

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 751**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2016** **PCT/EP2016/062759**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016** **WO16193490**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2016** **E 16730734 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.01.2022** **EP 3303630**

54 Título: **Método para separar el DNA por tamaño**

30 Prioridad:

05.06.2015 EP 15170885

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

20.04.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

O'NEIL, DOMINIC;
SPERLING, TANJA;
GRÜNEFELD, PETER y
SCHOLLE, NICOLA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 906 751 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

Método para separar el DNA por tamaño

Campo de la invención

La presente invención proporciona un método para el aislamiento selectivo por tamaño de moléculas de DNA. El método de la presente invención es particularmente útil para aislar moléculas de DNA diana que tienen una longitud mínima deseada para preparar una biblioteca de secuenciación. Además, se proporciona un kit que se puede utilizar para el aislamiento selectivo por tamaño de moléculas de DNA.

Antecedentes de la invención

En la técnica anterior se conocen bien diferentes métodos para aislar ácidos nucleicos. Dichos métodos implican la separación de los ácidos nucleicos de interés de otros componentes de la muestra, tal como por ejemplo contaminaciones de proteínas o potencialmente otros ácidos nucleicos, también denominados a menudo como ácidos nucleicos no diana. Por ejemplo, los métodos para aislar ácidos nucleicos tales como DNA de varios materiales de muestra uniéndolos a un material de sílice en presencia de una sal caotrópica son bien conocidos y establecidos en la técnica anterior. Ejemplos de métodos que se basan en dicho principio se describen, por ejemplo, en los documentos de Patente EP 0 389 063, WO 03/057910, EP 0 757 106, US 6,037,465 y WO 2006/084753.

Si se pretende aislar un ácido nucleico específico de interés de otros ácidos nucleicos, el proceso de separación generalmente se basa en las diferencias en los parámetros del ácido nucleico diana y no diana tal como, por ejemplo, su topología (por ejemplo, DNA superenrollado de DNA lineal), su tamaño (longitud) o diferencias químicas (por ejemplo, DNA de RNA) y similares.

Para ciertas aplicaciones, las diferencias en el tamaño son un criterio importante para distinguir los ácidos nucleicos diana de los ácidos nucleicos no diana. Por ejemplo, el fraccionamiento selectivo por tamaño del DNA es una etapa importante en la construcción de bibliotecas para aplicaciones de secuenciación de nueva generación (NGS). Existen diferentes tecnologías y métodos de NGS, tales como la pirosecuenciación, la secuenciación por síntesis o la secuenciación por ligación. La mayoría de las plataformas de NGS comparten una característica tecnológica común, a saber, la secuenciación en paralelo de manera masiva de moléculas de DNA individuales o amplificadas clonalmente que se separan espacialmente en una celda de flujo o mediante la generación de una emulsión de aceite y agua. En NGS, la secuenciación se realiza mediante ciclos repetidos de extensiones de nucleótidos mediadas por polimerasa o, en un formato, mediante ciclos iterativos de ligación de oligonucleótidos. Como un proceso en paralelo de manera masiva, la NGS genera cientos de megabases a gigabases de salida de secuencia de nucleótidos en una sola ejecución de instrumento, dependiendo de la plataforma. La producción económica de grandes volúmenes de datos de secuencia es la principal ventaja sobre los métodos convencionales. Por lo tanto, las tecnologías de NGS se han convertido en una importante fuerza impulsora en la investigación genética. Varias plataformas de tecnología de NGS han encontrado un uso generalizado e incluyen, por ejemplo, las siguientes plataformas de NGS: Roche/454, Illumina Solexa Genome Analyzer, the Applied Biosystems SOLiD™ system, analizador de secuencias de semiconductores Ion Torrent™, secuenciación en tiempo real PacBio® y secuenciación de molécula única Helicos™ (SMS). Las tecnologías de NGS, las plataformas de NGS y las aplicaciones/campos comunes para las tecnologías de NGS son, por ejemplo, recogidas en Voelkerding et al (Clinical Chemistry 55:4 641-658, 2009) y Metzker (Nature Reviews/Genetics Volume 11, January 2010, pages 31-46).

Además de la característica de que la secuenciación se realiza de forma masiva en paralelo en las tecnologías de NGS, las plataformas de tecnología de NGS tienen en común que requieren la preparación de una biblioteca de secuenciación que es adecuada para la secuenciación masiva en paralelo. Los ejemplos de dichas bibliotecas de secuenciación incluyen bibliotecas de fragmentos, bibliotecas emparejadas o bibliotecas de fragmentos con código de barras. La mayoría de las plataformas se adhieren a un procedimiento común de preparación de bibliotecas con modificaciones menores antes de una "ejecución" en el instrumento. Este procedimiento incluye la fragmentación del DNA (que también se puede obtener a partir del cDNA, por ejemplo, mediante cizallamiento mecánico, tal como sonicación, hidro-cizallamiento, ultrasonido, nebulización o fragmentación enzimática seguida de reparación del DNA y pulido final (extremo romo o proyección A) y, finalmente, la ligación al adaptador específica de la plataforma. La preparación y el diseño de dichas bibliotecas de secuenciación también se describen, por ejemplo, en Voelkerding, 2009 y Metzker, 2010.

Para garantizar datos de secuenciación de alta calidad, se necesitan métodos de preparación de bibliotecas eficientes. Además, para reducir el fondo en las lecturas de secuenciación, es importante eliminar los contaminantes de DNA que puedan estar presentes en la biblioteca de secuenciación como resultado de la preparación de la biblioteca. Un ejemplo de dichos contaminantes de DNA son los monómeros adaptadores y los productos de ligación adaptador-adaptador que a menudo están presentes en la biblioteca de secuenciación después de la ligación del adaptador. Estas pequeñas moléculas de DNA contaminantes deben eliminarse antes de la secuenciación.

Para garantizar una ligación del adaptador eficiente, los adaptadores se utilizan en exceso durante la ligación del adaptador. Por lo tanto, después de la ligación del adaptador, los monómeros adaptadores no ligados y los productos de ligación adaptador-adaptador tales como dímeros adaptadores están presentes además de las moléculas de DNA ligadas

al adaptador. Es importante eliminar los monómeros adaptadores no ligados y los productos de ligación adaptador-adaptador de las moléculas de DNA ligadas al adaptador. De lo contrario, los monómeros adaptadores no ligados y los productos de ligación adaptador-adaptador consumirán la capacidad de secuenciación, disminuyendo así la potencia disponible para investigar las secuencias de interés. Si la biblioteca de secuenciación comprende cantidades considerables de monómeros adaptadores y dímeros adaptadores no ligados, se desperdician valiosos recursos de secuenciación. Por lo tanto, la eliminación de monómeros adaptadores no ligados y productos de ligación adaptador-adaptador aumenta el valor de la secuenciación posterior. Los monómeros adaptadores no ligados y los productos de ligación adaptador-adaptador generalmente se eliminan mediante una purificación selectiva por tamaño de las moléculas de DNA ligadas al adaptador más grandes, que contienen los fragmentos de DNA que se van a secuenciar.

Se desarrollaron varios enfoques en la técnica anterior con el fin de aislar DNA de un tamaño diana específico, respectivamente de un intervalo de tamaño diana específico. Estos métodos de selección de tamaño se pueden usar para eliminar los dímeros y monómeros adaptadores, ya que estas contaminaciones de DNA tienen un tamaño que es más pequeño que las moléculas de DNA ligadas al adaptador. Un método clásico para aislar DNA de un tamaño diana implica la separación del DNA en un gel, cortando las bandas de gel deseadas y aislando después el DNA del tamaño diana de los fragmentos de gel. Los métodos de selección por tamaño basados en gel respectivos a menudo se recomiendan en muchos protocolos de preparación de bibliotecas de secuenciación de nueva generación para eliminar los monómeros y dímeros adaptadores.

Además, estos métodos también se pueden usar para eliminar el DNA que es más grande que el tamaño deseado si está contenido en la muestra. De este modo, es posible aislar moléculas de DNA que tengan un tamaño que se encuentre dentro de un cierto intervalo de tamaño que está determinado por un valor de corte inferior y un valor de corte superior. Sin embargo, los métodos respectivos requieren mucho tiempo, ya que la porción del gel que contiene los ácidos nucleicos de interés debe cortarse manualmente y luego tratarse para degradar el gel o por otra parte extraer el DNA del tamaño diana de la porción de gel.

Otra tecnología ampliamente utilizada es la precipitación selectiva por tamaño con un tampón que contiene un polímero de poli(óxido de alquileo), en particular tampones basados en polietilenglicol (Lis and Schleif. *Nucleic Acids Res.* 1975 Mar; 2 (3): 383-9) o la unión/precipitación sobre perlas funcionalizadas con carboxilo (DeAngelis et al., *Nuc. Acid. Res.* 1995, Vol. 23(22), 4742-3; los documentos de Patent US 5,898,071 und US 5,705,628, comercializado por Beckman-Coulter (AmPure XP; SPRIselect), los documentos de Patente WO 99/58664 y US 6,534,262). El producto AmPure XP se usa ampliamente y, por lo tanto, puede percibirse como un producto de referencia. Permite aislar moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte y, además, permite aislar moléculas de DNA que tienen un tamaño que se encuentra dentro de un intervalo de tamaño específico (determinado por el valor de corte inferior y el valor de corte superior). En estos métodos, la superficie de la perla carboxilada es esencial para generar rendimientos suficientes de los fragmentos de DNA precipitados del tamaño deseado. La necesidad de modificar la superficie de la fase sólida limita el material que se puede usar para proporcionar el soporte sólido que se usa para la unión de ácidos nucleicos. Además, la modificación de la superficie es una etapa tediosa, lenta y costosa en la fabricación de la fase sólida. Por lo tanto, aunque los métodos de selección por tamaño basados en polietilenglicol se han establecido como el estándar de oro para el aislamiento de DNA selectivo por tamaño, existe la necesidad de métodos mejorados.

La técnica anterior muestra que existe un interés y una necesidad crecientes de métodos que permitan el aislamiento selectivo por tamaño de moléculas de DNA, en particular de moléculas de DNA que tienen un tamaño mínimo determinado. En particular, existe la necesidad de un método simple, efectivo y rentable para aislar DNA de un tamaño mínimo específico y/o DNA que tenga un tamaño que se encuentre dentro de un intervalo de tamaño específico que pueda integrarse en los protocolos de preparación de la biblioteca de secuenciación de nueva generación existente. Además, existe la necesidad de métodos rápidos, sencillos y fiables para eliminar monómeros adaptadores y dímeros adaptadores no ligados de muestras de ligación de adaptadores, en particular muestras de ligación de adaptadores obtenidas en la preparación de una biblioteca de secuenciación.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un método para aislar DNA de un tamaño diana o un intervalo de tamaño diana de una muestra que contiene DNA que comprende moléculas de DNA de diferentes tamaños. En particular, el objetivo de la presente invención es proporcionar un método de aislamiento de DNA selectivo por tamaño basado en un polímero de poli(óxido de alquileo) que permita aislar moléculas de DNA diana de un tamaño diana o intervalo de tamaño diana con un rendimiento suficiente que sea independiente de las modificaciones superficiales del material de soporte sólido.

Compendio de la invención

La invención se puede definir mediante las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se basa en la tecnología establecida de aislamiento de DNA selectivo por tamaño, en la que se usa al menos un polímero de poli(óxido de alquileo), tal como un polietilenglicol, para precipitar selectivamente las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte de una muestra que contiene DNA. Las moléculas de DNA precipitadas se unen a un soporte sólido y pueden recuperarse y eliminarse de la muestra restante. Como se discutió en los antecedentes, los métodos selectivos por tamaño basados en polímeros de

poli(óxido de alquileo) conocidos en la técnica anterior tienen el inconveniente de que requieren una fase sólida con una superficie modificada para permitir el aislamiento de las moléculas de DNA diana con un rendimiento suficiente. Los inventores descubrieron ahora sorprendentemente que también es posible un aislamiento selectivo por tamaño de moléculas de DNA diana con alto rendimiento cuando se usa una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, si incluye al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino y al menos un catión divalente en la mezcla de unión, en donde la mezcla de unión comprende el catión divalente en una concentración de 3 mM a 75 mM, y si se establece un valor de pH alcalino en la mezcla de unión que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5. Los ejemplos demuestran que el rendimiento de los fragmentos de DNA recuperados que tienen un tamaño por encima de un cierto valor de corte se ve significativamente mejorado por esta combinación de características, lo que permite utilizar una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar para la unión del DNA al tiempo que garantiza altas tasas de recuperación. Por lo tanto, se proporciona un método eficaz de aislamiento de DNA selectivo por tamaño basado en un polímero de poli(óxido de alquileo), en el que el polímero de poli(óxido de alquileo) es un polietilenglicol, que es independiente de las modificaciones superficiales costosas y que requieren mucho tiempo de la fase sólida.

Según un primer aspecto, se proporciona un método de aislamiento de DNA selectivo por tamaño basado en un polímero de poli(óxido de alquileo) para aislar moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte de una muestra que contiene DNA, que comprende

(a) preparar una mezcla de unión que comprende la muestra que contiene DNA, al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino y al menos un catión divalente, en donde la mezcla de unión comprende el catión divalente en una concentración de 3 mM a 75 mM, y en el que dicha mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5 y une moléculas de DNA precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene moléculas de DNA unidas a ella que tiene un tamaño por encima del valor de corte, en el que, bajo las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte predominantemente no se unen a la fase sólida;

(b) separar las moléculas de DNA unidas de la muestra restante;

- opcionalmente lavar las moléculas de DNA unidas; y
- opcionalmente eluir las moléculas de DNA unidas de la fase sólida.

En dicho método, las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte deseado se unen eficientemente a la fase sólida con un alto rendimiento, mientras que las moléculas de DNA que tienen un tamaño por debajo de dicho valor de corte predominantemente no se unen y, por lo tanto, no se recuperan en la etapa (a). El valor de corte se puede ajustar modificando la concentración del polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol en la mezcla de unión como se conoce por la técnica anterior y también se demuestra mediante los ejemplos. La presencia del catión divalente y el valor de pH alcalino como se especifica en la presente memoria asegura la unión eficiente de las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte, incluso aunque se use una fase sólida que tenga una superficie que contenga silicio sin modificar. El método es particularmente adecuado para aislar moléculas de DNA ligadas al adaptador como moléculas de DNA diana de una muestra de ligación del adaptador y para eliminar monómeros adaptadores y productos de ligación adaptador-adaptador.

Según un segundo aspecto, se proporciona un kit para el aislamiento selectivo por tamaño de moléculas de DNA diana que tienen un tamaño por encima de un valor de corte deseado de una muestra que contiene DNA, en el que el kit es adecuado para el método según el primer aspecto, comprendiendo el kit

(a) un tampón de unión que comprende al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino, al menos un catión divalente y al menos un agente de tamponamiento, en el que el tampón de unión tiene un valor de pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5;

(b) una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar;

(c) opcionalmente al menos una solución de lavado; y

(d) opcionalmente al menos una solución de elución.

Se puede usar ventajosamente un kit respectivo junto con y para realizar el método según el primer aspecto de la invención.

Otros objetivos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Figuras

La **Figura 1** muestra un electroferograma (chip de DNA de alta sensibilidad de Agilent) de DNA fragmentado cortado antes y después del aislamiento selectivo por tamaño utilizando un tampón de unión y, por lo tanto, condiciones de

unión según la invención y tampones/condiciones de unión comparativos. Las curvas demuestran que usando un pH alcalino (en la presente memoria: 9.0) e incluyendo un catión divalente (en la presente memoria: de $MgCl_2$) en la mezcla de unión aumenta el rendimiento de fragmentos de DNA precipitados con PEG 8000 cuando se usa una fase sólida que tiene una superficie de sílice sin modificar. FU: unidades de fluorescencia; bp: pares de bases.

La **Figura 2** muestra un electroferograma (chip Agilent 7500) de DNA fragmentado cortado antes y después del aislamiento selectivo por tamaño utilizando diferentes condiciones de unión según la invención y partículas de sílice magnéticas como fase sólida. Como puede verse, el valor de corte de los fragmentos de DNA recuperados se puede variar y, por lo tanto, se puede ajustar usando diferentes concentraciones del polímero de poli(óxido de alquileo) (en la presente memoria: polietilenglicol) en la mezcla de unión. Esto se consiguió añadiendo diferentes cantidades del tampón de unión a la muestra que contenía DNA.

La **Figura 3** muestra un electroferograma (chip Agilent 7500) de DNA fragmentado cortado antes y después del aislamiento selectivo por tamaño utilizando diferentes condiciones de unión según la invención y columnas giratorias de sílice como fase sólida. Como puede verse, el valor de corte de los fragmentos de DNA recuperados se puede variar y, por lo tanto, se puede ajustar usando diferentes concentraciones del polímero de poli(óxido de alquileo) (en la presente memoria: polietilenglicol) en la mezcla de unión.

Las **Figuras 4 a 9** muestran los resultados del ejemplo 4, en el que diferentes tampones de unión que comprenden polietilenglicol (PEG), $MgCl_2$, NaCl y diferentes agentes de tamponamiento a diferentes valores de pH se utilizaron para realizar una selección de tamaño doble para aislar fragmentos de DNA dentro de un intervalo definido por un valor de corte superior e inferior (bp). Los resultados se compararon con el producto de referencia, AMPure. Las barras negras indican la cantidad de DNA obtenido después de la segunda etapa de elución. La **Figura 4a** muestra la tasa de recuperación de DNA (%) después de realizar una selección de tamaño doble utilizando CHES como agente de tamponamiento. La **Figura 4b** muestra la tasa de recuperación de DNA (%) cuando se usa PEG al 9 % en la mezcla de unión a diferentes valores de pH (valor de corte superior). La **Figura 5a** muestra la tasa de recuperación de DNA (%) después de realizar una selección de tamaño doble utilizando AMPD como agente de tamponamiento a diferentes valores de pH. La **Figura 5b** muestra la tasa de recuperación de DNA (%) cuando se usa PEG al 9 % en la mezcla de unión a diferentes valores de pH (valor de corte superior). Las **Figuras 6a y 6b** muestran los resultados correspondientes al utilizar TAPS como agente de tamponamiento. La **Figura 7** muestra la tasa de recuperación de DNA (%) al realizar una selección de tamaño doble utilizando el agente de tamponamiento AMPSO en diferentes concentraciones y a diferentes valores de pH. La **Figura 8** muestra la tasa de recuperación de DNA (%) después de realizar una selección de tamaño doble usando TRIS/(NH_4) $_2$ SO $_4$ como agente de tamponamiento. La **Figura 9** muestra la tasa de recuperación de DNA (%) después de realizar una selección de tamaño doble usando diferentes concentraciones de TRIS/(NH_4) $_2$ SO $_4$.

Las **Figuras 10 a 14** muestran los resultados del ejemplo 5, en el que diferentes tampones de unión que comprenden polietilenglicol (PEG), $MgCl_2$, NaCl y diferentes agentes de tamponamiento a diferentes valores de pH se usaron en la limpieza y selección por tamaño en un trabajo de preparación de bibliotecas de NGS (secuenciación dirigida). La **Figura 10a** muestra una imagen similar a un gel de Agilent BioAnalyzer obtenida para las muestras 1-6 del panel de genes de DNA analizados después de la limpieza y la selección por tamaño utilizando tampones de selección por tamaño recién preparados que comprenden CAPSO o CHES como agente de tamponamiento, ajustado a pH 9,0, 9,1 o 9,2. La muestra 7 muestra el panel de genes de DNA antes de la limpieza, diluido 1:100. (L) indica la escala utilizada. La **Figura 10b** muestra la tasa de recuperación de DNA (%) calculada para las muestras 1-6. Las **Figuras 11 a 14** muestran los resultados obtenidos para las muestras del panel de genes de DNA analizadas después de la limpieza y la selección por tamaño utilizando tampones de selección por tamaño que se han almacenado durante seis meses y que comprenden diferentes agentes de tamponamiento. Las **Figuras 11a, 12a, 13a y 14a** muestran las imágenes similares al gel de Agilent BioAnalyzer obtenidas para las muestras analizadas procesadas con los tampones de selección que comprenden diferentes agentes de tamponamiento (**Figura 11a**: CAPSO, pH 9,0, 9,1 o 9,2; **Figura 12a**: AMPD, pH 9,0 o 9,1; **Figura 13a**: CHES, pH 9,0, 9,1 o 9,2; **Figura 14a**: TAPS, pH 9,0 o 9,3). (L) indica la escala utilizada. **Figuras 11b, 12b, 13b y 14b** muestran la tasa de recuperación de DNA (%) calculada para las muestras procesadas con los tampones de selección respectivos (**Figura 11b**: CAPSO, pH 9,0, 9,1 o 9,2; **Figura 12b**: AMPD, pH 9,0 o 9,1; **Figura 13b**: CHES, pH 9,0, 9,1 o 9,2; **Figura 14b**: TAPS, pH 9,0 o 9,3).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método selectivo por tamaño para aislar moléculas de DNA diana por tamaño de una muestra que contiene DNA que comprende moléculas de DNA de diferentes tamaños que se basa en un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol. A diferencia de los métodos de la técnica anterior, el método de la invención utiliza una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar para unir las moléculas de DNA diana precipitadas. En combinación con los métodos de la técnica anterior, el uso de una fase sólida no modificada no era factible porque las tasas de recuperación de DNA son muy bajas (véanse los ejemplos). La presente invención supera este problema, *inter alia*, porque un catión divalente está presente en la mezcla de unión y el pH de la mezcla de unión se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5. Esta combinación de características mejora la precipitación y/o la eficiencia de unión y da como resultado que las moléculas de DNA precipitadas que tienen un tamaño por encima de un cierto valor de corte se recuperan con un alto rendimiento, como se demuestra en los ejemplos. Sin pretender ceñirse a la teoría, una posible explicación de este efecto ventajoso sobre la recuperación del

DNA es que el esqueleto del DNA tiene una carga más negativa cuando se usa un valor de pH alcalino durante el proceso de unión/precipitación. Como una fracción más grande de la superficie de la fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar también estará cargada más negativamente en estas condiciones, el ion divalente en la mezcla de unión puede funcionar como un puente entre esta superficie cargada más negativamente y el DNA cargado negativamente aumentando así potencialmente la recuperación de las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte.

Método

Se describe, pero no se reivindica, un método de aislamiento de DNA selectivo por tamaño basado en un polímero de poli(óxido de alquileo) para aislar moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte de una muestra que contiene DNA, que comprende

(a) preparar una mezcla de unión que comprende la muestra que contiene DNA, al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) y al menos un catión divalente, en la que dicha mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8 a 10 y une moléculas de DNA precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene unidas a ella moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte, en donde, bajo las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte no se unen sustancialmente a la fase sólida;

(b) separar las moléculas de DNA unidas de la muestra restante;

- opcionalmente lavar las moléculas de DNA unidas; y
- opcionalmente eluir las moléculas de DNA unidas de la fase sólida.

Como se reivindica, según un primer aspecto, se proporciona un método de aislamiento de DNA selectivo por tamaño basado en un polímero de poli(óxido de alquileo) para aislar moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte de una muestra que contiene DNA, comprendiendo el método

(a) preparar una mezcla de unión que comprende la muestra que contiene DNA, al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino y al menos un catión divalente, en donde la mezcla de unión comprende el catión divalente en una concentración de 3 mM a 75 mM, y en el que dicha mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5 y une moléculas de DNA precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene moléculas de DNA unidas a ella que tienen un tamaño por encima del valor de corte, en el que, bajo las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte predominantemente no se unen a la fase sólida;

(b) separar las moléculas de DNA unidas de la muestra restante;

- opcionalmente lavar las moléculas de DNA unidas; y
- opcionalmente eluir las moléculas de DNA unidas de la fase sólida.

El método es particularmente adecuado para realizar una selección por tamaño de moléculas de DNA durante la preparación de una biblioteca de secuenciación adecuada para la secuenciación de nueva generación.

El método se puede realizar en varias realizaciones. El método puede ser utilizado, entre otros, para

1. aislar las moléculas de DNA deseadas que tengan un tamaño por encima de un determinado valor de corte (las moléculas de DNA deseadas también se denominan en la presente memoria moléculas de DNA "diana") uniendo dichas moléculas de DNA diana en la etapa (a) a la fase sólida. Las moléculas de DNA diana unidas se separan (etapa (b)) y, opcionalmente, se lavan y eluyen. En esta realización, se puede realizar una selección de tamaño "unilateral", es decir, para moléculas de DNA diana que tengan un tamaño mínimo determinado como se determina por el valor de corte. Sin embargo, no se define un tamaño máximo de las moléculas de DNA diana (determinado por un valor de corte superior). Esta realización es, por ejemplo, adecuada para aislar y, por lo tanto, separar moléculas de DNA diana que tienen un tamaño por encima de un valor de corte deseado de moléculas de DNA más pequeñas que representan contaminaciones no deseadas, tales como, por ejemplo, oligonucleótidos, cebadores, fragmentos de DNA más cortos, etc.

2. retirar las moléculas de DNA que tengan un tamaño superior a un determinado valor de corte de una muestra que contenga DNA. Estas moléculas de DNA más grandes se unen en la etapa (a) a la fase sólida y en la etapa (b) se separan y, por lo tanto, se eliminan de la muestra restante. De este modo, la muestra se empobrece eficientemente de moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte. La muestra restante se puede procesar posteriormente, por ejemplo, para aislar ácidos nucleicos u otros componentes que todavía están presentes en la muestra restante. La muestra restante también se puede utilizar directamente en un método de análisis. Las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte que están unidas a la fase sólida pueden desecharse en caso de que no sean de interés o pueden procesarse más, por ejemplo, lavándolas y

eluyéndolas opcionalmente.

3. realizar un fraccionamiento por tamaño de la muestra que contiene DNA para obtener una o más fracciones que comprendan moléculas de DNA de un cierto intervalo de tamaño. Esto se puede lograr realizando dos o más ciclos de selección por tamaño según las enseñanzas de la presente invención. Por ejemplo, el método puede comprender repetir las etapas (a) y (b) mientras se aumenta la concentración del polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol en la mezcla de unión en cada ciclo. De este modo, el valor de corte se reduce en cada ciclo. Por ejemplo, en el primer ciclo, las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte, se unen a la fase sólida y se separan de la muestra. En el segundo ciclo, se aumenta la concentración del polímero de poli(óxido de oxialquileo) que es un polietilenglicol, reduciendo así el valor de corte en el segundo ciclo. Las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de este segundo valor de corte se unen a la fase sólida y se separan de la muestra restante. Las moléculas de DNA unidas en el segundo ciclo se seleccionan por tamaño para un valor de corte superior (determinado por el primer valor de corte) y un valor de corte inferior (determinado por el segundo valor de corte) y, por lo tanto, tienen un tamaño dentro de un intervalo de tamaño definido. Las moléculas de DNA que se unen a la fase sólida y, por lo tanto, se recuperan en cada ciclo y se pueden desechar o eluir, por ejemplo, después de una etapa de lavado opcional. Este fraccionamiento por tamaño también se puede realizar durante tres o más ciclos utilizando el mismo principio. Esto permite fraccionar por tamaño una muestra que contiene DNA y proporcionar moléculas de DNA de diferentes longitudes como diferentes fracciones de eluato utilizando una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, tal como una superficie de sílice o vidrio.

Según una realización preferida, el método según el primer aspecto es para aislar moléculas de DNA diana que tienen un tamaño dentro de un determinado intervalo de tamaño que está determinado por un valor de corte superior y un valor de corte inferior de una muestra que contiene DNA en el que dicho método comprende

- (a) preparar una primera mezcla de unión que comprende la muestra que contiene DNA, al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino y al menos un catión divalente, en donde la mezcla de unión comprende el catión divalente en una concentración de 3 mM a 75 mM, y en el que dicha primera mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5 y une las moléculas de DNA precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene unidas a ella moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte superior, en las que, bajo las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA diana que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte superior predominantemente no se unen a la fase sólida;
- (b) separar las moléculas de DNA unidas de la muestra restante que comprende las moléculas de DNA diana;
- (c) preparar una segunda mezcla de unión que comprende la muestra restante, en donde dicha segunda mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5 y en donde la concentración del polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol en la segunda mezcla de unión aumenta en comparación con la primera mezcla de unión y une las moléculas de DNA diana precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene moléculas de DNA diana unidas a la misma que tienen un tamaño por encima del valor de corte inferior, en donde bajo las condiciones de unión usadas, las moléculas de DNA que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte inferior predominantemente no se unen a la fase sólida;
- (d) separar las moléculas de DNA diana unidas de la muestra restante;
 - opcionalmente, lavar las moléculas de DNA diana unidas; y
 - opcionalmente eluir las moléculas de DNA diana unidas de la fase sólida.

Esta realización es ventajosa porque permite aislar moléculas de DNA diana que tienen un tamaño que se encuentra dentro de un intervalo definido que está determinado por el valor de corte superior y el valor de corte inferior.

Las etapas individuales (a) y (b) así como realizaciones adecuadas y preferidas no limitantes se describirán a continuación en detalle.

En la etapa (a), se prepara una mezcla de unión que comprende la muestra que contiene DNA, al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino y al menos un catión divalente, en donde la mezcla de unión comprende el catión divalente en una concentración de 3 mM a 75 mM. Es importante destacar que la mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5. Preferiblemente, la mezcla de unión se prepara poniendo en contacto la muestra que contiene DNA con un tampón de unión que tiene un pH que se encuentra en un intervalo de 8,5 a 9,5 y que comprende al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol, al menos un catión divalente y comprende al menos un agente de tamponamiento. El tampón de unión que se usa en la presente invención también se denomina en la presente memoria "tampón de precipitación". El polímero de poli(óxido de alquileo) contenido, que es un polietilenglicol, precipita moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte, de modo que se unen a la fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar. De ese modo, se proporciona una fase sólida que tiene unidas a ella moléculas de

DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte. Bajo las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA que tienen un tamaño molecular que es menor que el valor de corte predominantemente no se unen a la fase sólida. Como se muestra en los ejemplos y como era conocido en la técnica anterior, el valor de corte se puede ajustar variando la concentración de al menos un polímero de poli(óxido de alquilenos) que es un polietilenglicol en la mezcla de unión. Por lo tanto, en la etapa (a), las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte se adsorben eficientemente en la fase sólida, mientras que las moléculas de DNA más pequeñas que tienen un tamaño por debajo del valor de corte predominantemente no se unen a la fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio no modificado en esta etapa de unión selectiva por tamaño (a) y permanecen así en la mezcla de unión.

Para preparar la mezcla de unión, la muestra que contiene DNA se pone preferiblemente en contacto con un tampón de unión que tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5 y comprende al menos un polímero de poli(óxido de alquilenos) que es un polietilenglicol, al menos un catión divalente y al menos un agente de tamponamiento. Preferiblemente, las condiciones de unión las establece exclusivamente el tampón de unión y no se añaden aditivos o reactivos adicionales para establecer las condiciones de unión para unir las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte a la fase sólida. Esto simplifica el manejo. Por lo tanto, según una realización, las condiciones de unión selectiva por tamaño en la mezcla de unión están determinadas exclusivamente por el tampón de unión que se añade a la muestra que contiene DNA. Sin embargo, está dentro del alcance de la presente invención ajustar manualmente el valor de pH de la mezcla de unión añadiendo una base o ácido apropiado según sea necesario para alcanzar el valor de pH deseado en la mezcla de unión. El valor de pH de la mezcla de unión es importante, porque el pH del tampón de unión, respectivamente de la mezcla de unión, influye significativamente en el rendimiento de DNA cuando se usa una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar para unir las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte. Como se demuestra en los ejemplos, la recuperación del DNA diana es muy baja si no se utiliza un valor de pH alcalino durante la unión. Además, el pH también puede influir en el tamaño de las moléculas de DNA recuperadas y, por lo tanto, puede usarse para influir en el valor de corte. Por lo tanto, es importante que el valor de pH de la mezcla de unión se encuentre dentro del intervalo indicado.

Según una realización, la mezcla de unión y/o el tampón de unión que se añade a la muestra que contiene DNA para preparar la mezcla de unión tiene un valor de pH que se encuentra en un intervalo seleccionado de 8,5 a 9,4, 8,6 a 9,3 y 8,7 a 9,2. Preferiblemente, el valor de pH se encuentra en un intervalo de 8,6 a 9,2, más preferiblemente de 8,7 a 9,1 y lo más preferiblemente de 8,7 a 9,0, tal como 8,8 a 8,9.

La mezcla de unión comprende al menos un polímero de poli(óxido de alquilenos) que es un polietilenglicol. El polímero precipita las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte y ayuda a que se logren las condiciones de unión selectiva por tamaño (véase también anteriormente en la sección de antecedentes). El término "polímero de poli(óxido de alquilenos)", como se usa en la presente memoria, se refiere en particular a un oligómero o polímero de unidades de óxido de alquilenos. Se describe que los polímeros de poli(óxido de alquilenos) se conocen en pesos moleculares bajos y altos. El peso molecular suele ser una multitud del peso molecular de su(s) monómero(s) (por ejemplo, 44 en el caso del óxido de etileno), y puede variar hasta 50000 o incluso 100000. El peso molecular se indica en Da. El polímero de poli(óxido de alquilenos) puede ser lineal o ramificado o puede tener otras geometrías. Se prefiere un polímero de poli(óxido de alquilenos) lineal. El polímero de poli(óxido de alquilenos) puede estar sustituido o no sustituido. Los polímeros de poli(óxido de alquilenos) sustituidos incluyen, por ejemplo, polímeros de alquilpoli(óxido de alquilenos), por ejemplo, alquilpolietilenglicoles, pero también ésteres de poli(óxido de alquilenos), aminas de poli(óxido de alquilenos), compuestos de tiol de poli(óxido de alquilenos) y otros. La unidad de óxido de alquilenos se puede seleccionar del grupo que consiste en óxido de etileno y óxido de propileno. También copolímeros tales como, por ejemplo, óxido de etileno y óxido de propileno están abarcados por el término polímero de poli(óxido de alquilenos). Como se reivindica, el polímero de poli(óxido de alquilenos) es un polietilenglicol. Se prefiere particularmente el polietilenglicol porque también se usa comúnmente en métodos de aislamiento de DNA por tamaño selectivo como también se evidencia por la técnica anterior discutida anteriormente. Preferentemente, el polietilenglicol no está ramificado y puede estar sustituido o no sustituido. Las formas sustituidas conocidas de polietilenglicol incluyen alquilpolietilenglicoles que están, por ejemplo, sustituidos en uno o ambos extremos con un grupo alquilo de C1-C5. Preferiblemente, se utiliza en la presente invención el polietilenglicol no sustituido de fórmula $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$. Todas las descripciones descritas en esta solicitud para el polímero de poli(óxido de alquilenos) en general se aplican específicamente y se refieren particularmente a la realización preferida de polietilenglicol, en particular polietilenglicol no sustituido, incluso si no se indica explícitamente.

El polímero de poli(óxido de alquilenos) puede usarse en varios pesos moleculares. Según una realización, el polímero de poli(óxido de alquilenos), que es un polietilenglicol, tiene un peso molecular que se encuentra en un intervalo seleccionado de 2000 a 40000, 2500 a 30000, 3000 a 25000, 3500 a 20000, 4000 a 16000, 4500 a 12000 y 5000 a 10000. Se prefiere un peso molecular entre 5000 y 10000, más preferido de 6000 a 9000 tal como 8000. Dicho peso molecular es particularmente adecuado para polietilenglicol. También se usó polietilenglicol 8000 en los ejemplos.

Como se demuestra en los ejemplos, el valor de corte está influenciado y puede ajustarse por la concentración del polímero de poli(óxido de alquilenos) que es un polietilenglicol en la mezcla de unión. Por lo tanto, variando la concentración del polímero de poli(óxido de alquilenos) en la mezcla de unión se puede reubicar y así ajustar el valor de corte. El aumento de la concentración del polímero de poli(óxido de alquilenos) en la mezcla de unión reduce el valor de

corte. Tal variación puede, por ejemplo, lograrse preparando diferentes tampones de unión, comprendiendo cada uno de los cuales el polímero de poli(óxido de alquileo) en una concentración diferente o añadiendo un volumen diferente del mismo tampón de unión a la muestra que contiene DNA, como también se demuestra en los ejemplos.

El polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol está presente en la mezcla de unión en una concentración suficiente para precipitar las moléculas de DNA que tienen un tamaño superior al valor de corte que luego se unen a la fase sólida de sílice no modificada. Según una realización, la concentración de polímero de poli(óxido de alquileo) en la mezcla de unión se encuentra en un intervalo seleccionado de 6% a 20%, 7% a 17%, 7,5% a 15% y 8% a 13%. Para asegurar una precipitación y unión eficientes de las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte a la fase sólida, se prefiere que la mezcla de unión comprenda el polímero de poli(óxido de alquileo) en una concentración de al menos 7,5%. Particularmente preferido es un intervalo de 8,5% a 12,5%. Un tampón de unión que se añade a la muestra que contiene DNA para preparar la mezcla de unión en consecuencia comprende el polímero de poli(óxido de alquileo) en una cantidad que logra una concentración correspondiente en la mezcla de unión cuando se pone en contacto el volumen previsto de la muestra que contiene DNA con un apropiado volumen del tampón de unión. Lo mismo se aplica en caso de que se añada el tampón de unión a la muestra restante para establecer, por ejemplo, las condiciones de unión para el valor de corte inferior en la etapa (c).

Según una realización, se aíslan moléculas de DNA diana que tienen un tamaño dentro de un intervalo de tamaño determinado por un valor de corte superior e inferior y, en consecuencia, se realizan al menos dos etapas de aislamiento de DNA selectivo por tamaño como se describe en la presente memoria. Según una realización, el polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol está presente en la primera mezcla de unión en una concentración que se encuentra en el intervalo de 8,5 % a 9,5 % (para el valor de corte superior) y está presente en la segunda mezcla de unión en una concentración de 10% a 12%, preferiblemente de 10,5 a 11,5% (para el valor de corte inferior). Como se demuestra en los ejemplos, esta combinación conduce a resultados favorables. Las condiciones de unión en la primera y segunda mezcla de unión se pueden ajustar añadiendo diferentes volúmenes del mismo tampón de unión.

Según una realización, la concentración de al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol en el tampón de unión que se pone en contacto con la muestra que contiene DNA para establecer las condiciones de unión se selecciona del 7% al 45%, 10 % al 40%, 12,5% al 35%, 15% al 30%, 17,5% al 27,5% y 20% al 25%.

Según una realización, el catión divalente lo proporciona un metal alcalinotérreo, por ejemplo, Mg^{2+} .

El catión divalente se puede seleccionar de Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} . Preferiblemente, el catión divalente es Mg^{2+} . La mezcla de unión y/o el tampón de unión pueden comprender el catión divalente en forma de una sal disuelta. Dicha sal puede ser, por ejemplo, un haluro, sulfato, un fosfato o carbonato y preferiblemente es un haluro. Preferiblemente, la sal disuelta es cloruro de magnesio.

Salas adicionales que se pueden incluir en la mezcla de unión son cloruro de calcio y cloruro de bario.

El efecto beneficioso sobre la recuperación del DNA ya se observa con una baja concentración del catión divalente en la mezcla de unión. Según una realización, el catión divalente está presente en la mezcla de unión, preferiblemente en forma de una sal disuelta, en una concentración seleccionada entre los intervalos de 4 mM a 50 mM, 5 mM a 40 mM, 5,5 mM a 35 mM, 6 mM a 30 mm, 6,5 mM a 25 mM, 7 mM a 20 mM y 7,5 mM a 15 mM. Según una realización, la concentración se puede seleccionar de 5 mM a 20 mM, de 7 mM a 17,5 mM, de 7,5 mM a 15 mM y de 8 mM a 12,5 mM.

La mezcla de unión y/o el tampón de unión comprende al menos una sal de metal alcalino además del catión divalente (que preferiblemente se proporciona como sal disuelta, véase anteriormente). La inclusión de una sal adicional puede promover la unión de las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte a la fase sólida. Esto es particularmente factible si el catión divalente se usa en una concentración más baja. La sal del metal alcalino es preferiblemente un haluro. Se selecciona preferiblemente de cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de litio y cloruro de cesio. Más preferiblemente, la sal es cloruro de sodio. Según una realización, se usa una sal no caotrópica como sal adicional. Según una realización, la mezcla de unión no comprende una sal caotrópica tal como sales de guanidinio, yoduros, tiocianatos, percloratos u otras sales caotrópicas de naturaleza caotrópica igual o más fuerte.

La mezcla de unión puede comprender la sal adicional en una concentración seleccionada entre ≥ 250 mM, ≥ 350 mM, ≥ 500 mM, ≥ 600 mM, ≥ 650 mM, ≥ 700 mM, ≥ 750 mM y ≥ 800 mM. La concentración se puede seleccionar, por ejemplo, de 250 mM a 3 M, 250 mM a 2 M, 350 mM a 1,75 M, 500 mM a 1,5 M, 600 mM a 1,3 M y 650 mM a 1,25 M. El tampón de unión puede comprender la sal en una concentración seleccionada de 0,5 M a 4 M, 0,7 M a 3,5 M, 1 M a 3 M, 1,2 M a 2,75 M y 1,3 M a 2,5 M. La sal es preferiblemente un haluro tal como NaCl o KCl.

Según una realización, la mezcla de unión y/o el tampón de unión comprende el catión divalente en forma de una sal disuelta, preferiblemente $MgCl_2$, y además comprende una sal de metal alcalino, preferiblemente un haluro, más preferiblemente cloruro de sodio. Como se demuestra mediante los ejemplos, esta combinación conduce a resultados particularmente buenos.

Según una realización, después de poner en contacto el tampón de unión con la muestra que contiene DNA, se proporciona un valor de pH en la mezcla de unión resultante que corresponde a o corresponde sustancialmente al

valor de pH del tampón de unión. Así, según una realización, el valor de pH del tampón de unión se mantiene sustancialmente en la mezcla de unión resultante. Esto se consigue, o se apoya, respectivamente, mediante al menos un agente de tamponamiento que está comprendido en el tampón de unión. Preferiblemente, el valor de pH en la mezcla de unión no se desvía en más de $\pm 0,2$ unidades de pH, preferiblemente no más de $\pm 0,15$ unidades de pH, más preferiblemente no más de $\pm 0,1$ unidades de pH, lo más preferiblemente no más de $\pm 0,05$ unidades de pH del valor de pH del tampón de unión.

Las condiciones de unión (y por lo tanto el valor de corte) pueden controlarse, y preferiblemente lo están, mediante el tampón de unión que se añade a la muestra que contiene DNA. Según una realización, las condiciones de unión tales como la concentración del polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol, el catión divalente y el valor del pH de unión se establecen poniendo en contacto la muestra que contiene DNA con el tampón de unión. Preferiblemente, no se realizan más ajustes para establecer las condiciones de unión en la mezcla de unión. Así, preferiblemente, la mezcla de unión se proporciona exclusivamente poniendo en contacto el tampón de unión con la muestra que contiene DNA, pero no se añaden tampones u otros reactivos adicionales para establecer las condiciones de unión para unir las moléculas de DNA diana precipitadas a la fase sólida que tiene una superficie no modificada. Esto evita de manera ventajosa errores de manejo y ajuste. Por ejemplo, 1 volumen de muestra que contiene DNA puede ponerse en contacto con 0,1 a 10 volúmenes de tampón de unión, 0,15 a 5 volúmenes de tampón de unión, preferiblemente 0,15 a 3 volúmenes de tampón de unión, más preferiblemente 0,2 a 2 volúmenes de tampón de unión, lo más preferiblemente 0,2 a 1 volumen de tampón de unión. Poniendo en contacto el tampón de unión con la muestra que contiene DNA se reduce la concentración de los ingredientes contenidos en el tampón de unión en la mezcla de unión resultante debido a un efecto de dilución. Como se demuestra en los ejemplos, al añadir, por ejemplo, diferentes cantidades del tampón de unión a la muestra que contiene DNA, uno puede ajustar de manera flexible y, por lo tanto, reubicar el valor de corte.

Aunque se prefiere para muchas aplicaciones que el pH en la mezcla de unión se establezca poniendo en contacto la muestra que contiene DNA con el tampón de unión, la presente invención también cubre realizaciones en las que el valor de pH en la mezcla de unión se ajusta y, por lo tanto, se modifica después de que la muestra que contenía DNA se pusiera en contacto con el tampón de unión. Así, según una realización, el valor de pH de la mezcla de unión se ajusta al valor de pH de unión que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5. Los valores de pH adecuados se describen anteriormente y se hace referencia a la divulgación respectiva. Por ejemplo, el ajuste se puede hacer de manera manual. El valor de pH de la mezcla de unión puede determinarse y luego ajustarse al valor de pH de unión alcalino deseado mediante la adición de sustancias modificadoras de pH apropiadas tales como ácidos o bases. Dicho procedimiento puede ser ventajoso si la muestra que contiene DNA tiene un valor de pH inusualmente alto o bajo. Sin embargo, preferiblemente, el pH de la mezcla de unión se establece exclusivamente mediante la adición del tampón de unión.

Como se ha descrito anteriormente, la mezcla de unión se prepara preferiblemente poniendo en contacto la muestra que contiene DNA con un tampón de unión. El tampón de unión comprende un agente de tamponamiento. El agente de tamponamiento respalda que el valor de pH de la mezcla de unión se mantenga en el valor de pH de unión alcalino deseado que, como se describe, es importante para garantizar, en combinación con el catión divalente, buenas tasas de recuperación de las moléculas de DNA diana cuando se utiliza una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar. Por lo tanto, es importante que el valor de pH del tampón de unión, que también determina el valor de pH de la mezcla de unión, sea lo suficientemente estable para proporcionar de forma fiable el pH de unión deseado. El agente de tamponamiento se elige de manera que tenga una capacidad de tamponamiento que incluya el valor de pH de unión deseado. Como estimación aproximada, la capacidad de tamponamiento útil de un agente de tamponamiento es a menudo $pK_a \pm 1$. Los agentes de tamponamiento adecuados son bien conocidos en la técnica anterior e incluyen, pero no se limitan a, TRIS, MOPS, BICINE, TRICINE, CHES, CAPSO, TAPS, AMPSO, AMPD y $(NH_4)_2SO_4$. Los agentes de tamponamiento adecuados incluyen, pero no se limitan a, TRIS, MOPS, BICINE, TRICINE, CHES, TAPS, AMPSO, AMPD y $(NH_4)_2SO_4$. También se pueden usar combinaciones de agentes de tamponamiento como se demuestra en los ejemplos. Según una realización, AMPSO y/o una combinación de Tris/ $(NH_4)_2SO_4$ se utiliza como agente de tamponamiento.

Según una realización, el tampón de unión comprende al menos un agente de tamponamiento en una concentración seleccionada de 25 mM a 1 M, 50 mM a 750 mM, 75 mM a 700 mM, 100 mM a 650 mM, 125 mM a 600 mM, 150 mM a 550 mM, 175 mM a 525 mM y 200 mM a 500 mM. Se prefiere usar concentraciones más altas de al menos un agente de tamponamiento en el tampón de unión, preferiblemente al menos 50 mM, al menos 75 mM, al menos 100 mM, al menos 150 mM, al menos 175 mM o al menos 200 mM. Esto garantiza una capacidad de tamponamiento fiable incluso si se procesa una mayor cantidad de muestra que contiene DNA y/o si se realizan dos o más ciclos de selección por tamaño. Esto reduce o evita cambios en el valor de pH de la mezcla de unión que se crea al poner en contacto la muestra con el tampón de unión. En consecuencia, también la mezcla de unión comprende un agente de tamponamiento. La mezcla de unión puede comprender el agente de tamponamiento o una combinación de agentes de tamponamiento en una concentración seleccionada de 25 mM a 600 mM, 50 mM a 500 mM, 60 mM a 450, 70 mM a 400 mM, 80 mM a 350 mM, 90 mM a 300 mM y 100 mM a 275 mM. Si se utiliza más de un agente de tamponamiento, las concentraciones/intervalos indicados se refieren a la concentración total de agentes de tamponamiento. La concentración óptima también puede depender de qué agente de tamponamiento o combinación de agentes de tamponamiento se use y se puede determinar por un experto en la materia siguiendo los principios descritos en la presente memoria.

Según una realización, la etapa (a) comprende: preparar una mezcla de unión que comprende la muestra que contiene

DNA, al menos un polímero de poli(óxido de alquileo), que es polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino y al menos un catión divalente, en donde la mezcla de unión comprende el catión divalente en una concentración de 3 mM a 75 mM, y en donde dicha mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5 poniendo en contacto la muestra que contiene DNA con un tampón de unión que comprende al menos un polímero de poli(alquileo óxido) que es un polietilenglicol, el al menos un catión divalente y al menos un agente de tamponamiento, en donde el tampón de unión tiene un pH que se encuentra en un intervalo de 8,5 a 9,5 y une las moléculas de DNA precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, produciendo así una fase sólida que tiene moléculas de DNA unidas a ella que tienen un tamaño por encima del valor de corte, en donde, en las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA que tienen un tamaño molecular que es menor que el valor de corte predominantemente no se unen a la fase sólida. Como se describió anteriormente, el polímero de poli(óxido de alquileo) es polietilenglicol, más preferiblemente polietilenglicol no sustituido, y el catión divalente es preferiblemente Mg^{2+} . Puede estar comprendido en la mezcla de unión en una concentración que se encuentra en el intervalo de 5 mM a 50 mM, preferiblemente de 7 mM a 25 mM. Además, la mezcla de unión comprende preferiblemente una sal adicional tal como cloruro de sodio o cloruro de potasio, siendo preferido el cloruro de sodio. Los intervalos de concentración adecuados se describieron anteriormente. El valor de pH de la mezcla de unión está en el intervalo de 8,5 a 9,5, los valores de pH particularmente preferidos también se describieron anteriormente.

Según una realización, el tampón de unión que se añade a la muestra que contiene DNA para preparar la mezcla de unión tiene las siguientes características:

- i) comprende Mg^{2+} como catión divalente, preferiblemente en forma de $MgCl_2$;
- ii) comprende polietilenglicol en una concentración seleccionada de 7% a 45%, 10% a 40%, 12,5% a 35%, 15% a 30%, 17,5% a 27,5% y 20% a 25%;
- iii) comprende una sal de metal alcalino, preferiblemente cloruro de sodio, en una concentración que varía en el intervalo de 0,5 M a 2,75 M, preferiblemente de 0,75 M a 2,5 M;
- iv) comprende el al menos un agente de tamponamiento en una concentración que se encuentra en un intervalo de 100 a 550 mM;
- v) tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,6 a 9,2.

La longitud media de las moléculas de DNA que, en las condiciones de unión elegidas, se unen a la fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar se encuentra por encima del valor de corte, mientras que la longitud media de las moléculas de DNA que no se unen a la fase sólida se encuentra por debajo del valor de corte. La expresión que "moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte se unen a la fase sólida" y expresiones similares utilizadas en la presente memoria especifican en particular que las moléculas de DNA que tienen un tamaño en el valor de corte o por encima del valor de corte se unen a la fase sólida. Es decir, si el valor de corte se describe como 100 nt, esto significa que las moléculas de DNA que tienen un tamaño de 100 nt o más se unen a la fase sólida. Por lo tanto, el valor de corte en particular define el tamaño de las moléculas de DNA más pequeñas que sustancialmente no se unen bajo las respectivas condiciones de unión a la fase sólida. Según una realización, el valor de corte se refiere a la longitud del fragmento de DNA más corto que puede visualizarse por electroferograma. Según una realización, el valor de corte corresponde al punto de encuentro de la curva del electroferograma con el eje x. Sin embargo, se señala que, en este punto, respectivamente este valor de corte, normalmente no hay una recuperación cuantitativa del DNA, pero el porcentaje de moléculas de DNA capturadas aumenta con el aumento del tamaño de las moléculas de DNA.

La muestra que contiene DNA comprende moléculas de DNA de diferentes tamaños (longitudes). La muestra que contiene DNA puede comprender DNA monocatenario y/o bicatenario. El método según la presente invención permite la selección por tamaño de DNA monocatenario, así como de DNA bicatenario. Preferiblemente, las moléculas de DNA son moléculas de DNA lineales, bicatenarias. La muestra que contiene DNA puede ser de varios orígenes, incluyendo, pero no limitado a, muestras biológicas y muestras artificiales que se obtuvieron durante el procesamiento del ácido nucleico. Según una realización, la muestra que contiene DNA no es un lisado. Según una realización, la muestra que contiene DNA es una muestra de DNA extraído o DNA extraído que se ha procesado adicionalmente, por ejemplo, por cizallamiento o por medio de una reacción enzimática. Según una realización, la muestra que contiene DNA se obtuvo después de una reacción enzimática. Ejemplos de reacciones enzimáticas que proporcionan muestras que contienen DNA que pueden procesarse utilizando el método de aislamiento de DNA selectivo por tamaño de la invención incluyen, pero no se limitan a, reacciones de amplificación, reacciones de ligasa, en particular reacciones de ligación de adaptadores y polinucleótidos, por ejemplo, poli A, reacciones de relaves. Según una realización, la muestra que contiene DNA comprende DNA fragmentado, tal como, por ejemplo, DNA cortado. Según una realización, la muestra que contiene DNA comprende DNA genómico cortado o cDNA cortado. Según una realización, la muestra que contiene DNA es una solución resultante de un procedimiento de cizallamiento por tamaño. Dicha muestra que contiene DNA comprende fragmentos de DNA de diferentes tamaños. Dicho DNA fragmentado también puede repararse en los extremos para proporcionar fragmentos de DNA que tengan extremos romos. Por lo tanto, según una realización, la muestra que contiene DNA comprende fragmentos de DNA lineales de extremos romos de diferentes tamaños. Según una realización preferida, la muestra que contiene DNA se obtuvo durante la preparación de una

biblioteca de secuenciación, en particular durante la preparación de una biblioteca de secuenciación de nueva generación. Según una realización, la muestra que contiene DNA es una muestra de ligación al adaptador que se obtuvo como resultado de una etapa de ligación al adaptador, por ejemplo, durante la preparación de una biblioteca de secuenciación. Según una realización preferida, la muestra que contiene DNA es una muestra de ligación de adaptadores que comprende (i) moléculas de DNA de doble cadena que están flanqueadas en 5' y/o 3' por adaptadores, (ii) monómeros adaptadores y (iii) productos de ligación adaptador-adaptador tales como, por ejemplo, dímeros adaptadores. Además, la muestra que contiene DNA puede comprender componentes contaminantes adicionales tales como, por ejemplo, mono, oligo y/o polinucleótidos y proteínas tales como enzimas que están, por ejemplo, todavía presentes en la muestra que contiene DNA de las etapas de procesamiento de la biblioteca de secuenciación enzimática anteriores. El método según la presente invención permite, entre otros, purificar selectivamente por tamaño moléculas de DNA de doble cadena que están flanqueadas en 5' y/o 3' por adaptadores, preferiblemente están flanqueadas en su extremo 5' y su extremo 3' por adaptadores, eliminando de ese modo eficientemente los contaminantes respectivos. Según una realización, la muestra que contiene DNA comprende productos de amplificación, por ejemplo, productos de PCR. Así, según una realización, la muestra que contiene DNA es una muestra resultante de un procedimiento de amplificación, en particular resultante de una amplificación por PCR.

Según una realización, la muestra que contiene DNA tiene una o más de las siguientes características:

- i) la muestra que contiene DNA es una muestra de DNA extraído o DNA extraído que se ha procesado posteriormente, por ejemplo, por cizallamiento o por medio de una reacción enzimática;
- ii) la muestra que contiene DNA se obtuvo después de una reacción enzimática, preferiblemente una reacción de amplificación o reacción de ligasa, en particular después de una reacción de ligación del adaptador;
- iii) la muestra que contiene DNA comprende DNA fragmentado, por ejemplo, DNA cortado;
- iv) la muestra que contiene DNA comprende fragmentos de DNA lineales de extremos romos de diferentes tamaños;
- v) la muestra que contiene DNA comprende productos de amplificación, preferiblemente productos de PCR;
- vi) la muestra que contiene DNA es una muestra de ligación del adaptador que se obtuvo como resultado de una etapa de ligación del adaptador; y/o
- vii) la muestra que contiene DNA es una muestra de ligación del adaptador que comprende (i) moléculas de DNA de doble cadena que están flanqueadas en 5' y/o 3' por adaptadores, (ii) monómeros adaptadores y (iii) productos de ligación adaptador-adaptador tales como, por ejemplo, dímeros adaptadores.

Las condiciones de unión y, en particular, la concentración del polímero de poli(óxido de alqueno) que es un polietilenglicol en la mezcla de unión se eligen de modo que se obtenga un valor de corte deseado que permita, por ejemplo, eliminar pequeñas moléculas de DNA no deseadas, tal como, por ejemplo, adaptadores, productos de ligación adaptador-adaptador y cebadores. En el método según la invención, las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte se unen eficazmente a la fase sólida y, por lo tanto, pueden recuperarse o eliminarse durante la selección por tamaño. El valor de corte preciso a elegir depende, por ejemplo, en el uso previsto de las moléculas de DNA diana y también el tamaño de, por ejemplo, pequeñas moléculas de DNA contaminantes que se supone que no deben unirse y, por lo tanto, se recuperan durante la selección por tamaño. La eliminación de pequeñas moléculas de DNA que se logra con la presente invención no necesariamente tiene que ser completa. Para varias aplicaciones, es suficiente que las moléculas de DNA pequeñas no deseadas se agoten hasta el punto de que no perturben ni obstaculicen significativamente la reacción posterior prevista. Sin embargo, como se describe, a menudo no es necesario eliminar el 100% del DNA más pequeño. Como se describe, el método también se puede realizar para aislar selectivamente por tamaño dichos fragmentos de DNA que tienen una longitud dentro de un determinado intervalo de tamaño que está determinado por un valor de corte superior e inferior realizando al menos dos etapas de unión selectiva por tamaño.

Los tamaños, respectivamente los valores de corte indicados en la presente memoria con referencia a los nucleótidos "nt", se refieren a la longitud de la cadena de las moléculas de DNA y, por lo tanto, se utilizan para describir la longitud de, respectivamente describir el valor de corte para moléculas de DNA monocatenari, así como moléculas de DNA de doble cadena. En las moléculas de DNA de doble cadena, dichos nucleótidos están emparejados. Por lo tanto, si el DNA es una molécula de doble cadena, lo que se prefiere, las indicaciones anteriores con respecto al tamaño o longitud en "nt" se refiere a "bp". Así, si una molécula de DNA de doble cadena tiene una longitud de cadena, respectivamente un tamaño de 100 nt, dicha molécula de DNA de doble cadena tiene un tamaño de 100 bp. Lo mismo se aplica a la definición del valor de corte para moléculas de DNA de doble cadena.

Un valor de corte (inferior) que se encuentra en el intervalo de 125 nt a 200 nt, preferiblemente de 135 nt a 200 nt, tal como, por ejemplo, 150nt a 190nt es, por ejemplo, particularmente adecuado para la selección por tamaño durante la preparación de una biblioteca de secuenciación. En la presente memoria, una etapa de aislamiento de DNA selectivo por tamaño se realiza en particular para separar moléculas de DNA ligadas al adaptador de monómeros adaptadores no ligados y productos de ligación adaptador-adaptador, tales como dímeros adaptadores. El tamaño de los adaptadores que se usan comúnmente para preparar bibliotecas de secuenciación para la secuenciación de nueva generación a

menudo se encuentra en el intervalo de 25 nt a 75 nt, en particular de 30 nt a 60 nt. Para eliminar los monómeros adaptadores no ligados y los productos de ligación adaptador-adaptador (tal como, en particular, los dímeros adaptadores), el valor de corte es según una realización elegido de tal manera que se encuentra por encima del tamaño de los monómeros adaptadores y por encima del tamaño de los productos de ligación adaptador-adaptador esperados.

Preferiblemente, el valor de corte es al menos 10 nt, preferiblemente al menos 15 nt, al menos 20 nt, al menos 25 nt o al menos 30 nt más grande que el tamaño esperado de los productos de ligación adaptador-adaptador para garantizar una eliminación eficiente del (los) monómero(s) adaptador(es) y el(los) producto(s) de ligación adaptador-adaptador. Según una realización, dicho valor de corte en el intervalo de 125 nt y los subintervalos preferidos descritos anteriormente representan el valor de corte inferior en un método en el que se aíslan las moléculas de DNA diana que tienen un tamaño dentro de un determinado intervalo de tamaño definido por un valor de corte superior e inferior. Según esta realización, el valor de corte superior puede estar en un intervalo de 250 nt a 1000 nt, 275 nt a 750 nt y 300 nt a 500 nt. De manera ventajosa, el valor de corte superior e inferior se puede ajustar fácilmente añadiendo cantidades apropiadas del tampón de unión para establecer condiciones de unión selectivas por tamaño en la mezcla de unión.

En las etapas de unión (etapa (a) y etapa(s) de unión adicional opcional), las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte deseado se unen a la fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, que preferiblemente proporciona una superficie sílicea para la unión al DNA. Según una realización, al menos el 75 %, al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 95 % o más preferiblemente al menos el 97 % de las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte se unen en la etapa (a) (y la etapa (c) si se realiza). Según una realización, no más del 25 %, no más del 20 %, no más del 15 %, no más del 10 %, no más del 7 % o no más del 5 % de las moléculas de DNA que tienen un tamaño por debajo del valor de corte se unen a la fase sólida en la etapa (a) (y otras etapas de unión si se realizan).

La fase sólida comprende una superficie que contiene silicio sin modificar a la que se unen las moléculas de DNA diana precipitadas que tienen un tamaño por encima del valor de corte en las condiciones de unión elegidas. La unión se logra en particular por adsorción. Preferiblemente, la fase sólida proporciona una superficie sílicea tal como una superficie de sílice. El término "superficie de sílice", tal como se usa en la presente memoria, incluye superficies que comprenden o consisten en dióxido de silicio y/u otros óxidos de silicio, tierra de diatomeas, vidrio, gel de sílice, zeolita, bentonita, alquilsílice, silicato de aluminio y borosilicato. La fase sólida tiene una superficie que contiene silicio sin modificar. Por lo tanto, la superficie no se modifica con ligandos de unión a ácidos nucleicos u otros grupos de unión a ácidos nucleicos. Por ejemplo, la fase sólida no lleva ligandos en su superficie de unión que comprendan grupos de intercambio iónico, en particular, la superficie de la fase sólida no se modifica con ligandos funcionales. En particular, no se modifica con ligandos que comprenden grupos de intercambio aniónico o catiónico tal como, por ejemplo, grupos amina o grupos carboxilo como es común en los métodos de la técnica anterior para asegurar un buen rendimiento. Según una realización, la superficie de sílice no comprende ningún grupo funcional además de sus grupos silanol u otras formas oxidadas de silicio, como óxidos. Ejemplos de fases sólidas que se pueden usar junto con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fases sólidas que comprenden una superficie de sílice no modificada, incluyendo, pero no limitado a, partículas de sílice, fibras de sílice, materiales de vidrio tales como, por ejemplo, polvo de vidrio, fibras de vidrio, partículas de vidrio o vidrio de poro controlado, dióxido de silicio, vidrio o sílice en forma de partículas tal como polvo, perlas o frits. El término fase sólida no pretende implicar ninguna limitación con respecto a su forma o diseño. Por lo tanto, el término fase sólida abarca materiales apropiados que tienen una superficie que contiene silicio sin modificar, en particular una superficie de sílice sin modificar que es porosa o no porosa; permeable o impermeable. Las fases sólidas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, membranas, filtros, láminas, partículas, partículas magnéticas, perlas, geles, polvos, fibras y similares. Particularmente preferido es el uso de sílice tal como gel de sílice y materiales de ácido polisilícico, borosilicatos, silicatos y vidrios inorgánicos como fase sólida. La fase sólida que comprende una superficie de sílice sin modificar puede, por ejemplo, tener la forma de un filtro, fibras, membrana o partículas. Según la presente invención, se prefiere el uso de una fase sólida basada en una columna o el uso de partículas, en particular partículas magnéticas.

Según una realización, se utilizan partículas de sílice que tienen una superficie de sílice no modificada que pueden tener forma de perlas. Preferiblemente, dichas partículas tienen un tamaño de aproximadamente 0,02 a 30 μm , 0,1 a 15 μm , 0,2 a 12,5 μm , 0,5 a 10 μm y 0,75 a 7 μm . Para facilitar el procesamiento del ácido nucleico que se une a la fase sólida, se utilizan preferiblemente partículas de sílice magnéticas. Las partículas magnéticas responden a un campo magnético. Las partículas de sílice magnéticas pueden, por ejemplo, ser ferrimagnéticas, ferromagnéticas, paramagnéticas o superparamagnéticas. Las partículas de sílice magnéticas adecuadas se describen, por ejemplo, en los documentos de Patente WO 01/71732, WO 2004/003231 y WO 2003/004150. También se conocen otras partículas de sílice magnéticas de la técnica anterior y se describen, por ejemplo, en los documentos de Patente WO 98/31840, WO 98/31461, EP 1 260 595, WO 96/41811 y EP 0 343 934 y también incluyen, por ejemplo, partículas de vidrio de sílice magnéticas. El uso de partículas magnéticas tiene ventajas, porque las partículas magnéticas, que incluyen el DNA unido, pueden procesarse fácilmente con la ayuda de un campo magnético, por ejemplo, mediante el uso de un imán permanente. Esta realización es, por ejemplo, compatible con sistemas robóticos establecidos capaces de procesar partículas magnéticas. En la presente memoria, existen diferentes sistemas robóticos en la técnica anterior que se pueden usar junto con la presente invención para procesar las partículas de sílice magnéticas a las que se unieron las moléculas de DNA diana. Según una realización, las partículas magnéticas se recogen en el fondo o en el lateral de un recipiente de reacción y la muestra líquida restante se retira del recipiente de reacción, dejando atrás las partículas magnéticas recogidas a las que se unen las moléculas de DNA. La eliminación de la muestra restante puede ocurrir por decantación o aspiración. Dichos sistemas

son bien conocidos en la técnica anterior y, por lo tanto, no necesitan una descripción detallada en la presente memoria. En un sistema alternativo que es conocido para el procesamiento de partículas magnéticas, el imán, que normalmente está cubierto por una cubierta o envoltura, se sumerge en el recipiente de reacción para recoger las partículas magnéticas. Como los sistemas respectivos son bien conocidos en la técnica anterior y también están disponibles comercialmente (por ejemplo, QIASYMPHONY®; QIAGEN), no necesitan cualquier descripción detallada en la presente memoria. En otro sistema alternativo que se conoce para el procesamiento de partículas magnéticas, la muestra que comprende las partículas de sílice magnéticas se puede aspirar en una punta de pipeta y las partículas magnéticas se pueden recoger en la punta de pipeta aplicando un imán, por ejemplo, al lado de la punta de la pipeta. La muestra restante se puede liberar de la punta de la pipeta mientras que las partículas de sílice magnéticas recolectadas que transportan las moléculas de DNA diana unidas permanecen debido al imán en la punta de la pipeta. Las partículas magnéticas recolectadas después pueden procesarse más. Dichos sistemas también son bien conocidos en la técnica anterior y también están disponibles comercialmente (por ejemplo, BioRobot EZ1, QIAGEN) y, por lo tanto, no necesitan cualquier descripción detallada en la presente memoria.

Según una realización, la fase sólida está comprendida en una columna. El término "columna", como se usa en la presente memoria, describe en particular un recipiente que tiene al menos dos aberturas. De este modo, una solución y/o muestra puede pasar a través de dicha columna. El término "columna" en particular no implica ninguna restricción con respecto a la forma del contenedor que puede ser, por ejemplo, redondo o angular y preferiblemente es cilíndrico. Sin embargo, también se pueden usar otras formas, en particular cuando se usan varias columnas. La columna comprende la fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar que se usa para la unión al DNA. Dicha fase sólida comprendida en la columna debe permitir el paso de una solución, respectivamente la mezcla de unión cuando se aplica a la columna. Esto significa que, si por ejemplo se aplica una fuerza centrífuga a la columna, se permite que una solución y/o la mezcla de unión pasen a través de la columna en la dirección de la fuerza centrífuga. Como se discutió anteriormente, cuando se usa un procedimiento de aislamiento de DNA basado en una columna respectiva, la mezcla de unión generalmente se pasa a través de la columna, por ejemplo, asistido por centrifugación o vacío, y las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte se unen a la fase sólida comprendida durante dicho paso. La columna se puede utilizar en un solo formato o en un formato múltiple. Dichas multicolumnas que tienen un formato similar a las placas de múltiples pocillos y que comprenden una fase sólida tal como una membrana de sílice o fibras de vidrio, son bien conocidas en la técnica anterior y también están disponibles comercialmente. Preferiblemente, la columna es una columna giratoria. Preferiblemente, se utilizan como fase sólida una membrana de unión a DNA o fibras de unión a DNA que proporcionan una superficie que contiene silicio. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, membranas de sílice, membranas de fibra de vidrio o filtros que proporcionan una superficie que contiene silicio para la unión al DNA. Preferiblemente, la membrana es porosa. Para un procedimiento basado en columna, se prefiere usar una membrana o fibras como fase sólida que comprenden o consisten en sílice en la columna. Como se muestra en los ejemplos, los materiales de las columnas respectivas también son adecuados para ajustar con precisión el valor de corte dentro de un intervalo estrecho. Los materiales a base de sílice adecuados y preferidos que proporcionan una superficie de sílice adecuada para la unión al DNA también se describieron anteriormente. Otra fase sólida común comprendida en una columna es un relleno de partículas de sílice o una capa de un material de sílice (por ejemplo, un gel de sílice). Por ejemplo, las partículas de sílice se pueden disponer como una capa sobre un filtro o membrana inerte, formando así una fase sólida de DNA. Para aliviar el paso de la mezcla de unión a través de la fase sólida comprendida en la columna, se pueden utilizar medios adecuados, tales como por ejemplo centrifugación o el uso de un aparato generador de diferencia de presión que, por ejemplo, presiona la muestra a través de la columna, respectivamente la fase sólida o la succiona a través de la fase sólida aplicando un vacío. Los medios respectivos son bien conocidos en la técnica anterior y, por lo tanto, no necesitan una descripción adicional en la presente memoria.

El contacto de la muestra que contiene DNA con el tampón de unión para proporcionar la mezcla de unión y la unión de las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un valor de corte a la fase sólida se puede realizar de forma simultánea o secuencial. Según una realización, la muestra que contiene DNA se pone en contacto con el tampón de unión y la mezcla de unión resultante se pone luego en contacto con la fase sólida. Esta realización es, por ejemplo, factible si se utiliza un protocolo de aislamiento basado en columnas. También se puede usar un enfoque similar cuando se usa una fase sólida en partículas tal como, por ejemplo, partículas magnéticas de sílice. Cuando se utiliza una fase sólida en partículas, la fase sólida, el tampón de unión y la muestra que contiene DNA se pueden añadir en cualquier orden. Por ejemplo, está dentro del alcance de la presente invención proporcionar primero la fase sólida y el tampón de unión y después añadir la muestra o proporcionar primero la muestra, la fase sólida y después añadir el tampón de unión. Preferiblemente, el tampón de unión se mezcla con la muestra para proporcionar la mezcla de unión.

Al final de la etapa (a), las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte se unen a la fase sólida que tiene una superficie de sílice sin modificar.

En la etapa (b), las moléculas de DNA que están unidas a la fase sólida se separan de la muestra restante. De este modo, las moléculas de DNA más grandes unidas que tienen un tamaño por encima del valor de corte se separan de las moléculas de DNA no unidas presentes en la muestra. Los métodos de separación adecuados son bien conocidos en la técnica anterior y la técnica de separación apropiada también depende de la fase sólida utilizada. Por ejemplo, cuando se utiliza un enfoque basado en columnas, la separación generalmente se logra cuando la mezcla de unión pasa a través de la columna. Las moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte se unen a la fase sólida contenida en la columna, mientras que la muestra restante pasa a través de la columna y, por lo tanto, se

separa de las moléculas de DNA unidas. Como se describió anteriormente, este proceso puede ser asistido, por ejemplo, por centrifugación o aplicando vacío. Cuando se utiliza una fase sólida en partículas tal como, por ejemplo, partículas de sílice, las partículas pueden recogerse mediante sedimentación, que puede ser asistida por centrifugación o separación magnética si se utilizan partículas magnéticas y el sobrenadante se separa (por ejemplo, se decanta o aspira o las partículas se extraen del líquido). Las realizaciones adecuadas se describieron anteriormente junto con los diferentes formatos de la fase sólida y su procesamiento y también son bien conocidas por los expertos.

Las moléculas de DNA separadas se pueden descartar en caso de que el DNA unido no sea de interés y simplemente se eliminan o se pueden procesar más en caso de que represente el DNA diana. Los diversos usos y opciones ya se describieron anteriormente y también se describen con más detalle a continuación.

El DNA unido se puede lavar opcionalmente. En la presente memoria, se pueden realizar una o más etapas de lavado. Aunque esta etapa es opcional, se realiza preferiblemente para eliminar de manera eficiente los componentes e impurezas no unidos, tales como, por ejemplo, nucleótidos y enzimas de reacciones anteriores en caso de que el DNA unido represente el DNA diana. Esto es particularmente adecuado si la muestra que contiene DNA se obtuvo durante la preparación de una biblioteca de secuenciación. Además, las etapas de lavado también son adecuadas para eliminar las trazas del polímero de poli(óxido de alquileño), el catión divalente y, opcionalmente, las sales si se usan durante la unión. Así, según una realización, se realizan una o más etapas de lavado para purificar más las moléculas de DNA unidas. Para este propósito, se pueden usar soluciones de lavado comunes adecuadas. Una solución de lavado adecuada elimina las impurezas, pero no el DNA diana que está unido a la fase sólida. Según una realización, la solución utilizada para el lavado comprende al menos un alcohol. Como alcohol, para el lavado se pueden usar alcoholes ramificados o no ramificados de cadena corta con preferiblemente de uno a 5 átomos de carbono, respectivamente se pueden usar en la solución de lavado. También pueden usarse mezclas de alcoholes. Los alcoholes adecuados incluyen, pero no se limitan a, metanol, etanol, propanol, isopropanol y butanol. Preferiblemente, se usan isopropanol y/o etanol en la solución de lavado. Una solución de lavado adicional adecuada que se puede usar como alternativa o además de las soluciones de lavado descritas anteriormente comprende un alcohol y un agente de tamponamiento. Los alcoholes y agentes de tamponamiento adecuados, tales como tampones biológicos, se describieron anteriormente. Preferiblemente, se usa isopropanol o etanol, más preferiblemente etanol para esta segunda etapa de lavado. Preferiblemente, el etanol se usa en una concentración de al menos 60 % (v/v), al menos 70 % (v/v), preferiblemente al menos 80 % (v/v). El agente de tamponamiento puede ser preferiblemente Tris, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 7 a 8. Una solución de lavado adicional adecuada que se puede usar alternativamente u opcionalmente también además de las soluciones de lavado descritas anteriormente comprende un alcohol, pero no una sal. Esto permite quitar las sales. Preferiblemente, se usa isopropanol o etanol, más preferiblemente etanol para el lavado. Preferiblemente, el alcohol está comprendido en una concentración de al menos 50 % v/v, al menos 60 % v/v, preferiblemente al menos 70 % v/v. Preferiblemente, la concentración se encuentra en un intervalo del 50 % v/v al 100 % v/v, más preferiblemente del 70 % v/v al 100 % v/v.

El alcohol residual que pueda estar presente después de la etapa de lavado en caso de que se haya utilizado una solución de lavado que contenga alcohol puede eliminarse, por ejemplo, mediante secado al aire (por ejemplo, adecuado cuando se trabaja con una fase sólida en partículas) o mediante una etapa de centrifugación adicional si se utiliza una fase sólida basada en columna. Los métodos y procedimientos respectivos son bien conocidos en la técnica anterior y, por lo tanto, no necesitan una descripción adicional en la presente memoria.

Además, se realizan una o más etapas de elución para eluir el DNA diana seleccionado por tamaño. Sin embargo, las moléculas de DNA unidas también pueden procesarse mientras están unidas a la fase sólida, dependiendo de la aplicación posterior prevista, respectivamente, el uso previsto del DNA seleccionado por tamaño. Por ejemplo, una fase sólida en partículas tal como partículas magnéticas puede someterse directamente a una reacción de amplificación sin una elución por separado previa del DNA unido.

Sin embargo, se prefiere eluir el DNA. En la presente memoria, básicamente se puede usar cualquier solución de elución que efectúe la desorción del DNA unido de la fase sólida. Las soluciones de elución clásicas que se sabe que eluyen eficazmente el DNA de una superficie de sílice incluyen, pero no se limitan a, agua (por ejemplo, agua desionizada), tampones de elución tal como el tampón TE y soluciones bajas en sal que tienen un contenido de sal de 150 mM o menos, preferiblemente 100 mM o menos, más preferiblemente 75 mM o menos, 50 mM o menos, 25 mM o menos, 20 mM o menos, 15 mM o menos, 10 mM o menos o están libres de sal. La solución de elución puede, por ejemplo, comprender un agente de tamponamiento, en particular puede comprender un tampón biológico tal como Tris, MOPS, HEPES, MES, BIS-TRIS, propano y otros. El agente de tamponamiento puede estar presente en una concentración de 150 mM o menos, preferiblemente 100 mM o menos, más preferiblemente 75 mM o menos, 50 mM o menos, 25 mM o menos, 20 mM o menos, 15 mM o menos o 10 mM o menos. Según una realización, el tampón de elución tiene un valor de pH que se selecciona de pH 6,5 a pH 10, pH 7 a pH 9,5, pH 7,5 a 9,0, pH 7,75 a pH 8,75 y pH 8 a pH 8,6. La elución se puede ayudar calentando y/o agitando lo que es, por ejemplo, particularmente factible si se usa una fase sólida en partículas. Si se usa una fase sólida basada en columna, el tampón de elución generalmente se aplica a la columna y se fuerza a través de la fase sólida que se puede ayudar nuevamente, por ejemplo, por centrifugación o aplicando presión o vacío.

Preferiblemente, se usa una solución de elución que no interfiere con la aplicación posterior prevista. Así, según una realización, el tampón de elución no comprende un agente complejante tal como EDTA. El EDTA, en particular en

concentraciones más altas, puede inhibir las reacciones posteriores.

Además, también está dentro del alcance de la presente invención repetir la etapa de elución para garantizar que el DNA unido se libere eficazmente de la fase sólida.

El método para aislar DNA por tamaño según la presente invención es preciso y reproducible con respecto al tamaño de las moléculas de DNA aisladas y conduce, debido al valor de pH alcalino utilizado y al catión divalente en la mezcla de unión, a altas tasas de recuperación de DNA, incluso aunque se use una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar. Por lo tanto, en contraste con los métodos de la técnica anterior, no se requieren costosas fases sólidas modificadas en la superficie. El método según la presente invención es adecuado para procedimientos por lotes. Esto por ejemplo distingue los métodos de la presente invención de los métodos cromatográficos de la técnica anterior que se usaban para la separación por tamaños de ácidos nucleicos, por ejemplo, utilizando composiciones de intercambio aniónico titulables. Los métodos de la presente invención en particular no necesitan aparatos altamente específicos y costosos, no necesitan la generación y uso de gradientes de tampón de unión y/o elución y la recolección y selección de multitud de fracciones de elución. Por lo tanto, según una realización, no se utilizan gradientes de pH en el método según la presente invención. El método es ventajosamente adecuado para la automatización. En la presente memoria, es favorable usar partículas magnéticas para proporcionar la fase sólida.

Las realizaciones y aplicaciones preferidas no limitantes del método según la presente invención se describirán adicionalmente a continuación. Como se describió anteriormente, el método de aislamiento de DNA selectivo por tamaño según la presente invención es particularmente adecuado para enriquecer moléculas de DNA que tienen un tamaño deseado por encima de determinado valor de corte y/o que tienen un tamaño que se encuentra dentro de un cierto intervalo de tamaño (determinado por un valor de corte superior e inferior) de una población mixta de moléculas de DNA que tienen diferentes longitudes. El método es particularmente adecuado para eliminar moléculas de DNA no diana que tienen un tamaño por debajo de un determinado valor de corte uniéndose y, por lo tanto, aislando moléculas de DNA diana que tienen un tamaño mínimo deseado por encima del valor de corte de la muestra que contiene DNA. Además, es posible la eliminación de moléculas no diana por encima de un valor de corte determinado, mejorando así, por ejemplo, la heterogeneidad de una biblioteca de DNA y la eliminación de artefactos no deseados, tales como las repeticiones de PCR.

Según una realización, el método se realiza de la siguiente manera:

- (a) preparar una mezcla de unión que comprende la muestra que contiene DNA, un polietilenglicol en una concentración que se encuentra en el intervalo de 7,5% a 15%, preferiblemente de 8% a 13%, al menos una sal de metal alcalino y $MgCl_2$ en una concentración que se encuentra en el intervalo de 7 mM a 40 mM, preferiblemente de 8 mM a 30 mM, más preferiblemente de 8 mM a 20 mM, en donde dicha mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,25 y une moléculas de DNA precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene unidas a la misma moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte, en donde, en las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte predominantemente no se unen a la fase sólida;
- (b) separar las moléculas de DNA unidas de la muestra restante;
 - opcionalmente lavar las moléculas de DNA unidas; y
 - opcionalmente eluir las moléculas de DNA unidas de la fase sólida.

Según una realización preferida, el método se usa para aislar moléculas de DNA diana que tienen un tamaño dentro de un determinado intervalo de tamaño que está determinado por un valor de corte superior y un valor de corte inferior de una muestra que contiene DNA, en el que dicho método comprende

- (a) preparar una primera mezcla de unión que comprende la muestra que contiene DNA, al menos un polímero de poli(óxido de alquileno) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino y al menos un catión divalente, en donde la primera mezcla de unión comprende el catión divalente en una concentración de 3 mM a 75 mM, y en el que dicha primera mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5 y une moléculas de DNA precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene moléculas de DNA unidas a ella que tienen un tamaño por encima del valor de corte superior, en donde, en las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA diana que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte superior predominantemente no se unen a la fase sólida;
- (b) separar las moléculas de DNA unidas de la muestra restante que comprende las moléculas de DNA diana;
- (c) preparar una segunda mezcla de unión que comprende la muestra restante, en donde dicha segunda mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5 y en donde la concentración del polímero de poli(óxido de alquileno) que es un polietilenglicol en la segunda mezcla de unión aumenta en comparación con la primera mezcla de unión y une las moléculas de DNA diana precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene moléculas de DNA

diana unidas a la misma que tienen un tamaño por encima del valor de corte inferior, en donde en las condiciones de unión usadas, las moléculas de DNA que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte inferior predominantemente no se unen a la fase sólida;

(d) separar las moléculas de DNA diana unidas de la muestra restante;

- 5 - opcionalmente, lavar las moléculas de DNA diana unidas; y
- opcionalmente, eluir las moléculas de DNA diana unidas de la fase sólida.

10 Esto permite de manera ventajosa aislar las moléculas de DNA diana dentro de un intervalo de tamaño definido. Las concentraciones adecuadas para el polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol para la primera y la segunda etapa de unión se describieron anteriormente. Como se describe en la presente memoria, se prefiere ajustar las condiciones de unión en la primera y segunda mezcla de unión usando un tampón de unión como se describe anteriormente. Según una realización, se usa el mismo tampón de unión para preparar la primera y la segunda mezcla de unión. La concentración del polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol en la mezcla de unión puede, por ejemplo, variarse y ajustarse añadiendo diferentes volúmenes del tampón de unión.

Según una realización, el método se realiza de la siguiente manera:

15 (a) preparar una primera mezcla de unión que comprende la muestra que contiene DNA, polietilenglicol en una concentración que se encuentra en el intervalo de 8,5% a 9,5%, al menos una sal de metal alcalino y $MgCl_2$ en una concentración que se encuentra en el intervalo de 7 mM a 40 mM, preferiblemente de 8 mM a 30 mM, más preferiblemente de 8 mM a 20 mM, en donde dicha mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,25 y une las moléculas de DNA precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene unidas a ella moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte superior, en el que, en las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA diana que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte superior predominantemente no se unen a la fase sólida;

(b) separar las moléculas de DNA unidas de la muestra restante que comprende las moléculas de DNA diana;

25 (c) preparar una segunda mezcla de unión que comprende la muestra restante, en donde dicha segunda mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,25 y en donde la concentración de polietilenglicol en la segunda mezcla de unión aumenta en comparación con la primera mezcla de unión y se encuentra en un intervalo del 10% al 12% y que une las moléculas de DNA diana precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene moléculas de DNA diana unidas a la misma, en donde, en las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte inferior predominantemente no se unen a la fase sólida;

(d) separar las moléculas de DNA diana unidas de la muestra restante;

- opcionalmente, lavar las moléculas de DNA diana unidas; y
- opcionalmente, eluir las moléculas de DNA diana unidas de la fase sólida.

35 Como se describió anteriormente, el método según la presente invención es particularmente adecuado para la selección por tamaño en el contexto de la secuenciación de nueva generación. La preparación de una biblioteca de secuenciación adecuada para la secuenciación de nueva generación suele ser un proceso de varias etapas en el que en diferentes etapas de dicho proceso se puede realizar una selección por tamaño de las moléculas de DNA proporcionadas. En qué etapa de dicho proceso se realiza una selección por tamaño también depende del método de preparación de la biblioteca utilizado. Las realizaciones adecuadas se describirán a continuación. El método de selección de tamaño según la presente invención es particularmente adecuado para su uso en el contexto de la preparación de una biblioteca de secuenciación, ya que permite la separación de fragmentos de DNA con solo pequeñas diferencias de tamaño, por ejemplo, como se describe en la presente memoria, la eliminación de dímeros adaptadores no deseados (aproximadamente 120 bp) de los fragmentos de DNA deseados (150 bp y mayores) en protocolos de construcción de bibliotecas para aplicaciones de secuenciación de nueva generación.

40 Se puede preparar una biblioteca de secuenciación que sea adecuada para la secuenciación masiva en paralelo y, en consecuencia, es adecuada para la secuenciación de nueva generación usando métodos conocidos en la técnica anterior. La preparación de una biblioteca de secuenciación respectiva a menudo implica la generación de una pluralidad de fragmentos de DNA lineales de doble cadena a partir de una muestra que contiene ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA, como el DNA genómico o el cDNA, se puede fragmentar, por ejemplo, mediante cizallamiento, tal como sonificación, hidro-cizallamiento, ultrasonido, nebulización o fragmentación enzimática, para proporcionar fragmentos de DNA que sean adecuados para la secuenciación posterior. La longitud de los fragmentos se puede elegir en función de la capacidad de secuenciación de la plataforma de secuenciación de nueva generación que se utilice posteriormente para la secuenciación. Normalmente, los fragmentos obtenidos tienen una longitud de 1500 bp o menos, 1000 bp o menos, 750 bp o menos, 600 bp o menos y preferiblemente 500 bp o menos, ya que esto

corresponde a la capacidad de secuenciación de la mayoría de las plataformas de secuenciación de nueva generación actuales. Preferiblemente, los fragmentos obtenidos tienen una longitud que se encuentra predominantemente en un intervalo de 50 bp a 1000 bp, más preferiblemente de 75 bp a 900 bp, de 100 bp a 850 bp, de 110 bp a 800 bp, de 115 bp a 750 bp, de 120 bp a 700 bp, de 125 bp a 650 bp, de 130 bp a 600 bp, de 135 bp a 550 bp, 140 bp a 500 bp y 145 bp a 450 bp. Los tamaños de los fragmentos respectivos son particularmente adecuados para el DNA genómico, teniendo en cuenta también que el tamaño de un exón es de aproximadamente 150 bp a 200 bp de longitud y los respectivos fragmentos cortos se pueden secuenciar de manera eficiente utilizando plataformas comunes de secuenciación de nueva generación. Sin embargo, también pueden ser útiles fragmentos más largos, por ejemplo, si se utilizan métodos de secuenciación de nueva generación que permiten lecturas de secuencias más largas.

Según una realización, el DNA fragmentado se repara después de la fragmentación y se pule el extremo utilizando métodos conocidos en la técnica anterior, proporcionando así fragmentos de DNA que tienen extremos romos. En dichos métodos que son bien conocidos en la técnica anterior, los salientes resultantes del proceso de fragmentación se convierten en extremos romos. Como los métodos respectivos son bien conocidos en la técnica anterior, no necesitan ninguna descripción detallada en la presente memoria.

Según una realización, el método de aislamiento de DNA selectivo por tamaño según la invención se realiza después de obtener los fragmentos de DNA, preferiblemente después de que el DNA fragmentado se puliera para proporcionar fragmentos de DNA que tienen extremos romos. Un aislamiento de DNA selectivo por tamaño en esta etapa permite, por ejemplo, eliminar fragmentos de DNA muy cortos que no tienen la longitud adecuada para su posterior secuenciación. Como se describió anteriormente, el valor de corte para la unión del DNA se puede ajustar mediante la elección adecuada de la concentración del polímero de poli(óxido de alqueno) en la mezcla de unión. El presente método permite aislar fragmentos de DNA que sustancialmente tienen un tamaño dentro de un intervalo de tamaño definido.

Según una realización, después de la reparación de los extremos y, opcionalmente, la selección por tamaño, se añade un saliente a los extremos 3' de los fragmentos de extremos romos. Preferiblemente, se añade un único saliente de nucleótido. Por ejemplo, se puede añadir un solo nucleótido "A" usando métodos bien conocidos en la técnica anterior. Esto también se conoce como "relave A". Un saliente de nucleótido respectivo evita que los fragmentos se unan entre sí durante la posterior reacción de ligación del adaptador. Por ejemplo, se puede proporcionar una "T" única correspondiente u otro saliente complementario en el extremo 3' de los adaptadores para proporcionar un saliente complementario para la unión de los adaptadores al fragmento de DNA. Esto asegura una baja tasa de formación de quimeras (plantillas concatenadas). Sin embargo, también se conocen otras estrategias en la técnica anterior para garantizar la ligación adecuada de los adaptadores de secuenciación. Por ejemplo, también se pueden unir adaptadores de extremos romos.

Según una realización preferida, los adaptadores se unen a los extremos 5' y/o 3' de los fragmentos de DNA obtenidos, preferiblemente en ambos extremos de los fragmentos de DNA. El diseño específico de los adaptadores depende de la plataforma de secuenciación de nueva generación que se vaya a usar y, para los fines de la presente invención, se puede usar básicamente cualquier adaptador utilizado para preparar bibliotecas de secuenciación para la secuenciación de nueva generación. Las secuencias adaptadoras proporcionan una composición de secuencia conocida que permiten, por ejemplo, la posterior amplificación de la biblioteca y/o hibridación del cebador de secuenciación. Como adaptadores, pueden usarse ácidos nucleicos de doble cadena o parcialmente de doble cadena de secuencia conocida. Los adaptadores pueden tener extremos romos, extremos cohesivos con salientes de 3' o 5', se pueden proporcionar adaptadores en forma de Y o adaptadores en forma de bucle - vástago. Los adaptadores en forma de Y se describen, por ejemplo, en el documento de Patente US7,741,463 y los adaptadores en forma de bucle -e vástago se describen, por ejemplo, en el documento de Patente US2009/0298075, incorporado en la presente memoria por referencia con respecto al diseño específico de los adaptadores. Preferiblemente, los adaptadores tienen una longitud de al menos 7, preferiblemente al menos 10, preferiblemente al menos 15 bases. La longitud del adaptador se encuentra preferiblemente en un intervalo de 10 a 100 bases, preferiblemente de 15 a 75 bases, más preferiblemente de 20 a 60 bases. Se pueden usar adaptadores iguales o diferentes para los extremos 3' y 5' de los fragmentos de DNA. Usando el mismo tipo de adaptador para ambos extremos, como, por ejemplo, un adaptador en forma de Y o en forma de bucle - vástago tiene la ventaja de que no se pierden fragmentos durante la preparación de la biblioteca debido al emparejamiento incorrecto del adaptador, lo que es una ventaja cuando se trabaja con cantidades bajas de DNA.

Por lo tanto, según una realización, se prepara una biblioteca de secuenciación que comprende moléculas de DNA de doble cadena fragmentadas aleatoriamente que se unen en su extremo 3' y 5' a secuencias adaptadoras. Los adaptadores proporcionan una secuencia conocida y, por lo tanto, proporcionan una plantilla conocida para cebadores de amplificación y/o secuenciación. Opcionalmente, los adaptadores también pueden proporcionar un índice individual, lo que permite así la agrupación posterior de dos o más bibliotecas de secuenciación diana enriquecidas antes de la secuenciación. Esta realización se describirá con mayor detalle a continuación.

Para garantizar una ligación del adaptador eficaz, los adaptadores se suelen utilizar en exceso durante la etapa de ligación del adaptador. Por lo tanto, después de la ligación del adaptador, se proporciona una muestra que contiene DNA que comprende moléculas de DNA que están flanqueadas por adaptadores además de monómeros adaptadores no ligados y productos de ligación adaptador-adaptador tales como dímeros adaptadores. Los monómeros adaptadores y los productos de ligación adaptador-adaptador no ligados están normalmente contenidos en grandes cantidades en la muestra que se obtiene después del proceso de ligación del adaptador. Es importante eliminar estos

monómeros adaptadores y los productos de ligación adaptador-adaptador no ligados, ya que, de lo contrario, disminuirían el poder de secuenciación de la reacción de secuenciación posterior. Para eliminar los monómeros adaptadores y productos de ligación adaptador-adaptador no ligados, así como enzimas y otros contaminantes de la muestra de ligación del adaptador, se prefiere realizar un aislamiento de DNA selectivo por tamaño usando el método según la presente invención. El valor de corte para el DNA se elige de modo que esté por encima del tamaño de los monómeros adaptadores no ligados y por encima del tamaño de los productos de ligación adaptador-adaptador esperados. Esto asegura que los monómeros adaptadores no ligados y los productos de ligación adaptador-adaptador no deseados no se capturen durante dicha etapa de aislamiento de DNA selectivo por tamaño y, por lo tanto, se agoten del DNA diana aislado, que comprende predominantemente moléculas de DNA que tienen un tamaño superior al valor de corte. El método según la presente invención es particularmente ventajoso para este propósito, porque el valor de corte se puede ajustar con precisión dentro de un intervalo estrecho como se demuestra en los ejemplos variando la concentración del polímero de poli(óxido de alquilenos) en la mezcla de unión.

Por lo tanto, según una realización, el método de la invención se usa para aislar moléculas de DNA ligadas con el adaptador como moléculas de DNA diana de una muestra que contiene DNA que es una muestra de ligación del adaptador y para eliminar los monómeros adaptadores y productos de ligación adaptador-adaptador, en donde las moléculas de DNA unidas al adaptador se separan de los monómeros adaptadores no ligados y los productos de ligación adaptador-adaptador en base al tamaño más grande de las moléculas de DNA unidas al adaptador. Dicho método puede comprender

(a) preparar una mezcla de unión que comprende la muestra de ligación del adaptador, al menos un polímero de poli(óxido de alquilenos) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino y al menos un catión divalente, en donde la mezcla de unión comprende el catión divalente en una concentración de 3 mM a 75 mM, y en el que dicha mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5 y une las moléculas de DNA precipitadas ligadas con el adaptador a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, produciendo así una fase sólida que tiene unida a ella las moléculas de DNA ligadas al adaptador, en las que, en las condiciones de unión usadas, los monómeros adaptadores y los productos de ligación adaptador-adaptador predominantemente no se unen a la fase sólida;

(b) separar las moléculas de DNA ligadas al adaptador unidas de la muestra restante;

- opcionalmente, lavar las moléculas de DNA ligadas al adaptador unidas; y
- opcionalmente, eluir las moléculas de DNA ligadas al adaptador unidas de la fase sólida.

El valor de corte se encuentra por encima del tamaño de los monómeros adaptadores y por encima del tamaño de los productos de ligación adaptador-adaptador esperados. Según una realización, el valor de corte se encuentra al menos 10 nt, al menos 15 nt, al menos 20 nt, al menos 25 nt o al menos 30 nt por encima del tamaño del (de los) producto(s) de ligación adaptador-adaptador esperado. Además, la selección de tamaño doble se puede realizar como se describe anteriormente utilizando una muestra de ligación del adaptador como muestra que contiene DNA.

Según una realización, los fragmentos de DNA diana se enriquecen después de la ligación del adaptador (y preferiblemente la selección por tamaño como se describió anteriormente) mediante amplificación, preferiblemente amplificación por PCR. Dicha etapa de enriquecimiento es opcional, pero preferida para algunas aplicaciones. Por ejemplo, se puede usar una reacción de amplificación tal como la amplificación por PCR para enriquecer selectivamente aquellos fragmentos de DNA que tienen moléculas adaptadoras en ambos extremos y para amplificar la cantidad de DNA en la biblioteca. Según una realización, la PCR se realiza con uno o más cebadores que hibridan con los adaptadores. Las etapas de amplificación respectivas son bien conocidas en la técnica anterior y, por lo tanto, no necesitan una descripción detallada en la presente memoria. Según una realización, un aislamiento de DNA selectivo por tamaño según el método de la presente invención se realiza después de la amplificación. El valor de corte se elige de nuevo de modo que los cebadores, los monómeros adaptadores no ligados y los productos de ligación adaptador-adaptador que podrían haber estado presentes durante la amplificación y que podrían haber sido amplificados, no se capturen durante la unión al DNA. Según una realización, se usa el mismo valor de corte que se usó cuando se realizó un aislamiento de DNA selectivo por tamaño después de la etapa de ligación del adaptador.

Por lo tanto, según una realización, el método según la presente invención comprende amplificar las moléculas de DNA de doble cadena ligadas al adaptador, seleccionadas por tamaño, aisladas para proporcionar una biblioteca de secuenciación enriquecida, en donde después de la amplificación, se realiza una etapa de selección por tamaño que comprende

(a) poner en contacto la muestra amplificada con un tampón de unión que comprende al menos un polímero de poli(óxido de alquilenos) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino, al menos un catión divalente y al menos un agente de tamponamiento, en donde la mezcla de unión comprende el catión divalente en una concentración de 3 mM a 75 mM, y en la que dicho tampón de unión tiene un pH que se encuentra en un intervalo de 8,5 a 9,5 para proporcionar una mezcla de unión y unen las moléculas de DNA diana precipitadas que tienen un tamaño por encima del valor de corte a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar;

(b) separar el DNA diana unido de la muestra restante;

- opcionalmente, lavar el DNA diana unido; y
- opcionalmente, eluir el DNA diana unido de la fase sólida.

Después del enriquecimiento de la amplificación, que preferiblemente va seguido de un aislamiento de DNA selectivo por tamaño según la presente invención, la biblioteca de secuenciación está lista para su uso. Opcionalmente, la biblioteca de secuenciación preparada se puede validar, cuantificar y/o se pueden realizar controles de calidad para verificar el tamaño de los fragmentos ligados al adaptador obtenidos, respectivamente fragmentos enriquecidos por PCR.

Los métodos generales adecuados para preparar bibliotecas de secuenciación también se describen en Metzker, 2011, Voelkerding, 2009 y el documento de Patente WO12/003374 y puede combinarse con el método de aislamiento de DNA selectivo por tamaño según la presente invención.

Según una realización, la presente invención proporciona un método para preparar una biblioteca de secuenciación que es adecuada para la secuenciación en paralelo masiva, en el que dicho método comprende

A) fragmentar el DNA y, opcionalmente, reparar los extremos de los fragmentos de DNA para proporcionar una muestra que comprenda fragmentos de DNA de extremos romos de diferentes tamaños;

B) realizar opcionalmente una etapa de aislamiento de DNA diana que tiene un tamaño de fragmento por encima de un determinado valor de corte, en la que dicha etapa de selección por tamaño opcional comprende

(a) poner en contacto la muestra que comprende los fragmentos de DNA de diferentes tamaños con un tampón de unión que tiene un pH que se encuentra en un intervalo de 8,5 a 9,5 y que comprende al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino, al menos un catión divalente y al menos un agente de tamponamiento para proporcionar una mezcla de unión correspondiente, en la que la mezcla de unión comprende el catión divalente en una concentración de 3 mM a 75 mM, y une las moléculas de DNA diana precipitadas que tienen un tamaño superior al valor de corte a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar;

(b) separar el DNA diana unido de la muestra restante;

- lavar el DNA diana unido; y
- eluir el DNA diana unido de la fase sólida;

C) realizar una etapa de ligación de adaptadores para proporcionar una muestra que comprende moléculas de DNA de doble cadena que están flanqueadas en 5' y/o 3' por adaptadores,

D) aislar y, por lo tanto, separar moléculas de DNA de doble cadena ligadas al adaptador de monómeros adaptadores no ligados y productos de ligación adaptador-adaptador en base al mayor tamaño de las moléculas de DNA de doble cadena ligadas al adaptador, en el que dicha etapa de selección por tamaño comprende

(a) preparar una mezcla de unión que comprende la muestra de ligación del adaptador, al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino y al menos un catión divalente, en donde la mezcla de unión comprende el catión divalente en una concentración de 3 mM a 75 mM, y en el que dicha mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5 y une las moléculas de DNA ligadas al adaptador que se precipitaron de dicha mezcla de unión a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, produciendo así una fase sólida que tiene unidas a ella las moléculas de DNA ligadas al adaptador, en la que, en las condiciones de unión usadas, los monómeros adaptadores y los productos de ligación adaptador-adaptador predominantemente no se unen a la fase sólida;

(b) separar las moléculas de DNA ligadas al adaptador unidas de la muestra restante;

- lavar las moléculas de DNA ligadas al adaptador unidas; y
- eluir las moléculas de DNA ligadas al adaptador unidas de la fase sólida;

E) opcionalmente, amplificar la moléculas de DNA ligadas al adaptador.

Esta realización proporciona una biblioteca de secuenciación que comprende fragmentos de DNA ligados al adaptador que tienen una longitud mínima apropiada. Como se describió anteriormente, preferiblemente, los adaptadores se proporcionan en el extremo 3' y el extremo 5' de los fragmentos de DNA. Además, la etapa de selección por tamaño realizada en la etapa D) elimina eficazmente los monómeros adaptadores y los productos de ligación adaptador-adaptador, así como otros contaminantes de la reacción de ligación. Esto mejora la calidad de la biblioteca de secuenciación. La etapa D) también puede repetirse y, por lo tanto, realizarse dos o más veces para garantizar una eliminación eficiente de sustancialmente todos los monómeros adaptadores y productos de ligación adaptador-adaptador

y para aumentar la rigurosidad de la selección por tamaño. El método es rápido, fiable y proporciona una biblioteca de secuenciación de alta calidad. Además, dicho método se puede integrar fácilmente en métodos de preparación de bibliotecas de secuenciación existentes. El método descrito se puede realizar mutatis mutandis utilizando la realización, en la que la selección de tamaño se produce para un valor de corte superior e inferior para proporcionar moléculas de DNA diana que tienen un tamaño dentro de un determinado intervalo de tamaño (véase la reivindicación 2).

Una sola ejecución de NGS generalmente produce suficientes lecturas para secuenciar varias bibliotecas de secuenciación diana enriquecidas a la vez. Por lo tanto, las estrategias de agrupación y los enfoques de indexación son una forma práctica de reducir el costo por muestra. Las respectivas estrategias de multiplexación también se pueden usar junto con las enseñanzas de la presente invención. Las características que permiten la multiplexación se pueden incorporar en diferentes etapas del proceso de enriquecimiento. Según una realización, la biblioteca de secuenciación se genera utilizando adaptadores que contienen motivos de secuencia específicos para el etiquetado y la diferenciación de la biblioteca (adaptadores de "código de barras" o "índice"). Cada biblioteca de secuenciación se proporciona con adaptadores individuales y, por lo tanto, específicos de biblioteca que proporcionan una secuencia específica de biblioteca. Preferiblemente, cada adaptador comprende, además de la región de índice, una región universal común que proporciona una plantilla conocida para cebadores de PCR y/o cebadores de secuenciación que se pueden usar en todas las bibliotecas. Una vez que se obtuvieron las bibliotecas de secuenciación enriquecidas diana, se pueden agrupar y secuenciar en una sola ejecución. Proporcionar los fragmentos de DNA de la biblioteca de secuenciación con los respectivos adaptadores de índice permite así secuenciar posteriormente varias bibliotecas de secuenciación diana enriquecidas en el mismo ciclo de secuenciación porque los fragmentos secuenciados se pueden distinguir en base a la secuencia específica de la biblioteca de los adaptadores de índice. Después de la secuenciación, las secuencias individuales que pertenecen a cada biblioteca se pueden clasificar a través del índice específico de la biblioteca que después se encuentra en la secuencia obtenida. Los enfoques de índice respectivos se conocen en la técnica anterior y los adaptadores de índice también están disponibles comercialmente y, por ejemplo, se proporcionan en el kit de preparación de muestra de DNA TruSeq® DNA que son adecuados para su uso en la plataforma Illumina.

Según una realización, la biblioteca de secuenciación comprende las moléculas de DNA de doble cadena en una cantidad total de 3 µg o menos, 2 µg o menos, 1,5 µg o menos, 1 µg o menos, 0,75 µg o menos o 0,5 µg o menos. Según una realización, la biblioteca de secuenciación comprende las moléculas de DNA de doble cadena en una cantidad total de al menos 0,2 µg, al menos 0,5 µg o al menos 0,75 µg. El método según la presente invención no sólo permite un aislamiento de DNA selectivo por tamaño, sino que también asegura una captura eficiente de las moléculas de DNA que tienen el tamaño deseado. Esta es una ventaja importante porque, en muchos casos, la biblioteca de secuenciación comprende el DNA en cantidades bajas, ya que el material de DNA también podría perderse durante la preparación de la biblioteca de secuenciación.

Los ácidos nucleicos tales como el DNA y/o el RNA pueden aislarse de una muestra de interés según métodos conocidos en la técnica anterior para proporcionar el material de partida para preparar la biblioteca de secuenciación. El RNA generalmente se transcribe primero en cDNA antes de preparar la biblioteca de secuenciación.

Como se describió anteriormente, la secuenciación se realiza preferiblemente en una plataforma de secuenciación de nueva generación. Todas las plataformas de NGS comparten una característica tecnológica común, a saber, la secuenciación en paralelo masiva, por ejemplo, de moléculas de DNA o cDNA amplificadas de manera clonal o individuales que se separan espacialmente en una celda de flujo o mediante la generación de una emulsión de aceite y agua. En NGS, la secuenciación se realiza mediante ciclos repetidos de extensiones de nucleótidos mediadas por polimerasa o, en un formato común, mediante ciclos iterativos de ligación de oligonucleótidos. Después de obtener la biblioteca de secuenciación usando el método según la presente invención, la separación clonal de moléculas individuales y la posterior amplificación se realiza mediante reacciones de preparación de plantillas in vitro como PCR de emulsión (pirosecuenciación de Roche 454, secuenciación de semiconductores de Ion Torrent, secuenciación SOLiD por ligación de Life Technologies, secuenciación por síntesis de Intelligent Biosystems), amplificación puente en la celda de flujo (por ejemplo, Solexa/Illumina), amplificación isotérmica mediante tecnología Wildfire (Life Technologies) o colonias/nanobolas generadas por amplificación por círculo rodante (Complete Genomics, Intelligent Biosystems, Polonator). Las tecnologías de secuenciación como Heliscope (Helicos), la tecnología SMRT (Pacific Biosciences) o la secuenciación por nanoporos (Oxford Nanopore) permiten la secuenciación directa de moléculas individuales sin amplificación clonal previa. También se describieron en el antecedentes de la presente invención y se refirieron en la divulgación respectiva métodos y plataformas de NGS adecuados que se pueden utilizar. La secuenciación se puede realizar en una cualquiera de las respectivas plataformas. Según una realización, en la que el método de la presente invención se usa para eliminar monómeros adaptadores o dímeros adaptadores no ligados, después de la secuenciación, la biblioteca de secuenciación obtenida respectivamente, las lecturas de dímeros adaptadores en relación con el número de lecturas totales es $\leq 1,5\%$, preferiblemente $\leq 1,25\%$, $\leq 1\%$, $\leq 0,75\%$, $\leq 0,6\%$, más preferiblemente $\leq 0,5\%$, $\leq 0,4\%$, $\leq 0,3\%$, más preferiblemente $\leq 0,2\%$ y lo más preferiblemente $\leq 0,15\%$.

Según una realización, el método según la presente invención se realiza más de una vez. Así, según una realización, se realizan al menos dos ciclos de aislamiento de DNA por tamaño selectivo utilizando el método de la presente invención que comprende las etapas (a) y (b). Según una realización, un eluato que se obtiene en el primer ciclo de selección por tamaño proporciona la muestra que contiene DNA para el segundo ciclo de selección por tamaño. Por lo tanto, el eluato obtenido después del primer ciclo de selección por tamaño se pone en contacto en el segundo ciclo de selección por tamaño en la etapa (a) con el tampón de unión para proporcionar una mezcla de unión y unir

moléculas de DNA diana que tengan un tamaño superior al valor de corte deseado a la fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar. Según una realización, se utilizan las mismas condiciones de unión en el segundo ciclo de selección por tamaño que en el primer ciclo de selección por tamaño. Según otra realización, se utilizan diferentes condiciones de unión en el segundo ciclo de selección por tamaño, por ejemplo, usando una concentración diferente del al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol en la mezcla de unión para ajustar un valor de corte diferente. El mismo tipo de fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar puede usarse en el primer y segundo ciclo de selección por tamaño. La realización de al menos dos ciclos de selección por tamaño según la presente invención puede ser favorable para eliminar grandes cantidades de fragmentos de DNA cortos contaminantes, tales como, por ejemplo, monómeros adaptadores o productos de unión adaptador-adaptador durante la preparación de una biblioteca de secuenciación, en particular una biblioteca de secuenciación adecuada para la secuenciación de nueva generación.

Según una realización, el método según la presente invención se usa para fraccionar moléculas de DNA comprendidas en una muestra que contiene DNA según su tamaño. De este modo, se obtienen dos o más fracciones, en las que las moléculas de DNA comprendidas en las diferentes fracciones difieren en promedio en su longitud. El método según la presente invención también es adecuado para dicho propósito. Para fraccionar una muestra que contiene DNA, por ejemplo, se realizan dos o más ciclos de aislamiento de DNA por tamaño selectivo. El fraccionamiento por tamaño puede ser, por ejemplo, logrado de la siguiente manera:

- en el primer ciclo de aislamiento de DNA selectivo por tamaño A, se proporcionan condiciones de unión A en la mezcla de unión que determina el valor de corte A, y en el que el eluato A obtenido proporciona una fracción que comprende predominantemente moléculas de DNA diana que tienen un tamaño superior al valor de corte A;
- en donde la muestra restante separada obtenida en la etapa (b) del primer ciclo de aislamiento selectivo A de DNA por tamaño proporciona la muestra que contiene DNA para el segundo ciclo de aislamiento selectivo B de DNA por tamaño, y en donde se proporcionan las condiciones de unión B en la mezcla de unión que determina el valor de corte B, en el que el valor de corte B es menor que el valor de corte A y en el que el eluato B obtenido proporciona una fracción que comprende predominantemente las moléculas de DNA diana que tienen un tamaño por encima del valor de corte B pero por debajo del valor de corte A.

Los detalles sobre las condiciones de unión adecuadas ya se describieron anteriormente y se hace referencia a la descripción respectiva. Según una realización, el polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol está presente en la primera mezcla de unión en una concentración que se encuentra en el intervalo de 8,5% a 9,5% (valor de corte superior A) y está presente en la segunda mezcla de unión en una concentración de 10% a 12%, preferiblemente de 10,5 a 11,5% (valor de corte inferior B). Las condiciones de unión se pueden ajustar añadiendo diferentes volúmenes del mismo tampón de unión. Si se desea, las moléculas de DNA que tienen un tamaño menor que el valor de corte B que todavía están comprendidas en la muestra restante pueden someterse a un tercer ciclo de aislamiento C de DNA selectivo por tamaño, si se desea. Por lo tanto, según una realización, se realiza un ciclo de aislamiento C de DNA selectivo por tamaño, en el que la muestra restante separada obtenida en la etapa (b) del segundo ciclo de aislamiento selectivo B de DNA por tamaño proporciona la muestra que contiene DNA para el tercer ciclo de aislamiento selectivo C de DNA por tamaño, y en donde las condiciones de unión C se proporcionan en la mezcla de unión que determina el valor de corte C, en donde el valor de corte C es menor que el valor de corte B y en donde el eluato C obtenido proporciona una fracción que comprende predominantemente moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte C pero por debajo del valor de corte B.

Kit

Según un segundo aspecto, se proporciona un kit para el aislamiento selectivo por tamaño de moléculas de DNA diana que tienen un tamaño por encima de un valor de corte deseado de una muestra que contiene DNA, en el que el método es adecuado para el método según el primer aspecto, comprendiendo el kit

- (a) un tampón de unión que comprende al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino, al menos un catión divalente y al menos un agente de tamponamiento en el que el tampón de unión tiene un valor de pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5;
- (b) una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar;
- (c) opcionalmente al menos una solución de lavado; y
- (d) opcionalmente al menos una solución de elución.

Los detalles sobre el tampón de unión, en particular los componentes del tampón de unión adecuados y preferidos, las concentraciones de los componentes del tampón de unión y los valores de pH, así como los detalles con respecto a la fase sólida, la solución de lavado y la solución de elución, se describieron en detalle anteriormente junto con el método según la presente invención. Se hace referencia a la divulgación anterior que también se aplica en la presente memoria. A continuación, se describen de nuevo realizaciones seleccionadas no limitantes.

Las concentraciones adecuadas y preferidas para el polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol en

el tampón de unión se describieron anteriormente y se hace referencia a la divulgación anterior. Preferiblemente, la concentración de al menos un polímero de poli(óxido de alquileno) que es un polietilenglicol en el tampón de unión se selecciona del 7 % al 45 %, del 10 % al 40 %, del 12,5 % al 35 %, del 15 % al 30 %, 17,5% al 27,5% y 20% al 25%. Preferiblemente, el polímero de poli(óxido de alquileno) es polietilenglicol no sustituido.

- 5 El tampón de unión tiene preferiblemente un valor de pH que se encuentra en el intervalo de 8,6 a 9,2.

Los agentes de tamponamiento adecuados y las concentraciones en el tampón de unión se describieron anteriormente y se hace referencia a la divulgación anterior que también se aplica aquí. El tampón de unión puede comprender un agente de tamponamiento en una concentración seleccionada de 25 mM a 1 M, 50 mM a 750 mM, 75 mM a 700 mM, 100 mM a 650 mM, 125 mM a 600 mM, 150 mM a 550 mM, 175 mM a 525 mM y 200 mM a 500 mM.

- 10 El tampón de unión comprende una sal de metal alcalino, preferiblemente un haluro de metal alcalino. La sal se selecciona preferiblemente de cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de litio y cloruro de cesio, más preferiblemente la sal es cloruro de sodio. Las sales también se describieron junto con el método y se hace referencia a la divulgación respectiva. La concentración de la sal se puede seleccionar de 0,5 M a 4 M, 0,7 M a 3,5 M, 1 M a 3 M, 1,2 M a 2,75 M y 1,3 M a 2,5 M.

- 15 También se describieron realizaciones adecuadas y preferidas de la fase sólida junto con el método según la invención. Como se describió anteriormente, la fase sólida preferiblemente proporciona una superficie de sílice sin modificar.

Según una realización, el tampón de unión tiene las siguientes características:

- i) comprende Mg^{2+} como catión divalente, preferiblemente como $MgCl_2$;
- 20 ii) comprende polietilenglicol en una concentración seleccionada de 12,5% a 35%, 15% a 30%, 17,5% a 27,5% y 20% a 25%;
- iii) comprende una sal de metal alcalino, preferiblemente cloruro de sodio o cloruro de potasio, más preferiblemente cloruro de sodio, en una concentración que se encuentra en el intervalo de 0,5 M a 2,75 M, preferiblemente de 0,75 M a 2,5 M;
- 25 iv) comprende el al menos un agente de tamponamiento en una concentración que se encuentra en un intervalo de 100 a 550 mM; y
- v) tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,6 a 9,2.

- Además, el kit puede comprender instrucciones y/o información para su uso. Por ejemplo, el kit puede comprender instrucciones y/o información sobre el valor de corte que se logra al mezclar un volumen determinado del tampón de unión con un volumen determinado de la muestra que contiene DNA y/o los valores de corte que se logran si la muestra que contiene DNA se mezcla en cierta proporción con el tampón de unión. Si el kit comprende dos o más tampones de unión que difieren en la concentración del polímero de poli(óxido de alquileno), que es un polietilenglicol, el kit puede proporcionar información sobre qué valor de corte se alcanza cuando se usa un determinado tampón de unión comprendido en el kit. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un kit que permite el ajuste flexible del valor de corte, por ejemplo, mezclando un determinado volumen del tampón de unión y un determinado volumen de la muestra que contiene DNA.
- 30
- 35

En particular, se puede usar un kit respectivo en el método según el primer aspecto. En particular, se puede utilizar para fraccionar moléculas de DNA comprendidas en una muestra que contiene DNA según su longitud.

- Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Los encabezados proporcionados en la presente memoria no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta invención que pueden leerse con referencia a la memoria descriptiva en su conjunto.
- 40

El término "solución", tal como se usa en la presente memoria, se refiere en particular a una composición líquida, preferiblemente una composición acuosa. Puede ser una mezcla homogénea de una sola fase, pero también está dentro del alcance de la presente invención que una solución comprenda constituyentes sólidos tales como, por ejemplo, precipitados.

- 45 Tal como se utiliza en la especificación del tema y las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen aspectos plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un polímero de poli(óxido de alquileno)" incluye un único tipo de polímero de poli(óxido de alquileno), así como dos o más polímeros de poli(óxido de alquileno). Asimismo, la referencia a "un catión divalente", "una sal adicional", "un agente de tamponamiento" y similares incluye entidades individuales y combinaciones de dos o más de dichas entidades.
- 50 La referencia a "la divulgación" y "la invención" y similares incluye aspectos individuales o múltiples enseñados en la presente memoria; etcétera. Los aspectos enseñados en la presente memoria están abarcados por el término "invención".

La fase sólida no se considera al determinar las concentraciones de los componentes, tales como el polímero de poli(óxido de alquileno), el catión divalente, la sal o el agente de tamponamiento en la mezcla de unión.

Según una realización, el tema descrito en la presente memoria que comprende determinadas etapas en el caso de métodos o que comprende determinados ingredientes en el caso de composiciones, soluciones y/o tampones se refiere al tema que consiste en las respectivas etapas o ingredientes. Se prefiere seleccionar y combinar las realizaciones preferidas descritas en la presente memoria y el tema específico que surge de una combinación respectiva de realizaciones preferidas también pertenece a la presente descripción.

Ejemplos

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

1. Ejemplo 1

Solución madre tampón de unión/precipitación: PEG 8000 al 22 %, NaCl 2 M, Tris 200 mM con o sin MgCl_2 20 mM. El pH de estos tampones de precipitación se ajustó a pH 6 o 9 como también se indica en la Figura 1. Esta solución madre tampón de precipitación se puso en contacto con DNA humano cortado como muestra que contenía DNA. El DNA se cortó con el ultrasonificador Covaris en tampón TE para proporcionar una muestra que contenía DNA. Se mezclaron 90 μl de esta muestra que contenía DNA con 90 μl de solución madre tampón de precipitación (concentración en la mezcla de unión: PEG 8000 al 11 %, NaCl 1 M, Tris 100 mM con o sin MgCl_2 10 mM). El DNA cortado se precipitó sobre 10 μl de una suspensión que comprendía partículas de sílice magnéticas (MagAttract G beads - QIAGEN). El DNA que precipitó sobre las partículas de sílice magnéticas se lavó dos veces con etanol al 80 % y se eluyó con 50 μl de tampón de elución.

Los eluatos obtenidos se analizaron en un chip Agilent 7500 para analizar los valores de corte alcanzados con los diferentes tampones de unión/precipitación y el rendimiento de DNA. Los resultados se muestran en la Figura 1 (electroferograma). Los picos grandes que se muestran a 50 bp y 10380 bp son el resultado de los marcadores de calibración. Las curvas entre los marcadores se asemejan a los fragmentos de DNA de diferentes tamaños que se aislaron con los diferentes tampones de unión. Así, la curva entre los marcadores de calibración muestra la distribución de tamaños de los fragmentos de DNA aislados y la altura de la curva indica el rendimiento obtenido. Además, se muestra la curva del DNA de entrada.

La Figura 1 demuestra que cambiando el pH del tampón de precipitación a aproximadamente pH 9 junto con la adición del catión divalente Mg^{2+} mejora sorprendentemente el rendimiento de los fragmentos de DNA recuperados cuando se usa una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar. Por lo tanto, las condiciones de unión utilizadas en la presente invención mejoran la recuperación de fragmentos de DNA precipitados con polietilenglicol (PEG) sobre superficies de sílice no modificadas, permitiendo así utilizar dichas fases sólidas no modificadas para el aislamiento de DNA selectivo por tamaño con un polímero de poli(óxido de alquileno).

2. Ejemplo 2

El ejemplo 2 demuestra que el valor de corte de los fragmentos de DNA recuperados se puede reubicar y, por lo tanto, se puede ajustar añadiendo diferentes cantidades del tampón de unión y, por lo tanto, de precipitación de la presente invención. La muestra que contenía DNA se cortó, DNA humano. La solución madre tampón de unión/precipitación comprendía PEG 8000 al 22%, NaCl 2 M, MgCl_2 20 mM, Tris 200 mM pH 8,88. Este tampón de unión se añadió a la muestra que contenía DNA en una cantidad tal que se alcanzaron las siguientes concentraciones finales de PEG 8000 en la mezcla de unión: 14 %, 12 %, 10 % y 8 %.

El DNA cizallado se precipitó sobre 5 μl de suspensión G MagAttract (partículas de sílice magnéticas). Previamente, las perlas MagAttract G se preincubaron con un tampón que contenía NaCl 2 M, MgCl_2 20 mM, Tris 200 mM, pH 8,89 para volver a tamponar las partículas de sílice. Las perlas con el DNA unido se lavaron dos veces con etanol al 80 % y se eluyeron con 17 μl de un tampón de elución. Las muestras se analizaron nuevamente en un chip Agilent DNA 7500. El electroferograma obtenido se muestra en la Figura 2. Como puede verse, hay un cambio dependiente de la concentración en el valor de corte que se correlaciona con la concentración de polietilenglicol. Las concentraciones más altas de polietilenglicol condujeron a la recuperación de fragmentos de DNA más pequeños. Al reducir la concentración de polietilenglicol en la mezcla de unión, el valor de corte aumentó dependiendo de la concentración. Por lo tanto, al usar tampones de precipitación que comprenden diferentes cantidades de PEG o al incluir diferentes cantidades del tampón de precipitación en la mezcla de unión, el valor de corte se puede ajustar con precisión.

Por tanto, el ejemplo 2 muestra que añadiendo diferentes cantidades del tampón de unión/precipitación según la invención a la muestra que contiene DNA, se pueden separar fragmentos de DNA de diferentes longitudes. El método de separación selectiva por tamaño es particularmente adecuado para aplicaciones tales como la preparación de bibliotecas para la secuenciación de nueva generación, donde se deben eliminar pequeños fragmentos de DNA no deseados, como adaptadores, o fragmentos grandes, como productos de PCR mal cebados, mientras que el DNA de la biblioteca debe conservarse de la manera más eficaz posible. Otra ventaja del método de selección por tamaño según la presente invención en aplicaciones como la preparación de bibliotecas es la reubicación flexible del valor de corte. La invención permite esta reubicación flexible y, por lo tanto, la adaptación del valor de corte mientras mantiene el rendimiento mejorado de moléculas de DNA recuperadas. Todos los valores de corte se pueden reubicar simplemente añadiendo el tampón de unión en diferentes cantidades.

3. Ejemplo 3

El ejemplo 3 demuestra que los altos rendimientos de DNA diana y la adaptación del valor de corte también se logran cuando se utilizan columnas giratorias de sílice como fase sólida. La muestra que contenía DNA se cortó de nuevo, DNA humano. La concentración de la solución madre tampón de precipitación fue PEG 8000 al 22 %, NaCl 2 M, MgCl₂ 20 mM, Tris 200 mM pH 8,88. Este tampón de unión/precipitación se añadió a la muestra que contenía DNA de modo que se logaran las siguientes concentraciones finales de PEG 8000 en la mezcla de unión: 9 %, 8 %, 7 %. El DNA cortado se precipitó en columnas rotatorias MinElute que se preincubaron previamente con un tampón que contenía NaCl 2 M, MgCl₂ 20 mM, Tris 200 mM, pH 8,89. El DNA precipitado que se unió a la membrana de sílice contenida se lavó dos veces con etanol al 80 % y se eluyó en 17 % μ l de tampón de elución. El eluato se analizó en un chip Agilent DNA 7500. El electroferograma se muestra en la Figura 3. Como puede verse, se logra la misma reubicación dependiente de la concentración de polietilenglicol del valor de corte. Además, la recuperación de fragmentos de DNA fue alta.

4. Ejemplo 4

En el ejemplo 4, el método de la invención se realizó para aislar moléculas de DNA diana que tienen un tamaño dentro de un determinado intervalo de tamaños que está determinado por un valor de corte superior y un valor de corte inferior de una muestra que contiene DNA. Los resultados se compararon con los resultados obtenidos con la referencia AMPure XP según las instrucciones del fabricante. En resumen, el protocolo de AMPure XP Bead se realizó de la siguiente manera: se re-suspendieron las perlas AMPure XP. Se añadieron 80 μ l o 20 μ l de perlas a 100 μ l de muestra o al sobrenadante en la placa de microtitulación. La pipeta se ajustó a 160 μ l y el volumen total se pipeteó 10 veces hacia arriba y hacia abajo para obtener una mezcla completa. La punta de la pipeta se cambió después de cada muestra. La placa de microtitulación se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La placa de microtitulación se colocó en una placa magnética y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos o hasta que el fluido apareció transparente. Después, se eliminó y desechó aproximadamente la mitad de cada sobrenadante y se tuvo cuidado de no tocar las perlas; esta etapa se realizó dos veces. La punta de la pipeta se cambió después de cada muestra y puede haber líquido residual en el pocillo. Mientras la placa de microtitulación estaba sobre la placa magnética, se añadieron a cada muestra 200 μ l de etanol al 80 % recién preparado y se tuvo cuidado de no volver a suspender las perlas. La placa de microtitulación se incubó a temperatura ambiente durante al menos 30 segundos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante completo de cada pocillo y se descartó. Se tuvo cuidado de no tocar las perlas. La punta de la pipeta se cambió después de cada muestra. Se repitió el lavado con etanol. La placa de microtitulación se cogió de la placa magnética y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente para que se secara. El sedimento seco se re-suspendió en 17,5 μ l de tampón de re-suspensión, en la presente memoria EB, pipeteando todo el volumen cuidadosamente hacia arriba y hacia abajo 10 veces. La placa de microtitulación se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. La placa de microtitulación se dejó reposar sobre la placa magnética durante 5 minutos o hasta que el líquido apareció transparente. Se transfirieron 15 μ l del sobrenadante transparente a un tubo nuevo. Las puntas se cambiaron después de cada muestra.

En el ejemplo 4, se probaron además múltiples tampones de unión diferentes en el método de la invención. Si no se indica lo contrario en el ejemplo 4, la muestra que contenía DNA se cizalló, el DNA humano y el método se realizó de la siguiente manera:

- Las partículas de sílice magnéticas (perlas MagAttract G, QIAGEN) se preincubaron en un tampón de lavado (5 μ l de perlas + 10 μ l de tampón de lavado, mezclando mediante agitación con vortex). El tampón de lavado tenía la misma composición que el tampón de unión, excepto que no contenía PEG. Las partículas de sílice magnéticas se separaron con la ayuda de un imán y se eliminó el tampón de lavado.
- Las partículas de sílice magnéticas lavadas (5 μ l) se pusieron en contacto con 63 μ l de tampón de unión y 90 μ l de muestra que contenía DNA (1 μ g). De ese modo, se proporciona una primera mezcla de unión (1 parte de muestra de DNA por 0,7 partes de tampón de unión) que comprende aproximadamente un 9% PEG. Las partículas de sílice magnéticas no se consideran en el cálculo de la concentración de componentes en la mezcla de unión. La primera mezcla de unión se mezcló mediante agitación con vortex y se incubó durante 10 min mientras se agitaba la primera mezcla de unión para permitir la unión de moléculas de DNA que tenían un tamaño por encima del valor de corte superior a las partículas magnéticas.
- Las partículas magnéticas con las moléculas de DNA unidas se separaron magnéticamente colocando las muestras en una rejilla magnética. De ese modo, se eliminaron de la primera mezcla de unión las moléculas de DNA más grandes que tenían un tamaño por encima del valor de corte superior. El resto de la muestra se procesó adicionalmente.
- Se pusieron en contacto 5 μ l de partículas magnéticas de sílice (lavadas como se describe anteriormente) con un volumen adicional del tampón de unión (25,5 μ l) y 140 μ l del resto de la muestra. De ese modo, se proporcionó una segunda mezcla de unión que comprende aproximadamente un 11% de PEG. Las partículas de sílice magnéticas tampoco se consideran en el cálculo de la concentración de componentes en la mezcla de unión. La segunda mezcla de unión se mezcló mediante agitación con vortex y se incubó durante 10 min mientras se agitaba la segunda mezcla de unión para permitir la unión de moléculas de DNA diana que tenían un tamaño superior al valor de corte inferior a las partículas magnéticas.

- Las partículas magnéticas con las moléculas de DNA diana unidas se separaron magnéticamente colocando las muestras en una rejilla magnética. El sobrenadante se eliminó y descartó.
- 5 • Las partículas de sílice magnéticas con las moléculas de DNA diana unidas se lavaron con 500 µl de etanol al 80 %, se incubaron durante 5 min con agitación a temperatura ambiente y se separaron magnéticamente durante 1 min en la rejilla magnética. El sobrenadante se eliminó y descartó. La etapa de lavado se realizó dos veces.
- Las perlas de sílice magnéticas lavadas con las moléculas de DNA diana unidas se secaron al aire durante 5 min.
- Se realizó una primera etapa de elución añadiendo 17 µl de tampón TE (QIAGEN) e incubando durante 5 min a temperatura ambiente con agitación. La suspensión se colocó en una rejilla magnética para su separación y se eliminaron 15 µl del eluato obtenido.
- 10 • Se realizó una segunda etapa de elución utilizando 50 µl de tampón EB (QIAGEN) e incubando durante 5 min a temperatura ambiente con agitación. La suspensión se colocó en una rejilla magnética para su separación y se eliminó el eluato obtenido. La segunda etapa de elución se realizó en este ejemplo para garantizar que se recupere todo el DNA unido.

15 Los siguientes tampones de unión se probaron según este protocolo de la invención y se compararon con el producto de referencia (AMPure):

Tampón de unión (solución madre)	Resultados		
PEG al 22%; NaCl 2M; MgCl ₂ 20 mM; CHES 200 mM; pH 8,8, pH 8,9 o pH 9,0	Muestra	Corte inferior	Corte superior
	AMPure	188	389
	pH 8.8	170	417
	pH 8.9	178	405
	pH 9.0	146	391
Véanse también los resultados mostrados en las Fig. 4a y 4b.			
PEG al 22%; NaCl 2M; MgCl ₂ 20 mM; AMPD 200 mM; pH 8,8, pH 8,9 o pH 9,0	Muestra	Corte inferior	Corte superior
	AMPure	199	373
	pH 8.8	185	604
	pH 8.9	180	549
	pH 9.0	183	524
Véanse también los resultados mostrados en las Fig. 5a y 5b.			

PEG al 22%; NaCl 2M; MgCl ₂ 20 mM; TAPS 200 mM; pH 8,9 o pH 9,0	Muestra	Corte inferior	Corte superior
	AMPure	190	372
	pH 8.9	192	917
	pH 9.0	175	715
Véanse también los resultados mostrados en las Fig. 6a y 6b.			
PEG al 22%; NaCl 2M; MgCl ₂ 20 mM; AMPSO 200 mM; pH 8,8; pH 8,9 o pH 9,0	Muestra	Corte inferior	Corte superior
	AMPure	182	377
PEG al 22%; NaCl 2M; MgCl ₂ 20 mM; AMPSO 250 mM; pH 8,8; pH 8,9 o pH 9,0	200 mM, pH 8.8	188	403
	250 mM, pH 8.8	178	438
	300 mM, pH 8.8	199	456
PEG al 22%; NaCl 2M; MgCl ₂ 20 mM; AMPSO 300 mM; pH 8,8; pH 8,9 o pH 9,0	350 mM, pH 8.8	159	425
	400 mM, pH 8.8	160	429
PEG al 22%; NaCl 2M; MgCl ₂ 20 mM; AMPSO 350 mM; pH 8,8; pH 8,9 o pH 9,0	200 mM, pH 8.9	152	379
	250 mM, pH 8.9	161	413
	300 mM, pH 8.9	181	435
PEG al 22%; NaCl 2M; MgCl ₂ 20 mM; AMPSO 400 mM; pH 8,8; pH 8,9 o pH 9,0	350 mM, pH 8.9	140	359
	400 mM, pH 8.9	132	349
	200 mM, pH 9.0	137	356
	250 mM, pH 9.0	148	388
	300 mM, pH 9.0	156	440
	350 mM, pH 9.0	121	313
	400 mM, pH 9.0	118	289
Véanse también los resultados mostrados en la Fig. 7.			
PEG al 22%; NaCl 2M; MgCl ₂ 20 mM; Tris 400 mM; (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM; pH 8,86;	Muestra	Corte inferior	Corte superior
	AMPure	187	368
	Tris 400 mM + NH ₄ SO ₄	145	338
Véanse también los resultados mostrados en la Fig. 8.			
PEG al 22%; NaCl 2M; MgCl ₂ 20 mM; Tris 400 mM; (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM; pH 8,86;	Muestra	Corte inferior	Corte superior
	AMPure	191	352
PEG al 22%; NaCl 2M; MgCl ₂ 20 mM; Tris 450 mM; (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM; pH 8,85;	Tris 400 mM + (NH ₄) ₂ SO ₄	150	333
PEG al 22%; NaCl 2M; MgCl ₂ 20 mM; Tris 500 mM; (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM; pH 8,85;	Tris 400 mM + (NH ₄) ₂ SO ₄	163	374
	Tris 450 mM + (NH ₄) ₂ SO ₄	126	281
	Tris 500 mM + (NH ₄) ₂ SO ₄	147	337
Véanse también los resultados mostrados en la Fig. 9.			

Los resultados demuestran que se pueden usar diversos tampones de unión en el método según la invención y proporcionan buenos resultados cuando se usa una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar para la unión de ácidos nucleicos. El método de la invención es rentable y robusto y, por lo tanto, realiza una importante contribución a la técnica.

5. Ejemplo 5

El ejemplo muestra la limpieza y la selección por tamaño en un flujo de trabajo de preparación de bibliotecas de NGS (secuenciación dirigida).

Diseño experimental:

El DNA genómico humano se utilizó como material de muestra para generar un panel de secuenciación de DNA que

es un conjunto de amplicones de PCR según lo definido por el "Actionable Insights Tumor Panel" (GRTP-101X-12). Este panel de genes es un conjunto de cebadores de PCR para amplificar un conjunto de regiones dentro de los genes relevantes relacionados con el cáncer para permitir la secuenciación dirigida de estas regiones de DNA. La PCR multiple para amplificar las regiones de este panel de genes se realizó según "QIAact Gene Panels Handbook" (diciembre de 2015; QIAGEN).

A continuación, el DNA del panel de genes amplificado se sometió a un protocolo de limpieza y selección por tamaño para eliminar los cebadores no deseados, los productos de amplificación inespecíficos y otras impurezas.

Detalles del protocolo:

- 1) A 100 µl de DNA (producto de PCR no purificado), se añaden 30 µl de MagAttract Suspension G forense sin diluir (QIAGEN) a la muestra, hasta que el volumen total sea de 130 µl.
- 2) Añadir tampón de selección por tamaño a la muestra hasta una concentración del 46%*, mezclar.
- 3) Incubar a temperatura ambiente con agitación durante 20 min.
- 4) Separar las perlas de la suspensión mediante una rejilla magnética. Transferir el sobrenadante y desechar las perlas.
- 5) Añadir 30 µl de perlas MagAttract G forenses sin diluir al sobrenadante de la etapa 4.
- 6) Añadir tampón de selección por tamaño a una concentración del 70%*, mezclar.
- 7) Incubar a temperatura ambiente con agitación durante 20 min.
- 8) Separar las perlas de la suspensión en una rejilla magnética. Retirar y desechar el sobrenadante.
- 9) Añadir 500 µl de etanol al 80 % a las perlas y mezclar.
- 10) Incubar a temperatura ambiente con agitación durante 5 min.
- 11) Separar las perlas de la suspensión en un soporte magnético. Retirar y desechar el sobrenadante.
- 12) Repetir las etapas 9-11 una vez.
- 13) Secar al aire las perlas durante 20 minutos.
- 14) Añadir 50 µl de tampón de elución a las perlas. Mezclar por vortex.
- 15) Incubar a temperatura ambiente con agitación durante 5 min.
- 16) Separar las perlas de la suspensión en una rejilla magnética.
- 17) Transferir ≈ 50 µl de eluato a un tubo nuevo.

*porcentaje de tampón de selección por tamaño en la mezcla de unión

Tampones de selección por tamaño utilizados:

Tampones de selección por tamaño utilizados - composición general:

PEG 6000	22%
NaCl	2 M
MgCl ₂	20 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM
agente de tamponamiento (pH 9,0 – 9,3)	250 mM

Agentes de tamponamiento utilizados:

- 1) CAPSO (ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico),
- 2) AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol)
- 3) CHES (ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico)

4) TAPS (ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-3-aminopropanosulfónico)

Los tampones respectivos se ajustaron a diferentes valores de pH de 9,0 a 9,3 como se indica más adelante.

Para determinar la estabilidad de las 4 variantes probadas del tampón de selección por tamaño, los tampones se almacenaron durante 6 meses a 25°C después de recién preparados y después se usaron para el protocolo de limpieza de DNA y selección por tamaño (Resultados 2 a 4). Como una referencia, se probaron tampones recién preparados usando CAPSO y CHES como agentes de tamponamiento (Resultados 1).

Después de la limpieza, el DNA se analizó utilizando un sistema de electroforesis capilar Agilent Bioanalyzer según las instrucciones del fabricante.

La tasa de recuperación de DNA se calculó en función de la cantidad de DNA que se sometió al protocolo de limpieza y la cantidad de DNA del panel de genes en el intervalo de tamaño diana (como se determinó utilizando el software Agilent BioAnalyzer).

Resultados 1 - Tampón de selección por tamaño con CAPSO/CHES (recién preparado):

Se probaron tampones recién hechos usando CAPSO y CHES como agentes de tamponamiento. Usando CAPSO o CHES, el pH del tampón de selección por tamaño se ajustó a 9,0, 9,1, 9,2, respectivamente. Después de completar el protocolo de selección de tamaño y limpieza de DNA (descrito anteriormente), el DNA se analizó y cuantificó utilizando el Agilent BioAnalyzer. Los resultados se muestran en la Figura 10a. La figura muestra una imagen similar a un gel de Agilent BioAnalyzer obtenida para una escala (L) y para muestras de DNA del panel de genes. Las muestras 1-6 se analizaron después de la limpieza y selección por tamaño. La muestra 7 es DNA del panel de genes antes de la limpieza, diluida 1:100.

Muestra 1	GP CAPSO pH 9,0
Muestra 2	GP CAPSO pH 9,1
Muestra 3	GP CAPSO pH 9,2
Muestra 4	GP CHES pH 9,0
Muestra 5	GP CHES pH 9,1
Muestra 6	GP CHES pH 9,2
Muestra 7	GP antes de la limpieza diluida 1:100

Como se puede ver en una comparación de la pureza del DNA del panel de genes purificado (muestras 1-6) con el DNA no purificado diluido 100 veces (muestra 7), el protocolo de selección por tamaño es muy adecuado para purificar el DNA que se deriva de una reacción de PCR altamente multiplexada, ya que normalmente se usa para amplificar un conjunto de regiones de DNA para aplicaciones de secuenciación de nueva generación, por ejemplo, en una aplicación de perfil genético de cáncer.

La Figura 10b muestra la tasa de recuperación de DNA (%) calculada para las muestras de DNA del panel de genes 1-6 como se describe anteriormente.

Resultados 2 a 4 - Tampones de selección por tamaño con CAPSO, AMPD, CHES o TAPS (6 meses de almacenamiento):

Para determinar la estabilidad de las 4 variantes probadas del tampón de selección por tamaño (descrito anteriormente, que comprende CAPSO, AMPD, CHES o TAPS como agentes de tamponamiento), los tampones se almacenaron durante 6 meses a 25°C después de que fuesen recién preparados y después se usó para el protocolo de selección por tamaño y limpieza de DNA. Los resultados obtenidos para los agentes de tamponamiento individuales se proporcionan a continuación y en las Figuras 11-14.

Resultados 2 - Tampón de selección por tamaño con CAPSO (6 meses de almacenamiento):

Los tampones de selección por tamaño con CAPSO como agente de tamponamiento (pH 9,0/9,1/9,2) se probaron en tres réplicas cada uno. Después de completar el protocolo de selección por tamaño y limpieza de DNA (descrito anteriormente), el DNA se analizó utilizando el Agilent BioAnalyzer. Los resultados de la electroforesis capilar en gel del Agilent BioAnalyzer se muestran en la Figura 11a. La figura muestra una imagen similar a un gel de Agilent BioAnalyzer obtenida para una escala (L) y para las muestras 1-9 del DNA del panel de genes:

Muestra 1	GP CAPSO 9,0	25°C
Muestra 2	GP CAPSO 9,0	25°C
Muestra 3	GP CAPSO 9,0	25°C
Muestra 4	GP CAPSO 9,1	25°C
Muestra 5	GP CAPSO 9,1	25°C
Muestra 6	GP CAPSO 9,1	25°C
Muestra 7	GP CAPSO 9,2	25°C
Muestra 8	GP CAPSO 9,2	25°C
Muestra 9	GP CAPSO 9,2	25°C

La Figura 11b muestra la tasa de recuperación de DNA (%) calculada para las muestras de DNA del panel de genes 1-9.

Resultados 3 - Tampón de selección por tamaño con AMPD (6 meses de almacenamiento):

- 5 Los tampones de selección por tamaño con AMPD como agente de tamponamiento (pH 9,0/9,1) se probaron en tres réplicas cada uno. Después de completar el protocolo de selección por tamaño y limpieza de DNA (descrito anteriormente), el DNA se analizó utilizando el Agilent BioAnalyzer. Los resultados de la electroforesis capilar en gel del Agilent BioAnalyzer se muestran en la Figura 12a. La figura muestra una imagen similar a un gel de Agilent BioAnalyzer obtenida para una escala (L) y para las muestras 1-6 del panel de genes de DNA:

Muestra 1	AMP GP 9,0	25°C
Muestra 2	AMP GP 9,0	25°C
Muestra 3	AMP GP 9,0	25°C
Muestra 4	AMP GP 9,1	25°C
Muestra 5	AMP GP 9,1	25°C
Muestra 6	AMP GP 9,1	25°C

- 10 La Figura 12b muestra la tasa de recuperación de DNA (%) calculada para las muestras de DNA del panel de genes 1-6.

Resultados 4 - Tampón de selección por tamaño con CHES (6 meses de almacenamiento):

- 15 El tampón de selección por tamaño con CHES como agente de tamponamiento (pH 9,0/9,1/9,2) se probó en tres réplicas cada uno. Después de completar el protocolo de selección por tamaño y limpieza de DNA (descrito anteriormente), el DNA se analizó utilizando el Agilent BioAnalyzer. Los resultados de la electroforesis capilar en gel del Agilent BioAnalyzer se muestran en la Figura 13a. La figura muestra una imagen similar a un gel de Agilent BioAnalyzer obtenida para una escala (L) y para las muestras 1-9 del panel de genes de DNA:

Muestra 1	GP CHES 9,0	25°C
Muestra 2	GP CHES 9,0	25°C
Muestra 3	GP CHES 9,0	25°C
Muestra 4	GP CHES 9,1	25°C
Muestra 5	GP CHES 9,1	25°C
Muestra 6	GP CHES 9,1	25°C
Muestra 7	GP CHES 9,2	25°C
Muestra 8	GP CHES 9,2	25°C
Muestra 9	GP CHES 9,2	25°C

La Figura 13b muestra la tasa de recuperación de DNA (%) calculada para las muestras de DNA del panel de genes 1-9.

Resultados 5 - Tampón de selección por tamaño con TAPS (6 meses de almacenamiento):

El tampón de selección por tamaño con TAPS como agente de tamponamiento (pH 9,0/9,3) se probó en tres réplicas cada uno. Después de completar el protocolo de selección por tamaño y limpieza de DNA (descrito anteriormente), el DNA se analizó utilizando el Agilent BioAnalyzer. Los resultados de la electroforesis capilar en gel del Agilent BioAnalyzer se muestran en la Figura 14a. La figura muestra una imagen similar a un gel de Agilent BioAnalyzer obtenida para una escala (L) y para las muestras 1-6 del panel de genes de DNA:

5

Muestra 1	GP TAPS 9,0	25°C
Muestra 2	GP TAPS 9,0	25°C
Muestra 3	GP TAPS 9,0	25°C
Muestra 4	GP TAPS 9,3	25°C
Muestra 5	GP TAPS 9,3	25°C
Muestra 6	GP TAPS 9,3	25°C

La Figura 14b muestra la tasa de recuperación de DNA (%) calculada para las muestras de DNA del panel de genes 1-6.

Conclusiones:

10 Los cuatro agentes de tamponamiento probados son adecuados para un tampón de selección por tamaño de DNA para unir el DNA a una superficie de sílice de una manera dependiente del tamaño.

Como se muestra en la sección "Resultados 1" (comparación de la pureza del DNA del panel de genes purificado frente al DNA sin purificar diluido 100 veces), el protocolo de selección por tamaño es muy adecuado para purificar el DNA que se deriva de una reacción de PCR altamente multiplexada, como se utiliza normalmente para amplificar un conjunto de regiones de DNA para aplicaciones de secuenciación de nueva generación, por ejemplo, en una aplicación de perfiles genéticos de cáncer.

15

La recuperación de DNA mejora a pH alcalino. Un pH de 9,2 o 9,3 conduce a tasas de recuperación de DNA aún más altas que a un pH de 9,0.

20

Se encontró que las variantes del tampón probadas funcionaban bien. Las variantes del tampón de selección por tamaño con

- CAPSO, pH 9,2
- AMPD, pH 9,1
- CHES, pH 9,2
- TAPS, pH 9,3

25

muestran las tasas de recuperación de DNA más altas después de 6 meses de almacenamiento a 25°C (Resultados 2 a 4). Las tasas de recuperación también son comparables a la tasa de recuperación de DNA obtenida con tampón de selección de tamaño recién preparado que contiene CAPSO o CHES (Resultados 1).

REIVINDICACIONES

1. Un método de aislamiento de DNA selectivo por tamaño basado en un polímero de poli(óxido de alquileo) para aislar moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima de un determinado valor de corte de una muestra que contiene DNA, que comprende

- 5 (a) preparar una mezcla de unión que comprende la muestra que contiene DNA, al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino y al menos un catión divalente, en donde la mezcla de unión comprende el catión divalente en una concentración de 3 mM a 75 mM, y en el que dicha mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5 y une las moléculas de DNA precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar,
- 10 proporcionando así una fase sólida que tiene moléculas de DNA unidas a ella que tienen un tamaño por encima del valor de corte, en el que, en las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte predominantemente no se unen a la fase sólida;
- (b) separar las moléculas de DNA unidas de la muestra restante;
 - opcionalmente, lavar las moléculas de DNA unidas; y
 - 15 - opcionalmente, eluir las moléculas de DNA unidas de la fase sólida.

2. El método según la reivindicación 1 para aislar moléculas de DNA diana que tienen un tamaño dentro de un determinado intervalo de tamaño que está determinado por un valor de corte superior y un valor de corte inferior de una muestra que contiene DNA, que comprende

- 20 (a) preparar una primera mezcla de unión que comprende la muestra que contiene DNA, al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino y al menos un catión divalente, en donde la mezcla de unión comprende el catión divalente en una concentración de 3 mM a 75 mM, y en el que dicha primera mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5 y une las moléculas de DNA precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene moléculas de DNA unidas a ella que tienen un tamaño por encima del valor de corte superior, en las que, bajo las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA diana que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte superior predominantemente no se unen a la fase sólida;
- 25 (b) separar las moléculas de DNA unidas de la muestra restante que comprende las moléculas de DNA diana;
- (c) preparar una segunda mezcla de unión que comprende la muestra restante, en donde dicha segunda mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5 y en donde la concentración del polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol en la segunda la mezcla de unión aumenta en comparación con la primera mezcla de unión y une las moléculas de DNA diana precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene moléculas de DNA diana unidas a la misma que tienen un tamaño por encima del valor de corte inferior, en donde bajo las condiciones de unión usadas, las moléculas de DNA que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte inferior predominantemente no se unen a la fase sólida;
- 30 (d) separar las moléculas de DNA diana unidas de la muestra restante;
 - opcionalmente, lavar las moléculas de DNA diana unidas; y
 - 35 - opcionalmente, eluir las moléculas de DNA diana unidas de la fase sólida.

40 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que en la etapa (a) se añade un tampón de unión a la muestra que contiene DNA para preparar la mezcla de unión, en el que el tampón de unión comprende el al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietileno glicol, el al menos un catión divalente y al menos un agente de tamponamiento, en donde dicho tampón de unión tiene un pH que se encuentra en un intervalo de 8,5 a 9,5, y en donde opcionalmente el tampón de unión comprende adicionalmente la al menos una sal de metal alcalino.

45 4. El método según la reivindicación 2 o 3, en el que en la etapa (c) se añade un tampón de unión a la muestra restante para preparar la segunda mezcla de unión, en donde el tampón de unión comprende el al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietileno glicol, al menos un catión divalente y al menos un agente de tamponamiento y en donde dicho tampón de unión tiene un pH que se encuentra en un intervalo de 8,5 a 9,5 y en donde opcionalmente el tampón de unión comprende adicionalmente al menos una sal de metal alcalino.

50 5. El método según la reivindicación 4, en el que se usa el mismo tampón de unión que en la etapa (a).

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la sal de metal alcalino tiene una o más de las siguientes características:

- a) la sal de metal alcalino es un haluro de metal alcalino;
 - b) la sal de metal alcalino es cloruro de sodio; y/o
 - c) la sal de metal alcalino está presente en la mezcla de unión en una concentración seleccionada de los intervalos de 250 mM a 2 M, 350 mM a 1,75 M, 500 mM a 1,5 M, 600 mM a 1,3 M y 650 mM a 1,25 M.
- 5 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el catión divalente tiene una o más de las siguientes características:
- a) el catión divalente se selecciona de Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} y preferiblemente es Mg^{2+} ;
 - b) el catión divalente está presente en la mezcla de unión en forma de una sal disuelta, en donde dicha sal es opcionalmente un haluro;
- 10 c) el catión divalente está presente en la mezcla de unión en forma de una sal disuelta que es cloruro de magnesio;
- d) el catión divalente está presente en la mezcla de unión en una concentración seleccionada de los intervalos de 4 mM a 50 mM, 5 mM a 40 mM, 5,5 mM a 35 mM, 6 mM a 30 mM, 6,5 mM a 25 mM, 7 mM a 20 mM y 7,5 mM a 15 mM; y/o
- 15 e) el catión divalente está presente en la mezcla de unión en forma de una sal disuelta y la mezcla de unión contiene además cloruro de sodio.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene una o más de las siguientes características:
- a) el polietilenglicol tiene un peso molecular que se selecciona de los intervalos de 2000 a 40000, 2500 a 30000, 3000 a 25000, 3500 a 20000, 4000 a 16000, 4500 a 12000 y 5000 a 10000;
- 20 b) el valor de corte se ajusta mediante la concentración del polietilenglicol en la mezcla de unión; y/o
- c) la mezcla de unión comprende el polietilenglicol en una concentración en un intervalo seleccionado de 6% a 20%, 7% a 17%, 7,5% a 15%, 8% a 13% y 8,5% a 12,5%.
- 25 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la mezcla de unión tiene un valor de pH que se encuentra en un intervalo seleccionado de 8,6 a 9,2 y/o en el que la mezcla de unión comprende al menos un agente de tamponamiento, preferiblemente en una concentración seleccionada de 25mM a 600mM, 50mM a 500mM, 60mM a 450, 70mM a 400mM, 80mM a 350mM, 90mM a 300mM y 100mM a 275mM.
- 30 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en el que las condiciones de unión se establecen exclusivamente mediante el tampón de unión que se pone en contacto con la muestra que contiene DNA y/o la muestra restante.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 o el método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 cuando depende de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el tampón de unión tiene una o más de las siguientes características:
- a) tiene un valor de pH que se encuentra en un intervalo seleccionado de 8,6 a 9,2;
- 35 b) comprende un agente de tamponamiento en una concentración seleccionada de 25 mM a 1 M, 50 mM a 750 mM, 75 mM a 700 mM, 100 mM a 650 mM, 125 mM a 600 mM, 150 mM a 550 mM, 175 mM a 525 mM y 200 mM a 500 mM;
- c) comprende la sal de metal alcalino en una concentración seleccionada de 0,5 M a 4 M, 0,7 M a 3,5 M, 1 M a 3 M, 1,2 M a 2,75 M y 1,3 M a 2,5 M;
- 40 d) comprende el polietilenglicol en una concentración seleccionada de 7% a 45%, 10% a 40%, 12,5% a 35%, 15% a 30%, 17,5% a 27,5% y 20% a 25%.
12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 o el método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 cuando depende de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el tampón de unión tiene las siguientes características:
- i) comprende Mg^{2+} como catión divalente, preferiblemente como $MgCl_2$;
- 45 ii) comprende polietilenglicol en una concentración seleccionada de 12,5% a 35%, 15% a 30%, 17,5% a 27,5% y 20% a 25%;

- iii) comprende la sal de metal alcalino, preferiblemente cloruro de sodio, en una concentración que se encuentra en el intervalo de 0,5 M a 2,75 M;
- iv) comprende el al menos un agente de tamponamiento en una concentración que se encuentra en un intervalo de 100 a 550 mM;
- 5 v) tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5 o de 8,6 a 9,2.

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 12, en el que el método se realiza de la siguiente manera:

- (a) preparar una mezcla de unión que comprende la muestra que contiene DNA, un polietilenglicol en una concentración que se encuentra en el intervalo de 7,5% a 15%, preferiblemente de 8% a 13%, y $MgCl_2$ en una concentración que se encuentra en el intervalo de 7 mM a 40 mM, preferiblemente de 8 mM a 20 mM, en donde dicha mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,25 y une las moléculas de DNA precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene unidas a ella moléculas de DNA que tienen un tamaño por encima del valor de corte, en donde, en las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte predominantemente no se unen a la fase sólida;
- (b) separar las moléculas de DNA unidas de la muestra restante;
 - opcionalmente, lavar las moléculas de DNA unidas; y
 - opcionalmente, eluir las moléculas de DNA unidas de la fase sólida.

14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, en el que el método se realiza de la siguiente manera:

- (a) preparar una primera mezcla de unión que comprende la muestra que contiene DNA, polietilenglicol en una concentración que se encuentra en el intervalo de 8,5% a 9,5% y $MgCl_2$ en una concentración que se encuentra en el intervalo de 7 mM a 40 mM, preferiblemente de 8 mM a 20 mM, en donde dicha mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,25 y une las moléculas de DNA precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene moléculas de DNA unidas a ella que tienen un tamaño por encima del valor de corte superior, en donde, en las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA diana que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte superior predominantemente no se unen a la fase sólida;
- (b) separar las moléculas de DNA unidas de la muestra restante que comprende las moléculas de DNA diana;
- (c) preparar una segunda mezcla de unión que comprende la muestra restante, en donde dicha segunda mezcla de unión tiene un pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,25 y en donde la concentración de polietilenglicol en la segunda mezcla de unión aumenta en comparación con la primera mezcla de unión y se encuentra en un intervalo de 10% a 12% y que une moléculas de DNA diana precipitadas a una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar, proporcionando así una fase sólida que tiene moléculas de DNA diana unidas a la misma, en donde, en las condiciones de unión utilizadas, las moléculas de DNA que tienen un tamaño que es menor que el valor de corte inferior predominantemente no se une a la fase sólida;
- (d) separar las moléculas de DNA diana unidas de la muestra restante;
 - opcionalmente, lavar las moléculas de DNA diana unidas; y
 - opcionalmente, eluir las moléculas de DNA diana unidas de la fase sólida.

15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para aislar las moléculas de DNA ligadas al adaptador como moléculas de DNA diana de una muestra que contiene DNA que es una muestra de ligación al adaptador y para eliminar monómeros adaptadores y productos de ligación adaptador-adaptador, en donde las moléculas de DNA ligadas al adaptador se separan de los monómeros adaptadores no ligados y de los productos de ligación adaptador-adaptador en base al tamaño más grande de las moléculas de DNA ligadas al adaptador.

16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la fase sólida tiene una o más de las siguientes características:

- a) la fase sólida proporciona una superficie silíceas;
- b) la fase sólida proporciona una superficie de sílice;
- 50 c) la fase sólida se proporciona en forma de una membrana, filtro, lámina o partículas;

d) la fase sólida se basa en una columna o se proporciona en forma de partículas magnéticas.

17. Un kit para el aislamiento selectivo por tamaño de moléculas de DNA diana que tienen un tamaño por encima de un valor de corte deseado de una muestra que contiene DNA, en el que el kit es adecuado para el método según la reivindicación 1, comprendiendo el kit

- 5 (a) un tampón de unión que comprende al menos un polímero de poli(óxido de alquileo) que es un polietilenglicol, al menos una sal de metal alcalino, al menos un catión divalente y al menos un agente de tamponamiento en el que el tampón de unión tiene un valor de pH que se encuentra en el intervalo de 8,5 a 9,5;
- (b) una fase sólida que tiene una superficie que contiene silicio sin modificar;
- (c) opcionalmente al menos una solución de lavado; y
- 10 (d) opcionalmente al menos una solución de elución.

18. El kit según la reivindicación 17, en el que el tampón de unión tiene una o más de las características especificadas en la reivindicación 11 y/o en el que la fase sólida tiene una o más de las características definidas en la reivindicación 16.

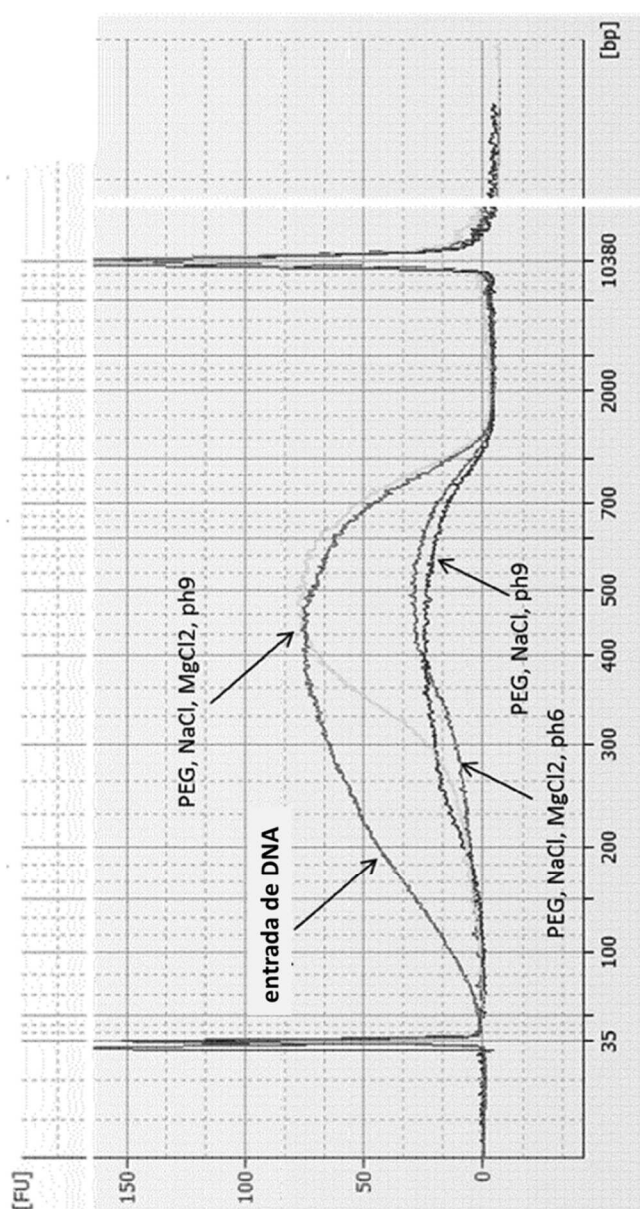


Fig. 1

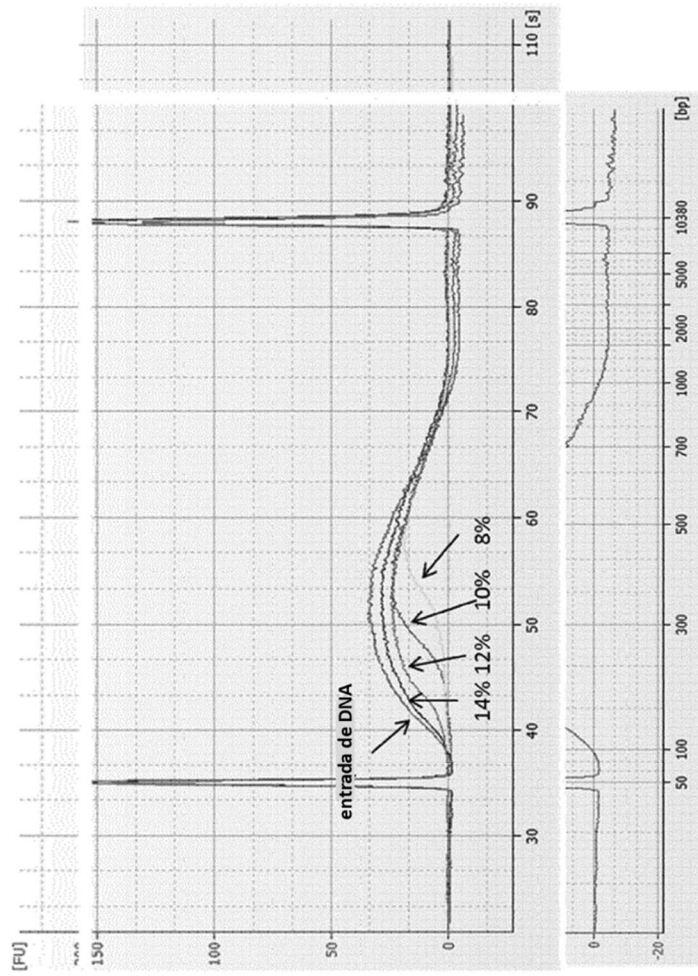


Fig. 2

Fig. 3

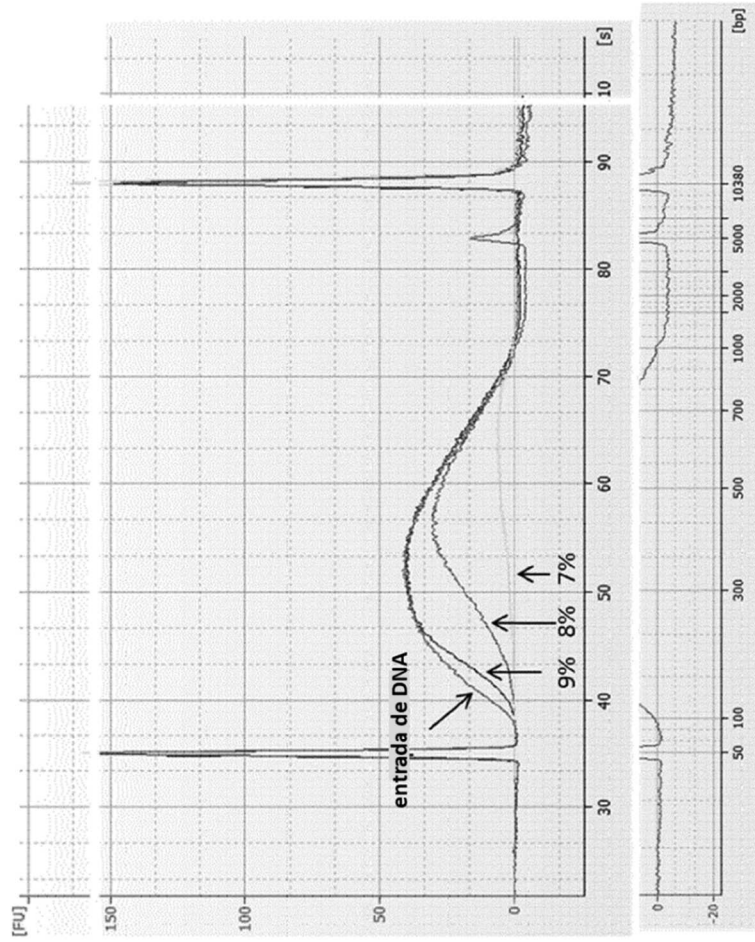


Fig. 4a

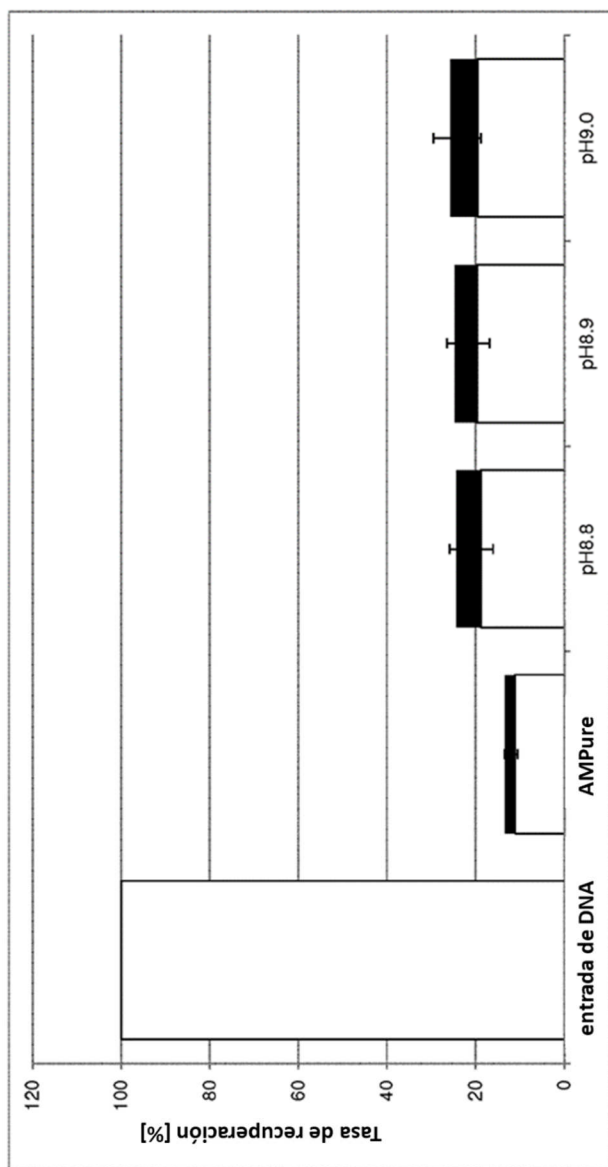


Fig. 4b

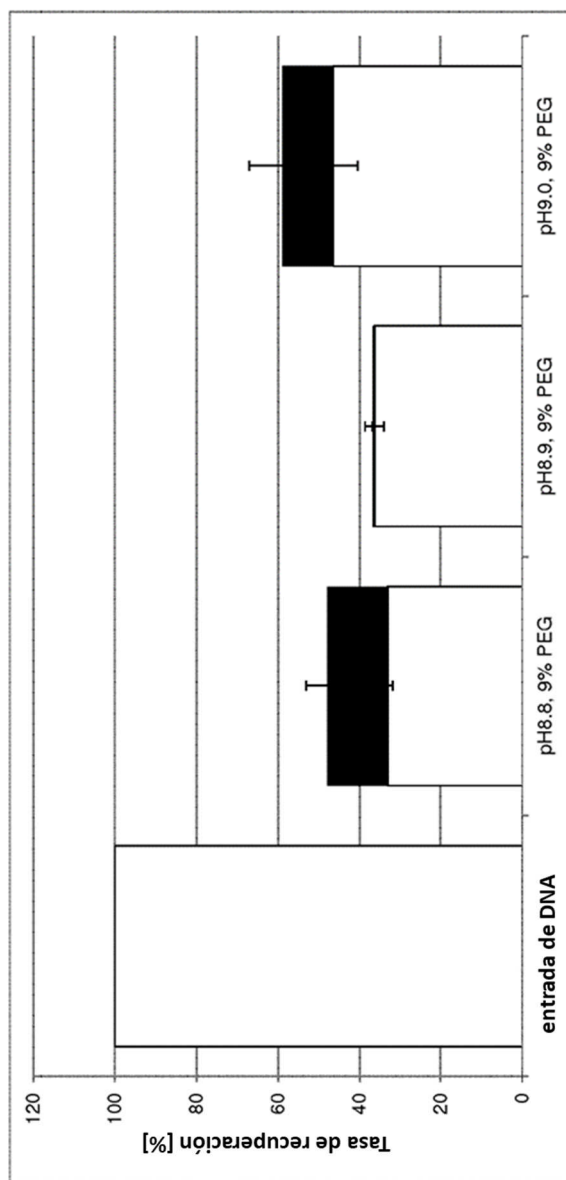


Fig. 5a

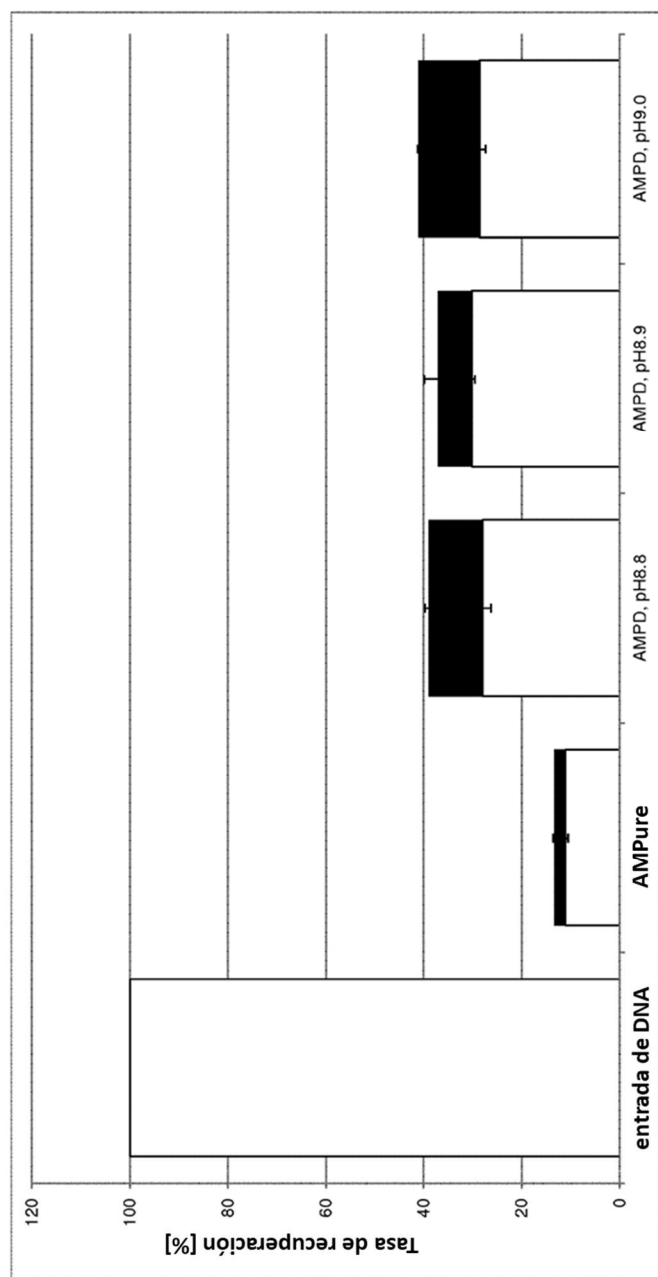


Fig. 5b

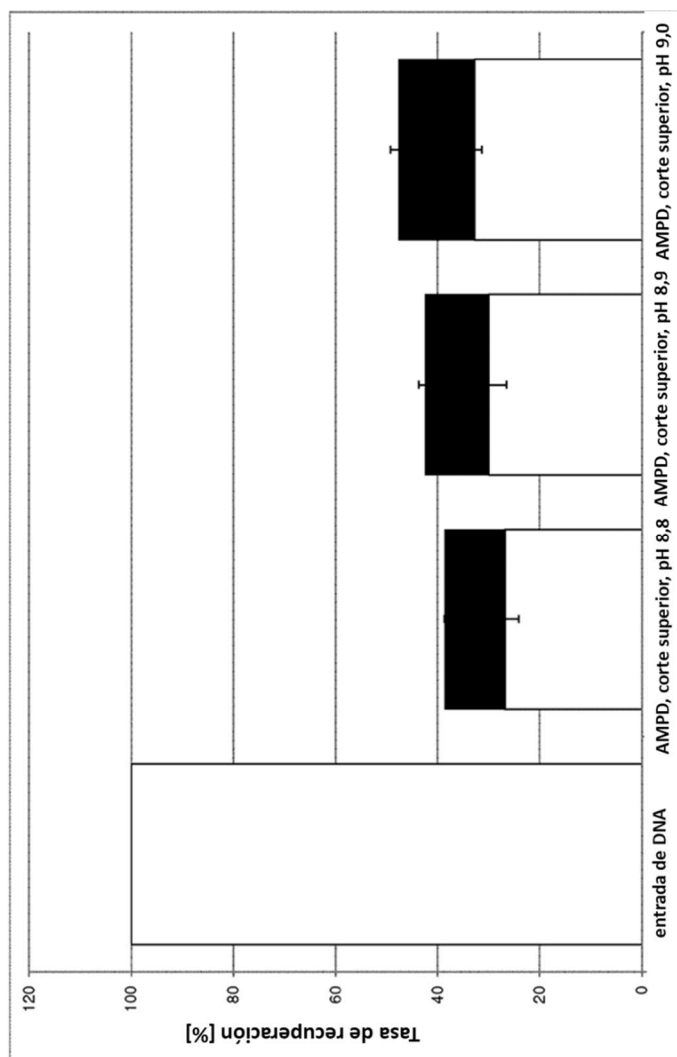


Fig. 6a

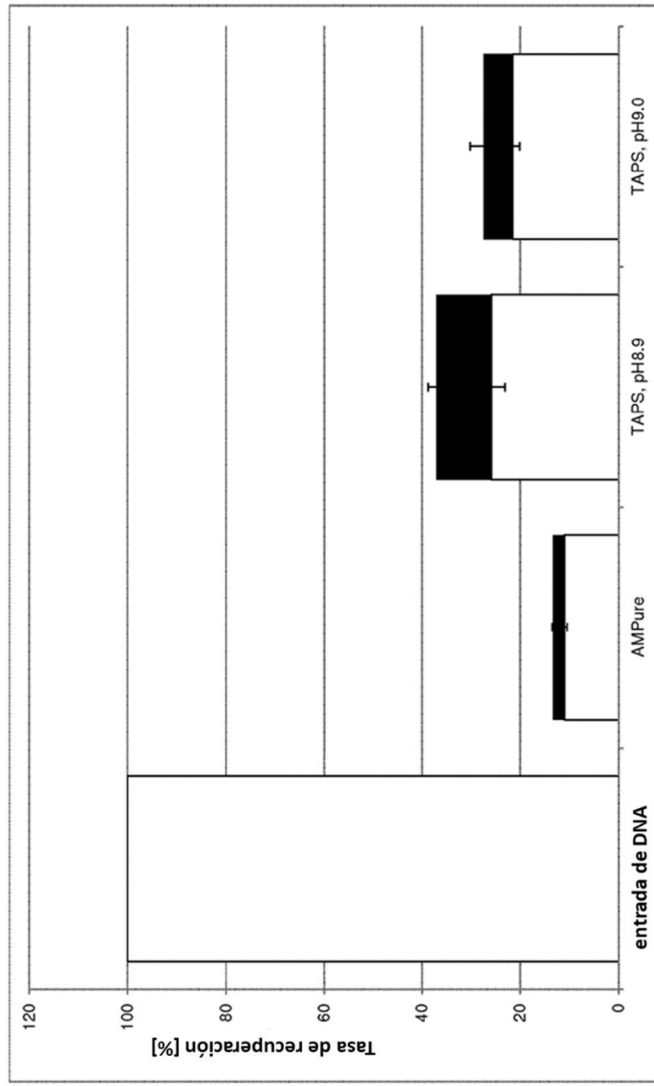


Fig. 6b

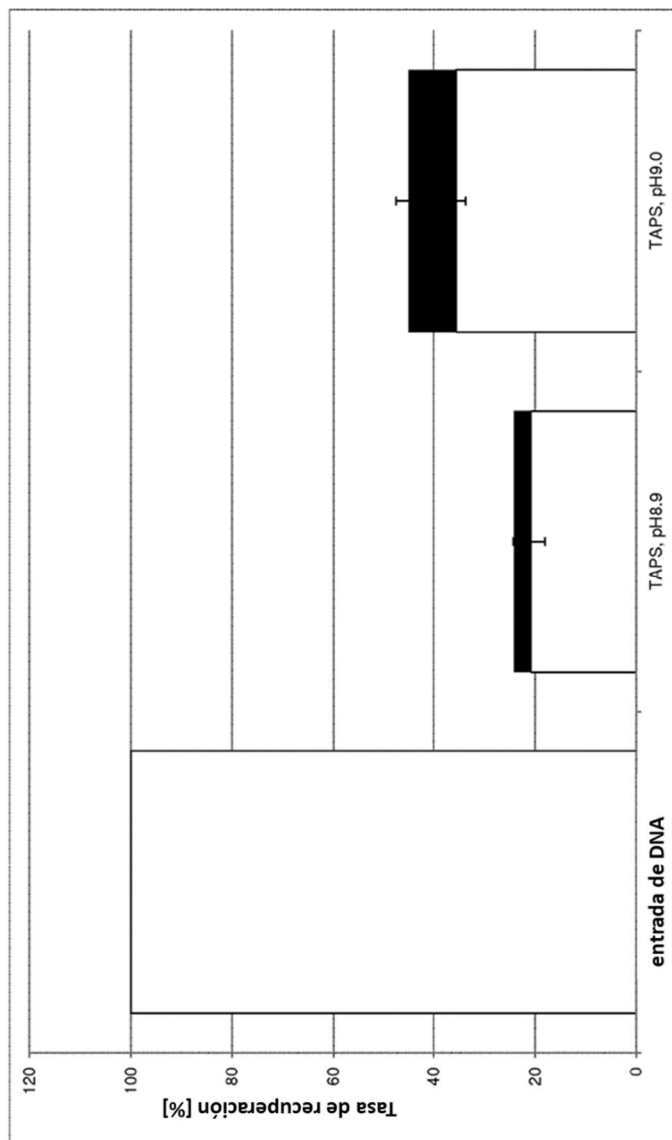


Fig. 7

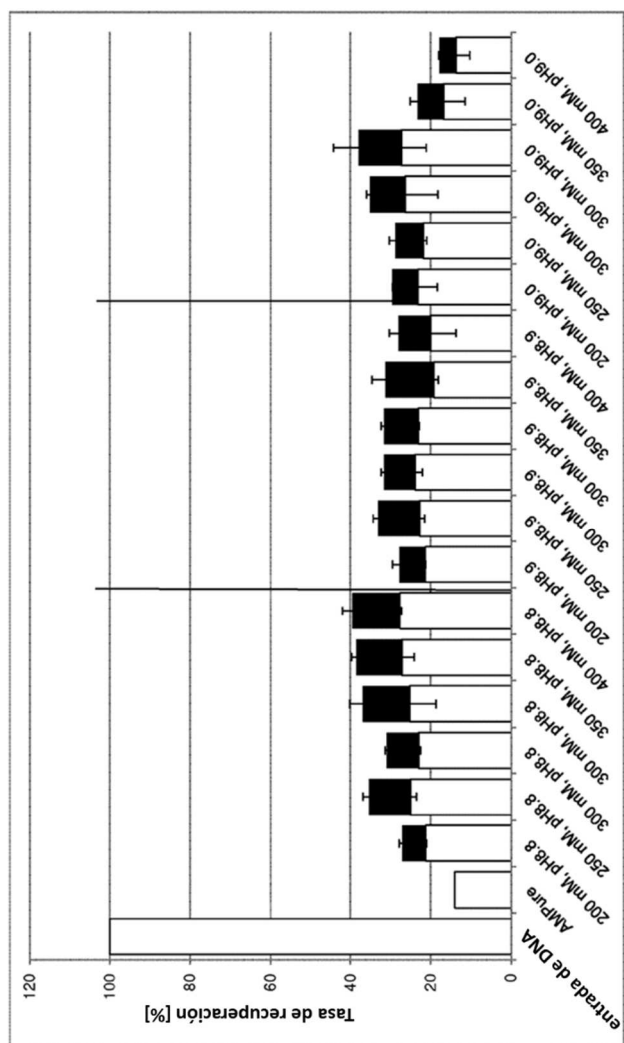


Fig. 8

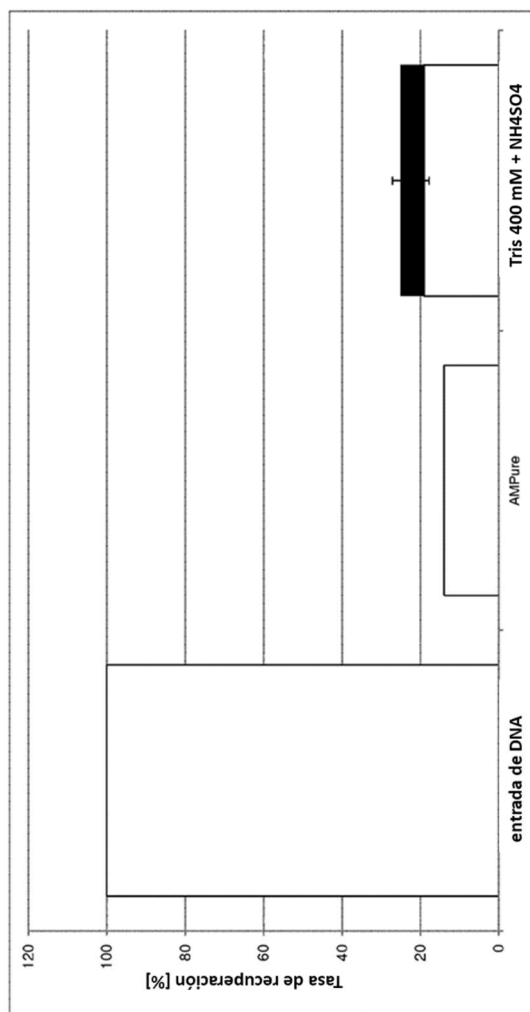


Fig. 9

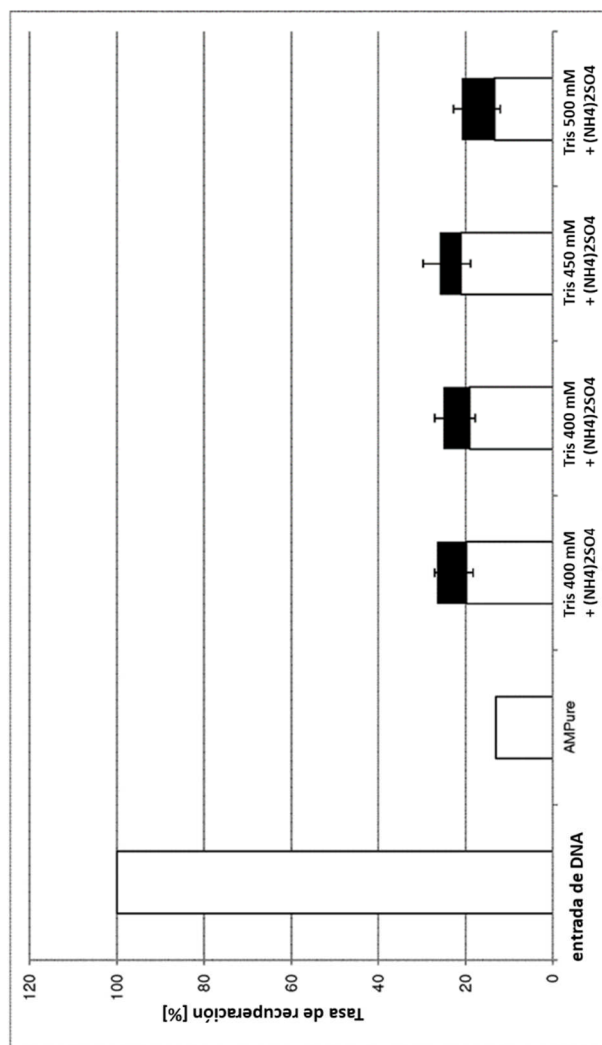
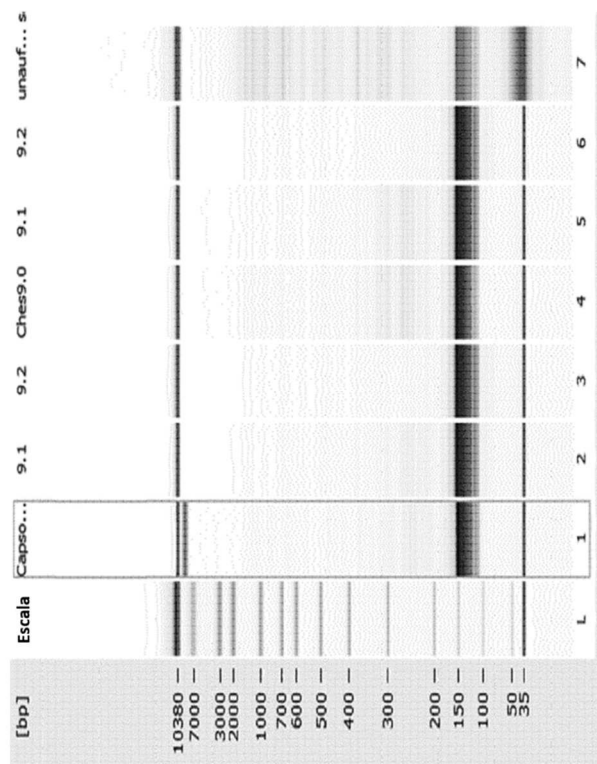


Fig. 10a



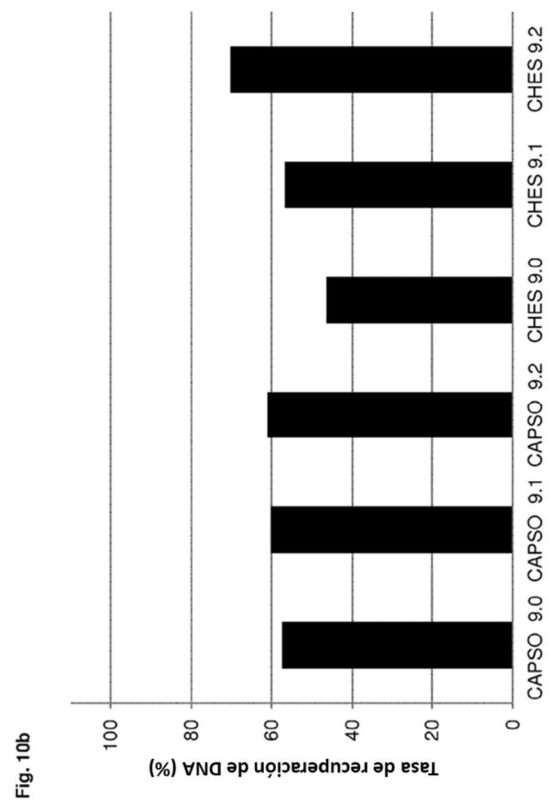
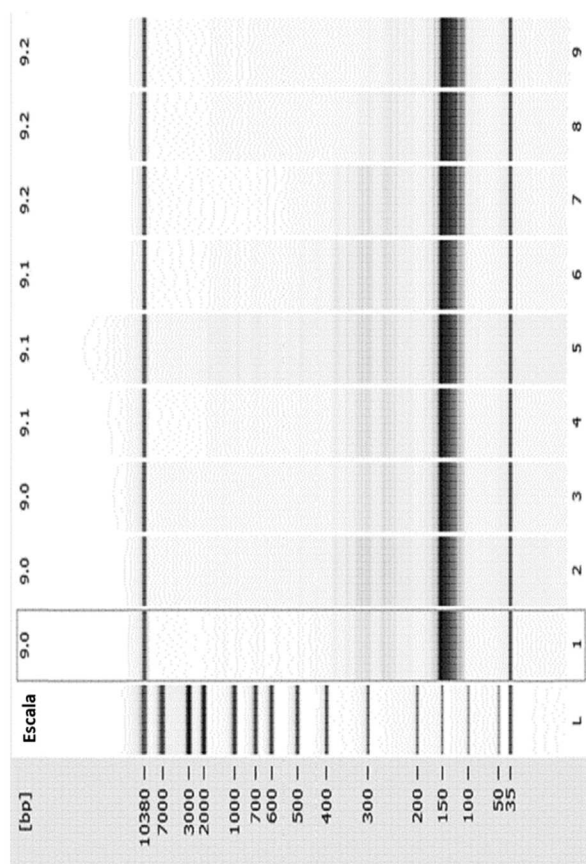


Fig. 11a



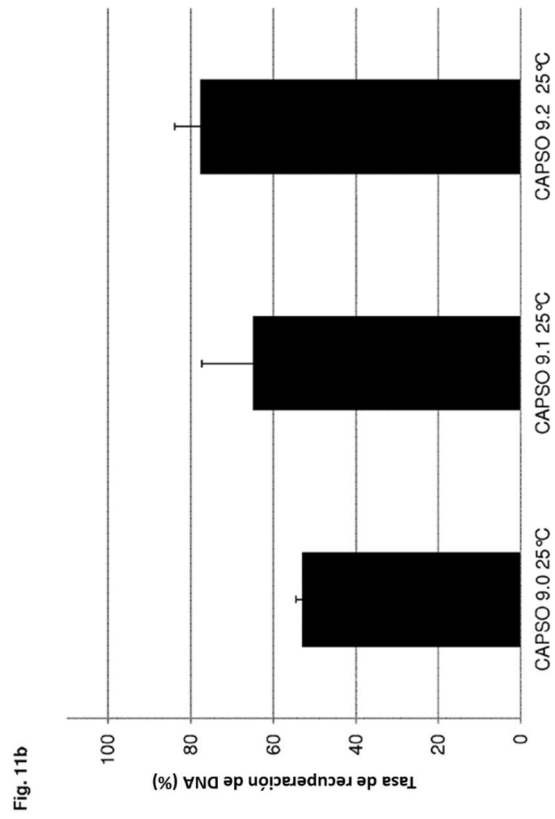


Fig. 12a

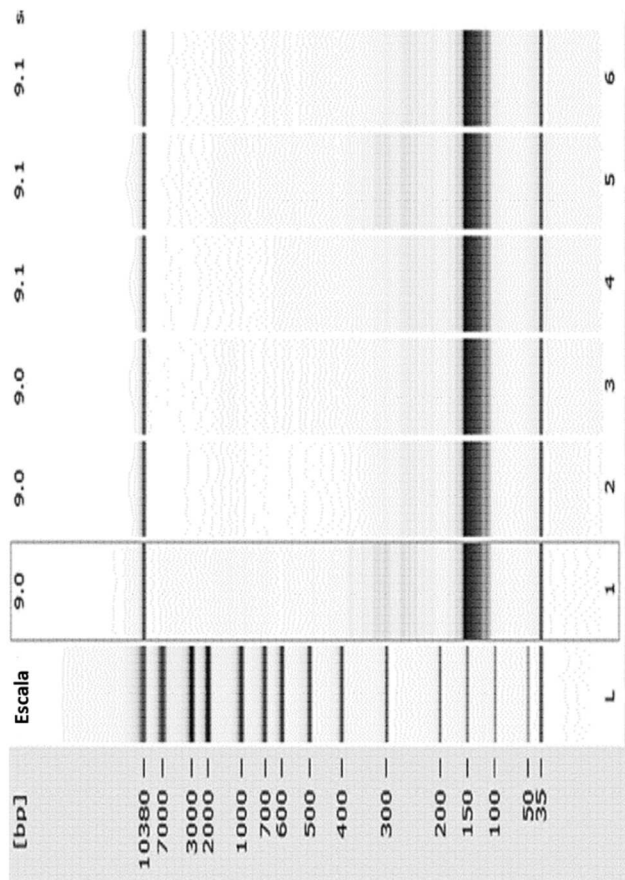


Fig. 12b

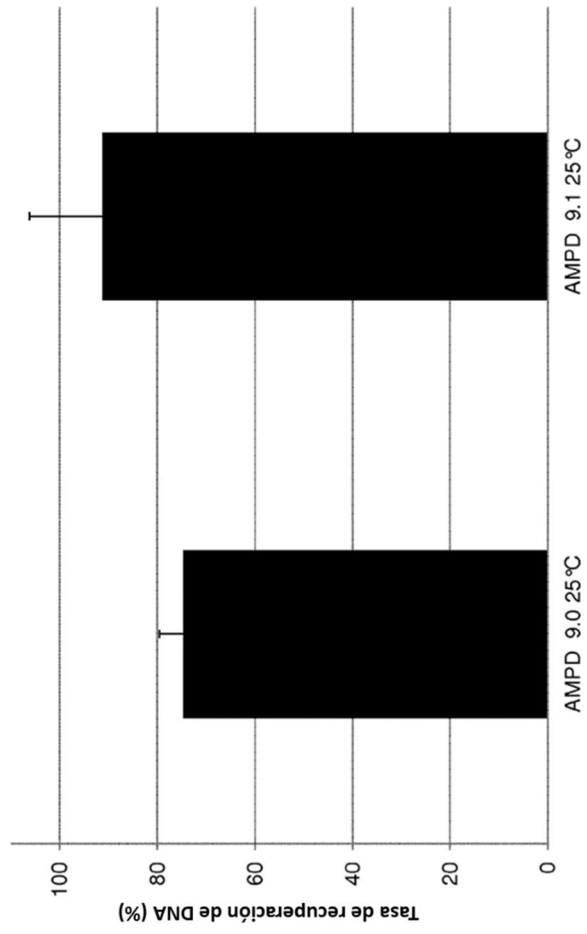


Fig. 13a

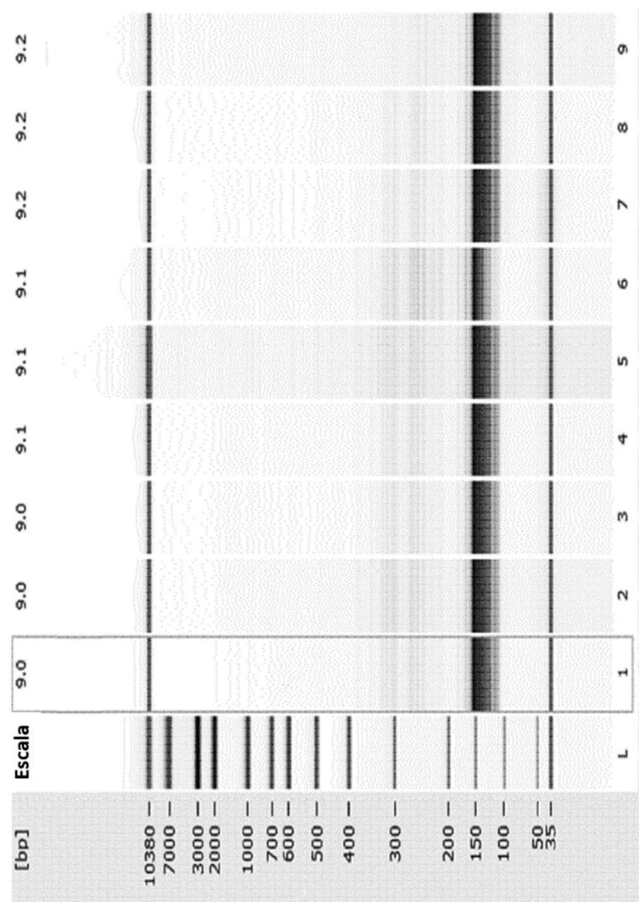


Fig. 13b

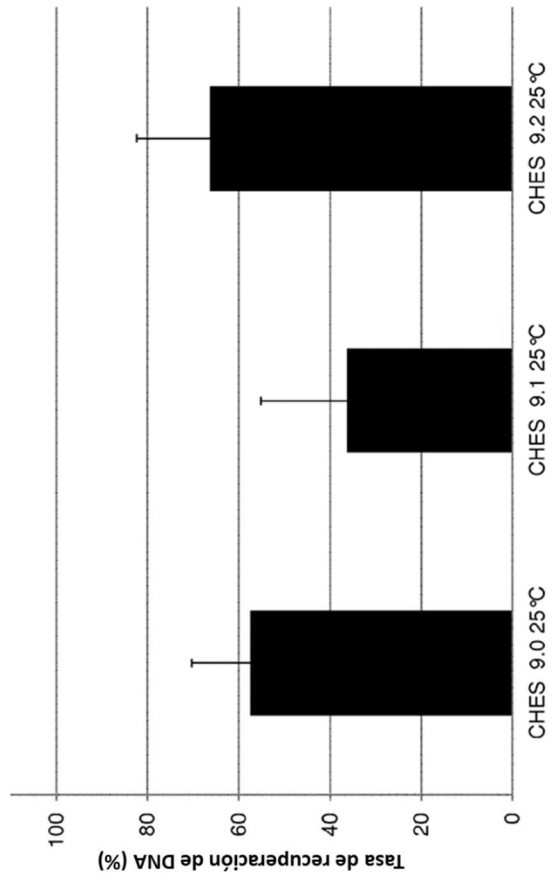


Fig. 14a

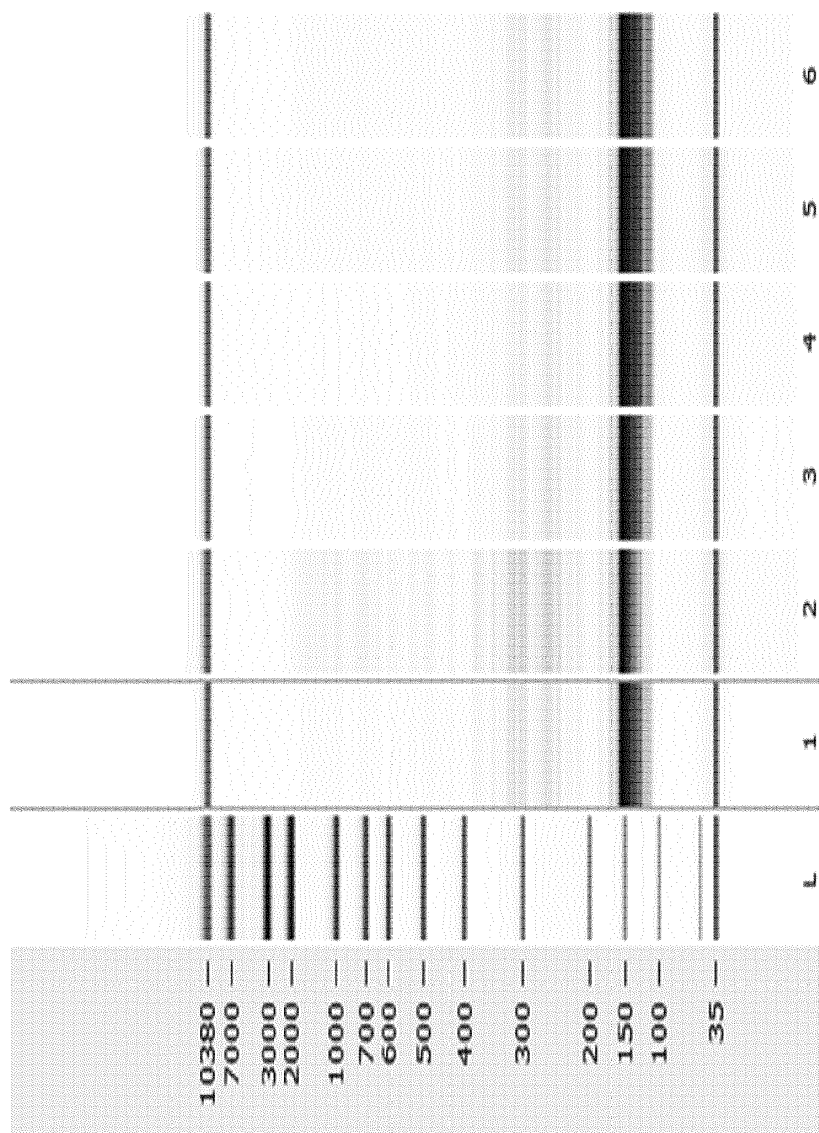


Fig. 14b

