



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 761**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06829945 .2**

96 Fecha de presentación : **06.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1951904**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2008**

54 Título: **Dispositivo y procedimiento para el aislamiento automático y la purificación de ácidos nucleicos a partir de materiales de partida complejos discrecionales.**

30 Prioridad: **06.11.2005 DE 10 2005 053 463**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2011

73 Titular/es: **AJ INNUSCREEN GmbH**
Robert-Roessle-Strasse 10
13125 Berlin, DE
AJ CYBERTRON GESELLSCHAFT FÜR
LABORAUTOMATIONSSYSTEME mbH

72 Inventor/es: **Timo, Hillebrand;**
Matthias, Arndt;
Uwe, Wellnitz;
Klaus, Berka y
Volker, Hillebrand

74 Agente: **Álvarez López, Fernando**

ES 2 360 761 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

Dispositivo y procedimiento para el aislamiento automático y la purificación de ácidos nucleicos a partir de materiales de partida complejos discrecionales

5

Es objeto de la invención un dispositivo y un procedimiento para el aislamiento automático de ácidos nucleicos a partir de materiales de partida lo más variados posibles que contienen ácidos nucleicos que tanto garantiza una calidad muy alta de los ácidos nucleicos que van a aislarse como también hace posible el aislamiento de rendimientos cuantitativos.

10

El aislamiento de ADN de células y tejidos se realiza bajo condiciones clásicas dado que los materiales de partida que contienen ácidos nucleicos son digeridos bajo condiciones fuertemente desnaturalizantes y reductoras, usando también parcialmente enzimas degradadoras de proteínas, las fracciones de ácidos nucleicos liberadas se purifican mediante etapas de extracción en fenol/cloroformo y los ácidos nucleicos se obtienen de la fase acuosa mediante diálisis o precipitación en etanol (Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., 1989, CSH, "Molecular Cloning").

15

Estos "procedimientos clásicos" para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de células y especialmente a partir de tejidos requieren mucho tiempo (en parte más de 48 h), requieren un gasto de aparatos considerable y además tampoco pueden realizarse bajo condiciones de campo. Además, tales procedimientos son peligrosos para la salud debido a los productos químicos usados como fenol y cloroformo en una cantidad significativa.

20

Distintos procedimientos alternativos para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de diferentes materiales de partida biológicos permiten evitar la costosa y peligrosa para la salud extracción en fenol/cloroformo de ácidos nucleicos, así como alcanzar una reducción de los costes de tiempo.

25

Todos estos procedimientos se basan en un procedimiento desarrollado y descrito por primera vez por Vogelstein y Gillespie (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 615-619) para la purificación preparativa y analítica de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa. El procedimiento combina la resolución de la agarosa que contienen las bandas de ADN que van a aislarse en una disolución saturada de una sal caotrópica (NaI) con una unión del ADN a partículas de vidrio. El ADN unido a las partículas de vidrio se lava a continuación con una disolución de lavado (Tris HCl 20 mM [pH 7,2]; NaCl 200 mM; EDTA 2 mM; 50% v/v de etanol) y después se separa de las partículas de soporte.

30

35

Hasta la fecha, este procedimiento ha experimentado una serie de modificaciones y actualmente se usa para diferentes procedimientos de extracción y purificación de ácidos nucleicos de fuentes diferentes (Marko, M.A., Chipperfield, R. y Bimboim, H.G., 1982, Anal. Biochem., 121, 382-387).

40

Además, actualmente también existe mundialmente una pluralidad de sistemas de reactivos, sobre todo para la purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa y para el aislamiento de ADN de plásmido a partir de lisados bacterianos, pero también para el aislamiento de ácidos nucleicos de cadenas más largas (ADN genómico, ARN total celular) de sangre, tejidos o también cultivos celulares.

45

Todos estos kits comercialmente disponibles se basan en el principio suficientemente conocido de la unión de ácidos nucleicos a soportes minerales en presencia de disoluciones de diferentes sales caotrópicas y como materiales de soporte usan suspensiones de polvo de vidrio finamente molido (por ejemplo, Glasmilk, BIO 101, La Jolla, CA), tierras de diatomeas (empresa Sigma) o también geles de sílice (Diagen, documento DE 41 39 664 A1).

50

Un procedimiento practicable para una pluralidad de diferentes aplicaciones para el aislamiento de ácidos nucleicos se describe en el documento US 5.234.809 (Boom). Allí se describe un procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de materiales de partida que contienen ácidos nucleicos mediante la incubación del material de partida con un tampón caotrópico y una fase sólida que se une a ADN. Los tampones caotrópicos realizan tanto la lisis del material de partida como también la unión de los ácidos nucleicos a la fase sólida. El procedimiento es muy adecuado para aislar ácidos nucleicos de pequeñas cantidades de muestra y encuentra su aplicación práctica especialmente en el sector del aislamiento de ácidos nucleicos víricos.

55

60

Modificaciones específicas de estos procedimientos se refieren a la utilización de novedosos materiales de soporte que muestran ventajas de aplicación para determinados problemas (documento WO-A 95/34569).

65

En las memorias de patente más nuevas se da a conocer que para la adsorción de ácidos nucleicos a los materiales de silicato conocidos y utilizados por el experto también pueden utilizarse muy eficientemente y satisfactoriamente las llamadas sales anticaotrópicas como constituyente de sistemas

de tampón de lisis/de unión (documento EP 1135479).

Al estado de la técnica también pertenece la memoria de patente de EE.UU. 6.207.445 B1 en la que se describe un dispositivo de filtración y extracción sencillo de utilizar para un fluido biológico que pone una muestra directamente a disposición de un procedimiento analítico. El dispositivo es capaz de poner un líquido clarificado directamente a disposición para un análisis o para una evacuación como es adecuado para el analito específico de interés, y es capaz de capturar materiales particulados y permite un procesamiento posterior, es decir, una extracción de estas partículas directamente con el dispositivo. Tan pronto como se ha extraído una vez, el dispositivo pone un líquido que contiene los analitos de interés a disposición de un procedimiento analítico. El dispositivo comprende un cuerpo flexible con un extremo superior abierto y una pared interna que define una cámara interna. Está dispuesto un mecanismo de cierre o de sellado para sellar el extremo superior abierto del cuerpo. Una disposición de filtro de gradiente que contiene al menos un filtro es soportado en el cuerpo mediante una disposición de soporte. El cuerpo flexible está dispuesto de forma que cuando es presionado por el dedo de un usuario genera una presión positiva en la cámara que es suficiente para hacer que un líquido fluya en la cámara por la disposición de filtro.

En la patente de EE.UU. 6.207.463 se describe un dispositivo para separar partículas magnéticas de una composición de sustancias. Este dispositivo contiene una envoltura protectora longitudinalmente extendida con un extremo superior y uno inferior, una zona interna rodeada por la envoltura protectora que se extiende desde su extremo superior hasta su extremo inferior, una barra magnética ajustable que está dispuesta en la zona interna, orientada en su dirección longitudinal.

En la solicitud de patente internacional WO2005/063831 A1 se describe un dispositivo para separar y purificar una suspensión con partículas magnéticas. Este dispositivo comprende un área de proceso con mecanismos que se mueven sincrónicamente para el transporte de las micropartículas magnéticas en la dirección x.

El análisis del estado de la técnica ilustra impresionantemente que existe una pluralidad de posibilidades para unir ácidos nucleicos a materiales de soporte sólidos, especialmente materiales de soporte minerales basados en silicio, lavarlos a continuación y desprender de nuevo los ácidos nucleicos del material de soporte.

Basándose en las tecnologías descritas para la unión de ácidos nucleicos a materiales de soporte sólidos existe una pluralidad de productos comercialmente disponibles que permiten al usuario aislar ácidos nucleicos de materiales de partida que contienen ácidos nucleicos. A este respecto son cada vez más interesantes las soluciones de procedimiento que permiten aislar y purificar de forma automatizada ácidos nucleicos. Esto se basa en reducir el considerable gasto manual o también en poder realizar altos rendimientos de extracciones de ácidos nucleicos. Estos requisitos tienen en cuenta que existen soluciones basadas en robots o máquinas para el aislamiento de ácidos nucleicos. A este respecto se trata generalmente de configuraciones de aparatos muy costosas que hacen posible un aislamiento de ácidos nucleicos. Generalmente pueden diferenciarse dos configuraciones de sistemas.

1. Procedimientos automatizados para aislar ácidos nucleicos utilizando placas de filtración de 96 pocillos para la unión de los ácidos nucleicos.
2. Procedimientos automatizados para aislar ácidos nucleicos utilizando partículas magnéticas para la unión de los ácidos nucleicos.

El proceso de aislamiento de los ácidos nucleicos se realiza a este respecto análogamente al procedimiento manual descrito. Después de la lisis del material de partida se realiza la unión de los ácidos nucleicos a los materiales de soporte sólidos respectivos (placa de filtración o partículas magnéticas), a continuación el lavado del ácido nucleico unido, secado de los materiales de soporte (eliminación de componentes alcohólicos) y elución de los ácidos nucleicos. A este respecto, el procesamiento de la extracción en el caso de uso de placas de filtración se realiza mediante vacío o mediante presión o usando partículas magnéticas mediante una separación magnética.

El objetivo de las estaciones robotizadas es, cuando sea posible, reproducir de forma automatizada todas las etapas de procedimiento necesarias de una extracción de ácidos nucleicos. A este respecto, esto se realiza mediante costosas etapas de pipeteado mediante mecanismos de dispensación que deben manipular los diferentes componentes de tampones, estaciones de vacío para la filtración o separadores magnéticos para el uso de partículas magnéticas, dado el caso la integración de la costosa técnica de centrifugación. También son necesarias unidades de calentamiento y unidades de agitación para ayudar en los procesos de lisis.

No obstante, sólo existen muy pocas máquinas altamente especializadas que permiten realizar todo el proceso de aislamiento de ácidos nucleicos. Además, estos aparatos no pueden utilizarse

frecuentemente de forma universal, sino siempre sólo optimizados para soluciones de aplicación altamente específicas. Otra desventaja extrema son costes enormemente altos para la adquisición de una máquina tal. Esto se agrava más por una utilización en parte extremadamente alta de materiales de consumo, especialmente de puntas de pipeta para las etapas de pipeteado necesarias. Así, en determinadas aplicaciones para el aislamiento de ácidos nucleicos mediante placas de filtración de 96 pocillos se necesitan parcialmente varios cientos de puntas de pipeta.

Sistemas más económicos son, por ejemplo, soluciones de aparatos que permiten aislar de forma parcialmente automatizada ácidos nucleicos mediante partículas magnéticas (por ejemplo, KingFisher (nombre comercial)). Estos aparatos se han desarrollado especialmente para el aislamiento de ácidos nucleicos y trabajan según un sencillo principio de "Walk-Away" (continuación). Las muestras que van a procesarse, así como las disoluciones tampón necesarias para las etapas unión-lavado-elución, se transfieren a cavidades de reacción, realizándose la separación de las partículas magnéticas mediante barras magnéticas que realizan paso a paso el proceso de aislamiento de ácidos nucleicos mediante la puesta en contacto de las partículas magnéticas con las diferentes disoluciones tampón. Un procedimiento más nuevo se da a conocer en la memoria de patente EP1382675. A este respecto, el proceso del aislamiento de ácidos nucleicos se realiza usando una membrana novedosa y extremadamente delgada. Esta membrana es constituyente de un cartucho de filtración. Esta unidad de filtración es la parte esencial de un aparato de extracción que realiza automatizadamente procesos parciales del aislamiento de ácidos nucleicos (unión-lavado-elución). A este respecto, el usuario introduce una muestra previamente lisada en la unidad de filtración. El paso de la muestra por la membrana de filtración puede realizarse mediante vacío. Las posteriores disoluciones de lavado se dispensan automatizadamente y se aspiran por la membrana. La etapa de elución se realiza de la misma forma después de la adición de un tampón de elución.

Estos últimos sistemas de aparato son mucho más económicos que los robots de extracción ya descritos.

Pero a este respecto, en estos sistemas es desventajoso el grado de automatización extremadamente bajo. Estos sistemas sólo automatizan etapas parciales de procedimientos para el aislamiento de ácidos nucleicos. El proceso total de la preparación de muestras y especialmente del análisis de muestras se realiza no se realiza mediante estos aparatos. La extracción automatizada se realiza sólo después de la lisis de la muestra. Además, la muestra lisada no es ni siquiera tomada automatizadamente por el aparato, sino que debe añadirse manualmente. El sistema KingFisher necesita además otras etapas que requieren tiempo y costosas para llenar todos los componentes de tampón en el plástico de reacción previsto para ellos.

Por tanto, el grado de automatización muy bajo representa una gran limitación del campo de utilización de estos aparatos.

Otro problema esencial en relación con una automatización de procedimientos para el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos especialmente a partir de materiales de partida complejos (tejido, cola de ratón, plantas, alimentos, muestras de heces, etc.) consiste en la necesaria separación de materiales de partida sin disolver después de realizarse la lisis. Hasta la fecha esto sólo puede conseguirse generalmente mediante una etapa de centrifugación para la sedimentación de los componentes sin disolver (tratamiento posterior con los sobrenadantes) o mediante una centrifugación mediante un filtro (tratamiento posterior con los filtrados). Como la integración de tales etapas de procedimiento es difícilmente posible en las máquinas usuales, la purificación automatizada de muestras problemáticas a este respecto no es posible o sólo puede realizarse insuficientemente.

El objetivo de la invención consistió en suprimir las desventajas mencionadas en el estado de la técnica.

El objetivo se alcanzó según las características de las reivindicaciones.

A este respecto, los procesos necesarios del aislamiento de ácidos nucleicos se realizaron de forma altamente automática, las cantidades de materiales de consumo necesarios se mantuvieron bajas, se procesaron volúmenes de muestra flexibles y se aceleró el proceso de aislamiento de los ácidos nucleicos.

Además, los ácidos nucleicos de muestras complejas difíciles, especialmente en lo referente a la presencia de componentes sin disolver sólidos, se automatizaron después de la lisis y se aislaron sin intervención manual adicional. Además, por primera vez se aisló simultáneamente y en paralelo tanto ADN genómico como también ARN total celular de una muestra.

El procedimiento según la invención y los dispositivos según la invención satisfacen de forma ideal los objetivos planteados.

La parte esencial del proceso de extracción es a este respecto una unidad de reacción que está compuesta por una parte superior y una inferior. La parte inferior de la unidad de reacción está constituida a este respecto por una cavidad de reacción con un inserto de rejilla de filtración permeable. Este inserto de rejilla de filtración sirve para la separación de componentes particulados después de la lisis de una muestra biológica compleja en el proceso de procedimiento que todavía va a describirse del procedimiento según la invención. Además, este inserto también sirve opcionalmente de superficie de apoyo para un material de soporte sólido para la unión de biomoléculas que van a separarse (por ejemplo, una tela de fibra de vidrio o una membrana). Esta variante se utiliza especialmente cuando a partir de una muestra biológica se aíslan simultáneamente el ADN genómico y el ARN total celular. La parte superior de la unidad de reacción está constituida por una cavidad de reacción en la que se proporciona una camisa de plástico. Además, la parte superior contiene un material de filtro para proteger de aerosoles. La unidad de reacción acabada se forma por la combinación de la parte superior y la parte inferior. Si se usa un material de filtro cromatográfico, entonces éste también se fija fijamente sobre el inserto de filtración por el contacto de la parte superior e inferior. A este respecto, la parte superior de la unidad de reacción fija el material de filtro. Después de la combinación de la parte superior e inferior la unidad de reacción está funcionalmente activa. La Figura 1 muestra la construcción de la unidad de reacción según la invención. El instrumento según la invención posee una función múltiple para el proceso que va a realizarse del aislamiento de ácidos nucleicos.

El instrumento sirve según la invención para:

1. una dispensación y pipeteado exactos de líquidos,
2. una separación de componentes sin disolver sólidos después de la lisis de la muestra que va a procesarse,
3. el aislamiento de ácidos nucleicos usando partículas magnéticas,
4. el aislamiento de ácidos nucleicos mediante su unión cromatográfica a un material de soporte sólido (como constituyente opcional de la unidad de reacción).

La unidad de reacción es a este respecto la parte esencial de una máquina. Está constituida por posiciones para la recepción de recipientes de reacción habituales en el comercio, así como de recipientes de almacenamiento para líquidos, así como por una posición de inserción para las unidades de reacción según la invención. Una posición de recipiente de reacción es posiblemente calefactable.

La máquina de extracción contiene además un dispositivo de aire aspirado o a presión. Esta unidad está acoplada a un cabezal dispensador que está adaptado exactamente a las unidades de reacción. La unidad de aire a presión está acoplada a una fuente de calor que también hace posible desprender aire calentado. En el cabezal dispensador se encuentra además una unidad cinemática para el movimiento vertical de agujas magnéticas. Además, la máquina de extracción contiene una interfaz para la comunicación con un ordenador que controla todas las secuencias de programa.

Un proceso según la invención de aislamiento de ácidos nucleicos, por ejemplo ADN genómico de una muestra biológica, se realiza del siguiente modo mediante el procedimiento según la invención. En general, el procesamiento de una muestra para el aislamiento y la purificación de ácidos nucleicos se realiza según el esquema de desarrollo general lisado-unión-lavado-elución. A este respecto, el proceso puede realizarse completamente automatizado. Todos los componentes de tampón necesarios para la extracción se encuentran en la máquina en los recipientes de almacenamiento o en los recipientes de reacción. Al principio de la extracción, la muestra que va a procesarse también se transfiere a recipientes de reacción y se coloca en la máquina. El procedimiento para el aislamiento de ácido nucleico se subdivide en los procesos de llenado de los recipientes de reacción, lisis de la muestra de partida y extracción de los ácidos nucleicos (mediante unión de los ácidos nucleicos a partículas magnéticas, lavado de los ácidos nucleicos unidos, secado de las partículas magnéticas y elución de los ácidos nucleicos). A este respecto, el proceso completo según la invención siempre se realiza sólo con una unidad de reacción por muestra que va a procesarse. Esto sirve en la función múltiple según la invención para la dispensación/pipeteado, dado el caso filtración y la extracción del ácido nucleico.

La invención se explicará a continuación mediante ejemplos, sin estar limitada a estos ejemplos.

Ejemplos de realización**Ejemplo 1:**

5

El proceso de extracción para el aislamiento, por ejemplo, de ADN genómico transcurre del siguiente modo:

10

A. Proceso de llenado de los recipientes de reacción

1. Recepción de las unidades de reacción por el cabezal dispensador.

2. Llenado de los recipientes de reacción con los tampones de los recipientes de almacenamiento.

15

A este respecto, la unidad de reacción hace de dispositivo de pipeteado clásico (aspiración de tampones y dispensación de tampones). El llenado se realiza según un esquema predeterminado en la técnica que siempre parte de la disolución con la menor concentración de sal, de manera que para el llenado de los recipientes de reacción sólo se trabaja con una unidad de reacción. Se llena según el siguiente orden: eluyente-tampón de lavado- tampón de lisis.

20

Estos componentes de tampón se encuentran todos en los recipientes de almacenamiento en la plataforma de la máquina.

25

3. Transferencia de la muestra al recipiente de reacción con tampón de lisis dispuesto.

B. Proceso de lisis del material de partida

30

1. La lisis de la muestra se realiza (dado el caso mediante acondicionamiento térmico conectado) mediante pipeteado arriba y abajo continuo repetido de la preparación de lisis mediante la unidad de reacción.

35

2. Después de la lisis se realiza la recepción del tampón de unión y de las partículas magnéticas mediante la unidad de reacción y la transferencia del tampón de unión y de las partículas magnéticas a la preparación de lisis. El tampón de unión con las partículas magnéticas no se encuentra a diferencia de los otros componentes de tampón en los recipientes de almacenamiento, sino en recipientes de reacción separados (esto es debido a que restos de muestra eventualmente presentes pueden ser arrastrados con la unidad de reacción en el tampón de unión y, por tanto, sirve para evitar una contaminación cruzada).

40

C. Extracción/dado el caso filtración de ácidos nucleicos de componentes sin disolver

1. Mezcla de la preparación de tampón de lisis / de unión y de las partículas magnéticas con la unidad de reacción (mediante pipeteado arriba y abajo).

45

2. Unión del ácido nucleico a las partículas magnéticas y posterior filtración de sustancias sin disolver, así como separación magnética. Esto se realiza mediante la aspiración de la muestra desde la parte inferior de la unidad de reacción por la rejilla de filtración a la parte superior de la unidad de reacción. Mediante este proceso, la muestra lisada (incluidas las partículas magnéticas) se transportan por la rejilla de filtración. La muestra lisada con las partículas magnéticas contenidas se encuentra ahora en la parte superior de la unidad de reacción. La separación magnética se realiza a continuación mediante la introducción de una aguja magnética del cabezal dispensador en la camisa de plástico de la parte superior de la unidad de reacción. En este proceso, las partículas magnéticas son extraídas por la aguja magnética sobre la camisa de plástico y permanecen en esta posición. Los componentes sin disolver eventualmente presentes en la muestra se encuentran en la parte inferior de la unidad de reacción. Después de la unión de las partículas magnéticas a la camisa de plástico, la muestra se devuelve a continuación de nuevo al recipiente de reacción de partida desde la parte superior de la unidad de reacción. Las partículas magnéticas con el ácido nucleico unido permanecen sobre la camisa de plástico.

50

55

60

65

3. Lavado del ácido nucleico unido a las partículas magnéticas. A este respecto, transferencia de la unidad de dispensación con la unidad de reacción a la siguiente fila de recipientes de reacción (con tampones de lavado contenidos). Esta transferencia puede realizarse tanto mediante un movimiento escalonado del cabezal dispensador como mediante el movimiento escalonado de los recipientes de reacción. En este caso, el cabezal dispensador es inmóvil. Después de realizarse la etapa cinemática, la unidad de reacción se encuentra sobre el recipiente de reacción con tampón de lavado contenido. A continuación, la unidad de reacción se sumerge en el recipiente de reacción con tampón de lavado y el tampón de lavado se aspira hasta la parte superior de la unidad de reacción. El lavado de las

partículas magnéticas se realiza sacando la aguja magnética. Así, las partículas magnéticas se liberan de la camisa de plástico y se mezclan eficientemente en el tampón de lavado (lavado) mediante aspiración y expulsión recíproca (dado el caso varias veces) del tampón de lavado desde la parte inferior de la unidad de reacción por el filtro a la parte superior de la unidad de reacción. La etapa de lavado termina cuando, después de la aspiración final del tampón de lavado en la parte superior de la unidad de reacción, la aguja magnética del cabezal dispensador se introduce a continuación en la camisa de plástico de la parte superior de la unidad de reacción, las partículas magnéticas son extraídas por la aguja magnética sobre la camisa de plástico y allí permanecen en esta posición. Finalmente, el tampón de lavado se devuelve al recipiente de reacción. Las etapas de lavado pueden repetirse varias veces mediante el movimiento relativo descrito de los recipientes de reacción con los tampones contenidos o mediante el movimiento del cabezal dispensador.

4. Secado del filtro. Para esto, la unidad de reacción se encuentra sobre un recipiente de reacción vacío. El secado se realiza mediante la aplicación de aire a presión (dado el caso calentado) y la circulación del aire por las partículas magnéticas magnéticamente fijadas a la camisa de plástico.

5. Elución del ácido nucleico unido. Para esto, transferencia de la unidad de dispensación con la unidad de reacción a la siguiente fila de recipientes de reacción (con tampón de elución contenido) o transferencia de la siguiente fila de recipientes de reacción al cabezal dispensador inmóvil. Inmersión reiterada de la unidad de reacción en el recipiente de reacción con tampón de elución y aspiración del tampón de elución en la parte superior de la unidad de reacción.

La elución de los ácidos nucleicos de las partículas magnéticas se realiza sacando la aguja magnética. Así, las partículas magnéticas se liberan de la camisa de plástico y se mezclan eficientemente en el tampón de elución mediante aspiración y expulsión recíproca (dado el caso varias veces) del tampón de elución desde la parte inferior de la unidad de reacción por el filtro a la parte superior de la unidad de reacción. La etapa de elución termina cuando, después de la aspiración final del tampón de lavado en la parte superior de la unidad de reacción, la aguja magnética del cabezal dispensador se introduce a continuación en la camisa de plástico de la parte superior de la unidad de reacción, las partículas magnéticas son extraídas por la aguja magnética sobre la camisa de plástico y allí permanecen en esta posición. Finalmente, el tampón de elución (el ácido nucleico aislado) se devuelve al recipiente de reacción.

El ácido nucleico aislado se encuentra ahora purificado en el último recipiente de reacción y puede utilizarse para las aplicaciones planeadas "aguas abajo".

Como se ha representado, el instrumento y procedimiento según la invención hace posible el aislamiento de ácidos nucleicos de una manera sencilla mediante los procedimientos de aspiración y dispensación de líquidos en combinación con el uso de partículas magnéticas. El concepto de "Walk-Away" (continuación) hace que el proceso de extracción sea extremadamente rápido, ya que se suprimen completamente costosas etapas de pipeteado necesarias hasta la fecha. Las múltiples funciones de la unidad de reacción según la invención permiten el llenado completo de todos los recipientes de reacción necesarios, dado el caso la separación por filtración de constituyentes sin disolver después de la lisis de muestras, así como el aislamiento de los ácidos nucleicos mediante la unión a partículas magnéticas. El gran consumo de materiales de plástico habitual hasta la fecha se reduce a sólo una unidad de reacción/muestra. La integración del proceso de lisis, incluida dado el caso la eliminación de componentes de muestra sin lisar, en el desarrollo de la extracción automatizada representa una ventaja decisiva en comparación con los aparatos de extracción alternativos y comercialmente disponibles descritos. Además, el aparato según la invención puede utilizarse mediante la selección del cabezal dispensador para diferentes capacidades de muestra. Por tanto, el instrumento según la invención no está fijado a determinados formatos y puede adaptarse de forma flexible a los requisitos del usuario. Esta medida de la flexibilidad con respecto al número de muestras que va a procesarse permite utilizar eficientemente la máquina incluso con bajos números de preparaciones y a este respecto aprovechar completamente la ventaja de la automatización del proceso.

El proceso del aislamiento de los ácidos nucleicos se realiza en un tiempo extremadamente corto. Después de realizarse la lisis de la muestra de partida, el proceso de extracción de ácidos nucleicos se concluye completamente en pocos minutos, ya que mediante el concepto de "Walk-Away" (continuación) todas los desarrollos de proceso necesarios transcurren extremadamente rápidos (por ejemplo, ya no se necesitan etapas de manipulación de líquidos). El desarrollo de proceso extremadamente rápido en combinación con la posibilidad de un montaje diferente de la máquina con distintos cabezales dispensadores para la recepción de un número de distinto tamaño de unidades de reacción hace posible procesar de forma extremadamente rápida y eficientemente incluso grandes volúmenes de muestra en un proceso de extracción completamente automatizado. Además, sólo se necesitan muy pocos de los llamados "consumibles".

Otra ventaja del instrumento según la invención se refiere al proceso de extracción de ácidos nucleicos. El aislamiento de los ácidos nucleicos se realiza como ya se ha descrito mediante la unión de los ácidos nucleicos que van a aislarse a partículas magnéticas. A este respecto, el instrumento según la invención es compatible con todas las soluciones de procedimiento conocidas para el experto para el aislamiento de ácidos nucleicos. Esto se refiere tanto al posible aprovechamiento de las diferentes partículas magnéticas conocidas hasta la fecha (combinación de química y funcionalización superficial de las partículas magnéticas) como también al posible aprovechamiento de formulaciones de tampón lo más variadas que hacen posible un aislamiento de ácidos nucleicos. Estas posibilidades ponen de relieve el posible espectro de aplicación enormemente amplio del instrumento según la invención.

La alta complejidad integrativa del instrumento según la invención permite finalmente aislar de forma altamente eficiente de manera sencilla y rápida ácidos nucleicos de materiales de partida lo más variados sin limitaciones en lo referente a la química de extracción.

Los desarrollos de procedimiento descritos siempre se han referido hasta la fecha sólo al aislamiento de ácidos nucleicos de una muestra. Por esto se entiende que puede aislarse tanto ADN como también ARN, o que mediante la elección de combinaciones de tampones adecuadas para la unión de los ácidos nucleicos a las partículas magnéticas también se realiza al mismo tiempo el aislamiento de ADN y ARN.

Pero también es muy ambicioso el aislamiento separado de ADN y ARN de una muestra biológica. Esto es de gran importancia para una serie de aplicaciones.

El objetivo de la presente invención también consistió en aislar automatizadamente ADN y ARN de una muestra. Esto se realiza usando las unidades de reacción según la invención del siguiente modo. Como ya se ha representado, la unidad de reacción también puede utilizarse para el aislamiento cromatográfico de ácido nucleico. Para esto, sobre el inserto de filtración de la unidad de reacción se proporciona un material de filtro cromatográfico conocido para el experto (por ejemplo, tela de fibra de vidrio) y se fija mediante la parte superior de la unidad de reacción. El procedimiento del aislamiento simultáneo y separado de ADN y ARN de una muestra se basa en el siguiente mecanismo. El material cromatográfico fijado en la unidad de reacción (tela de fibra de vidrio) sirve para la unión selectiva de ADN genómico, por el contrario, las partículas magnéticas que van a utilizarse para la unión del ARN que va a aislarse. Hasta la fecha no se ha descrito la combinación de un material de filtro con partículas magnéticas para el aislamiento selectivo y separado de ADN y ARN.

Las etapas preparatorias generales de la carga de los recipientes de reacción en la plataforma de la máquina se realizan como ya se ha descrito mediante la unidad de reacción según la invención y su función de pipeteado. Cuando todas las disoluciones tampón necesarias están dispuestas, el proceso del aislamiento separado y paralelo de ADN y ARN sigue del siguiente modo:

Ejemplo 2:

A. Aislamiento selectivo del ADN genómico de una muestra mediante la unión al material de filtro utilizado.

1. Lisis del material de partida

La lisis de la muestra se realiza mediante tampones de lisis conocidos para el experto basados en sales caotrópicas fuertemente desnaturizantes, así como otros aditivos como DTT y detergentes (dado el caso mediante acondicionamiento térmico conectado) mediante pipeteado arriba y abajo continuo repetido de la preparación de lisis mediante la unidad de reacción. Se usa una unidad de reacción según la invención que contiene una tela de fibra de vidrio sobre el inserto de filtración.

2. Aislamiento del ADN genómico

Unión del ADN genómico al material de filtro de la unidad de reacción. Esto se realiza mediante aspiración y expulsión recíproca de la muestra desde la parte inferior de la unidad de reacción por el filtro a la parte superior de la unidad de reacción. Mediante este proceso, la muestra lisada se transporta por el filtro. En este proceso, el ADN contenido en la muestra se une selectivamente al material de filtro, pero no el ARN. El proceso del pase de muestras por el filtro puede realizarse varias veces. Esto se consigue siempre que las condiciones de unión del tampón de lisis no sean adecuadas para la unión de ARN, pero sean altamente eficientes para la unión de ADN genómico. Finalmente, el lisado se devuelve al recipiente de reacción con el ARN ahora sólo contenido.

3. Lavado del ADN unido al filtro. A este respecto, transferencia de la unidad de dispensación con la unidad de reacción a la siguiente fila de recipientes de reacción (con tampones de lavado contenidos).

Inmersión reiterada de la unidad de reacción en el recipiente de reacción con tampón de lavado y pase del tampón de lavado mediante aspiración y expulsión recíproca (dado el caso varias veces) del tampón de lavado desde la parte inferior de la unidad de reacción por el filtro a la parte superior de la unidad de reacción. Repetición de la etapa en otro recipiente de reacción con tampón de lavado. Finalmente, el tampón de lavado se devuelve al recipiente de reacción.

4. Secado del filtro. Para esto, la unidad de reacción se encuentra sobre un recipiente de reacción vacío. El secado se realiza mediante la aplicación de aire a presión (dado el caso calentado) y la circulación del aire por el filtro.

5. Elución del ADN unido. Para esto, transferencia de la unidad de dispensación con la unidad de reacción a la siguiente fila de recipientes de reacción (con tampón de elución contenido). Inmersión reiterada de la unidad de reacción en el recipiente de reacción con tampón de elución y pase del tampón de elución mediante aspiración y expulsión recíproca (dado el caso varias veces) desde la parte inferior de la unidad de reacción por el filtro a la parte superior de la unidad de reacción.

El ADN aislado se encuentra ahora purificado y puede utilizarse para las aplicaciones planeadas "aguas abajo".

3. Posterior aislamiento del ARN total mediante la unión a partículas magnéticas.

Como ya se ha representado, el ARN que va a aislarse de la muestra de partida se encuentra en la preparación de lisis (después de la eliminación del ADN). Preparatoriamente, la unidad de reacción se urde con la tela de fibra de vidrio contenida. La máquina recibe una segunda unidad de reacción. Pero ésta no contiene tela de fibra de vidrio. El proceso del aislamiento del ARN se realiza mediante la unión a partículas magnéticas del siguiente modo.

1. Ajuste de las condiciones de unión óptimas para ARN. Adición de un tampón de unión alcohólico y de las partículas magnéticas a la preparación de lisis restante. El pipeteado se realiza, como ya se ha descrito, con la unidad de reacción según la invención. Mezcla de la preparación de tampón de lisis / de unión y de las partículas magnéticas con la unidad de reacción (mediante pipeteado arriba y abajo).

2. Unión del ARN a las partículas magnéticas. Esto se realiza mediante la aspiración de la muestra desde la parte inferior de la unidad de reacción a la parte superior de la unidad de reacción. La muestra lisada con las partículas magnéticas contenidas se encuentra ahora en la parte superior de la unidad de reacción. La separación magnética se realiza a continuación mediante la introducción de una aguja magnética del cabezal dispensador en la camisa de plástico de la parte superior de la unidad de reacción. En este proceso, las partículas magnéticas son extraídas por la aguja magnética sobre la camisa de plástico y permanecen en esta posición. Después de la unión de las partículas magnéticas a la camisa de plástico, la muestra se devuelve a continuación de nuevo al recipiente de reacción de partida desde la parte superior de la unidad de reacción. Las partículas magnéticas con el ácido nucleico unido permanecen en la camisa de plástico.

3. Lavado del ARN unido a las partículas magnéticas. A este respecto, transferencia de la unidad de dispensación con la unidad de reacción a la siguiente fila de recipientes de reacción (con tampones de lavado contenidos). Esta transferencia puede realizarse tanto mediante un movimiento escalonado del cabezal dispensador como mediante el movimiento escalonado de los recipientes de reacción. En este caso, el cabezal dispensador es inmóvil. Después de realizarse la etapa cinemática, la unidad de reacción se encuentra sobre el recipiente de reacción con tampón de lavado contenido. A continuación, la unidad de reacción se sumerge en el recipiente de reacción con tampón de lavado y el tampón de lavado se aspira hasta la parte superior de la unidad de reacción. El lavado de las partículas magnéticas se realiza sacando la aguja magnética. Así, las partículas magnéticas se liberan de la camisa de plástico y se mezclan eficientemente en el tampón de lavado (lavado) mediante aspiración y expulsión recíproca (dado el caso varias veces) del tampón de lavado desde la parte inferior de la unidad de reacción a la parte superior de la unidad de reacción. La etapa de lavado termina cuando, después de la aspiración final del tampón de lavado en la parte superior de la unidad de reacción, la aguja magnética del cabezal dispensador se introduce a continuación en la camisa de plástico de la parte superior de la unidad de reacción, las partículas magnéticas son extraídas por la aguja magnética sobre la camisa de plástico y allí permanecen en esta posición. Finalmente, el tampón de lavado se devuelve al recipiente de reacción. Las etapas de lavado pueden repetirse varias veces mediante el movimiento relativo descrito de los recipientes de reacción con los tampones contenidos o mediante el movimiento del cabezal dispensador.

4. Secado del filtro. Para esto, la unidad de reacción se encuentra sobre un recipiente de reacción vacío. El secado se realiza mediante la aplicación de aire a presión (dado el caso calentado) y la circulación del aire por las partículas magnéticas fijadas a la camisa de plástico.

5. Elución del ARN unido. Para esto, transferencia de la unidad de dispensación con la unidad de reacción a la siguiente fila de recipientes de reacción (con tampón de elución contenido) o transferencia de la siguiente fila de recipientes de reacción al cabezal dispensador inmóvil. Inmersión reiterada de la unidad de reacción en el recipiente de reacción con tampón de elución y aspiración del

5 tampón de elución en la parte superior de la unidad de reacción.

La elución del ARN de las partículas magnéticas se realiza sacando la aguja magnética. Así, las partículas magnéticas se liberan de la camisa de plástico y se mezclan eficientemente en el tampón de elución mediante aspiración y expulsión recíproca (dado el caso varias veces) del tampón de elución desde la parte inferior de la unidad de reacción por el filtro a la parte superior de la unidad de reacción. La etapa de elución termina cuando, después de la aspiración final del tampón de lavado en la parte superior de la unidad de reacción, la aguja magnética del cabezal dispensador se introduce a continuación en la camisa de plástico de la parte superior de la unidad de reacción, las partículas magnéticas son extraídas por la aguja magnética sobre la camisa de plástico y allí permanecen en esta posición. Finalmente, el tampón de elución (el ARN aislado) se devuelve al recipiente de

15 reacción.

El ARN aislado se encuentra ahora purificado en el último recipiente de reacción y puede utilizarse para las aplicaciones planeadas "aguas abajo".

20 Como se ha representado, el instrumento y procedimiento según la invención hace posible el aislamiento simultáneo y paralelo de ADN genómico y ARN de una muestra de partida de una manera sencilla mediante los procedimientos de aspiración y dispensación de líquidos en combinación con el uso de partículas magnéticas y membranas cromatográficas en sí conocidas. Otra ventaja también se basa en que mediante el aislamiento selectivo de ADN el ARN aislado está libre de ADN genómico. Esto siempre ha sido un problema hasta la fecha en los procedimientos de extracción en sí conocidos para aislar ARN total celular.

El concepto de "Walk-Away" (continuación) hace que el proceso de extracción simultánea y paralela de ADN y ARN sea extremadamente rápido, ya que se suprimen completamente costosas etapas de pipeteado necesarias hasta la fecha. Las múltiples funciones de la unidad de reacción según la invención permiten el completo llenado de todos los recipientes de reacción necesarios, así como el aislamiento de ADN y ARN de una muestra de partida. El gran consumo habitual hasta la fecha de materiales de plástico se reduce a sólo dos unidades de reacción/muestra según la invención. La integración del proceso de lisis en el desarrollo de la extracción automatizada representa una ventaja decisiva en comparación con los aparatos de extracción alternativos y comercialmente disponibles descritos. Finalmente, mediante la combinación según la invención de dos fases sólidas completamente diferentes, la combinación de la membrana de filtración y partículas magnéticas puede realizarse en un proceso de extracción, un aislamiento simultáneo y paralelo altamente eficiente y, por la automatización representada, extremadamente rápido de ADN y ARN de una muestra de partida. Un procedimiento tal todavía no está disponible.

30 Ejemplo 3:

45 Máquina de extracción para el aislamiento automático de ARN total celular

El aparato se desarrolló como aparato de mesa y está constituido por una cinemática con cuatro grados de libertad, un cabezal dosificador de 12 canales y una bandeja de carga manual.

50 La cinemática realiza los siguientes movimientos:

- Recogida y posicionamiento de la bandeja (11) en la dirección Y.
- Posicionamiento del cabeza dosificador en la dirección Z para la recepción automática de las puntas (12), (13)
- 55 o para bajar las puntas (13) a los tubos (1-5) y depósitos (6-10)
- Posicionamiento de las columnas magnéticas (14).
- Posicionamiento de los émbolos dosificadores (15).

Función del cabezal dosificador:

60 El cabezal dosificador puede recibir 12 puntas multifuncionales (12), (13) automáticamente de la bandeja, pipetear en paralelo 12 disoluciones y posicionar 12 columnas magnéticas para la separación magnética.

65 La función de la bandeja:

La bandeja se carga manualmente fuera del aparato con puntas multifuncionales y se llena de

disoluciones. En la bandeja se colocan 12 filtrados. (Véase A. Etapas preparatorias)

B. Proceso de extracción automatizado

- 5 1. Adición de partículas magnéticas al filtrado de la etapa 6 y colocación de los tubos receptores en la posición 1 del robot.
2. Carga automática de los tubos receptores en el robot con las siguientes disoluciones:
- 10 Posición del tubo receptor (5): agua libre de ARNasa del depósito (9)
Posición del tubo receptor (4): vacía
Posición del tubo receptor (3): disolución de lavado LS (800 µl) del depósito (8)
Posición del tubo receptor (2): disolución de lavado HS (500µl) del depósito (7)
Posición del tubo receptor (1): disolución de unión EG (500 µl) del depósito (6)
- 15 3. Mezcla del filtrado con las partículas magnéticas y la disolución de unión EG en la posición (1). Separación magnética dentro de la unidad de reacción. Movimiento de la unidad de reacción hacia el tubo receptor (2).
- 20 4. Lavado de las partículas en la disolución de lavado HS.

Separación magnética. Movimiento de la unidad de reacción hacia el tubo receptor (3).
5. Lavado de las partículas en la disolución de lavado LS.
- 25 Separación magnética. Movimiento de la unidad de reacción hacia el tubo receptor (4).
6. Secado de las partículas (4).
- 30 7. Movimiento de la unidad de reacción hacia el tubo receptor (5). Desorción del ARN de las partículas. Separación magnética. El ARN se encuentra en el tubo receptor en la posición (5)

FINAL de la extracción
- 35 La unidad de reacción según la invención se representa esquemáticamente a continuación en la Figura 1. Las variantes mostradas no representarán a este respecto ninguna limitación del instrumento según la invención. Las Figuras 2 y 3 muestran el aparato de extracción. La Figura 4 muestra una variante especial de la unidad de reacción. Los números de referencia en la Figura 4 muestran:
- 40 1 partículas magnéticas
2 imanes con partes de plástico
3 camisa
4 septo
5 parte superior de la unidad de reacción
- 45 En la Figura 4 se representa un inserto de rejilla de filtración permeable. Este tipo especial de dispositivo puede usarse cuando no deban separarse constituyentes sin disolver. El septo evita que no se aspire demasiado líquido hacia arriba.

REIVINDICACIONES

1. Unidad de reacción que comprende una parte inferior y una superior para el pipeteado de líquidos, **caracterizada porque** la parte inferior está constituida por una cavidad de reacción con un inserto de rejilla de filtración permeable y la parte superior representa una cavidad de reacción que puede fijarse a la parte inferior y contiene una entalladura o una camisa para la recepción de un imán.
2. Unidad de reacción según la reivindicación 1, **caracterizada porque** la parte inferior representa una punta de pipeta y la parte superior contiene un filtro para la protección de aerosoles.
3. Unidad de reacción según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada porque** sobre rejilla de filtración se encuentra un material de soporte para la unión de biomoléculas.
4. Unidad de reacción según la reivindicación 3, **caracterizada porque** como material de soporte se usa una tela de fibra de vidrio, una membrana o un material de filtro cromatográfico.
5. Unidad de reacción según la reivindicación 3 ó 4, **caracterizada porque** el material de soporte está fijado al inserto de rejilla de filtración mediante la colocación de la parte superior sobre la parte inferior.
6. Máquina que contiene al menos una unidad de reacción según una de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Máquina según la reivindicación 6, **caracterizada porque** se trata de una máquina de extracción.
8. Máquina según la reivindicación 6, **caracterizada porque** se trata de un aparato de mesa que contiene una cinemática con cuatro grados de libertad, además de un cabezal dosificador de preferiblemente 12 canales y una bandeja de carga manual, así como adicionalmente contiene un dispositivo de aire aspirado o a presión.
9. Máquina de extracción según la reivindicación 8, **caracterizada porque** el dispositivo de aire aspirado o a presión está acoplado a un cabezal dispensador que está adaptado exactamente a la unidad de reacción según una de las reivindicaciones 1 a 5.
10. Máquina de extracción según la reivindicación 8 ó 9, **caracterizada porque** la unidad de aire a presión contiene una fuente de calor.
11. Máquina de extracción según la reivindicación 8, **caracterizada porque** en el cabezal dispensador se encuentra una unidad cinemática para el movimiento vertical de imanes.
12. Máquina de extracción según una de las reivindicaciones 7 a 11, **caracterizada porque** contiene una interfaz para la comunicación con un ordenador que controla los procesos.
13. Procedimiento para aislar y purificar ácidos nucleicos de materiales de partida complejos discrecionales usando la unidad de reacción según una de las reivindicaciones 1 a 5 y/o la máquina de extracción según una de las reivindicaciones 7 a 12, caracterizado por las siguientes etapas:
 - lisis del material de partida
 - unión de los ácidos nucleicos a partículas magnéticas y dado el caso filtración de componentes sin disolver
 - lavado de los ácidos nucleicos unidos / secado
 - elución de los ácidos nucleicos unidos.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado porque** antes de la lisis del material de partida, los recipientes de reacción se llenan con tampones de recipientes de almacenamiento usando la unidad de reacción según una de las reivindicaciones 1 a 5.
15. Procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado porque** el llenado se realiza de forma que siempre se parte de una disolución con la menor concentración de sal.
16. Procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado porque** el llenado se realiza en el orden eluyente - tampón de lavado - tampón de lisis.
17. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado porque** la lisis de la muestra se realiza mediante pipeteado arriba y abajo continuo repetido de la preparación de lisis mediante la unidad de reacción.
18. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado porque** después de la lisis se realiza la recepción del tampón de unión y las partículas magnéticas mediante la unidad de reacción y la transferencia del tampón de unión y de las partículas magnéticas a la preparación de lisis.

19. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado porque** la preparación de tampón de lisis/de unión y las partículas magnéticas se mezclan mediante la unidad de reacción mediante pipeteado arriba y abajo.
20. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado porque** la unión del ácido nucleico a las partículas magnéticas y la posterior filtración de sustancias sin disolver, así como la separación magnética, se realiza mediante las siguientes etapas se:
- aspiración de la muestra desde la parte inferior de la unidad de reacción por la rejilla de filtración a la parte superior de la unidad de reacción
 - introducción de un imán del cabezal dispensador en la camisa o entalladura de la parte superior de la unidad de reacción
 - devolución del líquido de muestra (sin los ácidos nucleicos unidos a las partículas magnéticas) a un recipiente de partida.
21. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado porque** el lavado del ácido nucleico unido a las partículas magnéticas se realiza mediante las siguientes etapas:
- transferencia de la unidad de reacción a la siguiente fila de recipientes de reacción (con tampones de lavado contenidos)
 - inmersión de la unidad de reacción en el recipiente de reacción con tampón de lavado y aspiración del tampón de lavado hasta la parte superior de la unidad de reacción
 - eliminación del imán
 - repetición varias veces de las dos últimas etapas.
22. Procedimiento según la reivindicación 21, **caracterizado porque** la transferencia puede realizarse tanto mediante un movimiento escalonado del cabezal dispensador como mediante el movimiento escalonado de los recipientes de reacción.
23. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado porque** el secado del ácido nucleico unido a las partículas magnéticas se realiza mediante las siguientes etapas:
- transferencia de la unidad de reacción a un recipiente de reacción vacío
 - aplicación de aire a presión / dado el caso calentamiento
 - circulación del aire por las partículas magnéticamente fijadas a la camisa o entalladura.
24. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado porque** la elución del ácido nucleico unido se realiza mediante las siguientes etapas:
- transferencia de la unidad de dispensación con la unidad de reacción a la siguiente fila de recipientes de reacción (con tampón de elución contenido) o transferencia de la siguiente fila de recipientes de reacción al cabezal dispensador inmóvil
 - inmersión reiterada de la unidad de reacción en el recipiente de reacción con tampón de elución y aspiración del tampón de elución en la parte superior de la unidad de reacción
 - sacar el imán
 - aspiración y expulsión recíproca (dado el caso varias veces) del tampón de elución
 - repetición de las dos últimas etapas.
25. Procedimiento para el aislamiento simultáneo selectivo de ADN genómico de ARN celular a partir de materiales de partida complejos discrecionales usando la unidad de reacción según una de las reivindicaciones 1 a 5 y/o máquinas de extracción según una de las reivindicaciones 7 a 12, caracterizado por las siguientes etapas:
- lisis del material de partida
 - aislamiento del ADN genómico
 - aislamiento del ARN.
26. Procedimiento según la reivindicación 25, **caracterizado porque** la lisis del material de partida se realiza mediante pipeteado arriba y abajo continuo repetido de la preparación de lisis mediante la unidad de reacción y sobre el inserto de filtración se encuentra una tela de fibra de vidrio o una membrana o un material de filtro cromatográfico.
27. Procedimiento según la reivindicación 25, **caracterizado porque** el aislamiento del ADN genómico se realiza mediante las siguientes etapas:
- unión del ADN genómico al material de filtro de la unidad de reacción mediante aspiración y expulsión recíproca reiterada de la muestra desde la parte inferior de la unidad de reacción por el filtro a la parte superior de la unidad de reacción
 - devolución del lisado con el ARN ahora sólo incluido al recipiente de reacción
 - lavado del ADN unido al filtro, realizándose la transferencia de la unidad de reacción a la siguiente fila de recipientes de reacción (con tampones de lavado contenidos)
 - inmersión reiterada de la unidad de reacción en el recipiente de reacción con tampón de lavado y

- pase (varias veces) del tampón de lavado mediante aspiración y expulsión recíproca (dado el caso varias veces) del tampón de lavado desde la parte inferior de la unidad de reacción por el filtro a la parte superior de la unidad de reacción
- devolución del tampón de lavado al recipiente de reacción
- 5 - secado del filtro mediante la aplicación de aire a presión (dado el caso calentado), encontrándose la unidad de reacción sobre un recipiente de reacción vacío
- elución del ADN unido mediante inmersión de la unidad de reacción en el recipiente de reacción con tampón de elución y aspiración y expulsión recíproca (dado el caso varias veces) del tampón de elución desde la parte inferior de la unidad de reacción por el filtro en la parte superior de la unidad de
- 10 reacción, realizándose la transferencia de la unidad de reacción a la siguiente fila de recipientes de reacción (con tampón de elución contenido).
28. Procedimiento según la reivindicación 25, **caracterizado porque** el aislamiento del ARN se realiza mediante las siguientes etapas:
- 15 - ajuste de las condiciones de unión óptimas para ARN
 - adición de un tampón de unión alcohólico y de partículas magnéticas en la preparación de lisis restante
 - pipeteado con la unidad de reacción según la invención, realizándose la mezcla de la preparación de tampón de lisis / de unión y de las partículas magnéticas con la unidad de reacción (mediante
- 20 pipeteado arriba y abajo)
- unión del ARN a las partículas magnéticas mediante aspiración de la muestra desde la parte inferior de la unidad de reacción a la parte superior de la unidad de reacción
 - separación magnética mediante la introducción de un imán del cabezal dispensador en la camisa o entalladura de la parte superior de la unidad de reacción
- 25 - devolución de la muestra sin el ARN unido al recipiente de partida
- lavado, secado y elución del ARN unido a las partículas magnéticas análogamente a las reivindicaciones 21 a 24.
29. Procedimiento según la reivindicación 13 ó 25, **caracterizado porque** todas las etapas de
- 30 procedimiento transcurren según el principio "Walk-Away" (continuación).
30. Uso de la unidad de reacción según una de las reivindicaciones 1 a 5 y/o máquinas de extracción según una de las reivindicaciones 7 a 12 para
- a) una dispensación y pipeteado exactos de líquidos y/o
- 35 b) una separación de componentes sin disolver sólidos después de la lisis de una muestra que va a procesarse y/o
- c) el aislamiento de ácidos nucleicos usando partículas magnéticas y/o
 - d) el aislamiento de ácidos nucleicos mediante su unión cromatográfica a un material de soporte sólido.

Figura 1

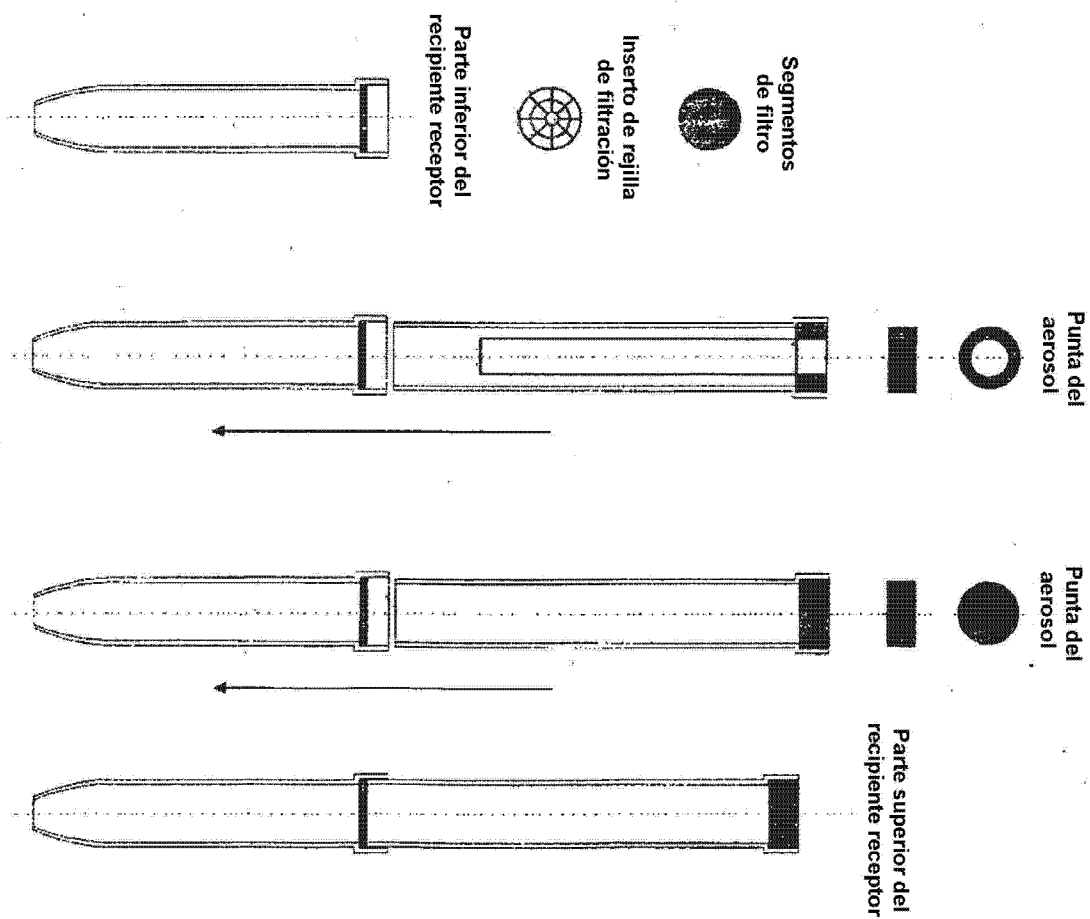


Figura 2

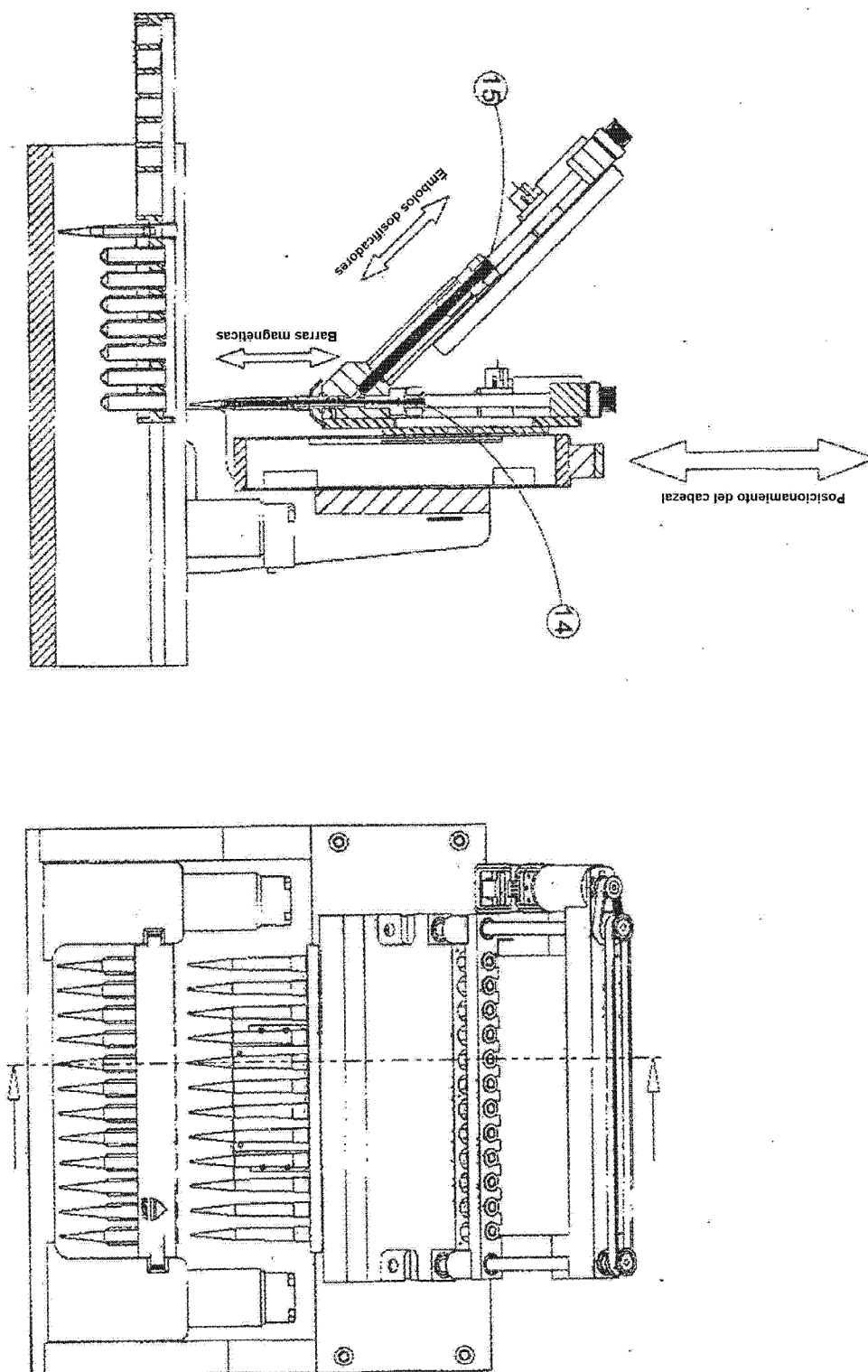


Figura 3

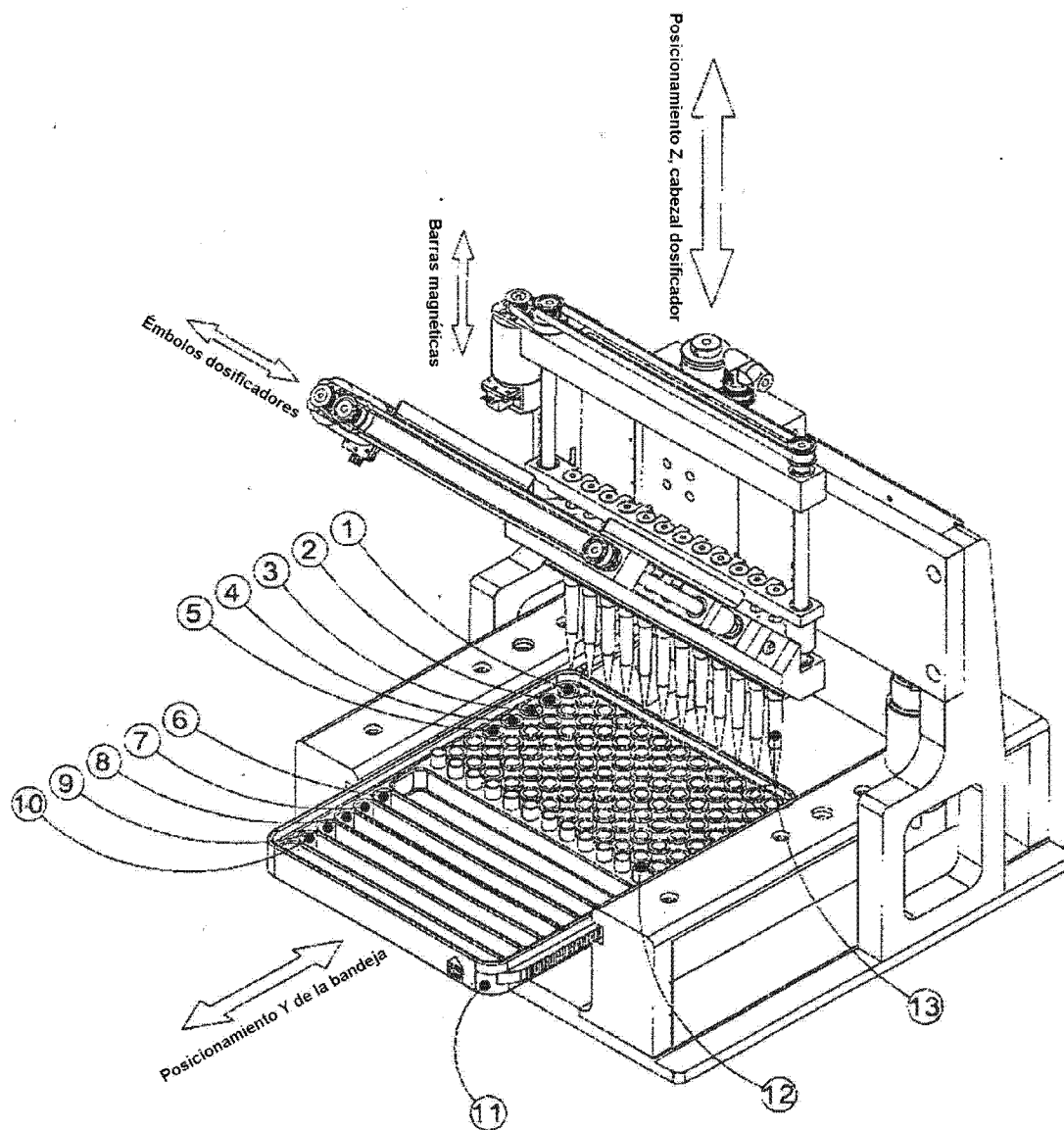


Figura 4

