARN particular de una solución que contiene ARN heterogéneo o eliminación de un conjunto de cebadores particular durante PCR anidada. La superficie de poro puede estar funcionalizada con el oligonucleótido complementario y la superficie de no-poro funcionalizada con un material de elevado PM. Para funcionalizar la superficie de poro con un oligonucleótido complementario, la superficie de poro puede estar funcionalizada con un oligonucleótido modificado con amina que se funcionalizó previamente
- 15 con un grupo epoxi usando química de silanización. El grupo epóxido puede reaccionar con el grupo amina del oligonucleótido modificado con amina dando como resultado la funcionalización de la superficie de poro. La superficie de no-poro puede funcionalizarse de modo que se le haga resistente a la adsorción mediante unión covalente de PEG aminado de alto PM con epóxidos sin reaccionar. Como alternativa, la superficie de no-poro puede funcionalizarse con grupos cargados positivamente mediante autoensamblaje electrostático de polielectrolitos
- 20 que contienen amina de alto PM (por ejemplo, PAH) o con grupos cargados negativamente mediante reacción con PAA seguida por reacción con PAH.

La selección del tamaño de poro y polímeros de alto PM puede llevarse a cabo para recoger selectivamente especies particulares pequeñas de interés a partir de un analito complejo. El protocolo general puede implementarse

25 para retener las especies recogidas o para retener la solución purificada que ya no contiene las especies recogidas.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una estrategia general para funcionalizar de forma diferencial la superficie de poro y de no-poro de un material nanoporoso. En general, la superficie de no-poro se funcionaliza mediante reacción/exposición a materiales (normalmente polímeros de alto peso molecular) macromoleculares

30 grandes que no encajan fácilmente en los poros y, por lo tanto, solamente funcionalizan la superficie de no-poro. La funcionalización de la superficie de no-poro puede realizarse antes o después de la de la superficie de poro, y cada estrategia tiene sus ventajas. Por ejemplo, la funcionalización de la superficie de no-poro puede conseguirse a través de unión covalente, tal como química de silanización sobre óxidos porosos o mediante autoensamblaje electrostático as por ejemplo adsorción de polielectrolitos sobre superficies cargadas tales como óxidos hidroxilados.

35 Las macromoléculas pueden aplicarse antes o después de la funcionalización interior. Además, las macromoléculas pueden, aunque no es necesario que lo hagan, portar la funcionalidad exterior final. Las macromoléculas pueden llevar grupos funcionales generales sometidos a reacción química adicional que posteriormente otorga la propiedad deseada selectivamente sobre las superficies exteriores.

40 Cuando las superficies de poro se funcionalizan primero, las macromoléculas "cubren" la superficie de no-poro exterior y reaccionan con o simplemente bloquean mecánica o electrostáticamente la funcionalización de la superficie original haciendo a estas fracciones inaccesibles a un analito subsiguiente. Por ejemplo, un polielectrolito cargado negativamente demasiado grande para penetrar en los poros puede ponerse en contacto con partículas

45 prefuncionalizadas con restos positivos tales como grupos amina. En este ejemplo, los poros tendrían un carácter superficial cargado positivamente mientras que la superficie de no-poro exterior tendría un carácter superficial cargado negativamente. Por lo tanto, estos materiales podrían usarse en aplicaciones donde es deseable eliminar moléculas cargadas negativamente, pequeñas de un analito mientras se retienen moléculas cargadas negativamente grandes en solución. La limpieza de PCR es un ejemplo de dicha aplicación donde dNTP y

50 cebadores monocatenarios pueden adsorberse sobre superficies de poro que tienen un carácter superficial cargado positivamente mientras que, moléculas de ADN bicatenario grandes permanecen en la solución.

Como alternativa, las macromoléculas también pueden funcionalizar primero y subsiguientemente los poros. Esta estrategia es eficaz en la medida en que las macromoléculas cubren eficazmente la superficie de no-poro exterior y

55 bloquean la química de funcionalización que está siendo aplicada a las superficies de poro. Como otra estrategia alternativa, la funcionalización de no-poro puede ser química que se produce "debajo de" las macromoléculas sobre la superficie de no-poro exterior, de modo que la funcionalidad que se le está dando a la superficie porosa interior esté "oculta" en la superficie de no-poro exterior a pesar de la química de poro que también se produce en el exterior como en el ejemplo anterior donde las macromoléculas se aplican después de la funcionalización de poros.

60 En general, la funcionalización superficial, tal como se usa en la presente invención, puede llevarse a cabo usando

cualquier reacción, procedimiento, etc., que de cómo resultado que el compuesto deseado se inmovilice sobre la superficie del material nanoporoso. Por ejemplo, pueden inmovilizarse compuestos sobre la superficie del material nanoporoso mediante uno o varios enlaces covalentes entre el compuesto y la superficie. Los compuestos también pueden depositarse de forma electrolítica sobre revestimientos adecuados. Cuando solamente se pretende

5 funcionalización exterior, las fracciones deseadas pueden unirse previamente al polímero de peso molecular grande que está electrolíticamente adsorbido sobre la superficie. Como un ejemplo, se podría decorar PAA de alto peso molecular con biotina y a continuación depositarlo sobre las superficies exteriores que portan la biotina consigo y de este modo biotinilar selectivamente el exterior.

10 Por ejemplo, puede introducirse funcionalidad de carga positiva usando química de silanización (por ejemplo, reacción con aminosilanos tales como APTMS) o autoensamblaje de polielectrolitos cargados positivamente con bajo peso molecular (por ejemplo poli(alilamina), poli(etilenimina) o poli(lisina)).

Un ejemplo del uso de química de silanización para funcionalizar la superficie de poro de sílice nanoporosa con

15 grupos cargados positivamente es unión covalente de aminas con aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) o cualquiera de los silanos disponibles en el mercado. Como otro ejemplo, la exposición del material nanoporoso a polielectrolitos pequeños, tales como polietilenimina (PEI) de bajo peso molecular, clorhidrato de polialilamina (PAH) o polilisina, que se sabe que se adsorben sobre sílice nativa. Dicha funcionalización de la superficie de poro transmitirá carácter positivo a esta superficie debido a los grupos amina que están expuestos sobre la superficie. Otros tipos de sustratos

20 pueden funcionalizarse con química superficial análoga. Por ejemplo, alúmina porosa puede modificarse para presentar los grupos químicos deseados mediante química de fosfonato y óxido de titanio también puede funcionalizarse con química de silanización estándar usada sobre sílice.

Como otro ejemplo, la superficie de poro puede funcionalizarse usando química de silanización (usando, por

25 ejemplo, compuestos disponibles en el mercado) para unir grupos hidrófobos comunes (tales como, por ejemplo, alcanos, grupos fenilo e hidrocarburos fluorados).

En otra realización, el procedimiento para preparar un material nanoporoso funcionalizado de forma diferencial comprende, como etapa inicial, poner en contacto el material nanoporoso con un material funcionalizador de poros

30 que da como resultado que ambas superficies se funcionalicen con el material funcionalizador de poros. Una etapa subsiguiente implica poner en contacto el material nanoporoso (funcionalizado con el material funcionalizador de poros) con un material funcionalizador de superficie que da como resultado que la superficie externa y no la superficie de poro se funcionalice con el material funcionalizador de la superficie externa. Un experto en la materia reconocería que pueden usarse otras metodologías que darían como resultado los materiales de la presente

35 invención que comprenden dos superficies funcionalizadas distintas con las propiedades deseadas.

Como un ejemplo de esta realización, se produce un material nanoporoso con una superficie de poro resistente a la adsorción y una funcionalización de superficie de no-poro diferente sobre partículas de sílice. En primer lugar, una

40 superficie se funcionaliza mediante silanización con una amina, de modo que se produce una superficie cargada positivamente. A continuación, las aminas exteriores se cubren y/o se hacen reaccionar con PAA de alto PM. En tercer lugar, las aminas interiores se hacen reaccionar con oligoetilenglicol carboxilado de un PM tal que pueda penetrar en los poros. Esto produciría un material nanoporoso con una superficie de poro resistente a la adsorción y superficie de no-poro cargada negativamente. La superficie de no-poro podría hacerse hidrófoba usando un copolímero de PAA/hidrófobo o hacerse positiva sobre-revistiendo PAA con PAH de alto PM. Otros órdenes de

45 aplicación y el uso de capas de silanización mixtas para impartir sitios de unión junto con interiores resistentes a la adsorción, también son posibles.

En otra realización más, es posible eliminar (u ocultar) selectivamente las aminas sobre la superficie de no-poro exterior mediante aplicación de una macromolécula. Por ejemplo, si se desea que la superficie exterior tenga un

50 carácter negativo, la superficie exterior puede funcionalizarse en último lugar con, por ejemplo, un polielectrolito negativo tal como ácido poliacrílico (PAA) con peso molecular (PM) suficientemente alto (es decir, tamaño suficientemente grande) para que los poros permanezcan no afectados. Los grupos carboxilato portados por el PAA son electrostáticamente atraídos a las aminas y, dado que el PAA los porta en exceso, la carga exterior cambiaría a negativa. Otros polímeros cargados negativamente tales como sulfonato de poliestireno (SPS) también podrían

55 usarse para este fin. Nótese que la carga del polielectrolito y la carga de la amina dependen del pH, de modo que esta atracción es solamente en ciertos intervalos de pH (en estos casos, bastante amplios, de aproximadamente pH 5 a pH 8). También es posible hacer al acoplamiento independiente del pH uniendo covalentemente PAA a las aminas superficiales mediante química de acoplamiento de carboxilato-amina.

60 La funcionalización del exterior puede realizarse de al menos dos maneras. En primer lugar, capas de silanización mixtas con un componente minoritario que contiene grupos marginalmente hidrófilos que portan fracciones

funcionales que pueden hacerse reaccionar con polímeros de alto PM en el exterior. Por ejemplo, los materiales nanoporosos pueden funcionalizarse con capas mixtas de OTS e hidrocarburos de cadena larga que tienen una terminación amina. Esta última reaccionará con materiales carboxilados tales como PAA y copolímeros de PAA con otros polímeros que son o contienen unidades funcionales. La reacción con PAA haría al exterior negativo, mientras que la reacción con PEG carboxilado lo haría resistente a la adsorción. Análogamente, el depósito de polielectrolitos cargados positivamente tales como PAH o PEI de alto PM encima de PAA podría usarse para hacer al exterior positivo.

Si es deseable hacer a la superficie exterior hidrófoba, existen al menos dos maneras generales de hacerlo. En primer lugar, se podría hacer reaccionar un polímero de alto PM con las aminas superficiales (por ejemplo, un copolímero de PAA con polietileno) para llevar alcanos hidrófobos u otros grupos a la superficie. En segundo lugar, se podría eliminar por reacción el exceso de grupos carboxilato en el PAA con compuestos hidrófobos que contienen amina, tales como octadecilamina. En el último caso, se puede cambiar incluso las propiedades de la superficie exterior selectivamente con moléculas pequeñas, dado que éstas no serían capaces de unirse a los grupos amina u OH residual en el interior de sílice porosa funcionalizada. La química para modificar algunos de los carboxilatos de PAA podría realizarse antes o después de la aplicación del PAA.

Estrategias similares que usan estas dos alternativas (unión anterior de la funcionalidad deseada al polímero que contiene carboxilato o reacciones con exceso de carboxilatos de PAA no amarrados por aminas después del depósito) también pueden usarse para otorgar carácter resistente a la adsorción al exterior. Por ejemplo, polietilenglicol carboxilado (COOH-PEG) de alto PM, que no puede penetrar en los poros, puede hacerse reaccionar con las aminas. La funcionalización de una superficie con PEG da como resultado una suspensión biocompatible, hidrófila y resistente a la adsorción. Como alternativa, puede hacerse reaccionar oligoetilenglicol aminado con el exceso de grupos carboxilato para funcionalizar la superficie.

En una realización, micropartículas de sílice porosa pueden funcionalizarse con polielectrolitos de bajo peso molecular (PM) o APTMS en los poros y con PAA de alto PM en el exterior usando técnicas convencionales.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un procedimiento para separar ácidos nucleicos bicatenarios de ácidos nucleicos monocatenarios y/o libres (individuales) usando los materiales nanoporosos descritos en el presente documento.

En una realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento para la purificación de dsADN a partir de una mezcla que comprende dsADN y uno o más de dNTP, cebadores y/u otros ssADN. El procedimiento comprende combinar la mezcla con el material nanoporoso descrito anteriormente, incubar la mezcla combinada durante un periodo de tiempo para efectuar secuestro de dNTP y ssADN (incluyendo cebadores) sobre o dentro de los poros de los materiales nanoporosos; y, separar el material nanoporoso de la solución de mezcla para obtener una solución de dsADN purificada. Por lo tanto, separar el material nanoporoso de la mezcla elimina dNTP y ssADN adsorbidos a las superficies de nanoporo (y por lo tanto, secuestrados o atrapados en los poros) del dsADN que puede recuperarse en la solución. Por ejemplo, este procedimiento puede usarse para "limpiar"/purificar un producto de PCR. En exposición de una mezcla de productos de PCR de ADN bicatenario, ácidos nucleicos y dNTP a un material nanoporoso de la presente invención, el ADN bicatenario no se adsorberá sobre las superficies mientras que otros componentes se adsorberán preferentemente. La solución eliminada de las superficies será ADN bicatenario purificado. Las figuras 1(a) y (b) ilustran gráficamente la preparación de materiales típicos y representan el comportamiento de un producto de PCR.

En esta realización, la superficie de poro debe funcionalizarse de modo que adsorba fuertemente dNTP y cadenas sencillas de ácidos nucleicos mientras que la superficie de no-poro exterior del material nanoporoso debe ser resistente a la adsorción de ácido nucleico bicatenario. Una estrategia es funcionalizar los poros para que presenten carga positiva mientras se funcionaliza el exterior para que presente superficies con carga negativa o completamente inertes (es decir, resistentes a la adsorción) que inhiben la adsorción de amplicones. La carga positiva podría introducirse sobre partículas de sílice porosa usando química de silanización (por ejemplo, reacción con aminosilanos tales como aminopropiltrimetoxisilano) o autoensamblaje de polielectrolitos cargados positivamente con bajo peso molecular (por ejemplo, polialilamina, polietilenimina o polilisina). Dado que estos revestirían presumiblemente superficies tanto interiores como exteriores, se bloquearían las superficies exteriores con polielectrolitos cargados negativamente grandes (tales como ácido poliacrílico de alto peso molecular) demasiado grandes para penetrar en los poros. También puede ser posible usar revestimientos hidrófobos en el interior y revestimientos hidrófilos, negativos o inertes en el exterior de las partículas para adsorber de forma diferencial dNTP y cebadores.

El presente procedimiento es diferente de procedimientos previos donde todos los componentes de una reacción de

amplificación se movilizan sobre superficies homogéneas y diversos componentes se eluyen a continuación selectivamente. El procedimiento proporciona una metodología de separación de etapa única que combina exclusión por tamaño (por ejemplo, materiales con un radio hidrodinámico mayor que el tamaño de poro promedio del material nanoporoso son excluidos) con superficies que tienen características de adsorción diferencial, de modo que un subconjunto de moléculas y complejos pequeños pueden eliminarse selectivamente de mezclas para aplicaciones de purificación o ensayo.

La mezcla que comprende dsADN y material nanoporoso puede incubarse durante periodos de tiempo que varían entre menos de un minuto y varios minutos. El tiempo de incubación puede ser optimizado por un experto en la materia para contemplar diversos parámetros de reacción de amplificación de ácido nucleico, tales como el volumen de la mezcla que se combina con el material nanoporoso, así como la cantidad de dsADN, ssADN y/o dNTP presente o que se espera que esté presente en la mezcla. Por ejemplo, y sin pretender estar limitados por ninguna teoría particular, generalmente se considera que entre 40 - 200 μM de dNTP es una concentración de dNTP óptima para reacciones de PCR convencionales. Del mismo modo, generalmente se considera que entre 0,1 - 1,0 μM es una concentración óptima de cebadores de PCR para reacciones de PCR típicas. Sin embargo, concentraciones mayores o menores de dNTP y/o cebadores pueden usarse para ciertas reacciones de amplificación, dependiendo de diversos factores, tales como la cantidad y calidad del patrón de ADN, la longitud de amplicones esperados, y el número, temporización y temperaturas de ciclos de amplificación. Por lo tanto, el periodo de incubación puede prolongarse o acortarse para cualquier protocolo de PCR particular para optimizar la cantidad de tiempo que dNTP no incorporados y/o cebadores no incorporados tienen que difundirse en los nanoporos. La invención contempla tiempos de incubación de más de un minuto, y tiempos entre 5-60 segundos ambos inclusive, y que incluyen todos los números enteros entre 5 y 60 segundos. Además, el periodo de incubación puede ajustarse para conseguir una cantidad deseada de eliminación de dNTP o ssADN, y/o una cantidad deseada de retención de dsADN en la mezcla. Por ejemplo, en una realización, un periodo de incubación de entre 30 y 45 segundos es suficiente para eliminar más del 90% de los dNTP y mantener más del 80% de los amplicones de PCR en la solución de mezcla.

La cantidad de material nanoporoso funcionalizado de forma no homogénea añadida a una mezcla de amplificación de ácido nucleico particular puede optimizarse teniendo en cuenta diversos factores. Por ejemplo, y sin pretender estar limitados por la teoría, es posible calcular los moles de dNTP y cebadores que se añaden a una reacción de amplificación de ácido nucleico particular. También es posible estimar, basándose en factores tales como el número y la temperatura de ciclos de amplificación y la actividad polimerasa esperada, la cantidad de dNTP y cebadores no incorporados que permanecerá en la mezcla una vez que el protocolo de amplificación está completo. Por consiguiente, la capacidad total del material nanoporoso en la mezcla de adsorber dNTP y cebadores no incorporados puede ajustarse para proporcionar más (o menos) área superficial de nanoporo para facilitar la eliminación de tantos dNTP y cebadores como fuera posible, sin hacer que la mezcla se vuelva difícil de procesar debido a, por ejemplo, la viscosidad incrementada. Por ejemplo, en un volumen de reacción de PCR típico de 100 μl que comprende al comienzo del protocolo de amplificación una concentración convencional de dNTP y cebadores, una cantidad ejemplar del material nanoporoso que podría añadirse a la solución postamplificación para eliminar dNTP y cebadores no incorporados está entre 2-4 mg.

El material nanoporoso (con los contaminantes atrapados) puede separarse del dsADN mediante una técnica adecuada, incluyendo aunque sin limitarse a técnicas de centrifugado y magnéticas. Como alternativa, el material nanoporoso puede retenerse mediante filtración y la eliminación de la solución de amplificación, tal como pipeteando. Esto dará como resultado la separación de dsADN de los contaminantes, proporcionando de este modo una solución de ácido nucleico bicatenario purificado. La cantidad de contaminantes que quedan en (o eliminados de) una preparación de ácido nucleico bicatenario purificado puede determinarse mediante técnicas estándar, tales como análisis espectroscópico.

Se espera que la invención pueda usarse para purificar ácidos nucleicos bicatenarios a cualquier grado de purificación deseado, tal como purificación parcial, purificación sustancialmente completa o purificación completa. En realizaciones diferentes, los contaminantes pueden comprender menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 10%, menos del 5% o menos del 1%, y menos que todos los números enteros entre el 50% y el 1%. La invención también puede dar como resultado una preparación de ácido nucleico bicatenario que está completamente libre de contaminantes. Por lo tanto, los ácidos nucleicos bicatenarios pueden comprender del 50% al 100%, incluyendo todos los números entre ambos, de los ácidos nucleicos en la solución después de que las nanopartículas porosas se separen de la mezcla.

El procedimiento de la presente invención puede usarse para purificar dsADN a partir de una solución de reacción de amplificación de ácido nucleico, una preparación de ADN plasmídico concentrado, una preparación de digestión por restricción, una extracción de ADN, soluciones de hibridación de ensayo de ADN y/o ARN, una preparación de ARN, o una reacción de mutagénesis dirigida de ssADN, y similares. Los ácidos nucleicos bicatenarios purificados usando

el procedimiento de la invención pueden ser ADN bicatenario, ARN bicatenario, o moléculas de ácido nucleico monocatenarias (ss) que adoptan regiones significativas de estructura bicatenaria. Las moléculas de ácido nucleico bicatenarias pueden ser lineales o circulares. Usando el procedimiento y los materiales nanoporosos de la presente invención, puede aislarse dsADN de tan solo 10 pb a partir de una reacción de amplificación.

5

En una realización, se usan micropartículas de sílice porosa con superficies de poro funcionalizadas con APTMS y superficies de no-poro funcionalizadas con PAA de alto PM en el procedimiento. Varios mg de material nanoporoso se añaden a 100 μ l de una solución acuosa de mezcla de ss/dsADN y en la separación del material nanoporoso y la mezcla, solamente el dsADN es retenido en la solución acuosa.

10

En otra realización, micropartículas de sílice porosa con superficies de poro funcionalizadas con polielectrolitos de bajo PM cargados positivamente y superficies de no-poro revestidas con PAA de alto PM. Varios mg de material nanoporoso se añaden a 100 μ l de una solución acuosa de mezclas de ss/dsADN y, en la separación del material nanoporoso y la mezcla, solamente el dsADN es retenido en la solución acuosa.

15

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona procedimientos para separar ácidos nucleicos bicatenarios de proteínas. Ejemplos no limitantes de las proteínas incluyen proteínas enzimáticas, tales como polimerasas y nucleasas. Las polimerasas incluyen, sin limitación, ADN polimerasas, ARN polimerasas, transcriptasas inversas y ARN polimerasas dependientes de ARN. Las nucleasas incluyen sin limitación endonucleasas de restricción, y

20

ADNasa y ARNasa de todas las variedades.

En diversas realizaciones ilustrativas, para algunas aplicaciones posteriores de ADN amplificado, es deseable separar el dsADN de la enzima ADN polimerasa usada para amplificación del ADN, tal como Taq polimerasa. Sin embargo, dado que las ADN polimerasas están cargadas negativamente y tienen pesos moleculares grandes y, por lo tanto, probablemente no penetrarían en los poros de las nanopartículas funcionalizadas de forma heterogénea divulgadas en el presente documento, la presente divulgación contempla el uso de partículas nanoporosas que tienen funcionalización superficial hidrófoba para adsorber selectivamente las polimerasas y/u otras proteínas que pueden estar presentes con ácidos nucleicos bicatenarios en una mezcla. A este respecto, se demuestra la separación de Taq polimerasa de ácido nucleico ds usando partículas nanoporosas funcionalizadas con fracciones hidrófobas. Se espera que este resultado pueda extenderse a la separación de ácidos nucleicos bicatenarios de otras proteínas, tales como enzimas implicadas en catálisis de ácidos nucleicos, dado que en la técnica se conoce que, por ejemplo, las nucleasas se adsorberán selectivamente sobre superficies hidrófobas mientras que el ADN no lo harán. También es conocido que si cualquier proteína particular se adsorberá sobre una superficie hidrófoba está correlacionado con el contenido de aminoácidos aromáticos de la proteína, y que aquellas proteínas que tienen más del 10% de contenido de aminoácidos aromáticos tendrán alta afinidad por las superficies hidrófobas. (Véase, por ejemplo, el documento Cashion y col., *Nucleic Acids Research*, vol. 8, No. 5, Mar. 11, 1980, págs. 1167-1185.)

25

30

35

40

En una realización, puede usarse una sílice nanoporosa parcialmente funcionalizada covalentemente con OTS (octadeciltriclorosilano) de modo que la superficie de no-poro sea hidrófoba, para eliminar Taq polimerasa de la solución. El grado de revestimiento con OTS es tal que las partículas siguen siendo hidrófilas y se dispersan fácilmente en agua.

45

Como alternativa, materiales nanoporosos que comprenden una superficie de no-poro funcionalizada con un compuesto de polielectrolito que tiene una funcionalidad múltiple (es decir, diferentes grupos funcionales) pueden usarse para eliminar selectivamente polimerasa. Por ejemplo, copolímeros de PAA y un resto hidrófobo tal como polietileno pueden usarse para funcionalizar la superficie de no-poro. Esta superficie funcionalizada se volverá no atractiva para dsADN grande debido a que el PAA resiste electrostáticamente la adsorción de ADN, pero las regiones hidrófobas eliminarán polimerasa, dado que ésta es mucho más hidrófoba que el dsADN. El grado de hidrofobia de la superficie de no poro puede ajustarse a medida apropiadamente usando diferentes copolímeros con composición de grupos funcionales variable. La múltiple funcionalidad de superficie de no-poro también puede crearse mediante sustitución de un número controlado de los grupos carboxilato en el PAA por grupos hidrófobos. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar PAA con una cantidad apropiada de octadecilamina antes o después de la funcionalización de la superficie de no-poro.

50

55

La separación de ácidos nucleicos ds de proteínas con carácter hidrófobo pueden conseguirse como parte de una limpieza de etapa única de soluciones de PCR. La eliminación de proteínas puede comprender usar más de un material nanoporoso (por ejemplo, perlas mixtas)

60

En otra realización, las partículas nanoporosas pueden comprender una o varias funcionalizaciones de no-poro para tener tanto carga negativa como carácter hidrófobo, lo que permitiría, por ejemplo, limpieza de PCR y eliminación de enzimas simultáneamente con un único material nanoporoso, por ejemplo, perlas nanoporosas. En una realización,

una superficie de no-poro se funcionaliza con copolímeros de PAA (por ejemplo donde el copolímero es hidrófobo (por ejemplo polietileno o poliestireno)).

Otra realización más se refiere a la limpieza de reacciones de marcado. Frecuentemente es deseable añadir marcas fluorescentes u otras (por ejemplo, biotina o ferroceno) a oligonucleótidos. Después de estas reacciones, el colorante fluorescente no unido debe eliminarse de la mezcla para purificar el oligonucleótido marcado. La metodología general de los procedimientos descritos en el presente documento puede aplicarse a esas situaciones en las que es deseable adsorber las marcas en los poros del material nanoporoso mientras se excluyen los oligonucleótidos. Puede usarse un material nanoporoso con poros muy pequeños (hasta 30Å están disponibles en el mercado en sílice) funcionalizado de modo que el marcador libre se adsorba en el poro y la cadena sencilla marcada no pueda entrar en el poro. Puede usarse la funcionalización de la superficie de poro que hace a la superficie de poro cargada positivamente, cargada negativamente o hidrófoba dependiendo de la naturaleza del marcador.

Otro procedimiento más se refiere a aplicaciones en ensayos de hibridación. Se realizan ensayos de hibridación para pruebas de secuenciación en ADN o ARN (por ejemplo, detección de SNP rápida en ADN genómico amplificado por PCR). Los ensayos de hibridación son habituales, por ejemplo, en tecnología de cribado genético. En general, después de la amplificación química de ADN, pruebas rápidas para determinar si se amplificó la secuencia diana correcta son valiosas. A menudo, se usa electroforesis en gel para valorar si se han amplificado fragmentos de la longitud esperada, pero la electroforesis en gel es lenta y no puede usarse fácilmente para la detección de polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP). Una alternativa habitual, al menos para el ADN, es PCR en tiempo real donde se incorporan sondas en el proceso de amplificación para realizar una detección específica de secuencia. El ensayo de hibridación en el presente documento obvia la necesidad del complejo diseño de ensayo y la infraestructura necesaria para PCR en tiempo real y permite el uso de PCR simple seguida por un rápido ensayo de hibridación con una sonda marcada para lograr el mismo fin. Dado que se puede adsorber y eliminar de forma diferencial ADN monocatenario mientras se deja una preponderancia de ADN bicatenario (o parcialmente bicatenario) en solución, se puede valorar si sondas monocatenarias marcadas han hibridado con secuencias diana. Estas dianas pueden ser complementos monocatenarios (o complementos parciales) o pueden ser ADN bicatenario donde las sondas monocatenarias se unen con una cadena de la doble cadena después de una etapa de deshibridación e hibridación. Las dianas también pueden ser estructuras parcialmente de doble cadena donde el oligonucleótido de la sonda se une a regiones monocatenarias en la diana como podría ser el caso para la unión a ARN plegado o para ensayos de sándwich.

Las partículas para adsorción diferencial podrían estar compuestas por sílice, alúmina, óxido de titanio o polímeros solubles en agua posiblemente hidrófilos. Las partículas porosas tienen la ventaja de tener una mayor área de adsorción. Dado que las partículas se tratarán con revestimientos hidrófobos pero es ventajoso tener partículas solubles en agua, también puede ser de cierta ventaja la porosidad para permitir una gran área superficial que es relativamente difícil que se vuelva hidrófoba. Los revestimientos hidrófobos normalmente estarán unidos covalentemente a la superficie de la partícula, como por ejemplo usando química de silanización para modificar o modificar parcialmente la superficie de sílice con fracciones hidrófobas, tales como alcanos o anillos fenilo. Sin pretender estar limitados por ninguna teoría particular, se considera que la razón física por la que superficies hidrófobas pueden adsorber de forma diferencial ADN monocatenario es que éste es mucho más hidrófobo que el ADN bicatenario. La termodinámica que impulsa la adsorción es que entidades relativamente hidrófobas pueden adsorber y sustituir al agua forzada a residir en superficies hidrófobas donde no puede satisfacer eficazmente sus requisitos de unión. La liberación del agua interfacial causa una ganancia entrópica que hace la adsorción termodinámicamente favorable. La divulgación contempla adición de sales caotrópicas para afinar este proceso e incrementar el contraste entre las eficiencias de adsorción de las especies relevantes.

Una ilustración no limitante de un protocolo útil para realizar ensayos de hibridación de acuerdo con la invención es la siguiente.

En primer lugar, se añaden sondas marcadas a una muestra de ADN a ensayar. Las sondas pueden ser oligonucleótidos monocatenarios que tienen estructuras secundarias mínimas o no tienen. Las marcas pueden ser colorantes fluorescentes (por ejemplo rodamina, fluoresceína, cy-3, cy-5, etc.), restos redox (por ejemplo ferroceno, etc.) o marcadores radiactivos (por ejemplo ³²P). Las dianas pueden ser cualesquier ácido nucleico. Los ejemplos no limitantes incluyen ADN genómico bicatenario, ADN amplificado por PCR, ARN o ADN que contiene cadenas dobles, o cadenas sencillas no marcadas de ADN o ARN. Para dianas de amplicón de PCR, las marcas pueden añadirse a la mezcla de PCR antes de la amplificación, dado que son normalmente cortas en comparación con cebadores y no interferirán en la PCR. Esto evita manipulación adicional y contaminación potencial. Por ejemplo, los cebadores típicos tienen 20-25 bases y una T_m de aproximadamente 55°C, de este modo sondas con aproximadamente 15 bases que tienen una T_m de aproximadamente 40°C hibridarán solamente en la última etapa del ciclo cuando la muestra se refrigera finalmente a por debajo de 55°C.

- La segunda etapa comprende calentar la mezcla para permitir que las sondas hibriden con la diana. Cuando la diana es bicatenaria, es necesario deshibridarla, de modo que las sondas puedan hibridar con la diana. En el caso de amplificación por PCR, la hibridación de las sondas se realiza como la última etapa del protocolo de ciclado térmico, que normalmente comprende calentar el sistema a 95 grados y enfriar a por debajo de la temperatura de fusión del complejo sonda-diana (por ejemplo ~40 grados centígrados para una sonda de 15-méero). Este protocolo de ensayo de hibridación podría usarse con procedimientos de amplificación de ADN o ARN diferentes de PCR para valorar si una diana particular está presente. Estos otros procedimientos incluyen, aunque sin limitarse a, reacción en cadena de la ligasa, amplificación mediada por transcripción, amplificación por desplazamiento de cadena y amplificación isotérmica. En el caso de detección de polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP), la solución de hibridación se hibrida en condiciones de astringencia (habitualmente una temperatura entre las temperaturas de fusión de sondas de tipo silvestre y mutantes) donde la determinación de emparejamientos erróneos de una sola base es factible. Sin embargo, el ensayo es independiente de la hibridación y se puede ejecutar en condiciones ambiente.
- 15 En tercer lugar, la mezcla hibridada se expone a las partículas con revestimiento hidrófobo. Las partículas pueden estar compuestas por sílice, óxido de titanio, alúmina, etc., y se funcionalizan con una capa hidrófoba, tal como alcanos unidos a sílice mediante química de silanización. Puede ser ventajoso funcionalizar de forma incompleta las superficies de partículas nanoporosas de modo que éstas retengan suficiente carácter hidrófilo para dispersarse bien en solución acuosa. Las partículas porosas se aprovechan del área superficial elevada para adsorción. La exposición puede ser añadiendo una dispersión de perlas al analito o viceversa. Como alternativa, las partículas pueden estar en forma seca y contenidas en un tubo o pipeta. El analito puede añadirse al tubo o aspirarse al interior de la pipeta. Durante la exposición, las cadenas sencillas no hibridadas se adsorberán sobre las perlas. Por lo tanto, la separación de las perlas del analito (o viceversa) dejará solamente sondas que han hibridado con la diana en solución.
- 25 Finalmente, se ensaya en la solución la presencia de la marca. Por ejemplo, se detectan marcas fluorescentes usando fotoluminiscencia y marcas redox usando voltametría cíclica o voltametría de pulso diferencial. Su presencia indica hibridación con éxito de la sonda con la diana y, por lo tanto, la presencia de la secuencia complementaria en la diana.
- 30 En otra realización, para determinar si un oligonucleótido de sonda con un marcador ha hibridado con su secuencia complementaria en ADN o ARN genómico o amplificado por PCR, la sonda puede comprender una secuencia que coinciden con el amplicón diana que ha sido incluido deliberadamente en la reacción de PCR pero con una temperatura de fusión menor que la de los cebadores, así que no interfiere en la PCR. En este caso, los materiales no porosos, por ejemplo, las nanopartículas en la figura 1(b), pueden añadirse a la mezcla final. Si la sonda hibrida con el amplicón al refrigerarse por debajo de su temperatura de fusión, no se adsorberá, dado que el complejo resultante es demasiado grande para penetrar en los poros del material nanoporoso. Si la sonda no hibrida con la diana, se adsorberá en los poros del material nanoporoso. Por lo tanto, la presencia de marcas en el analito (determina mediante, por ejemplo, técnicas de fluorescencia o redox) una vez que el material nanoporoso se elimina, demuestra la presencia de la secuencia diana. Adicionalmente, el procedimiento puede adaptarse para usar ensayos colorimétricos para demostrar la presencia del híbrido diana basándose en agregación inducida por sales de nanopartículas de oro coloidal.
- 45 Otros ejemplos de hibridación incluyen los siguientes. Eliminación de oligonucleótido marcado no hibridado, donde el oligonucleótido marcado no hibridado es un cebador no extendido. En esta realización, la falta de señal de marca en el analito restante después de la eliminación de cadenas sencillas reflejaría una amplificación por PCR fallida. A la inversa, la presencia de señal de marca indicaría que los cebadores habían sido extendidos y que la PCR funcionó. Esta última circunstancia refleja la presencia de la secuencia diana en la muestra original.
- 50 El uso de varias oligosecuencias con diferentes marcas colorantes simultáneamente para detectar múltiples dianas (por ejemplo, para la lectura de PCR múltiple o para genotipado de SNP donde una sonda sería un complemento de tipo silvestre con un tipo de fluoróforo y la otra la secuencia complemento mutante con un fluoróforo distinguible). Una prueba de astringencia adecuada, tal como se ha descrito anteriormente, se prefiere en el caso de SNP. Un caso especial para detección de SNP combinaría el uso de varias oligosecuencias con diferentes marcas colorantes simultáneamente para detectar múltiples dianas y la eliminación de cebador no extendido donde se usan dos cebadores que solapan el SNP con secuencias de tipos silvestre y mutante que tienen diferentes marcas y la solución de PCR amplificada se expone al medio hidrófobo para eliminar cebadores no extendidos. En este caso, la prueba de astringencia estaría integrada en el protocolo de ciclado térmico de PCR ajustando la temperatura de hibridación de los cebadores para preferir el uno o varios cebadores perfectamente complementarios.
- 60 Otro uso incluye la adición deliberada de sales para facilitar adsorción diferencial y optimizar el contraste de ss frente

a ds. Dado que la fluorescencia es suficientemente sensible, una pequeña alícuota de la solución de hibridación puede diluirse enormemente en otras soluciones tampón y permitir controlar la intensidad del efecto hidrófobo durante la exposición a las partículas revestidas.

- 5 Otro uso más incluye el uso de funcionalización superficial mixta adicional, tal como, por ejemplo, incluir una baja densidad de extintores FRET que no alterarían el carácter hidrófobo pero que servirían para extinguir la fluorescencia de cadenas sencillas marcadas que no hibridan y de este modo obvian la necesidad de eliminar las perlas antes de leer la fluorescencia. Los ejemplos de extintores FRET incluyen, aunque sin limitarse a, BHQ™ (Biosearch Technologies) y Iowa Black™ (Integrated DNA Technologies) y Blackberry650™ (Berry Associates).
- 10 Estos materiales pueden estar unidos covalentemente a capas de silanización mixtas. Se espera que 0,001 - 0,1 monocapas de extintor sean adecuadas para proporcionar extinción casi completa basándose normalmente en radios de transferencia de energía de Förster.

- En el caso donde se usa ensayo electroquímico, los materiales nanoporosos, puede no ser necesario eliminar perlas para ensayos electroquímicos dado que las marcas redox adsorbidas tendrán una difusividad reducida drásticamente y por lo tanto, la señal que aportan a voltametría se reducirá proporcionalmente.
- 15

Otro ejemplo más incluye inserción de sondas ss marcadas en cadenas triples (donde se espera que la cadena triple no se adsorba).

- 20 Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención. No pretenden ser limitantes de ninguna manera.

EJEMPLO 1

- 25 Ejemplo de material nanoporoso funcionalizado de forma diferencial preparado mediante unión covalente de funcionalización de no-poro.

Sílice mesoporosa, sílice de grado de cromatografía, Merck 9385, es un ejemplo de sustrato adecuado para uso en la invención. Esta sílice es normalmente esférica, con un diámetro de 40-60 micrómetros, tamaño de poro de 60 Å y un área superficial BET de 480-540 m²/g. Los nanoporos y la superficie pueden funcionalizarse con grupos amina mediante injerto con APTMS. Para este ejemplo, APTMS (Fluka), 0,5 ml, se añadió a 25 ml de EtOH y la solución se agitó durante 5 minutos en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Se añadió gel de sílice Merck 9385, 1 g, a la solución, y la suspensión se calentó a reflujo durante 1 hora. La suspensión se transfirió a un vaso de precipitados de 100 ml y la solución se decantó. La sílice se lavó con 200 ml de agua caliente en 8 alícuotas, agitando y decantando. Finalmente, la sílice se lavó con 25 ml de agua a temperatura ambiente, y se secó en un horno a 110°C durante 30 minutos. Se cree que este procedimiento da como resultado funcionalización con APTMS en todas las superficies de sílice hidroxiladas, internas y externas.

30

35

La superficie de partículas de sílice, excepto los nanoporos, se funcionalizó a continuación con carboxilato mediante la introducción de sal sódica del ácido poliacrílico (PAA), que se autoensambla solamente en la superficie de partícula, dado que es demasiado grande para entrar en los poros. Evidencia de esto es proporcionada tanto por ensayos funcionales como por datos de espectroscopía FTIR presentados a continuación. La sal sódica del ácido poliacrílico, PM 100.000 (Aldrich) se añadió a las superficies externas de la siguiente manera. Gel funcionalizado con APTMS, 0,5 g, se añadió a 10 ml de solución de PAA (0,01 M en PAA, 0,1 M en NaCl). La suspensión se mezcló en un agitador Rocker durante 20 minutos. El gel se lavó mediante centrifugado y decantación sucesivas tres veces con 10 ml de agua cada vez, seguido por un lavado final con 10 ml de EtOH. El gel se secó en un horno a 110°C durante 10 minutos.

40

45

50 1. Verificación de la química superficial

Se usó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) como estrategia analítica debido a su sencillez, amplia disponibilidad y capacidad para proporcionar información molecularmente específica. En la medida en que se conocen secciones transversales de absorción en modo infrarrojo, también se puede calcular la cobertura superficial aproximada de diversas fracciones. La figura 2 presenta los espectros de FTIR de las perlas de sílice porosa no tratadas y tratadas con APTMS. En cada caso, las perlas se dispersan en un sedimento de KBr cuya transmisión se mide con un espectrómetro 8400 FTIR de Shimadzu.

55

La asignación de las bandas espectrales usando espectro de APTMS puro es sencilla. La amplia absorción en perlas no tratadas cerca de 3400 cm⁻¹ es debida a grupos OH superficiales unidos a hidrógeno, mientras que la absorción a 1635 cm⁻¹ procede del pliegue de OH unido a silano y la banda de 1100 - 1200 cm⁻¹ (no mostrada) procede de las

60

vibraciones de tensión de Si-O en la masa. Esta última banda sirve como una excelente referencia para corregir la cantidad total de material. La banda cerca de 2300 cm^{-1} es debida a CO_2 en la atmósfera sin corregir mediante sustracción del fondo, dado que la calidad de la purga del espectrómetro varía con el tiempo. La química de unión por silanización elimina una parte sustancial de la intensidad de la banda de OH y mientras aparecen nuevas bandas transparentes en la región de tensión de CH_2 asociadas con APTMS. La supresión sustancial de la tensión de OH no solamente indica unión eficaz de APTMS a la superficie tratada, sino que también prueba que el APTMS se infiltra eficazmente en los poros. Dado que la gran mayoría del área superficial total está en los poros (sólo aproximadamente el 0,2% del área superficial total está en el exterior), la reducción sustancial de OH superficial significa que mucha de la superficie ha sido modificada químicamente. Una grosera estimación de la cantidad de APTMS adsorbido puede obtenerse a partir de la intensidad de la absorción por tensión de CH_2 y es coherente con una cobertura sustancial ($> 10\%$) del área superficial total de la perla. La pequeña cantidad de señal de PAA es atribuible al hecho de que su gran peso molecular le impide entrar en los poros y adsorberse sobre la gran mayoría del área superficial de las perlas. Se sabe que el PAA está presente a partir del hecho de que las perlas tratadas con solamente APTMS eliminan eficazmente amplicones de ADN de la solución.

Se usó espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) como estrategia analítica debido a su sencillez, amplia disponibilidad y capacidad para proporcionar información molecularmente específica. En la medida en que se conocen secciones transversales de absorción en modo infrarrojo, también se puede calcular la cobertura superficial aproximada de diversas fracciones. La química de unión por silanización elimina una parte sustancial de la intensidad de banda de OH y aparecen nuevas bandas transparentes blancas en la región de tensión de CH_2 asociadas con APTMS. La supresión sustancial de la tensión de OH no solamente indica unión eficaz de APTMS a la superficie tratada, sino que también prueba que el APTMS se infiltra eficazmente en los poros. Dado que la gran mayoría del área superficial total está en los poros (solamente aproximadamente el 0,2% del área superficial total está en el exterior), la reducción sustancial de OH superficial significa que mucha de la superficie ha sido modificada químicamente. Una grosera estimación de la cantidad de APTMS adsorbido puede obtenerse a partir de la intensidad de la absorción por tensión de CH_2 y es coherente con una cobertura sustancial ($> 10\%$) del área superficial total de la perla. El instrumento de FTIR no es suficientemente sensible para ver sobrecapas de PAA en las partículas pero se ha verificado su depósito independientemente usando microscopía confocal con PAA modificado fluorescentemente. En ese caso, es posible determinar que la adsorción de PAA es casi exclusivamente sobre los exteriores de las partículas dado que se pueden obtener imágenes usando una profundidad de campos (~ 1 micrómetro) mucho menores que los tamaños de partícula (~ 50 micrómetros).

2. Eficacia de limpieza

35 a. Rendimiento de componentes de solución de PCR

Se realizaron estudios iniciales para determinar la eficacia de las perlas para eliminar los diversos componentes de la solución de productos de PCR usando un espectrómetro de absorción NanoDrop 1000. Los datos del NanoDrop proporcionan información cuantitativa sobre la cantidad de interacción entre los componentes de solución de PCR individuales y las perlas funcionalizadas. Se midió la cantidad de amplicones de PCR purificados, ssADN (TAATACGACTCACTATAGGG; SEQ ID NO: 1), ssADN autocomplementario hibridado (ATCGTCCTGCAGGACGAT; SEQ ID NO: 2) y cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) retenido en solución después de exposición de ~ 30 segundos a las perlas funcionalizadas de forma diferencial descritas anteriormente. Los amplicones de PCR eran bandas de 530 pb, 1063 pb y 1956 pb de un patrón de ADN lambda de New England Biolabs (NEB) (NEB N3011S) amplificadas usando los cebadores diseñados 11F (TGA AAC GCT TGC TGC AAC GCC AAA; SEQ ID NO: 3) y 15R (AAA GCA ATT GGC GGT GAT GTA AAC ACT ATG; SEQ ID NO: 4) con reactivos y condiciones de reacción a partir de NEB (E5100S), una temperatura de hibridación de 60°C , un tiempo de extensión de 2,5 minutos y 25 ciclos. Los amplicones se recuperaron de la solución usando el kit de purificación de PRC PureLink de Invitrogen (K3100-01). Se usó absorbancia en la región de 260 nm como medida de concentración relativa antes y después de la exposición a las perlas. En cada caso, los analitos mencionados anteriormente se disolvieron en un tampón Tris 20 mM (pH 8,4) con K^+ 50 mM y Mg^{2+} 2 mM constituido para simular la solución tampón de PCR de Invitrogen y las concentraciones de analito estaban en las inmediaciones de lo que podría esperarse del producto de PCR (el cebador era 10 veces la concentración típica, el dNTP era 0,2 veces el típico y los amplicones eran los típicos para PCR). La idea detrás de evaluar ADN Lambda y amplicones purificados antes y después de la exposición a las perlas era poner a prueba la retención de dsADN en solución. Las secuencias de ssADN sintéticas pretendían simular cebadores mientras que las secuencias autocomplementarias simulan dímeros de cebadores fortuitos. Se definen estos últimos como cebadores que complementan partes de sí mismos o del otro cebador de modo que podrían formar cadenas dobles parciales a 25°C .

La figura 3 muestra "curvas de dosificación" tanto para dNTP, cebador, y dsADN (amplicones de PCR purificados de 1956 pb). Estos cuantifican la cantidad de material que queda después de exposición de 30 segundos a diversos

números de perlas. Soluciones puras (25 μ l) de cada uno se mezclaron con las perlas durante 30 segundos y, después de una etapa de centrifugado para separar las perlas, se muestreó una alícuota del sobrenadante usando un espectrómetro NanoDrop que registró espectros en el intervalo espectral de 240 - 280 nm. Las concentraciones iniciales del cebador, dNTP y amplicones eran \sim 3,5 μ M, 170 μ M y 0,02 μ M (23, 56, 14 ng/ μ l) respectivamente.

5

Aproximadamente 2 mg de perlas son adecuados para eliminar \sim 90% del dNTP o los cebadores a concentraciones y cantidades típicas de soluciones de producto de PCR. Incluso aunque los cebadores (normalmente 20 bases) son mucho más grandes que dNTP, las demandas de área superficial del dNTP son mucho mayores, dado que las concentraciones de dNTP son de cerca de 1 mM mientras que las concentraciones de cebador son como máximo 1

10

μ M. Las perlas deben ser, por lo tanto, capaces de acomodar hasta \sim 25 nmoles de dNTP (\sim $1,5 \times 10^{14}$ moléculas). Una cantidad de 2 mg de perlas porta \sim 10⁴ cm² de área superficial. Si la cobertura del área de APTMS es \sim 10%, tal como se ha estimado anteriormente, el resultado de la figura 3 puede conseguirse incluso si solamente cada centésimo sitio de APTMS adsorbe una única molécula de dNTP.

15

Las mediciones de la retención del amplicón muestran que las soluciones después de la exposición a las perlas son ligeramente más concentradas que antes del tratamiento. La razón para esto es que los poros retienen parte del agua, mientras que no permiten penetrar a los amplicones. Esto da como resultado una concentración eficaz de los amplicones. La retención total del amplicón puede cuantificarse de al menos dos maneras. En primer lugar, se puede medir la cantidad de agua retenida y corregir la concentración indicada por la medición del NanoDrop (o, como

20

alternativa, recuperar tanta agua como sea posible y rediluir la con tampón al volumen original de 25 μ l). En segundo lugar, se pueden usar simplemente volúmenes de analito más grandes, de modo que la cantidad de retención de agua se vuelva menos importante. Usando cualquier estrategia, se concluye que la recuperación de los amplicones de 1956 pares de bases es del 85 \pm 5% (donde la incertidumbre citada se deriva de la desviación estándar de múltiples experimentos). Por lo tanto, elegir una cantidad de perlas de 2 mg para limpieza de 25 μ l de reacciones de

25

PCR debe dar un excelente rechazo de dNTP y cebadores y retención de amplicones. Esta cantidad representa una pequeña fracción del volumen de la solución a limpiar.

La Figura 4a presenta los datos en bruto de experimentos donde los diversos componentes de dNTP, cebadores y amplicones se exponen a 2 mg de las perlas funcionalizadas con APTMS/PAA. En cada caso, se usaron 2 mg de

30

perlas y tiempos de exposición de 30 segundos. Los tubos se centrifugaron (10.000 x g, 10 segundos) para sedimentar el material y la concentración de sobrenadante se midió inmediatamente en el NanoDrop1000. La Figura 4b resume, la fracción retenida que se deriva a partir de estos datos y la compara con lo que se obtuvo usando un kit de purificación de PCR de Invitrogen. 15 μ l de solución de partida se mezclaron con 2 mg de perlas durante 30 segundos y se muestrearon como en la figura 4a. Soluciones análogas se trataron con el kit de purificación de PCR

35

PureLink de Invitrogen (K3100-01) ("columna de centrifugado"); la ds (1956 pb) se incrementa con perlas no funcionalizadas debido a la retención de agua por las perlas. Nótese que también se puso a prueba polimerasa pura en tampón simulado de manera similar y se observó eliminación completa mediante las perlas funcionalizadas. Es probable que restos positivos en la enzima se adhieran fuertemente al revestimiento exterior de PAA.

40

Se analizó la cinética de adsorción para determinar durante cuánto tiempo se debería incubar el producto de PCR con las perlas antes de eliminarlo. 25 μ l de solución de dNTP o amplicón se aspiraron en una punta de pipeta que contenía 3,5 mg de material (no funcionalizado, rombos y triángulos o funcionalizado, cuadrados y círculos), se mezclaron y se dispersó 1 gota sobre el espectrómetro NanoDrop a los tiempos indicados. Para esta medición, se empleó un formato de pipeta donde se aspiró y se expulsó material. La figura 5 muestra que, en esta realización

45

particular, los tiempos óptimos están entre 30 y 45 segundos donde $>$ 90% del dNTP ha sido eliminado y $>$ 80% de los amplicones permanecen. Esta ventana es satisfactoria para establecer un protocolo robusto pero, basándose en los resultados presentados en el presente documento, se espera que la optimización adicional del protocolo de manipulación de materiales y de fluido conseguirá una eliminación de impurezas más rápida y estabilizará adicionalmente los amplicones para que permanezcan en solución indefinidamente.

50

b. Rendimiento para producto de PCR

Las pruebas en la sección anterior tienen la ventaja del rigor, dado que se trabajó con dNTP, cebadores y amplicones independientemente. Por lo tanto, no había ninguna ambigüedad aparente en la interpretación de la absorbancia de UV incluso aunque los tres componentes adsorban en la región entre 240 y 280 nm. No obstante, se analizó un producto de PCR fiable y sus complejidades concomitantes. Para analizar cada componente independientemente, se separaron por masa con electroforesis en gel (Figura 6). La PCR se ejecutó como anteriormente excepto que tres segmentos de longitud diferente de ADN Lambda (590 pb, 1063 pb y 1956 pb) se amplificaron a partir de un patrón lambda (NEB N2011S) usando tres conjuntos de cebadores.

60

Todo el ADN usado en las limpiezas y controles procedía de los mismos tubos de PCR y 5 microlitros se hicieron pasar sobre el gel. Los carriles de partida incluyen muestra sin alterar para comparación. 15 μ l de solución de ADN se mezclaron en tubos que contenían 2 mg de perlas no funcionalizadas o funcionalizadas durante 15 segundos y una alícuota de 5 microlitros para su análisis en gel se extrajo después del centrifugado como se muestra en la Figura 4. Para el control de la columna de centrifugado, 50 microlitros de cada reacción se trataron con el kit de purificación de PCR PureLink de Invitrogen (K3100-01) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (con la adición de un centrifugado extra para eliminar tampón de lavado residual) y se eluyeron en un volumen de 50 microlitros; 5 microlitros se hicieron pasar sobre un gel de poliacrilamida al 5%. Se tuvo cuidado de garantizar que volúmenes iguales se cargaran en cada carril. Sin embargo, los carriles indicados mediante "f" en la parte inferior tienen concentraciones reducidas debido a muestras flotantes causadas de la forma más probable mediante etanol residual a partir de la purificación en columna de centrifugado. El etanol residual persistía a pesar de 3 centrifugados para eliminar tampón de lavado (el protocolo requiere 2 centrifugados) y una corta incubación a 100 grados C. La flecha continua apunta a las bandas de cebador monocatenario (~20 pb) mientras que la flecha doble indica el área donde se encuentran los amplicones bicatenarios (590, 1063 o 1956 pb).

Cualitativamente, los resultados en la Figura 6 confirman esencialmente los resultados de la Figura 4, concretamente retención eficaz de ADN y rechazo de cebadores, comparable a la que se consiguió con el tratamiento en columna de centrifugado comercial. Es notable que, en la Figura 6, el tratamiento del marcador estándar de bajo peso molecular con el procedimiento de los inventores parece dar una sustancialmente mejor retención de ADN en el intervalo de peso molecular menor de 500 pb. Aunque la mayoría de la amplificación por PCR para secuenciación implica amplicones más largos, esto sugiere, no obstante, un área potencial de ventaja de rendimiento diferencial para la presente invención.

3. Secuenciación después de la limpieza

La aplicación más amplia para la limpieza de reacciones de PCR es el uso de los amplicones para secuenciación capilar, y para este fin la eliminación eficiente de cebadores y dNTP es crítica. Se ha puesto a prueba la presente invención usando exposición a perlas porosas funcionalizadas de forma diferencial durante 45 segundos y se preparó la muestra recuperada para secuenciación añadiendo 8 pmol del cebador de secuenciación Lambda16seq (GCCAAAGGCGGTTAAGGTGGTAAT; SEQ ID NO: 5) a 10 ng/ μ l por 100 pb de amplicón patrón. Estas muestras se enviaron al Functional Genomics Center (FGC) en el University of Rochester Medical Center sin procesamiento adicional. En casos donde se compararon nuestros resultados frente a kits de limpieza comerciales u otros controles, las muestras se enviaron marcadas de tal manera que se cree que no se podrían introducir sesgos en el personal de secuenciación. Los protocolos estándar están disponibles en la página web del FGC y conllevan secuenciación en un secuenciador 3700 Prism de Applied Biosystems usando química de marcado con Big Dye® estándar. Los resultados de los inventores demuestran que la eficacia (desde el punto de vista de calidad de la secuencia) de la limpieza usando las perlas porosas funcionalizadas de forma diferencial es similar a aquella usando protocolos con columna de centrifugado comercial, según lo determinado a partir de un cromatograma generado a partir del centro aproximado de una secuencia de 1956 pb. El cromatograma mostraba una mejora de la calidad de los picos entre muestras no purificadas y purificadas, tal como se mostraba mediante una fidelidad de base incrementada y una proporción de señal con respecto a ruido mejorada. Se observaron resultados similares en más de 5 experimentos. Para caracterizar adicionalmente la calidad del dsADN obtenido usando el procedimiento de la invención, se seleccionaron dos medidas de secuenciación estándar, longitud de lectura contigua (CRL) y valor de calidad superior a 20 (QV20). QV20 es el número total de bases en toda la pista de secuenciación que tienen valores de calidad de lector de nucleótidos (*basecaller*) mayores o iguales que 20, aquellos que se considera que tienen una probabilidad de error de asignación de menos del 1%. CRL es el tramo de bases más largo ininterrumpido con QV mayor que un límite especificado, en este caso 20. En la evaluación de la calidad de cada base, no solamente es el valor de calidad de esa base usado, sino también aquellos de bases adyacentes dentro de un tamaño de ventana especificado. Resultados representativos de ensayos usando estas medidas se muestran en la Tabla 1. Al realizar los experimentos indicados en la Tabla 1, se ha usado deliberadamente una muestra de producto de PCR "sucio" (es decir, una muestra nominalmente idéntica sin limpieza) donde se descubre que la calidad de secuenciación es muy mala en ausencia de limpieza para incrementar la astringencia de nuestras pruebas. Se obtienen excelentes resultados de secuenciación con el procedimiento de limpieza de los inventores.

Tabla 1. Medida de calidad de secuencia para tres series de PCR donde se emplearon diferentes protocolos de limpieza. Para los ensayos I y II, el tratamiento de perlas porosas usa el protocolo de la Figura 4 mientras que el ensayo III usa un formato de pipeteador.

| | APTMS/PAA Ensayo I (pre-prototipo) | | APTMS/PAA Ensayo II (pre-prototipo) | | APTMS/PAA Ensayo III (prototipo) | |
|--|---------------------------------------|------|--|------|-------------------------------------|------|
| | CRL | QV20 | CRL | QV20 | CRL | QV20 |
| Sin limpieza | 921 | 865 | 51 | 194 | 840 | 843 |
| Columna de centrifugado (competidor I) | 962 | 978 | 995 | 994 | 960 | 971 |
| Tratado con perlas porosas | 919 | 989 | 884 | 933 | 935 | 932 |

EJEMPLO 2

5

Preparación y uso de ejemplos de materiales nanoporosos funcionalizados de forma diferencial preparados usando ensamblaje electrostático del revestimiento de no-poro.

Síntesis y preparación de materiales nanoporosos.

10

Ejemplo 1. Gel de sílice 3-aminopropilsililado. Con agitación mecánica suave, gel de sílice Davisil (25 g, poro de 150 Angstrom, 60-200 micrómetros de tamaño de partícula) se suspendió en tolueno anhidro (200 ml) en una atmósfera de nitrógeno. A esto se le añadió 3-aminopropiltriethoxisilano (12,5 ml, 53,59 mM) y la mezcla se calentó a reflujo. Después de 6 horas, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El gel de sílice 3-aminopropilsililado resultante se lavó a continuación con tolueno anhidro (2x100 ml), diclorometano anhidro (2x100 ml) y se secó al aire. Este material se secó finalmente a peso constante en un horno a 60°C durante 12 horas. Rendimiento 27,5 g.

15

El matl-1 Ácido poliacrílico-gel de sílice 3-aminopropilsililado, P_M 100K. Cloruro sódico (1,5 g, 25,7 mM), ácido 4-morfolinoetanosulfónico x-hidratado (2,44 g) y ácido poliacrílico acuoso al 35%, $P_M=100K$, (50 mg) se disolvieron en agua (200 ml), se ajustaron a pH 7,0 con hidróxido de potasio 1 N y finalmente se enrasaron a 250 ml con agua. A la solución preparada anteriormente (200 ml) con agitación mecánica suave, se le añadió gel de sílice 3-aminopropilsililado (2 g). El pH del sobrenadante se monitorizó de forma constante y se elevó a aproximadamente 9,0 durante un período de 1 hora. (Si fuera necesario, el pH del sobrenadante puede ajustarse a 9,0 mediante la adición de pequeñas cantidades de hidróxido de potasio o ácido clorhídrico diluidos.) Después de agitar durante 1 hora, el ácido poliacrílico-gel de sílice 3-aminopropilsililado se retiró por filtración, se lavó con etanol (30 ml), se secó al aire y finalmente se secó en un horno a 60°C durante 1 hora. Rendimiento 1,8 g.

20

25

Ejemplo 2. Matl-2 ácido poliacrílico-gel de sílice 3-aminopropilsililado, P_M 450K. Una solución acuosa (250 ml) que contiene cloruro sódico (1,5 g, 25,7 mM), ácido 4-morfolinoetanosulfónico x-hidratado (2,44 g) y ácido poliacrílico, P_M 450K (35 mg) se preparó y se ajustó a pH 7,0 con hidróxido de potasio 1 N. En un procedimiento idéntico al descrito en el ejemplo de síntesis también se preparó ácido poliacrílico-gel de sílice 1,3-aminopropilsililado, P_M 450K. Rendimiento 1,8 g.

30

Ejemplo 3. Matl-3 ácido poliacrilamida-co-acrílico-gel de sílice 3-aminopropilsililado. Una solución acuosa (250 ml) que contenía cloruro sódico (1,5 g, 25,7 mM), ácido 4-morfolinoetanosulfónico x-hidratado (2,44 g) y ácido poliacrilamida-co-acrílico 20:80) (35mg) se preparó y se ajustó a pH 7,0 con hidróxido de 1 N. En un procedimiento idéntico al descrito en el ejemplo de síntesis también se preparó ácido poliacrilamida-co-acrílico-gel de sílice 1,3-aminopropilsililado. Rendimiento 1,8 g.

35

40 Pruebas.

Análisis de mezclas de compuestos biológicos y químicos a menudo requieren la separación y el aislamiento de sus componentes individuales. Por ejemplo, el análisis y el aislamiento del amplicón de ADN bicatenario recién formado (dsADN) en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de los reactivos de PCR y subproductos no deseados. Estos reactivos y subproductos no deseados son normalmente 2'-desoxinucleósido 5'-trifosfatos (dNTP), cebadores (cadenas de ácidos nucleicos que sirven como puntos de partida para la replicación de ADN) y sus derivados.

45

Los materiales de la invención se pusieron a prueba por su capacidad para eliminar los cuatro dNTP asociados con la amplificación de ADN, es decir 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP), 2'-desoxicidina 5'-trifosfato (dCTP), 2'-

50

desoxiguanosina 5'-trifosfato (dGTP) y 2'-timidina 5'-trifosfato (dTTP). Una mezcla 10 mM de los cuatro nucleótidos puede adquirirse de Invitrogen, número de catálogo 18427-088. Esta mezcla de dNTP se diluyó a 1:250 para dar una solución con una concentración final de ~150 µM, útil para poner a prueba la capacidad de los materiales de la invención para eliminar los cuatro nucleótidos de la reacción de PCR. Habitualmente existe cierta variabilidad en la dilución de estas soluciones debido a errores de pipeteo pero normalmente las concentraciones de NanoDrop son de 50-100 ng/µl, alrededor de 5 veces por debajo de una concentración de partida típica para dNTP en una reacción de PCR. Debe observarse que el término Nano-Drop se usa junto con el espectrómetro NanoDrop 1000, que es un instrumento analítico usado para medir la absorbancia de volúmenes muy pequeños de soluciones, normalmente 2,5 µl o menos y, por lo tanto, la concentración de componentes en las soluciones. El espectrómetro NanoDrop está disponible para adquisición de Thermo Scientific.

Para poner a prueba la capacidad de los materiales de la invención para eliminar cebadores o ADN monocatenario (ssADN) y sus derivados de la reacción de PCR, se empleó el cebador de secuencia T7 estándar. Éste es un cebador de 20 pares de bases (pb) con la secuencia TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG (SEQ ID NO: 6). Está disponible de Integrated DNA Technologies y se emplearon soluciones de prueba de ~20 ng/µl, que es aproximadamente 5 veces una concentración de PCR de partida típica.

La capacidad de los materiales de la invención para dejar el amplicón de dsADN intacto y, de este modo, separarlo de los otros componentes se puso a prueba usando Lambda-ADN. Lambda es un bacteriófago con un genoma bicatenario lineal de 48 Kb. Éste se usa ampliamente como ADN genómico de partida en biología molecular. Invitrogen, número de catálogo 15612-013 (Lambda/HindIII), es el lambda-ADN genómico digerido por la enzima de restricción HindIII en pedazos que varían entre 500-23000 pb. Lambda/HindIII se adquiere como una solución de partida de 500 ng/µl que a continuación se diluye a ~30 ng/µl para pruebas en Nano-Drop. A 10-50 ng/µl, ésta es la concentración de amplicón de PCR típica.

Para poner a prueba la eficacia de los materiales de la invención, una muestra de 2,5 mg se mezcló con 25 µl de cada uno de las soluciones de dNTP, ssADN o dsADN descritas anteriormente. La suspensión se agitó durante 30 segundos, se centrifugó brevemente y se eliminó una alícuota de 2,5 µl y su absorbancia se registró en el espectrofotómetro NanoDrop. Para tener en cuenta variaciones en las lecturas, se llevaron a cabo varias pruebas para cada una de las pruebas de dNTP, ssADN y dsADN y se calculó un promedio. Conociendo la absorbancia y la concentración de las soluciones de partida iniciales de dNTP, ssADN y dsADN, puede determinarse la cantidad de dNTP, ssADN y dsADN que queda en las soluciones de prueba que contienen los materiales de la invención.

Para mostrar la eficacia de la invención, materiales de comparación Comp-1 y Comp-2 que están fuera del alcance de la invención, se prepararon y se pusieron a prueba. Comp-1 es gel de sílice que es idéntico en todos los aspectos al gel de sílice usado en la preparación de materiales de la invención, excepto que no ha sido funcionalizado con amino, sino que, como Matl-1, ha sido expuesto a 100K de ácido poliacrílico. Comp-2, similar a la invención, es gel de sílice que ha sido funcionalizado con amino tal como se ha descrito previamente pero, a diferencia de la invención, no ha sido tratado con ácido poliacrílico.

A partir de la Tabla 1 puede verse que, aunque Comp-1 no elimina dsADN de la solución de prueba, también es ineficaz para eliminar dNTP y ssADN. Por otro lado, Comp-2 elimina todos los compuestos puestos a prueba. Ni Comp-1 ni Comp-2 son útiles, dado que ninguno muestra selectividad alguna para eliminar el dNTP, ssADN o dsADN de la solución. Sin embargo, los materiales de la invención Matl-1, Matl-2 y Matl-3 que se prepararon de acuerdo con la descripción de la invención y están tanto funcionalizados adecuadamente como tratados con un polímero adecuado son muy eficaces para eliminar dNTP y ssADN mientras dejan el dsADN en la solución.

Tabla 1: eficacia de materiales de la invención.

| Ejemplo | Material | % que queda en solución | | |
|---------------|----------|-------------------------|-------|-------|
| | | dNTP | ssADN | dsADN |
| 1 (invención) | Comp-1 | 104* | 99 | 100 |
| 2 (invención) | Comp-2 | 7 | 7 | 5 |
| 3 (invención) | Matl-1 | 2 | 9 | 106* |
| 4 (invención) | Matl-2 | 5 | 8 | 97 |
| 5 (invención) | Matl-3 | 7 | 9 | 101* |

*está dentro del error experimental

50

1. Rendimiento de componentes de solución de PCR

Se realizaron estudios iniciales para determinar la eficacia de las perlas para eliminar los diversos componentes de

solución de producto de PCR usando un espectrómetro de absorción NanoDrop 1000. Los datos de NanoDrop proporcionan información cuantitativa sobre la cantidad de interacción entre los componentes de la solución de PCR individuales y las perlas funcionalizadas. Se midió la cantidad de amplicones de PCR purificados, ssADN (TAATACGACTCACTATAGGG), ssADN autocomplementario hibridado (ATCGTCCTGCAGGACGAT) y cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) retenido en solución después de exposición de ~30 segundos a las perlas funcionalizadas de forma diferencial descritas anteriormente. Las cadenas dobles estaban representadas por el patrón de ADN (NEB N3011S) de New England Bio labs (NEB). Se usó absorbancia en la región de 260 nm como medida de la concentración relativa antes y después de la exposición a las perlas. En cada caso, los analitos mencionados anteriormente se disolvieron en un tampón Tris 20 mM (pH 8,4) con K^+ 50 mM y Mg^{2+} 2 mM constituidos para simular la solución tampón de PCR de Invitrogen y las concentraciones de analito estaban en las inmediaciones de lo que podría esperarse del producto de PCR (el cebador era 10 veces la concentración típica, el dNTP era 0,2 veces el típico y los amplicones eran los típicos para PCR). La idea detrás de evaluar ADN Lambda y amplicones purificados antes y después de la exposición a las perlas era poner a prueba la retención de dsADN en solución. Las secuencias de ssADN sintéticas pretendían simular cebadores mientras que las secuencias autocomplementarias simulan dímeros de cebadores fortuitos. Se definen estos últimos como cebadores que complementan partes de sí mismos o del otro cebador de modo que podrían formar cadenas dobles parciales a 25°C.

Las cantidades de perlas usadas eran las mismas que para el ejemplo 1, 2,5 mg por 25 microlitros de solución de prueba.

La Figura 7(a) ilustra la retención del cebador modelo, mezcla de dNTP y dsADN Lambda demostrando excelente eliminación de dNTP y ADN monocatenario y casi completa retención de la diana ds. Soluciones similares se trataron con el kit de purificación de PCR PureLink de Invitrogen (K3100-01) ("columna de centrifugado") y el análogo Wizard de Promega, mostrándose los datos en la figura.

La Figura 7(b) es una comparación entre el producto de PCR antes y después de la limpieza usando los materiales nanoporosos funcionalizados de la presente invención, que demuestran buen rendimiento de ADN independientemente de la longitud.

Los datos de cinética de adsorción para las partículas preparadas mediante autoensamblaje electrostático se muestran en la Figura 8. Para esta medición, se usó el formato de pipeta donde se aspira y se expulsa material, dado que esto sería más representativo de cómo se prevé que los clientes usen el producto pretendido. La Figura 8 presenta la cinética de eliminación de dNTP y dsADN de la solución usando tratamientos mediante perlas porosas funcionalizadas con APTMS/PAA. 25 μ l de solución de amplicón de dNTP o ADN se aspiraron en una punta de pipeta que contenía 3,5 mg de material (no funcionalizado, rombos y triángulos o funcionalizado, cuadrados y círculos), se mezclaron, y se dispensó 1 gota sobre el espectrómetro NanoDrop a los tiempos indicados. Los datos muestran que los tiempos óptimos están entre 30 y 45 segundos donde > 95% del dNTP ha sido eliminado y > 95% de los amplicones permanecen. Los amplicones permanecen en solución durante al menos 10 minutos.

2. Secuenciación después de la limpieza

La aplicación más amplia para limpieza de reacciones de PCR es el uso de los amplicones para secuenciación por capilaridad. Tal como se explica en la sección sobre necesidad del mercado, la eliminación eficiente de cebadores y dNTP es crítica. Resultados de secuenciación análogos a los mostrados para los materiales unidos covalentemente (véase el Ejemplo 1) se muestran en la Figura 9.

EJEMPLO 3

Este ejemplo demuestra la eliminación de la enzima TAQ polimerasa de soluciones de PCR usando perlas con revestimiento hidrófobo (materiales nanoporosos).

El protocolo usado es el siguiente. En una preparación típica, 0,5 ml de octadeciltriclorosilano (OTS, SIO6640.0, Gelest, Morrisville, PA) se añadieron a 25 ml de EtOH (200% en volumen) y se dejaron agitar durante 5 minutos en un matraz de fondo redondo de 50 ml. Se añadió gel de sílice 60 (0,5 g de Merck 9385 o SiliaFlash 60, por ejemplo) al matraz, y la mezcla se calentó a reflujo durante 0,5 horas. El gel se lavó cuatro veces con EtOH en ebullición y se secó en un horno durante diez minutos a 110°C.

Solución de partida de TAQ (25 microlitros) (dilución 1:10) se trató con material nanoporoso (2,5 mg) funcionalizado con OTS en réplicas de 2 cada una. Diluciones de TAQ conocidas se midieron usando absorbancia a 280 nm para crear una curva patrón, que se usó para calcular diluciones desconocidas después del tratamiento.

ES 2 613 740 T3

Dado que las enzimas son mucho más hidrófobas que el dsADN y se adsorben tal como se demuestra en los datos representados en la Figura 11 que se registran con perlas funcionalizadas con octadeciltriclorosilano.

5 Lista de secuencias

| | | | |
|----|-------|---|----|
| | <110> | Universidad de Rochester | |
| 10 | <120> | MEDIOS POROSOS FUNCIONALIZADOS DE FORMA ESPACIALMENTE NO HOMOGÉNEA Y PROCEDIMIENTO PARA SU USO EN LA ELIMINACIÓN SELECTIVA DE CONTAMINANTES | |
| | <130> | 055652.00015 | |
| 15 | <150> | 61/151.551 | |
| | <151> | 11-02-2008 | |
| | <160> | 6 | |
| 20 | <170> | Patentin versión 3.5 | |
| | <210> | 1 | |
| | <211> | 20 | |
| | <212> | ADN | |
| 25 | <213> | secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| | <223> | cadena de ssADN autocomplementario hibridado | |
| 30 | <400> | 1 taatacgact cactataggg | 20 |
| | <210> | 2 | |
| | <211> | 18 | |
| 35 | <212> | ADN | |
| | <213> | secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| 40 | <223> | cadena sencilla de ssADN autocomplementario hibridado | |
| | <400> | 2 atcgtcctgc aggacgat | 18 |
| 45 | <210> | 3 | |
| | <211> | 24 | |
| | <212> | ADN | |
| | <213> | secuencia artificial | |
| 50 | <220> | | |
| | <223> | cebador de PCR directo para amplificación del patrón de ADN Lambda | |
| | <400> | 3 tgaaacgctt gctgcaacgc caaa | 24 |
| 55 | <210> | 4 | |
| | <211> | 30 | |

ES 2 613 740 T3

| | | | |
|----|-------|--|----|
| | <212> | ADN | |
| | <213> | secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| 5 | <223> | cebador de PCR inverso para amplificación del patrón de ADN Lambda | |
| | <400> | 4 | |
| | | aaagcaattg gcggtgatgt aaacactatg | 30 |
| 10 | <210> | 5 | |
| | <211> | 24 | |
| | <212> | ADN | |
| | <213> | Fago Lambda | |
| 15 | <400> | 5 | |
| | | gccaaaggcg gttaaggtgg taat | 24 |
| | <210> | 6 | |
| 20 | <211> | 20 | |
| | <212> | ADN | |
| | <213> | secuencia artificial | |
| | <220> | | |
| 25 | <223> | cebador de secuencia T7 | |
| | <400> | 6 | |
| | | taatacgact cactataggg | 20 |

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para separar ácidos nucleicos bicatenarios a partir de una mezcla que comprende
5 ácidos nucleicos bicatenarios, ácidos nucleicos monocatenarios y/o nucleótidos libres en una solución acuosa que comprende las etapas de:
- a) poner en contacto a la mezcla con un material nanoporoso funcionalizado de forma espacialmente no
10 homogénea,
donde la superficie del material nanoporoso comprende superficie de poro y superficie de no-poro y donde la superficie de poro se funcionaliza con una amina primaria para adsorber dNTP, cebadores y cadenas sencillas y la superficie de no-poro se funcionaliza con compuestos cargados negativamente seleccionados de entre el grupo que
15 consiste en compuestos aniónicos, compuestos polianiónicos, polielectrolitos y combinaciones de los mismos, y/o
compuestos hidrófobos y/o compuestos resistentes a la adsorción que son resistentes a la adsorción de ácido
nucleico bicatenario y donde el material nanoporoso tiene poros de aproximadamente 2 a 300 nm;
- b) incubar la solución acuosa y el material nanoporoso de a) en condiciones tales que los ácidos nucleicos
20 monocatenarios y/o nucleótidos libres se adsorban selectivamente a la superficie de poro; y
- c) aislar el material nanoporoso a partir de la solución acuosa separando de este modo los ácidos nucleicos
bicatenarios de los ácidos nucleicos monocatenarios y/o de los nucleótidos libres,
donde la solución acuosa se incuba con el material nanoporoso durante de 5 a 60 segundos.
25
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el material nanoporoso es sílice porosa, alúmina porosa, óxido de titanio poroso o zeolita.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la superficie de poro se funcionaliza con un
30 aminosilano.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la superficie de poro se funcionaliza con aminopropiltrimetoxisiloxano y donde la superficie de no-poro se funcionaliza con polielectrolitos seleccionados de entre el grupo que consiste en sal sódica del ácido poliacrílico y sulfonato de poliestireno y/o el compuesto resistente
35 a la adsorción polietilenglicol.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la superficie de no-poro se funcionaliza con compuestos hidrófobos seleccionados de entre el grupo que consiste en octadeciltriclorosilano, poli(tetrafluoroetileno), n-butiltrimetoxisilano, ciclooctiltriclorosilano, fenoxipropiltriclorosilano, nonafluorohexiltrimetoxisilano y combinaciones
40 de los mismos.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la superficie de no-poro se funcionaliza con copolímeros de PAA por ejemplo donde el copolímero es hidrófobo tal como polietileno o poliestireno.
- 45 7. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el material nanoporoso se aísla de la solución acuosa mediante centrifugado, magnéticamente o por filtración.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la solución acuosa se incuba con el material nanoporoso durante de 30 a 45 segundos.
50
9. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el ácido nucleico bicatenario es ADN.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la mezcla comprende además enzimas, y donde la superficie de no-poro se funcionaliza con compuestos cargados negativamente y compuestos hidrófobos.
55
11. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la mezcla comprende además enzimas, y donde la solución acuosa y un primer material nanoporoso tal como se define en la etapa a) de la reivindicación 1 y un segundo material nanoporoso funcionalizado con grupos de la superficie de no-poro hidrófobos se incuban en condiciones tales que los ácidos nucleicos monocatenarios y/o nucleótidos libres se adsorben selectivamente a la
60 superficie de poro del primer material nanoporoso y las enzimas se adsorben sobre la superficie de no-poro hidrófoba del segundo material nanoporoso, y donde cuando el primer material nanoporoso y el segundo material

nanoporoso se separan de la solución acuosa de modo que los ácidos nucleicos bicatenarios se separan de las enzimas.

12. Una composición que comprende un material nanoporoso funcionalizado de forma no homogénea, donde la superficie del material nanoporoso funcionalizado de forma no homogénea comprende superficie de poro y superficie de no-poro, donde la superficie de poro tiene grupos superficiales de amina primaria y la superficie de no-poro se funcionaliza con compuestos cargados negativamente seleccionados de entre el grupo que consiste en compuestos aniónicos, compuestos polianiónicos, polielectrolitos y combinaciones de los mismos, y/o compuestos hidrófobos y/o compuestos resistentes a la adsorción que son resistentes a la adsorción de ácido nucleico bicatenario, donde el material nanoporoso tiene poros de 2 a 300 nm de diámetro.
13. La composición de la reivindicación 12, donde el material nanoporoso es sílice porosa, alúmina porosa o zeolita.
- 15 14. La composición de la reivindicación 12, donde la superficie de poro se funcionaliza con un aminosilano.
15. La composición de la reivindicación 12, donde
- 20 (a) la superficie de poro se funcionaliza con aminopropiltrimetoxisiloxano; o
(b) la superficie de no-poro se funcionaliza con polielectrolitos seleccionados de entre el grupo que consiste en sal sódica del ácido poliacrílico, sulfonato de poliestireno; o
(c) la superficie de no-poro se funcionaliza con el compuesto resistente a la adsorción polietilenglicol; o
(d) la superficie de no-poro se funcionaliza con compuestos hidrófobos seleccionados de entre el grupo que consiste
25 en octadeciltriclorosilano, octadeciltriclorosilano, n-butiltrimetoxisilano, ciclooctiltriclorosilano, fenoxipropiltriclorosilano, nonafluorohexiltrimetoxisilano y poli(tetrafluoroetileno).

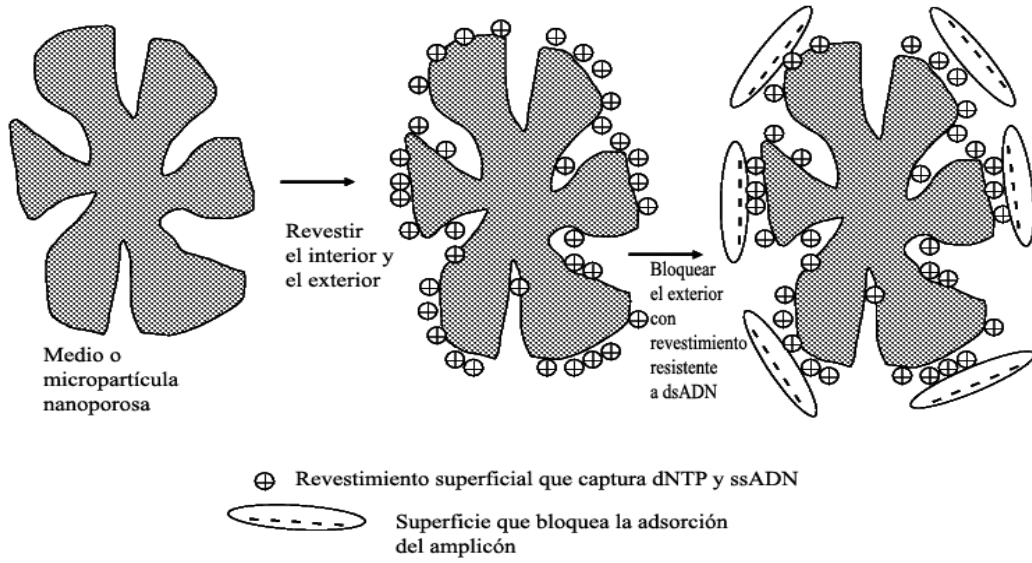


Figura 1(a)

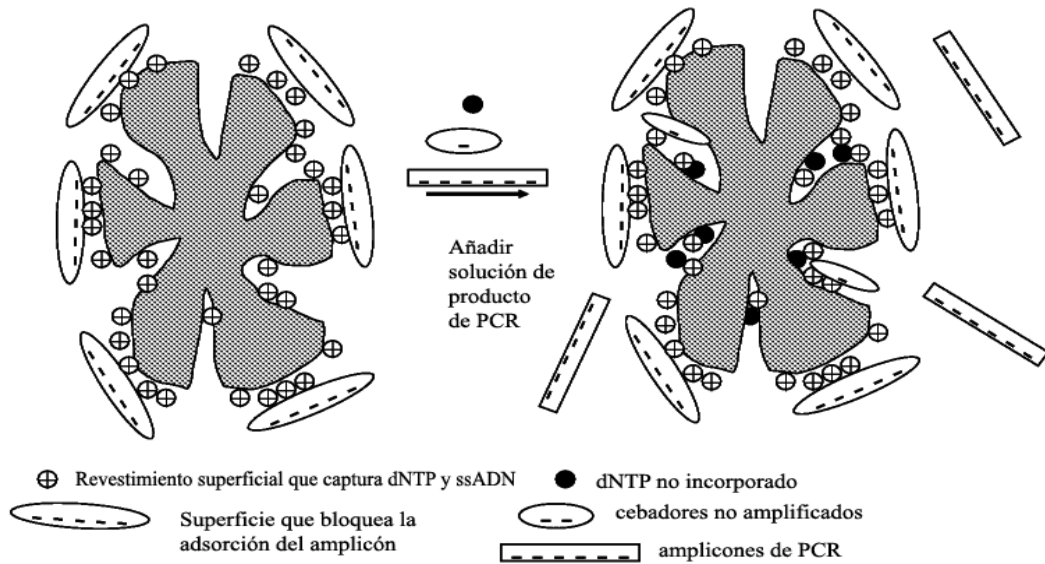


Figura 1(b)

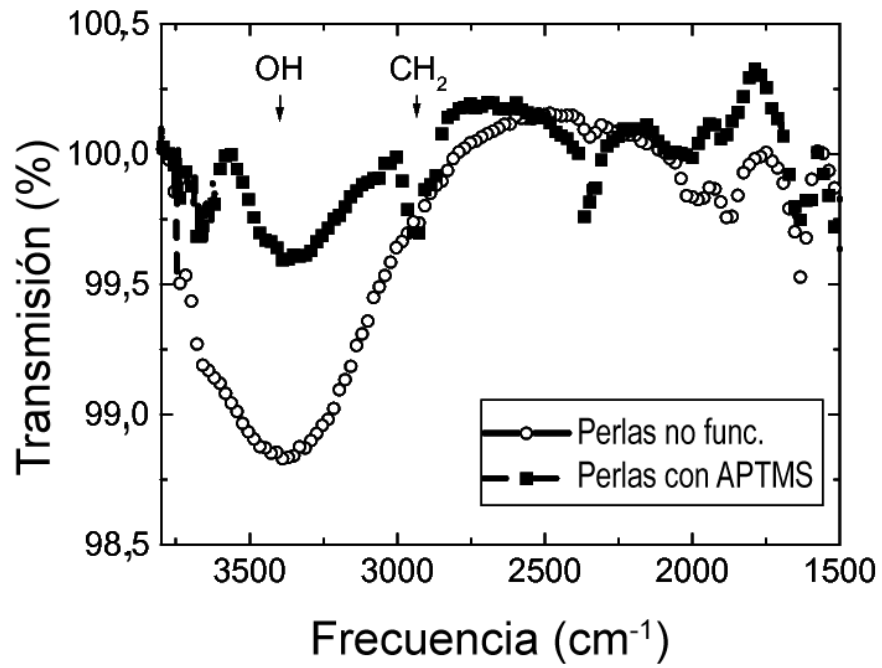


Figura 2

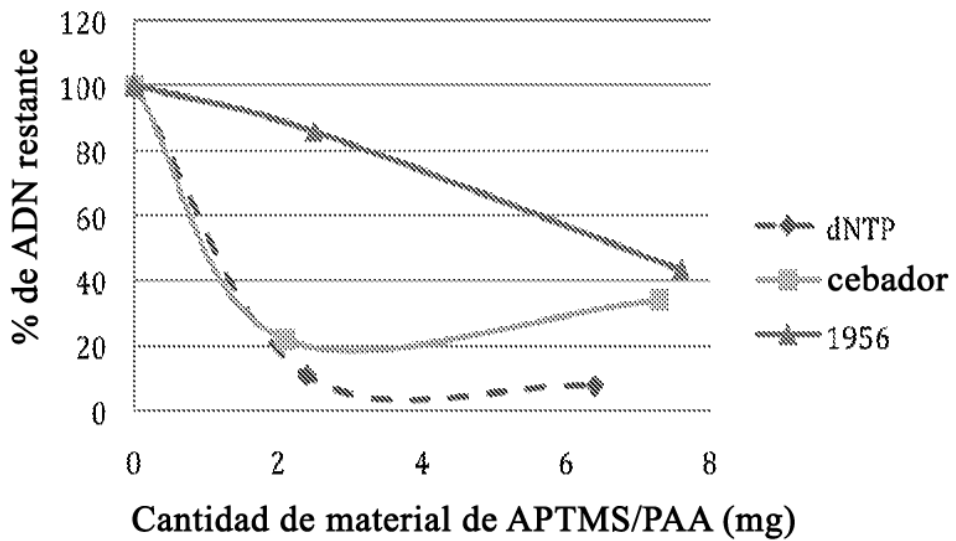


Figura 3

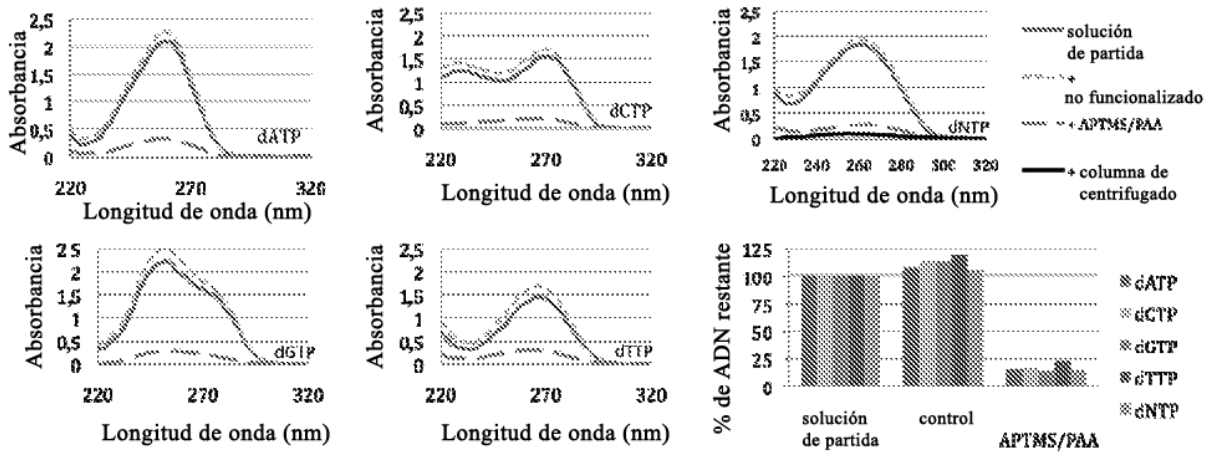


Figura 4a

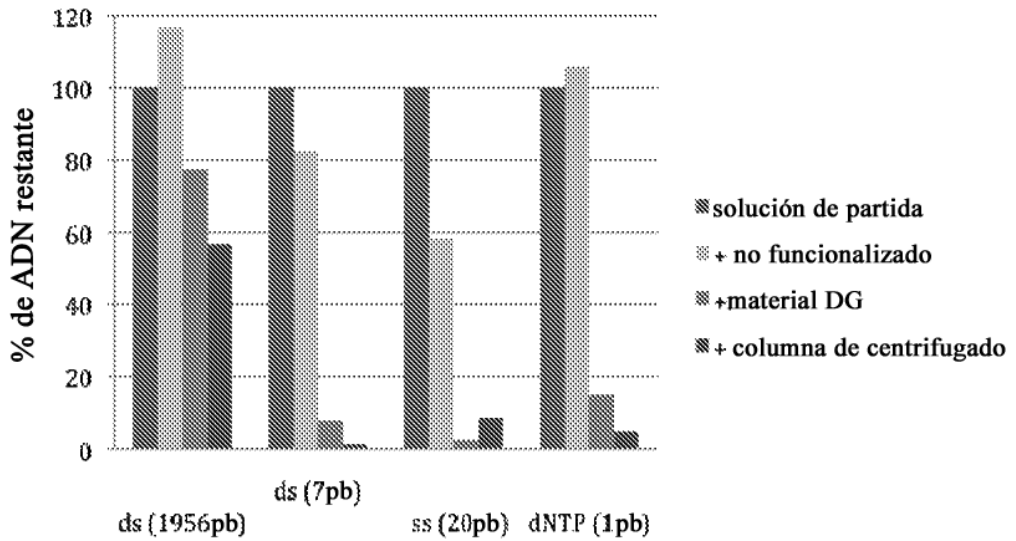


Figura 4b

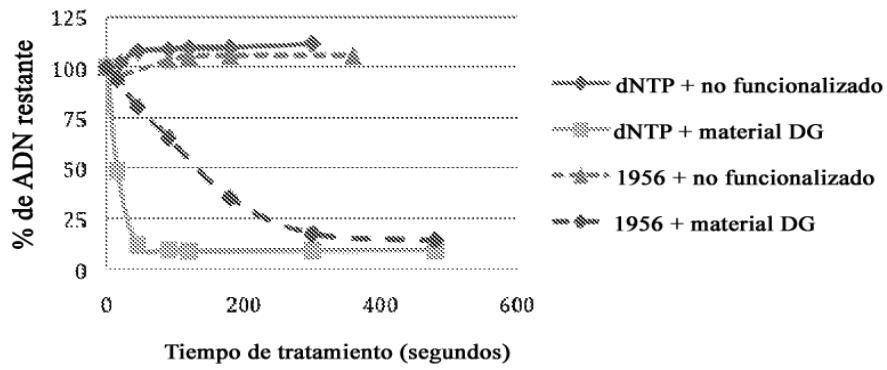


Figura 5

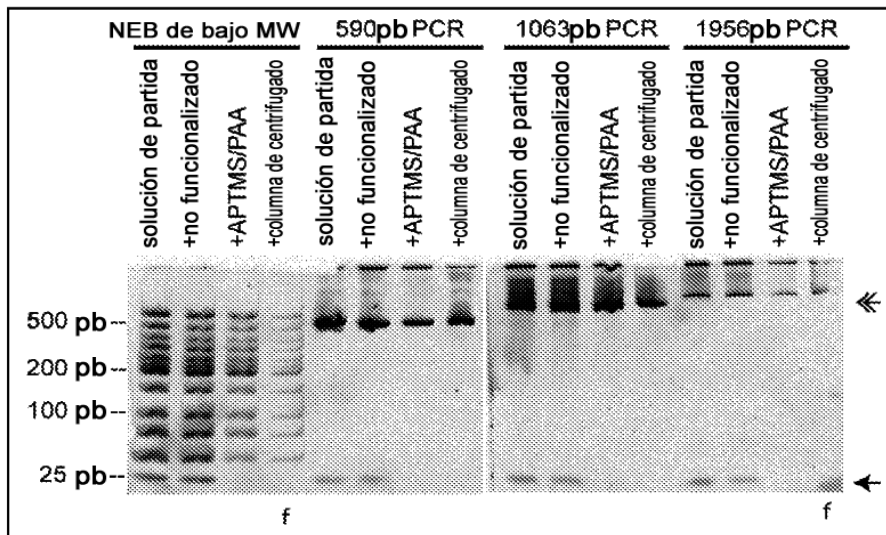


Figura 6

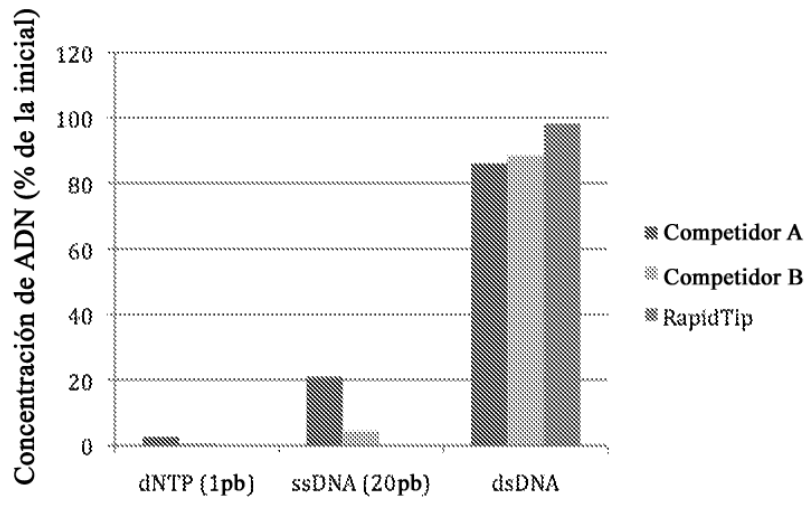


Figura 7(a)

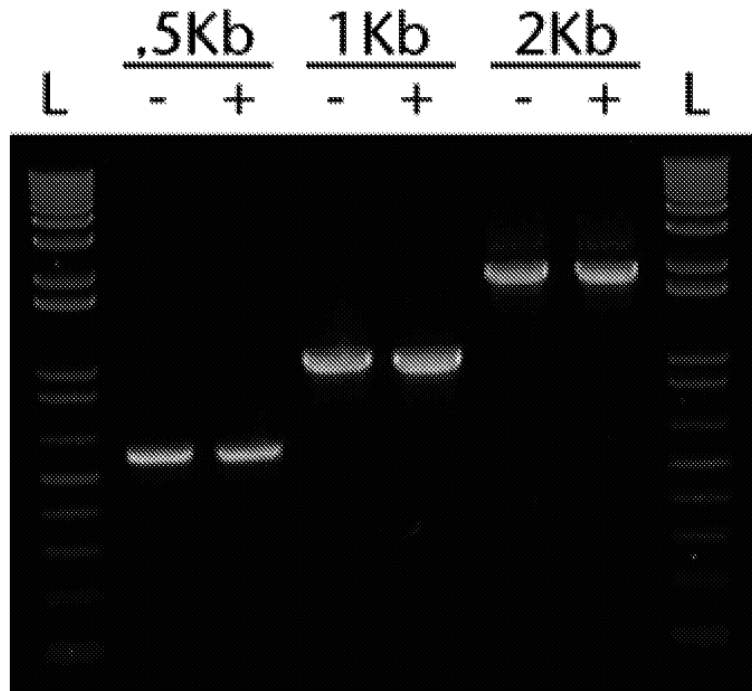


Figura 7(b)

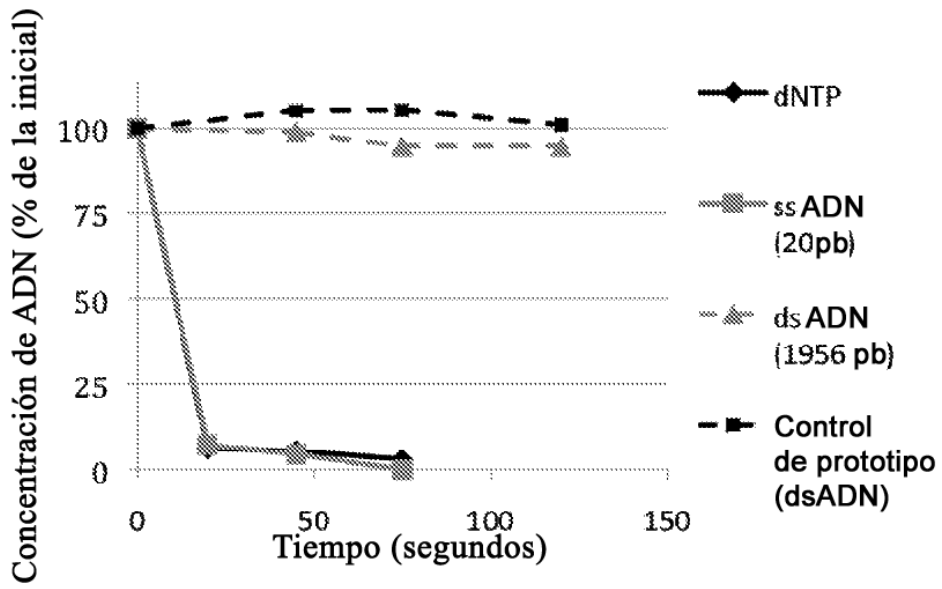


Figura 8

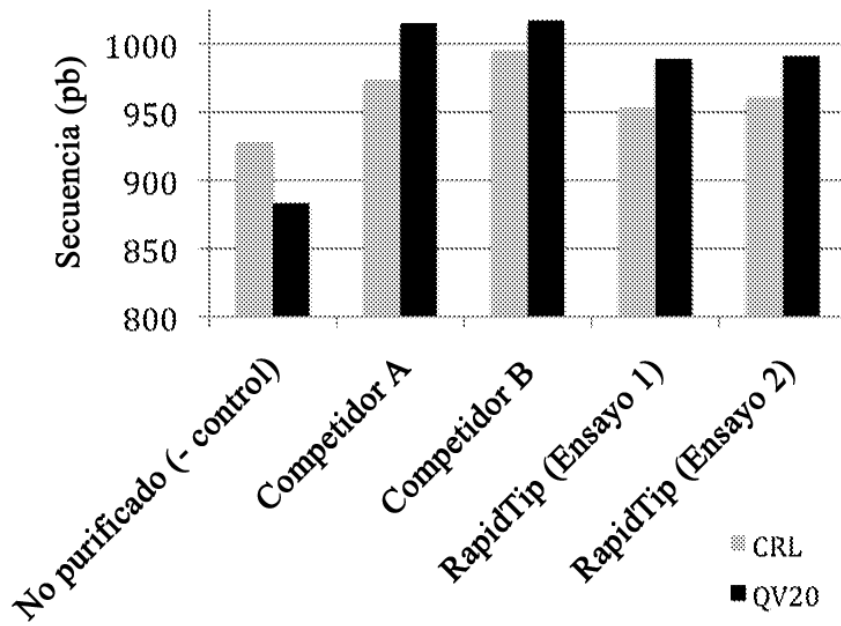


Figura 9

SUPERFICIE (DE PORO) INTERNA

| | | Hidrófobo (H) | Cargado (C) | Unión específica (S) | Resistente (R) | |
|---------------------------|---|---|---|--|----------------|---|
| SUPERFICIE EXTERNA | <u>Interna más/ externa menos</u> | | <ul style="list-style-type: none"> • Ensayo de hibridación (eliminar oligo-sonda ss corta no unida, retener ss hibridada a la diana grande tal como PCR) | | | H |
| | • Ensayo de hibridación (H interior y - exterior) | | <ul style="list-style-type: none"> • Ensayo de hibridación (+ interior y - exterior) • Limpieza de PCR | | | C |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Ensayo de hibridación (eliminar ss no unida, retener ss hibridada incluso con diana pequeña) • Limpieza rxn enzimática | <ul style="list-style-type: none"> • Eliminación de nucleótidos o limpieza rxn de secuenciación de colorantes grandes (eliminar dNTP mientras se retienen fragmentos ss) • Ensayo de hibridación Limpieza rxn enzimática o de PCR • Eliminar el colorante no unido en reacciones de marcado mientras se conservan biomoléculas marcada | <ul style="list-style-type: none"> • Eliminar m-ARN pequeño del ARN total • Incrementar la especificidad de la detección de m-ARN | <ul style="list-style-type: none"> • Concentración de moléculas grandes mediante retención de agua en los poros | R | |

Figura 10

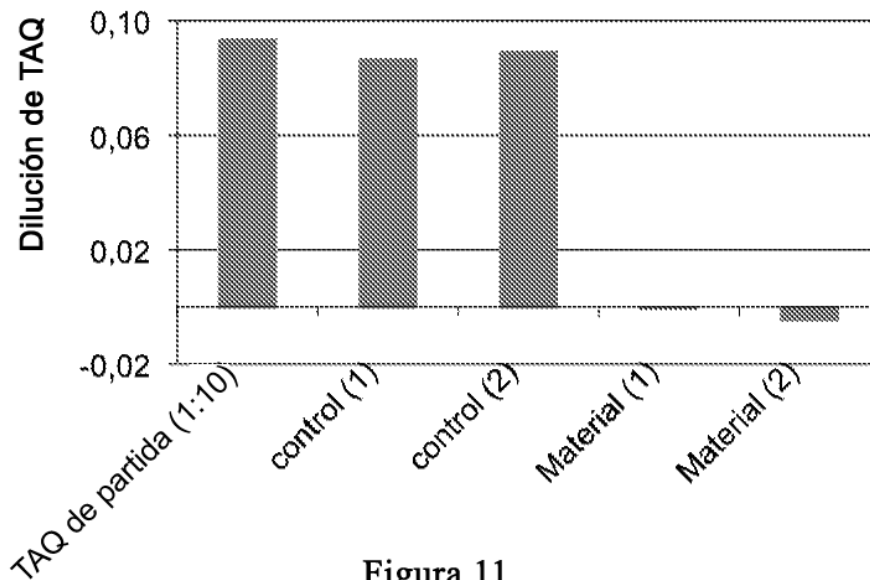


Figura 11