

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 644**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/38** (2006.01)

**C12M 1/12** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2013 PCT/KR2013/000609**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO2013118990**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2013 E 13745997 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2813565**

54 Título: **Aparato de extracción de ácido nucleico a velocidad ultra-alta y procedimiento de extracción de ácido nucleico usando el mismo**

30 Prioridad:

**07.02.2012 KR 20120012222**

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

**07.06.2017**

73 Titular/es:

**NANOBIOSYS INC. (100.0%)  
47 Digital-ro 9-gil Room 1206 Geumcheon-gu  
Seoul 153-712, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SUNG WOO;  
KIM, DUCK JOONG;  
LEE, DONG HOON;  
KIM, SUN JIN;  
CHOI, YONG HEA y  
RYU, HO SUN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 615 644 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).

## **Aparato de extracción de ácido nucleico a velocidad ultra-alta y procedimiento de extracción de ácido nucleico usando el mismo**

### **DESCRIPCIÓN**

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un dispositivo para la extracción de un ácido nucleico a partir de un espécimen biológico, tal como esputo, sangre, células, orina, saliva, tejidos, etc.

### **Técnica anterior**

15 Para el diagnóstico, tratamiento o prevención de las enfermedades a nivel genético, las técnicas para la extracción de ácidos nucleicos a partir de un espécimen biológico, tales como células, bacterias, o virus, se han estado usando mucho recientemente en asociación con técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Asimismo, hay una demanda de técnicas para la extracción de ácidos nucleicos a partir de un espécimen biológico en varios campos de aplicaciones, tales como el desarrollo personalizado de fármacos, forense, detección de interruptores endocrinos, y así sucesivamente, además del diagnóstico, tratamiento o prevención de enfermedades.

20 Un ejemplo de las técnicas de extracción de ácidos nucleicos convencionales es un procedimiento de solubilización de un espécimen, incluyendo células con SDS o proteinasa K, modificación y eliminación de proteínas con fenol y, después, purificación de un ácido nucleico. Sin embargo, el procedimiento de extracción basado en fenol no solo requiere una serie de etapas que duran mucho tiempo, sino también tiene la eficiencia de extracción de ácidos nucleicos en gran medida influida por la experiencia y las habilidades del trabajador, produce adversamente un gran deterioro de la fiabilidad. Para la solución de este problema, recientemente se ha utilizado un kit que utiliza sílice o fibra de vidrio que se combina específicamente con un ácido nucleico. La sílice o fibra de vidrio tiene una baja relación de combinación con proteínas o metabolitos celulares, por lo que es posible adquirir un ácido nucleico en una concentración relativamente alta. Este procedimiento es ventajosamente más conveniente en comparación con el procedimiento basado en fenol. Sin embargo, el procedimiento utiliza un reactivo caotrópico o etanol que inhibe fuertemente la reacción enzimática, tal como la reacción en cadena de polimerización (PCR) o similar y, por lo tanto, requiere una eliminación completa de las sustancias, es decir, el reactivo caotrópico o etanol, por lo que es demasiado pesado trabajar y requiere demasiado tiempo. Recientemente, la patente internacional abierta a inspección pública 00/21973 da a conocer un procedimiento de purificación directa de un ácido nucleico con un filtro, en el que el procedimiento implica pasar un espécimen a través de un filtro para que el filtro absorba las células, disolver las células adsorbidas, filtrar las células y, a continuación, lavar y eluir el ácido nucleico adsorbido. Sin embargo, es necesario seleccionar el filtro en función del tipo de las células con el fin de adsorber las células con el filtro y, después, eluir el ácido nucleico. Además, los dispositivos utilizados en este procedimiento son demasiado grandes y complicados para que el trabajador los utilice con facilidad.

### **Divulgación de la invención**

45 Para resolver los problemas con las técnicas de extracción de ácidos nucleicos convencionales, la presente invención es proporcionar un dispositivo de extracción de ácido nucleico que es capaz de realizar automatización, ultra-miniaturización y velocidad superalta a diferencia del dispositivo y procedimiento de extracción de ácido nucleico existentes, sin limitación a los especímenes biológicos, tales como esputo, sangre, células, orina, saliva, tejidos, etc., minimizando la cantidad usada de la solución de muestra, y, además, manteniendo y / o mejorando la eficacia de la extracción de ácido nucleico con fiabilidad.

50 De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona un dispositivo para la extracción de un ácido nucleico a partir de un espécimen biológico que incluye: un sustrato; un soporte de chip dispuesto en la superficie superior del sustrato y que incluye una parte de recepción del chip que tiene la forma de una placa con una superficie horizontal en estrecho contacto con una superficie inferior de un chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico; y un calentador dispuesto sobre la superficie horizontal de la parte de recepción del chip y hecho para aplicar calor a una parte de toda la superficie inferior del chip microfluído para la extracción de ácido nucleico instalado en la parte de recepción del chip.

En una realización de la presente invención, el calentador puede ser un bloque de calentamiento de tipo placa de contacto.

60 Además, el dispositivo puede incluir además una cubierta del chip que está dispuesta en la parte superior del soporte del chip y que tiene una superficie horizontal en estrecho contacto con la superficie superior del chip de microfluidos para instalar la extracción de ácido nucleico en la parte de la parte de recepción del chip.

65 Además, el dispositivo puede incluir adicionalmente un módulo de control de fluidos hecho de controlar el flujo de una solución de reactivo recibida en el chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico instalada en la parte de recepción del chip.

Además, el dispositivo puede incluir adicionalmente un módulo de control del calor conectado al calentador para controlar la capacidad térmica proporcionada por una solución de reactivo recibida en el chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico instalada en la parte de recepción del chip.

5 Además, el dispositivo puede incluir adicionalmente un chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico que tiene la forma de una placa con una superficie superior horizontal y una superficie horizontal inferior, donde el chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico incluye: una porción de entrada; estando una parte de calentamiento dispuesta en una primera región de canal conectada a la porción de entrada y hecha para transferir el calor obtenido a partir de un exterior a un espécimen biológico introducido a través de la porción de entrada; estando un primer filtro dispuesto en una segunda región de canal conectada a la parte de calentamiento y permitiendo que una sustancia que tiene un tamaño equivalente del ácido nucleico pase a través; estando una parte de separación del ácido nucleico dispuesta en una tercera región de canal conectada al primer filtro y teniendo una sustancia de unión a ácido nucleico capaz de unirse específicamente con el ácido nucleico; estando un segundo filtro dispuesto en una cuarta región de canal conectada con la parte de separación del ácido nucleico y permitiendo que una sustancia que tiene un tamaño equivalente del ácido nucleico pase a través; y una porción de salida conectada al segundo filtro.

10 Además, un canal que incluye la primera a cuarta regiones de canal del chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico puede estar hecho para permitir que un fluido pase a través y tenga una anchura y una profundidad en el intervalo de 0,001 a 10 mm.

15 Además, el primero y segundo filtros del chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico pueden tener un poro con un diámetro en el intervalo de 0,1 a 0,4  $\mu\text{m}$  y un espesor en el intervalo de 0,01 a 10 mm.

20 Además, el primero y segundo filtros del chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico pueden tener un poro que tiene un diámetro de 0,2  $\mu\text{m}$  y un espesor de 0,01 a 0,5 mm.

25 Además, la parte de separación del ácido nucleico del chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico puede tener una perla con un grupo funcional de unión a ácido nucleico sobre la superficie de la misma como una sustancia de unión de ácido nucleico.

30 Además, la perla que tiene un grupo funcional de unión a ácido nucleico del chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico puede tener un diámetro en el intervalo de 0,001 a 20 mm.

35 Además, la parte de separación del ácido nucleico del chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico puede incluir la perla que tiene un grupo funcional de unión a ácido nucleico en una cantidad de 1  $\mu\text{g}$  a 200 mg.

40 Además, el chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico puede estar hecho de un material plástico.

Además, el chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico puede incluir una primera placa; estando una segunda placa dispuesta en la primera placa y que tiene un canal que incluye la primera a cuarta regiones de canal; y estando una tercera placa dispuesta sobre la segunda placa y que tiene la parte de entrada y la parte de salida.

45 Además, la primera y tercera placas del chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico pueden incluir un material seleccionado del grupo que consiste en polidimetilsiloxano (PDMS), copolímero de cicloolefina (COC), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), carbonato de polipropileno (PPC), poliéter sulfona (PES), tereftalato de polietileno (PET), y una mezcla de los mismos. La segunda placa del chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico puede incluir un material de resina termoplástica o de resina termoendurecible seleccionada del grupo que consiste de polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), copolímero de cicloolefina (COC), poliamida (PA), polietileno (PE), polipropileno (PP), éter de polifenileno (PPE), poliestireno (PS), polioximetileno (POM), polieteretercetona (PEEK), politetrafluoroetileno (PTFE), cloruro de polivinilo (PVC), fluoruro de polivinilideno (PVDF), tereftalato de polibutileno (PBT), etilenpropileno fluorado (FEP), perfluoroalcoxicano (PFA), y una mezcla de los mismos.

50 Además, la parte de entrada de la tercera placa del chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico puede tener un diámetro en el intervalo de 0,1 a 5,0 mm. La parte de salida del chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico puede tener un diámetro de 0,1 a 5,0 mm. La primera y tercera placas del chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico pueden tener un espesor en el intervalo de 0,01 a 20 mm. La segunda placa del chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico puede tener un espesor en el intervalo de 30  $\mu\text{m}$  a 10 mm.

### Efectos de la invención

65 De acuerdo con el dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de la presente invención, es posible realizar la automatización, ultra-miniaturización y velocidad superalta en la extracción de ácidos nucleicos, sin limitaciones de los especímenes biológicos, tales como esputo, sangre, células, orina, saliva, tejidos, etc., minimizar la cantidad

utilizada de la solución de muestra y, también, mantener y / o mejorar la eficacia de la extracción de ácido nucleico con fiabilidad.

**Breve descripción de los dibujos**

- 5 La figura 1 es una ilustración de un dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención.
- La figura 2 es una ilustración del dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención con una cubierta del chip.
- 10 La figura 3 es una ilustración del dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención con un módulo de control de fluidos.
- La figura 4 es una ilustración del dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención con un módulo de control térmico.
- 15 La figura 5 es una ilustración de un chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención.
- La figura 6 es una vista en planta transversal del chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención.
- La figura 7 es una ilustración de que el chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos de la figura 5 está instalado en el dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención.
- 20

**Mejor modo de llevar a cabo la invención**

25 En lo sucesivo, se describirá una realización de la presente invención con referencia a las figuras adjuntas. La descripción se ofrece para la mejor comprensión de las realizaciones de la presente invención y no pretende limitar el alcance de la presente invención.

La figura 1 es una ilustración de un dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención.

30 De acuerdo con la figura 1, el dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención para la extracción de un ácido nucleico a partir de un espécimen biológico incluye: un sustrato 500; un soporte 600 de chip dispuesto en la superficie superior del sustrato 500 y que incluye una parte de recepción 650 del chip que tiene la forma de una placa con una superficie horizontal en estrecho contacto con una superficie inferior de un chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico (no mostrada); y un calentador 700 dispuesto sobre la superficie horizontal de la parte de recepción 650 del chip y hecho para aplicar calor a una parte de toda la superficie inferior del chip de microfluidos para la extracción de ácido nucleico instalado en la parte de recepción 650 del chip.

40 El dispositivo de extracción de ácidos nucleicos significa un dispositivo hecho para llevar a cabo todas las etapas para la extracción de ácidos nucleicos y, por supuesto, puede incluir además diferentes módulos necesarios para extraer un ácido nucleico.

45 El sustrato 500 puede estar hecho de cualquier material que no tiene ningún cambio en las propiedades físicas y / o químicas por calentamiento con el calentador 700 mencionado posteriormente que está dispuesto en el sustrato 500 o mediante el mantenimiento de la temperatura y no permite la deformación en las partes que no sean el calentador en el sustrato 500 por conducción térmica. El sustrato 500 puede estar hecho de, si no está limitado a los mismos, plástico, vidrio, silicio, o similares, y aparecerá transparente o semitransparente. El sustrato 500 puede estar hecho de modo que tenga diferentes formas y, preferentemente, hecho en forma de una placa que tiene una superficie horizontal como se muestra en la figura 1.

50 El soporte 600 del chip es una parte sobre la que se monta y se fija el chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención mencionado más adelante con detalle. Por lo tanto, el soporte 600 del chip puede estar dispuesto sobre la superficie superior del sustrato 500 y, por supuesto, hecho de un material capaz de montar y fijar el chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos (no mostrado) de una manera estable. Además, el soporte 600 del chip tiene la parte de recepción del chip en forma de placa 650 con una superficie horizontal en estrecho contacto con la superficie inferior del chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos (no mostrado). Dado que la parte de recepción del chip 650 tiene la forma de una placa, se pone en estrecho contacto con la superficie inferior del chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos. Esto aumenta el área de contacto del calor transferido desde el calentador 700 que se menciona más adelante con detalle y aumenta la velocidad de transferencia de calor para permitir un control de fluido estable de la solución de reactivo recibido en el chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos, por lo que la reacción de extracción de ácidos nucleicos puede lograrse, incluso con una pequeña cantidad de la solución de reactivo.

65 El calentador 700 es un módulo para suministrar calor a una parte del chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos (no mostrado) cuando el chip de microfluidos para el ácido nucleico está montado sobre el soporte

del chip 600. El calentador 700 puede realizarse de forma diferente pero es, preferentemente, un bloque de calentamiento de tipo placa de contacto con el fin de aumentar la velocidad de transferencia de calor. En una realización de la presente invención, el calentador 700 puede estar dispuesto sobre la superficie horizontal de la parte de recepción 600 del chip y hecho para aplicar calor a una parte de toda la superficie inferior del chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos instalado en la parte de recepción 600 del chip.

La figura 2 es una ilustración del dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención con una cubierta del chip.

De acuerdo con la figura 2, el dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención puede incluir además una cubierta 800 del chip que está dispuesta en la parte superior del soporte 600 del chip y que tiene una superficie horizontal en estrecho contacto con la superficie superior del chip de microfluidos para la instalación de la extracción de ácidos nucleicos (no mostrado) en la parte de recepción 650 del chip. La cubierta 800 del chip soporta para montar de forma estable el chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos y evita la emisión de calor desde el chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos, de modo que la reacción de extracción de ácidos nucleicos tenga lugar rápidamente en el chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos. La cubierta 800 del chip puede hacerse en diferentes formas para lograr el objeto descrito anteriormente y está hecha, preferentemente, en forma de una placa.

La figura 3 es una ilustración del dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención con un módulo de control de fluidos.

De acuerdo con la figura 3, el dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención puede incluir además un módulo de control de fluidos 900 hecho de controlar el flujo de una solución de reactivo recibida en el chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos instalada en la parte de recepción 650 del chip. El módulo de control de fluidos 900 está conectado a la parte de entrada y / o la parte de salida del chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos instalada sobre el soporte 600 del chip, por lo que se puede hacer para introducir una solución para la extracción de ácidos nucleicos en el chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos y / o la salida de la solución desde el interior del chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos y / o para controlar el movimiento de la solución de reactivo en el interior del chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos. El módulo de control de fluidos 900 puede incluir varios componentes. Por ejemplo, el módulo de control de fluidos 900 puede incluir además un microcanal como un paso de fluidos, una bomba neumática para proporcionar una fuerza motriz para el flujo de fluidos, una válvula para controlar el flujo de fluidos o una cámara de almacenamiento que contiene diferentes soluciones requeridas para extraer un ácido nucleico, tal como un tampón de unión de ácido nucleico, un tampón de elución, gel de sílice, agua destilada (AD), etc.

La figura 4 es una ilustración del dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención con un módulo de control térmico.

Haciendo referencia a la figura 4, el dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención puede incluir además un módulo de control de calor 750 conectado al calentador 700 para controlar la capacidad calorífica proporcionada por una solución de reactivo recibida en el chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos instalada en la parte de recepción 650 del chip. Mediante el control de la fuente de alimentación para el calentador 700, el módulo de control de calor 750 puede controlar el calentamiento o enfriamiento del calentador 700 de manera que la reacción de extracción de ácidos nucleicos se pueda producir de acuerdo con la temperatura y el orden secuencial tal como se ha predefinido en el chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos. Por otro lado, si no se muestra en la figura 4, el dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención puede incluir además un módulo de control electrónico (no mostrado) para controlar automáticamente el calentador 700, la cubierta 800, el módulo de control de fluidos 900 y el módulo de control del calor 750. El módulo de control electrónico puede controlar los módulos individuales de un modo preciso para extraer con precisión una cantidad predeterminada de ácido nucleico en el chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con un programa guardado. El programa guardado incluye, por ejemplo, un programa relacionado con una serie de etapas relativas a la extracción de ácidos nucleicos.

La figura 5 es una ilustración del chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención.

De acuerdo con la figura 5, el chip de microfluidos 1 para la extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención, que es extraer un ácido nucleico a partir de un espécimen biológico incluye: una porción de entrada 10; estando una parte de calentamiento dispuesta en una primera región de canal conectada a la porción de entrada 10 y hecha para transferir el calor obtenido a partir de un exterior al espécimen biológico introducido a través de la porción de entrada 10; estando un primer filtro 30 dispuesto en una segunda región de canal conectada a la parte de calentamiento 20 y permitiendo que una sustancia que tiene un tamaño equivalente del ácido nucleico pase a través; estando una parte de separación 40 del ácido nucleico dispuesta en una tercera

región de canal conectada al primer filtro 30 y teniendo una sustancia de unión 45 a ácido nucleico capaz de unirse específicamente con el ácido nucleico; estando un segundo filtro 50 dispuesto en una cuarta región de canal conectada con la parte de separación 40 del ácido nucleico y permitiendo que una sustancia que tiene un tamaño equivalente del ácido nucleico pase a través; y una porción de salida 60 conectada al segundo filtro 50.

5 El chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un microchip en el que los componentes para la extracción de ácidos nucleicos, es decir, la porción de entrada, la porción de salida, el canal que conecta la parte de entrada con la parte de salida, el primer filtro, el segundo filtro, y así sucesivamente, se realizan en el tamaño de una escala de milímetros (mm) o micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).

10 El espécimen biológico tal como se usa en el presente documento es una sustancia biológica que incluye un ácido nucleico, tal como ADN o ARN. Por ejemplo, el espécimen biológico puede ser un espécimen líquido que contiene, si no está limitado a los mismos, células animales, células vegetales, bacterias patógenas, hongos, bacterias, virus, etc.

15 La parte de entrada 10 es una parte a través de la cual se introduce el espécimen biológico o la solución para la extracción de ácidos nucleicos en el chip de microfluidos. La porción de salida 60 es una parte a través de la cual el ácido nucleico adquirido del espécimen biológico, la solución para la extracción de ácidos nucleicos y otros desechos se salen del chip de microfluidos. En este caso, la parte de entrada 10 y la parte de salida 60 pueden desempeñar un papel como una entrada o una salida, respectivamente. La solución para la extracción de ácidos nucleicos incluye cualquier solución requerida en la extracción de un ácido nucleico. Los ejemplos de la solución para la extracción de ácidos nucleicos pueden incluir agua destilada, un tampón de unión a ácido nucleico, un tampón de elución, y así sucesivamente. Por otra parte, la parte de entrada 10 y la parte de salida 60 están conectadas entre sí a través de un canal 70, de manera que un fluido pueda pasar entre ellos. Los componentes mencionados más adelante, tal como la parte de calentamiento 20, el primer filtro 30, la parte de separación del ácido nucleico 40 y el segundo filtro 50, están dispuestos en el canal 70 de modo que puedan ser accionados para llevar a cabo sus respectivas funciones. El canal 70 se puede hacerse en diferentes tamaños, pero la anchura y la profundidad del canal 70 están, preferentemente, en el intervalo de 0,001 a 10 mm. Las primera, segunda, tercera y cuarta regiones del canal que se mencionan más adelante se proporcionan solo en términos de la disposición secuencial desde la parte de entrada 10 a la parte de salida 60 y no están limitadas a lugares específicos en el canal 70.

35 La parte de calentamiento 20 es una parte en la que se aplica el calor obtenido desde el exterior sobre la solución (incluyendo el espécimen biológico) introducido a través de la parte de entrada 10. La parte de calentamiento 20 está dispuesta en la primera región de canal conectada a la parte de entrada 10. Por ejemplo, cuando se introduce un espécimen que incluye células, bacterias o virus a través de la parte de entrada 10, cuando las células, bacterias o virus llegan a la parte de calentamiento 20 se calientan instantáneamente a aproximadamente 80 a 100 °C y sus membranas celulares externas son destruidas para liberar el contenido de las células rotas. La parte de calentamiento 20 se suministra con el calor por medio del contacto desde el calentador 70 del dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención.

45 El primer filtro 30 es una estructura que tiene poros de un tamaño predeterminado y se usa para separar las sustancias de acuerdo con su tamaño e identificar las sustancias que pasan a través de los poros en la dirección del fluido de las sustancias que no pueden pasar a través de los poros. En una realización de la presente invención, el primer filtro 30 está dispuesto en la segunda región de canal conectada a la parte de calentamiento 20 y diseñado para permitir que las sustancias que tienen un tamaño equivalente del ácido nucleico pasen a través. Fuera del producto de disolución preparado mediante calentamiento en la parte de calentamiento 20, el primer filtro 30 recoge las sustancias más grandes que el ácido nucleico en la parte de calentamiento 20 y permite que el ácido nucleico y las sustancias que tienen el tamaño del ácido nucleico pasen a través y se muevan a la parte de separación 40 del ácido nucleico mencionada más adelante. El primer filtro 30 puede estar hecho de diferentes tamaños, pero, preferentemente, con poros que tienen un diámetro en el intervalo de 0,1 a 0,4  $\mu\text{m}$  y un espesor en el intervalo de 0,01 a 0,5 mm.

55 La parte de separación 40 del ácido nucleico es para separar de forma selectiva el ácido nucleico a partir de las sustancias que tienen un tamaño equivalente del ácido nucleico. Haciendo referencia a la figura. 5, parte de separación 40 del ácido nucleico es un espacio entre el primer filtro 30 y el segundo filtro 50 mencionados más adelante y tiene la sustancia de unión a ácido nucleico 45 capaz de unirse específicamente a el ácido nucleico. La sustancia de unión a ácido nucleico 45 es una perla con un grupo funcional de unión a ácido nucleico y puede ser, por ejemplo, una perla de sílice o una perla de biotina o estreptavidina. La perla que tiene un grupo funcional del ácido nucleico puede hacerse de diferentes tamaños, pero, preferentemente, con un diámetro en el intervalo de 0,001 a 20 mm. Además, la parte de separación del ácido nucleico 40 puede contener la perla que tiene un grupo funcional de unión a ácido nucleico en diferentes cantidades. Pero, el contenido de la perla que tiene un grupo funcional de unión al ácido nucleico en la parte de separación 40 del ácido nucleico está, preferentemente, en el intervalo de 1  $\mu\text{g}$  a 200 mg. Después de que el ácido nucleico se une específicamente a la sustancia de unión 45 al ácido nucleico, el interior la parte de separación 40 del ácido nucleico se lava para eliminar sustancias extrañas, dejando un complejo del ácido nucleico diana y la sustancia de unión 45 al ácido nucleico solo en la parte de

separación 40 del ácido nucleico. Posteriormente, se aplica un tampón de elución se aplica a la parte de separación 40 del ácido nucleico para separar el ácido nucleico diana del complejo.

5 Como el primer filtro 30 mencionado anteriormente, el segundo filtro es una estructura que tiene poros de un tamaño predeterminado y se usa para separar las sustancias de acuerdo con su tamaño e identificar las sustancias que pasan a través de los poros en la dirección del fluido de las sustancias que no pueden pasar a través de los poros. En una realización de la presente invención, el segundo filtro 50 está dispuesto en la cuarta región de canal conectada a la parte de separación 40 de ácido nucleico y diseñado para permitir que las sustancias que tienen un tamaño equivalente del ácido nucleico pasen a través. El segundo filtro 50 recoge las sustancias más grandes que el  
10 ácido nucleico en la parte de separación 40 del ácido nucleico y permite que el ácido nucleico separado de la sustancia de unión al ácido nucleico 45 pase a través y se mueva a la parte de salida 60. El segundo filtro 50 puede estar hecho de diferentes tamaños, pero, preferentemente, con poros que tienen un diámetro en el intervalo de 0,1 a 0,4  $\mu\text{m}$  y un espesor en el intervalo de 0,01 a 0,5 mm. Más preferentemente, el segundo filtro 50 tiene poros que tienen un diámetro de 0,2  $\mu\text{m}$  y un espesor de 0,3 mm.

15 La figura 6 es una vista en planta transversal del chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención.

20 De acuerdo con la figura 6 el chip de microfluidos 1 para la extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención incluye: una primera placa 100; estando una segunda placa 200 dispuesta sobre la primera placa 100 y teniendo un canal 70 que incluye la primera a cuarta regiones de canal; y estando una tercera placa 300 dispuesta sobre la segunda placa 200 y teniendo la parte de entrada 10 y la parte de salida 60. El chip de microfluidos 1 para la extracción de ácidos nucleicos puede estar formado por materiales diferentes, pero, preferentemente, está hecho de un material plástico. Cuando el chip de microfluidos 1 para la extracción de ácidos nucleicos está hecho de un material plástico, es posible aumentar la eficiencia de la transferencia de calor solamente mediante el ajuste del espesor del plástico y reducir en gran medida los costes de producción del proceso de producción simple. Por otro lado, la primera y tercera placas 100 y 300 pueden incluir un material seleccionado del grupo que consiste en polidimetilsiloxano (PDMS), copolímero de cicloolefina (COC), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), carbonato de polipropileno (PPC), poliéter sulfona (PES), tereftalato de polietileno (PET), y una mezcla de estos. La segunda placa 200 puede incluir un material de resina termoplástica o de resina termoendurecible seleccionada del grupo que consiste de polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), copolímero de cicloolefina (COC), poliamida (PA), polietileno (PE), polipropileno (PP), éter de polifenileno (PPE), poliestireno (PS), polioximetileno (POM), polietereceton (PEEK), politetrafluoroetileno (PTFE), cloruro de polivinilo (PVC), fluoruro de polivinilideno (PVDF), tereftalato de polibutileno (PBT), etilenpropileno fluorado (FEP), perfluoroalcoxialcano (PFA), y una mezcla de estos. Además, la parte de entrada de la tercera placa tiene un diámetro en el intervalo de 0,1 a 5,0 mm. La parte de salida de la tercera placa tiene un diámetro de 0,1 a 5,0 mm. La primera y tercera placas tienen un espesor en el intervalo de 0,01 a 20 mm y la segunda placa tiene un espesor en el intervalo de 30  $\mu\text{m}$  a 10 mm. Además, en virtud de la necesidad, el chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención puede incluir al menos dos partes de  
40 entrada, al menos dos partes de salida, y canales que las conectan, en cuyo caso es posible extraer el ácido nucleico de al menos dos especímenes biológicos en un solo chip, lo que consigue la extracción del ácido nucleico de una manera rápida y eficiente.

45 La figura 7 es una ilustración de que el chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos de la figura 5 está instalado en el dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención.

50 De acuerdo con la figura. 7, la reacción de extracción de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo mientras que el chip de microfluidos en forma de placa 1 para la extracción de ácidos nucleicos está en estrecho contacto con la parte de recepción 652 del chip del dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención. Más específicamente, el procedimiento para la extracción de un ácido nucleico a partir de un espécimen biológico usando el dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención incluye: una etapa (etapa de alimentación del chip de microfluidos) de alimentación del chip de microfluidos 1 para la extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención; una  
55 etapa (etapa de introducción del espécimen biológico) de introducción de un espécimen biológico, tal como esputo, sangre, células, orina, saliva, tejidos, etc., a través de la parte de entrada del chip de microfluidos 1; una etapa (etapa de lisis del espécimen biológico) de transferencia del espécimen biológico introducido en la parte de calentamiento del chip de microfluidos 1 y, a continuación, aplicación de calor a la parte de calentamiento del chip de microfluidos 1 a través del calentador 700 para disolver el espécimen biológico; una etapa (etapa de filtración usando el primer filtro) de transferencia de la sustancia obtenida de la etapa de lisis al primer filtro del chip de microfluidos 1, pasando la sustancia a través del primer filtro y, después, eliminando las sustancias que no pueden pasar a través del primer filtro; una etapa (etapa de separación de ácidos nucleicos) de transferencia de las sustancias que pasan a través del primer filtro a la parte de separación del ácido nucleico del chip de microfluidos 1, unión del ácido nucleico entre las sustancias que pasan a través del primer filtro con la sustancia de unión al ácido nucleico y, después, eliminación de las sustancias que no se unen a la sustancia de unión del ácido nucleico; una  
60 etapa (etapa de filtración usando el segundo filtro) de aislar el ácido nucleico de la sustancia de unión del ácido

nucleico, transferir el ácido nucleico aislado al segunda filtro y, después, pasar el ácido nucleico a través del segundo filtro; y una etapa (etapa de extracción de ácidos nucleicos) de transferencia de las sustancias que pasan a través del segundo filtro y, después, extracción del ácido nucleico a través de la parte de salida. Por tanto, el uso del dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención puede realizar la automatización, ultra-miniaturización y velocidad superalta en la reacción de extracción de ácidos nucleicos, sin limitaciones de los especímenes biológicos, tales como esputo, sangre, células, orina, saliva, tejidos, etc., minimizar la cantidad utilizada de la solución de muestra y mantener y / o mejorar la eficacia de la extracción de ácido nucleico con fiabilidad.

#### 10 Ejemplo experimental: Rendimiento de la extracción de ácidos nucleicos y tiempo requerido

En primer lugar, un dispositivo de extracción de ácidos nucleicos en general usando un tubo y un dispositivo de extracción de ácidos nucleicos usando un chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención se utilizan de forma independiente para extraer ADN de una célula de la cepa de bacilo tuberculoso y se determinan el rendimiento de los ADN y el tiempo requerido.

La etapa general de extracción de ácido nucleico es la siguiente. La célula de la cepa de bacilo tuberculoso se prepara y se mezcla con 6 % de NaOH y 4 % de NaLC en una relación de mezcla de 1:1:1 para preparar una solución de muestra. La solución de muestra se somete a una separación centrífuga y se retira del sobrenadante (20 minutos, 4.300 rpm, 4 °C). Se añade 1 ml de agua destilada (AD) a la solución de muestra y, después de agitación en vórtex, la solución de muestra se transfiere a otro tubo. La solución de muestra se somete a una segunda separación centrífuga y, después, se retira del sobrenadante (3 minutos, 12.000 rpm, temperatura ambiente). Se añade 1 ml de agua destilada (AD) a la solución de muestra y, después de agitación en vórtex, se añaden 500 µl de agua destilada (AD) a la solución de muestra para obtener un ADN (utilizando un kit QIAamp DNA disponible comercialmente). Como resultado, el rendimiento del producto final es de aproximadamente 100 µl y el tiempo requerido para obtener el producto final de ADN es al menos aproximadamente una hora.

Posteriormente, el chip de microfluidos 1 para la extracción de ácidos nucleicos y el dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención se utilizan para extraer el ácido nucleico de la misma célula de la cepa de de bacilo tuberculoso. Los procedimientos específicos son como sigue. La célula de la cepa de bacilo tuberculoso se prepara y se mezcla con 6 % de NaOH y 4 % de NaLC en una relación de mezcla de 1:1:1 para preparar una solución de muestra. A continuación, se utiliza una jeringa para introducir la solución de muestra en la parte de entrada del chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos (25 x 72 x 2 mm<sup>3</sup>, perla de sílice (OPS Diagnostics, LLC), filtro (Whatman)) de la figura 1 (se requiere aproximadamente un minuto). En la parte de entrada del chip de microfluidos de acuerdo con una realización de la presente invención se introducen gel de sílice y 300 µl de 1X tampón de unión a ADN. Y, la parte de calentamiento del chip de microfluidos de acuerdo con una realización de la presente invención se calienta rápidamente hasta 95 °C (se requieren aproximadamente un minuto y treinta segundos). A través de la parte de entrada del chip de microfluidos de acuerdo con una realización de la presente invención, los residuos fuera de la solución de muestra se eliminan y se introducen 100 µl de un tampón de elución (se requieren aproximadamente 30 segundos). A continuación, se obtiene el producto final a través de la parte de salida del chip de microfluidos de acuerdo con una realización de la presente invención. Como resultado, el rendimiento del producto final de ADN es de aproximadamente 100 µl y el tiempo requerido para obtener el producto final de ADN es de aproximadamente 7 minutos. Esto demuestra que el uso en el experimento del dispositivo de extracción de ácidos nucleicos automática en lugar del dispositivo de extracción de ácidos nucleicos manual puede acortar el tiempo requerido a aproximadamente 5 minutos o menos.

Como resultado del experimento, en comparación con el procedimiento convencional de extracción de ácidos nucleicos, el chip de microfluidos y el dispositivo de extracción de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención pueden utilizarse para reducir en gran medida el tiempo requerido para la extracción de ácidos nucleicos, al tiempo que se mantiene el rendimiento de la extracción de ácidos nucleicos.

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo para la extracción de un ácido nucleico de un espécimen biológico, que comprende:

5 un sustrato (500);  
 un soporte del chip (600) que está dispuesto en la superficie superior del sustrato (500) y que incluye una parte de recepción (650) del chip que tiene la forma de una placa con una superficie horizontal en estrecho contacto con una superficie inferior de un chip de microfluidos para la extracción de ácidos nucleicos;  
 10 un calentador (700) en forma de un bloque de calentamiento de tipo placa de contacto, estando el calentador (700) dispuesto en la superficie horizontal de la parte de recepción (650) del chip y hecho para aplicar calor a una parte de toda la superficie inferior del chip de microfluidos (1) para la extracción de ácidos nucleicos instalada en la parte de recepción (650) del chip; y un chip de microfluidos (1) para la extracción de ácidos nucleicos que tiene la forma de una placa con una superficie horizontal superior y una superficie inferior horizontal, en el que el chip de microfluidos (1) comprende:  
 15 una parte de entrada (10); para recibir un espécimen biológico  
 una parte de salida (60) para recuperar el ácido nucleico extraído;  
 un canal (70) que conecta la parte de entrada (10) y la parte de salida (60);  
 20 un primer filtro (30) y un segundo filtro (50), en el que el primer filtro (30) y el segundo filtro (50) están dispuestos dentro del canal (70) y en el que el primer filtro (30) y el segundo filtro (50) están configurados para permitir que una sustancia que tiene un tamaño equivalente de un ácido nucleico pase a través;  
 una parte de separación (40) de ácido nucleico, en la que la parte de separación (40) de ácido nucleico está situada entre el primer filtro (30) y el segundo filtro (50), y en la que dicha parte de separación (40) de ácido nucleico comprende una sustancia de unión (45) a ácido nucleico capaz de unirse específicamente al ácido nucleico; y  
 25 una parte de calentamiento (20), en la que la parte de calentamiento (20) está dispuesta dentro del canal (70) y está situada entre la parte de entrada (10) y el primer filtro (30), en la que la parte de calentamiento (20) está configurada para transferir el calor obtenido del calentador (700) a un espécimen biológico introducido a través de la parte de entrada (10).

30 2. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende:

35 una cubierta del chip (800) que está dispuesta en la parte superior del soporte (600) del chip y que tiene una superficie horizontal en estrecho contacto con la superficie superior del chip de microfluidos (1) para instalar la extracción de ácido nucleico en la parte de la parte de recepción (650) del chip.

3. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende:

40 un módulo de control de fluidos (900) hecho para controlar el flujo de una solución de reactivo recibida en el chip de microfluidos (1) para la extracción de ácido nucleico instalada en la parte de recepción del chip.

4. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende:

45 un módulo de control del calor (750) conectado al calentador (700) para controlar la capacidad térmica proporcionada por una solución de reactivo recibida en el chip de microfluidos (1) para la extracción de ácido nucleico instalada en la parte de recepción del chip.

5. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el canal (70) del chip de microfluidos (1) está hecho para permitir que un fluido pase a través y tenga una anchura y una profundidad en el intervalo de 0,001 a 10 mm.

50 6. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer filtro (30) y el segundo filtro (50) del chip de microfluidos (1) para la extracción de ácidos nucleicos tienen un poro con un diámetro en el intervalo de 0,1 a 0,4  $\mu\text{m}$  y un espesor en el intervalo de 0,01 a 0,5 mm.

55 7. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el primer filtro (30) y el segundo filtro (50) del chip de microfluidos (1) para la extracción de ácidos nucleicos tienen un poro con un diámetro de 0,2  $\mu\text{m}$  y un espesor de 0,01 a 0,5 mm.

60 8. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la parte de separación (40) de ácido nucleico del chip de microfluidos (1) para la extracción de ácidos nucleicos tiene una perla con un grupo funcional de unión al ácido nucleico sobre la superficie del mismo como una sustancia de unión de ácido nucleico (45).

65 9. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la perla que tiene un grupo funcional de unión a ácido nucleico del chip de microfluidos (1) para la extracción de ácido nucleico tiene un diámetro en el intervalo de 0,001 a 20 mm.

10. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la parte de separación (40) del ácido nucleico del chip de microfluidos (1) para la extracción de ácidos nucleicos comprende la perla que tiene un grupo funcional de unión a ácido nucleico en una cantidad de 1 µg a 200 mg.

5 11. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el chip de microfluidos (1) para la extracción de ácidos nucleicos comprende una primera placa (100); estando una segunda placa (200) dispuesta sobre la primera placa (100) y que tiene el canal (70); y estando una tercera placa (300) dispuesta en la segunda placa (200) y que tiene la parte de entrada (10) y la parte de salida (60).

10 12. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la parte de entrada (10) de la tercera placa (300) del chip de microfluidos (1) para la extracción de ácido nucleico tiene un diámetro en el intervalo de 0,1 a 5,0 mm, en el que la parte de salida (60) del chip de microfluidos (1) para la extracción de ácido nucleico tiene un diámetro de 0,1 a 5,0 mm, en el que la primera placa (100) y la tercera placa (300) del chip de microfluidos (1) para la extracción de ácido nucleico tienen un espesor en el intervalo de 0,01 a 20 mm, en el que la segunda placa (200) del chip de microfluidos (1) para la extracción de ácido nucleico tiene un espesor en el intervalo de 30 µm a 10 mm.

20

25

30

35

40

45

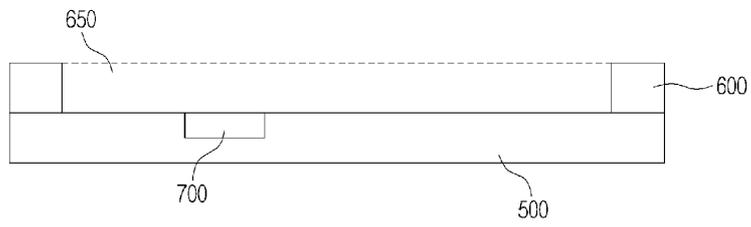
50

55

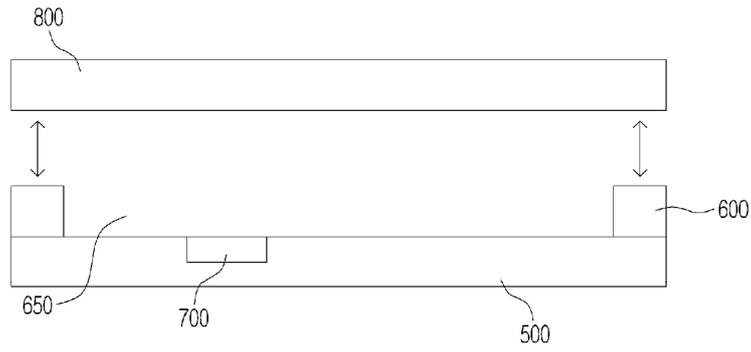
60

65

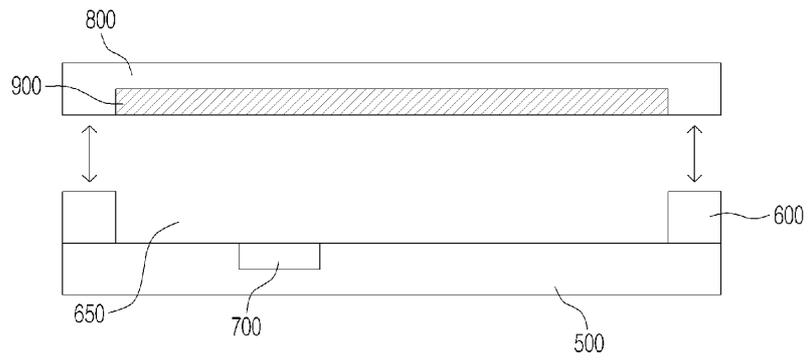
[Fig. 1]



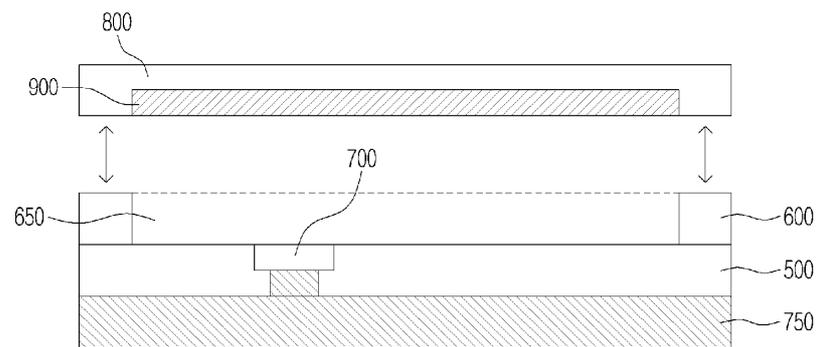
[Fig. 2]



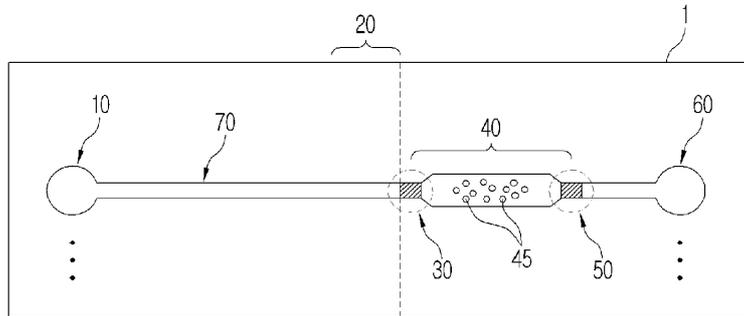
[Fig. 3]



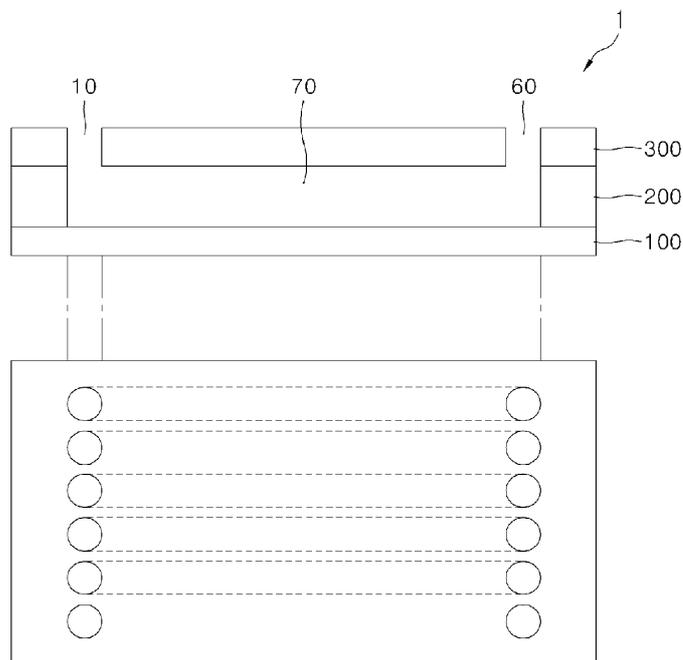
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]

