

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 453**

51 Int. Cl.:

C12M 1/26 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2010 PCT/US2010/035942**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.02.2011 WO11019428**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2010 E 10808476 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2438151**

54 Título: **Método y sistema para preparación de muestras**

30 Prioridad:

22.05.2009 US 180494 P

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

02.08.2017

73 Titular/es:

**INTEGRATED NANO-TECHNOLOGIES, INC.
(100.0%)
999 Lehigh Station Road
Henrietta, NY 14467, US**

72 Inventor/es:

**CONNOLLY, DENNIS, M.;
DEBOER, CHARLES;
TANNOUS, VERA;
KILCOIN, CHRISTOPHER;
APTEKAREV, KONSTANTIN;
BAILEY, DAVID, B. y
MURANTE, RICHARD, S.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU SLP, .

ES 2 628 453 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método y sistema para preparación de muestras

Derechos de licencia gubernamentales

- 5 El Gobierno de Estados Unidos tiene una licencia pagada en esta invención y el derecho en circunstancias limitadas a requerir al titular de la patente a autorizar a otros en términos razonables según lo previsto por los términos de uno o más de las siguientes Concesiones de Subvención N°s DMI-0450472 e IIP-0450472 concedidas por la Fundación Nacional de Ciencia, N° de Contrato W81XWH-07-2-0109 otorgado por la Comandancia de Materiales e Investigación del Ejército de los E.E.U.U., N°s de Contrato W911NF-06-1-0238 y W911NF-09-C-0001 otorgados por RDECOM ACQ CTR del Ejército de los E.E.U.U.

Campo de la invención

- 15 Esta invención se refiere a un método para preparar muestras mediante ruptura de una muestra para obtener moléculas de ácido nucleico dentro de un intervalo de pares de bases utilizable. Las moléculas de ácido nucleico se pueden manipular utilizando nanopartículas magnéticas. La invención se refiere también a válvulas multi-cámara, y más particularmente a válvulas rotatorias multi-cámara. La invención se refiere además a un método para transmitir fluidos desde los depósitos de almacenamiento y de la muestra hacia una cámara de reacción.

Antecedentes de la invención

- 20 Existe un interés continuo por mejorar metodologías de prueba y disminuir los requerimientos de tiempo en los laboratorios clínicos. Las pruebas particulares requieren que una muestra se descomponga para extraer moléculas de ácido nucleico como ADN o ARN.

Se estima que se llevaron a cabo aproximadamente 30 millones de pruebas de diagnóstico molecular en instalaciones médicas de E.E.U.U. en 2007. Se espera que esta cifra aumente a 67 millones en 2009. Muchos, si no todos estos ensayos, podrían beneficiarse de un proceso de preparación rápida de muestras que es fácil de usar, no requiere la intervención de operador, es rentable y sensible a muestras de pequeño tamaño.

- 25 Está creciendo rápidamente el uso de diagnóstico molecular y de secuenciación de genes en investigación y diagnóstico médico. Las técnicas moleculares proporcionan mayores niveles de especificidad y sensibilidad que los métodos de anticuerpos. La secuenciación genética permite la recopilación de grandes cantidades de información no disponibles con anterioridad. Sin embargo, la preparación de muestra es un componente importante de coste de funcionamiento de la PCR, PCR a tiempo real, análisis de secuenciación genética y pruebas de hibridación. Además, retrasa los resultados de las pruebas y limita la capacidad de ejecutar estos ensayos de laboratorios con personal bien entrenado.

- 30 La identificación de material biológico basada en ácidos nucleicos requiere primero el aislamiento de las moléculas de ácido nucleico (NAMs) de la muestra. Para que un sistema cumpla con efectividad y eficacia las necesidades de los usuarios, se requiere un proceso universal de preparación de la muestra. Los procesos actuales de preparación de muestra son laboriosos, consumen mucho tiempo y requieren capacidad de laboratorio. Para ser universal, el proceso debe ser capaz de manejar una amplia variedad de materiales de inicio. Esto incluye, pero no se limita a, virus, esporas, organismos, bacterias y materiales de diagnóstico médico, como sangre, tejido, saliva, orina y heces.

- 35 Por ejemplo, el documento de E.E.U.U. 2007/0092876 A1 describe un método y un sistema para células y/o el aislamiento de moléculas de ácido nucleico. El método comprende i) tratar una muestra de tejido con al menos una enzima para la disociación del tejido; ii) añadir una solución lítica; y aislar las moléculas de ácido nucleico. Además, se aplica una fuerza de cizallamiento hidrodinámica al producto de la etapa i). Esto es, después de añadir la enzima, se colocó la muestra de tejido en baño con agitación durante 30 minutos. Según un ejemplo diferente, se usan canales de disrupción para la disrupción del tejido.

- 40 El documento de E.E.U.U. 2007/0172949 A1 describe un método para aislar ADN. El método implica la aplicación de energía mecánica oscilatoria controlada al material biológico durante cortos periodos de tiempo para lisar el material. En particular, está descrito que el material biológico oscile a una velocidad de oscilación entre aproximadamente 25 Hz a aproximadamente 133 Hz y que produzca una aceleración lineal promedio en el material en el intervalo de aproximadamente 150 veces la gravedad (g) a aproximadamente 415 veces la gravedad (g) durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 3 segundos a 5 minutos. Además, se describe que se proporcionan una o más perlas esféricas, que impactan con el material y facilitan el proceso de aislamiento hasta la oscilación.

- 45 El batido con perlas se ha susado durante años para aislar moléculas de ácido nucleico a partir de muestras. El batido con perlas es la agitación, normalmente por ultrasonidos, de perlas de vidrio de tamaño de micras añadidas a la muestra. Es un sólido enfoque que es muy adecuado para usar con sólidos como esporas o tejido.

- 5 El batido con perlas tiene varios inconvenientes. Por un lado, si la muestra se trata demasiado tiempo, o a un nivel de potencia muy alto, se producen solamente fragmentos cortos de menos de 100 bases de longitud. Por otro lado, si la muestra se trata con agitación de baja potencia, breve, se produce un rendimiento bajo de ácido nucleico, junto con un amplio intervalo de tamaños de fragmentos. Cuando se necesitan intervalos de tamaño particular de ácidos nucleicos, algunas veces se emplea electroforesis en gel de la muestra, cortar las secciones de gel con los intervalos de tamaños correctos del gel acabado y extraer los fragmentos de ácido nucleico del gel. Este proceso es tanto lento como tedioso.
- 10 En la ejecución de pruebas biológicas y químicas a menudo se desea obtener un intervalo de tamaño utilizable de moléculas de ácido nucleico y concentrar y retener el analito deseado. Concentrar la muestra puede ser un proceso difícil. Los métodos tradicionales para concentrar una muestra biológica incluyen filtrado, lavado, centrifugado y/o reacción química. A menudo estas etapas no se pueden realizar en una única cámara de procesamiento y requieren que la muestra se transfiera a otros dispositivos o cámaras.
- 15 Las nanopartículas magnéticas son partículas que son atraídas por un campo magnético. Anclando una nanopartícula magnética a polímeros de ácidos nucleicos y aplicando un campo magnético a una muestra, los polímeros de ácido nucleico se pueden mover a una ubicación deseada, concentrando así una porción de la muestra con los polímeros de ácido nucleico. Se puede sacar entonces la muestra de la porción concentrada produciendo una alta cantidad de polímeros de ácido nucleico.
- 20 Aplicar un campo magnético permite además manipular el polímero de ácido nucleico. Por ejemplo, manteniendo un polímero de ácido nucleico estable se puede aplicar un aclarado sin eliminar con líquido el polímero de ácido nucleico.
- 25 Aplicar un campo magnético en una disposición de diferentes sensores permite el posicionamiento del polímero de ácido nucleico en la proximidad de un área de prueba deseada. El polímero de ácido nucleico se puede manipular para interactuar secuencialmente con una multitud de áreas de prueba.
- 30 El análisis de fluidos requiere generalmente una serie de etapas del proceso. Estas etapas del proceso requieren generalmente que se pongan en contacto distintos fluidos con un área de reacción a diferentes tiempos y en secesión variable. Además, cada fluido puede requerir diferente pre-tratamiento antes de ponerse en contacto con el área de reacción como etapas de pre-tratamiento químico, óptico, térmico, mecánico, magnético o acústico. Se puede someter una muestra de fluido única a una variedad de etapas de pre-tratamiento antes de ponerse en contacto con un área de reacción como calentamiento o procesamiento ultrasónico. Según aumenta el número de fluidos y etapas de pre-tratamiento, el sistema de suministro de fluidos se vuelve más complejo.
- 35 Los diseños actuales para sistemas de suministro de fluidos se personalizan para un proceso particular y no se convierten fácilmente a nuevos procesos. Generalmente, los sistemas de suministro de fluidos comprenden una serie de cámaras configuradas de modo único para el pre-tratamiento y suministro de un fluido particular. Estos sistemas no se adaptan fácilmente a nuevas etapas de pre-tratamiento o de suministro de fluido sin cambiar las cámaras y el procedimiento de suministro.
- Por lo tanto, existe una necesidad de un método para preparar muestras de ácido nucleico a partir de cualquier fuente en un intervalo de tamaño deseado, de forma rápida y económica.
- Además, se desea una partícula de entrelazamiento magnética que se une específicamente a analitos diana.
- Aún más, se desea una partícula de entrelazamiento que tenga propiedades magnéticas.
- 40 Por lo tanto, hay una necesidad de un sistema de suministro de fluido que es fácilmente configurable a nuevos procedimientos de suministro y etapas de pre-tratamiento.
- Además, hay una necesidad de un sistema de suministro de fluido desechable que se puede fácilmente insertar y eliminar de una mesa o un dispositivo portátil.
- 45 Todavía más, existe una necesidad de un sistema de suministro de fluido que se fabrique y se personalice fácilmente para adaptarse a diferentes necesidades de suministro de fluidos.
- Compendio de la invención**
- Se diseña un módulo de preparación de la muestra para identificar y validar componentes para disrupción por ultrasonidos y manipulación genética de moléculas de ácido nucleico. En una realización, todas las etapas de procesamiento tienen lugar dentro de un cartucho desechable.
- 50 La automatización del proceso de preparación de la muestra puede reducir en gran medida los costes y aumentar la reproducibilidad de estas técnicas. En particular, los sistemas de secuenciación genética automatizados requieren procesamiento extensivo de muestras para preparar ADN para análisis. La mayoría de los abordajes de secuenciación de ADN usan una etapa de clonaje *in vitro* para amplificar moléculas individuales de ADN. La PCR de

emulsión aísla moléculas de ADN individuales junto con perlas recubiertas con cebador en gotas acuosas dentro de una fase de aceite. La PCR recubre entonces cada perla con copias clonales de la molécula de ADN seguido de inmovilización para secuenciación posterior. La PCR de emulsión se usa en los métodos por Margulis et al. (comercializados por 454 Life Sciences), Shendure y Porreca et al. (también conocido como “secuenciación polony”) y secuenciación SOLiD, (desarrollada por Agencourt, ahora Applied Biosystems). Otro método para amplificación clonal *in vitro* es la PCR *punteo*, donde los fragmentos se amplifican sobre cebadores anclados a una superficie sólida. El método de una sola molécula desarrollado por el laboratorio de Stephen Quake (más tarde comercializado por Helicos) se salta este paso de amplificación, fijando directamente las moléculas de ADN a una superficie.

Dado que ambos fragmentos de ADN sonicados pueden contener extremos de cadena sencilla, la mayoría de los procedimientos incluyen una etapa de reparación de extremos de ADN antes de la ligación en vectores de extremos romos (10, 11). Se usa una combinación de la ADN polimerasa T4 y la ADN polimerasa Klenow para “rellenar” los fragmentos de ADN catalizando la incorporación de nucleótidos complementarios en fragmentos de doble cadena con un 5' saliente resultantes. Además, la actividad exonucleasa 3'-5' de cadena sencilla de la ADN polimerasa T4 se usa para degradar salientes 3'. Las reacciones incluyen las dos enzimas, tampón, y deoxinucleótidos y se incuban a aproximadamente 37°C. Los fragmentos se concentran por precipitación con etanol seguido de resuspensión en tampón quinasa, y fosforilación usando polinucleótido quinasa T4 y rATP. La polinucleótido quinasa se elimina por extracción con fenol y los fragmentos de ADN se concentran por precipitación con etanol, secado, resuspensión en tampón, y ligación en vectores de clonaje con extremos romos. Dado que, una parte significativa de los fragmentos de ADN sonicados se clonan fácilmente sin tratamiento con quinasa o reparación de extremos, se pueden combinar estas dos etapas sin afectar significativamente al número total de clones transformados resultantes.

Actualmente, después de la reparación de extremos de los fragmentos, las muestras de ADN se someten a electroforesis en un gel preparativo de agarosa de baja temperatura de fusión frente a un marcador de tamaño, y después de una separación apropiada, los fragmentos en el intervalo de tamaño a partir de 1-2 Kbp y 2-4 Kbp se escinden y se eluyen por separado del gel. Alternativamente, los fragmentos se pueden purificar por fraccionamiento en una columna de centrifugación como un Sephacryl S-500.

El proceso de preparación de la muestra de la corriente invención puede preparar fragmentos de ADN y de ARN en un intervalo de tamaño de entre 100 y 10.000 pares de bases. Se puede variar la distribución exacta de tamaños cambiando las concentraciones de tensioactivos, los tensioactivos usados o la frecuencia de sonicación. La capacidad de producir fragmentos del intervalo de tamaño deseado obvia la necesidad de la electroforesis o el aislamiento en columna. Esto también aumenta el rendimiento global de fragmentos útiles eliminando la necesidad de añadir etapas de purificación.

El módulo de preparación de la muestra permite la disrupción de células, el tamaño de ADN y ARN, la concentración y limpieza del material. Se pueden usar cámaras adicionales en el cartucho para suministrar los reactivos necesarios para la reparación de extremos y el tratamiento con quinasa. Las enzimas se pueden almacenar en seco y rehidratadas en el cartucho o añadir al cartucho antes del uso.

La válvula rotatoria se puede almacenar en posición que deja todos los puertos y conductos cerrados permitiendo el almacenamiento a largo plazo y el envío de la válvula rotatoria con reactivos líquidos y sólidos cargados dentro de la válvula.

En una forma, la invención rompe en pedazos una muestra para obtener moléculas de ácido nucleico. Se aplica una fuerza de cizallamiento en presencia de un estabilizador de tamaño para romper en pedazos la muestra y obtener fragmentos de ácido nucleico del intervalo de tamaño deseado.

La descripción comprende, en una forma de la misma, un método para usar nanopartículas magnéticas que contienen un elemento de unión al analito diana para unir la nanopartícula de nucleación a un analito diana. La nanopartícula magnética es capaz de ser manipulada dentro de un campo magnético. Como la nanopartícula magnética está anclada al analito diana, se puede manipular indirectamente el analito diana mediante la aplicación de un campo magnético.

En una forma, el elemento de unión al analito diana se une directamente a la superficie de la partícula. Opcionalmente, el elemento de unión al analito diana se ancla a la nanopartícula magnética a través de grupos conectores intermediarios como, pero no se limitan a, enlazadores, andamiajes, estabilizadores o estabilizadores estéricos. El grupo conector intermediario puede ser de tamaño, arquitectura y composición química variables para interconectar la(s) nanopartícula(s) magnética(s) y el(los) elemento(s) de unión al analito diana en una entidad multifuncional. En otra realización la nanopartícula magnética contiene además un material catalítico. Las nanopartículas magnéticas se definen como capaces de formar enlaces con ácidos nucleicos poliméricos en ciertas condiciones las cuales se pueden liberar en otras ciertas condiciones.

En una realización, las nanopartículas magnéticas se liberan de la molécula de ácido nucleico a través de la aplicación de calor. Se ha visto que temperaturas alrededor de 95°C liberan eficazmente las nanopartículas magnéticas. En otra realización, las nanopartículas magnéticas se liberan de la molécula de ácido nucleico a través

de una solución de elución. La solución de elución puede ser un detergente o sal. En una realización preferida, la solución de elución son fosfatos o citratos. En una realización la solución de elución es un fosfato potásico o sódico o citrato.

- 5 En una realización, la partícula funcionalizada con el grupo de unión al analito diana requiere una mejor estabilidad coloidal para prevenir la aglomeración. Por lo tanto, se añade un estabilizador coloidal, como una cadena hidrófila o grupo iónico, o se conecta a un grupo enlazador que liga la partícula. Estos grupos ayudan a limitar el tamaño de nanopartículas durante la etapa de generación de partícula.

Es un objeto de la invención preparar muestras de ácido nucleico dentro de un intervalo de tamaño deseado.

Una ventaja de la invención, es un alto rendimiento de ácido nucleico a partir de la preparación de la muestra.

- 10 Otra ventaja de la invención, es que se pueda usar con cualquier fuente de muestra de ácido nucleico, incluyendo tejido vivo, células bacterianas, esporas, insectos, plantas, y células virales.

Otra ventaja aún de la invención, es que el ácido nucleico producido es puro y limpio, sin contaminación por otros materiales biológicos como proteínas, lípidos, y restos celulares.

- 15 Una ventaja adicional más de la invención, es que el proceso de preparación de la muestra genera un alto rendimiento global porque la mayoría de los fragmentos se encuentran en un intervalo de tamaño utilizable.

Otra ventaja de la presente invención es que la utilización de nanopartículas magnéticas permite la concentración de la muestra mediante la aplicación de un campo magnético sin etapas de procesamiento adicionales.

Una ventaja adicional de la presente invención es que la utilización de nanopartículas magnéticas permite la rápida manipulación de anilitos diana reduciendo así los tiempos de difusión y reacción.

20 **Breve descripción de los dibujos**

La presente invención se describe con referencia a los dibujos adjuntos, en donde:

Las Figs. 1A-1B muestran una representación gráfica de una válvula rotatoria según una realización;

La Fig. 2 muestra una vista ampliada de una válvula rotatoria según una realización;

La Fig. 3A muestra una vista en sección transversal de una válvula rotatoria según una realización;

- 25 La Fig. 3B muestra una vista en sección transversal de una válvula rotatoria según una realización que tiene un electroimán y un sonicador incorporados en la válvula;

Las Figs. 4A-4D muestran una representación gráfica del cuerpo del cartucho según una realización;

Las Figs. 5A-5B muestran una vista de sección transversal de una válvula rotatoria montada según una realización que tiene el depósito multi-cámara protegido en el cuerpo del cartucho;

- 30 Las Figs. 6A-6G muestran una representación gráfica del depósito multi-cámara según una realización;

Las Figs. 7-16C muestran varias representaciones gráficas de una válvula rotatoria montada con el depósito multi-cámara colocado para el flujo de fluido deseado a través de los canales según una realización;

La Fig. 17 muestra una representación esquemática de la válvula rotatoria según una realización;

La Fig. 18 muestra un diagrama de flujo del proceso para un uso de la válvula rotatoria según una realización;

- 35 Las Figs. 19A-21B muestran una representación gráfica de las configuraciones del depósito multi-cámara inserto según varias realizaciones;

La Fig. 22 muestra una representación gráfica de dispositivo de muestreo que contiene un accionamiento de válvula rotatoria y un accionamiento de émbolo según una realización;

- 40 La Fig. 23 muestra una representación gráfica de un accionamiento de válvula rotatoria con la válvula rotatoria eliminada según una realización;

La Fig. 24 muestra una representación gráfica del montaje del motor paso a paso y accionamiento helicoidal según una realización;

La Fig. 25 muestra una representación gráfica de un calentador según una realización;

- La Fig. 26 demuestra la liberación eficaz de moléculas de ácido nucleico a partir de la lisis de esporas usando batido ultrasónico con perlas con estabilizador de tamaño;
- La Fig. 27 demuestra moléculas de ácido nucleico aisladas de moscas de la fruta y que la adición de un estabilizador de tamaño en los carriles 2 y 3 protegen las moléculas de ácido nucleico de un sobre-cizallamiento, mientras que las muestras sin desnaturalizantes se cizallaron a un nivel muy por debajo de 100 pares de bases;
- La Fig. 28 muestra que usando este proceso las moléculas de ácido nucleico de una amplia variedad de diferentes muestras se pueden tratar con los mismos niveles de potencia y tiempo de sonicación para dar la misma distribución de tamaño de fragmentos;
- La Fig. 29 es una representación gráfica que muestra la liberación de las moléculas de ácido nucleico de las partículas magnéticas;
- La Fig. 30 demuestra el aislamiento de la molécula de ácido nucleico obtenida del uso de tejido de la oreja de una vaca;
- La Fig. 31 demuestra el aislamiento de la molécula de ácido nucleico obtenida del uso de moscas de la fruta contaminadas con tierra;
- La Fig. 32 demuestra ADN purificado recuperado de moscas de la fruta;
- La Fig. 33 demuestra ADN recuperado de moscas de la fruta usando varios tampones;
- La Fig. 34 demuestra la recuperación de moléculas de ácido nucleico de levadura, hierba y arándanos;
- La Fig. 35 demuestra la recuperación de moléculas de ácido nucleico a partir de e-coli y que los tiempos de sonicación largos no cambian la distribución de tamaño;
- La Fig. 36 es una representación gráfica de la recuperación de ADN a partir de volúmenes crecientes de cultivo celular bacteriano usando la presente invención, el kit comercial de Quiagen para la recuperación de ADN y el método de Fenol/Cloroformo bibliográfico;
- La Fig. 37 demuestra la eficacia del tampón de alta fuerza iónica en la protección de moléculas de ácido nucleico durante la sonicación; y
- La Fig. 38 demuestra que la sonicación en presencia de un estabilizador de tamaño seleccionado puede proporcionar un alto rendimiento de ADN en un intervalo de tamaño limitado.
- Los caracteres de referencia correspondientes indican partes correspondientes en las distintas vistas. Los ejemplos presentados en esta memoria ilustran varias realizaciones de la invención pero no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.
- Descripción detallada**
- El dispositivo automatizado de preparación de muestras proporciona una solución automatizada para preparar una muestra biológica para su análisis. El dispositivo contiene una válvula rotatoria que tiene un número de cámaras para realizar las diversas etapas requeridas para obtener una muestra utilizable.
- La válvula rotatoria es una construcción de dos piezas capaz de varios posicionamientos para permitir el paso de fluido contenido en los depósitos en las rutas de fluido. El diseño de dos piezas permite una fabricación y montaje fáciles. El diseño permite además que la válvula rotatoria sea una pieza desechable en instrumentos que requieren una pluralidad de fluidos. En una realización, la válvula rotatoria es una única pieza para usar en dispositivos de detección. La válvula rotatoria contiene los fluidos necesarios para el ensayo biológico y además es capaz de inyectarlos con una muestra de campo.
- Refiriéndose a las Figs. 1A-1B se muestra una válvula rotatoria montada de la presente invención. La válvula rotatoria comprende dos componentes principales. El depósito inserto 101 está contenido dentro del cuerpo del cartucho 102. La válvula rotatoria 100 es un componente desechable que contiene una pluralidad de depósitos capaces de almacenar una pluralidad de fluidos. En una realización, depósito inserto 101 y el cuerpo del cartucho 102 están formados a través de técnicas de modelado por inyección.
- En una realización, un chip que contiene sondas biológicas está sujeto al cuerpo del cartucho 102. El fluido contenido en los depósitos se transfiere para entrar en contacto con el chip que contiene sondas biológicas que inician la química de reacción o detección. El chip está en comunicación con un dispositivo de detección como un dispositivo de detección de mesa o portátil para indicar la presencia de sondas biológicas diana en cualquier muestra. La válvula rotatoria 100 está insertada dentro del dispositivo de detección que está en comunicación eléctrica con el chip. El dispositivo de detección está sujeto además al cuerpo del cartucho 102 en una posición fija.

Refiriéndose a la Fig. 2 se muestra una vista desarrollada de la presente invención. El depósito inserto 101 es capaz de contener una pluralidad de fluidos en los diferentes depósitos 103. Las películas de sellado térmico 104 sellan los fluidos en el depósito inserto y evitan fugas permitiendo al mismo tiempo la inyección de muestras. Las películas de sellado térmico 104 sellan los depósitos del ambiente exterior. Las películas de sellado térmico 104 permiten además que se añada o se elimine fluido de los depósitos sin comprometer la integridad del sellado. En una realización, las películas de sellado térmico 104 mejoran la transferencia de energía dentro y fuera de los depósitos y cámaras del depósito inserto 101. La transferencia de energía incluye pero no se limita a calor, ultrasónica y magnética. Opcionalmente, se coloca un filtro 105 en línea con rútas particulares de fluido para filtrar sólidos grandes del fluido. En una realización, una vez que las películas de sellado térmico 104 están selladas en el depósito inserto 101, se fija el depósito inserto 101 al cuerpo del cartucho 102. En una realización, el depósito inserto 101 "se encaja en" el cuerpo del cartucho 102. Se entiende que las películas de sellado térmico 104 se pueden sellar al depósito inserto 101 después de que el depósito inserto 101 se fija al cuerpo del cartucho 102.

Refiriéndose ahora a las Figs. 3A-3B se muestra una vista transversal de la válvula rotatoria 100. La válvula rotatoria 100 se coloca sobre un mecanismo de acción 110. El mecanismo de acción 110 es capaz de rotar el depósito inserto 101 a la configuración deseada. El mecanismo de acción 110 hace girar el depósito inserto 101 mientras el cuerpo del cartucho 102 permanece estable. En una realización el mecanismo de acción tiene un calentador 111 opcional. El calentador es capaz de calentar los fluidos contenidos en los depósitos 103 a la temperatura deseada. Alternativamente, las cámaras de calentamiento están estratégicamente colocadas por encima del calentador para calentar el fluido en la cámara sin calentar de manera significativa los fluidos en los depósitos 103. En una realización, las películas de sellado térmico 104 facilitan este calentamiento sin calentar de manera significativa los fluidos en los depósitos 103. Las cámaras de tratamiento se incorporan en el depósito inserto 101 para facilitar la mezcla, calentamiento, disrupción, presurización o cualquier otro proceso de tratamiento.

En una realización el mecanismo de acción tiene un disruptor 112. El disruptor es capaz de mezclar o romper los fluidos contenidos en los depósitos 103 aplicando una fuerza de ultrasonidos. Alternativamente, la válvula rotatoria tiene una cámara disruptora 113 para mezclar fluidos en una cámara distinta de los depósitos. En otra realización se sitúan pequeñas perlas en la cámara disruptora o el depósito para ayudar en la mezcla de fluidos o ruptura de las muestras. El disruptor 112 aplica una fuerza de ultrasonidos que causa que las perlas se exciten y se muevan a través del fluido. En una realización se usa un imán 114 para generar un campo eléctrico. El imán puede atraer o repeler partículas magnéticas en el depósito inserto. El imán 114 puede concentrar la muestra de partículas magnéticas o acelerar el proceso de difusión al guiar las partículas magnéticas.

Se aplica una fuerza mecánica, como una fuerza de cizallamiento, a una muestra biológica para romper la muestra con el fin de liberar moléculas de ácido nucleico. Está presente un estabilizador de tamaño para obtener moléculas de ácido nucleico dentro de un intervalo de tamaño utilizable. En una realización, se tritura el material de muestra con nanopartículas de alta velocidad usando sonicación. Este proceso rompe las células, tejidos u otros materiales para liberar moléculas de ácido nucleico. Se entiende que la fuerza mecánica puede ser cualquier fuerza adecuada para desgarrar la muestra para liberar las moléculas de ácido nucleico. Fuerzas mecánicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a sonicación, nebulización u homogeneización. En una realización, las moléculas de ácido nucleico se reducen a tamaños entre 200 y 10.000 pares de bases de longitud. En otra realización las moléculas de ácido nucleico se reducen a tamaños entre 300 y 3.000 pares de bases de longitud. En otra realización las moléculas de ácido nucleico se reducen a tamaños entre 400 y 2.000 pares de bases de longitud. En otra realización las moléculas de ácido nucleico se reducen a tamaños entre 200 y 500 pares de bases de longitud. Se entiende que la longitud de pares de bases deseada variará dependiendo de la técnica de procesamiento corriente abajo de la muestra. Las técnicas de procesamiento de la muestra incluyen, pero no se limitan a hibridación, PCR, PCR en tiempo real, PCR de transcripción inversa, plataformas "laboratorio-en-un-chip" y secuenciación de ADN.

Las muestras biológicas incluyen todos los organismos biológicos que contienen ácidos nucleicos. Que incluyen, pero no se limitan a bacterias, esporas, sangre, tejidos, hongos, plantas e insectos.

El batido con perlas es un proceso para aislar moléculas de ácido nucleico a partir de muestras. Es un enfoque serio que es muy adecuado para usar con muestras de esporas o de tejido. En el batido con perlas, se usan perlas de vidrio de aproximadamente 100 micras de diámetro para machacar la muestra con el fin de liberar moléculas de ácido nucleico. Las partículas se mueven usando una fuente de ultrasonidos. La Figura 26 demuestra la eficaz liberación de moléculas de ácido nucleico a partir de muestras de esporas.

Disrupción de la muestra

En una realización, se usan perlas disruptoras como perlas de vidrio de aproximadamente 100 micras de diámetro para romper una muestra y liberar moléculas de ácido nucleico. Las perlas se hacen vibrar usando una fuente de ultrasonidos para generar una fuerza de cizallamiento en la muestra. En una realización, para suspensiones de muestras de aproximadamente 0,1 ml a 0,5 ml de agua, que contienen de aproximadamente 0,1% a 1% de ácido nucleico, se usa un nivel de potencia ultrasónica de aproximadamente 3 a 7 vatios durante un periodo de aproximadamente 1 a 3 minutos. El volumen de perlas de vidrio usado en la muestra está preferiblemente entre aproximadamente 10% a 50% del volumen de la suspensión total. La frecuencia ultrasónica usada para agitar las

perlas de vidrio convenientemente es de 20 KHz, desde un dispositivo comercial como el Branson Sonifier 150. Se entiende que frecuencias de aproximadamente 10 KHz a 100 KHz podrían ser adecuadas dependiendo de los parámetros de la muestra.

En otra realización, la fuerza de cizallamiento se aplica mediante un nebulizador o un homogeneizador.

5 La adición de estabilizadores de tamaño en la preparación de la muestra de esta invención da como resultado un alto rendimiento de ácidos nucleicos de intervalo de tamaño limitado. Los estabilizadores de tamaño de esta invención incluyen detergentes, tensioactivos y jabones. Los estabilizadores preferidos incluyen tensioactivos aniónicos, y los estabilizadores más preferidos incluyen dodecilsulfato sódico, y dodecibencenosulfonato sódico. El estabilizador de tamaño está presente en la suspensión sonicada en una cantidad entre aproximadamente 0,1% y 10%, y más preferiblemente, en una cantidad entre aproximadamente 0,2% y 2% y lo más preferiblemente, en una cantidad entre aproximadamente 0,5% y 1,5%.

Otros estabilizadores de tamaño incluyen sales caotrópicas como tiocianato de guanidinio. Tales sales se sabe que desorganizan el plegamiento normal de proteínas asociadas con ácidos nucleicos, liberando de este modo los ácidos nucleicos en forma libre.

15 Sin un estabilizador de tamaño presente, las moléculas de ácido nucleico tienden a degradarse durante la etapa de lisis. El batido ultrasónico con perlas cizalla las moléculas de ácido nucleico en fragmentos cortos que son menores de 100 bases de longitud (Véase la Figura 27, carriles 5 y 6). Para la mayoría de las aplicaciones, los fragmentos tienen que ser mayores de 100 bases. En una realización, el intervalo preferido está entre 400 a 2.000 bases. Como se muestra en la Figura 28, se realizaron una serie de pruebas para sonicar polímeros cortados de ADN y ARN purificados no más pequeños de 400 bases. En muestras complejas, las moléculas de ácido nucleico se adhieren a membranas y proteínas mientras continúan rompiéndose en fragmentos más pequeños. Para superar este problema, se modifica el tampón de lisis para contener un estabilizador de tamaño como un detergente como dodecilsulfato sódico (SDS). En otra realización, el estabilizador de tamaño es hidrocloreuro de guanidinio o bromuro potásico. Como se muestra en la Figura 27, la adición del estabilizador de tamaño mostrada en los carriles 3 y 4 protege las moléculas de ácido nucleico de más cizallamiento. Las muestras sin el estabilizador de tamaño se cortaron hasta muy por debajo de 100 bases, como se muestra en los carriles 5 y 6.

La Figura 26 demuestra la liberación eficaz de moléculas de ácido nucleico a partir de muestras de esporas. Para determinar la eficiencia de la lisis de esporas, se estimó y comparó la máxima cantidad de ácido nucleico de salida esperada con la cantidad medida en el gel en la Figura 26. Usando esta técnica, el método proporciona una estimación de la eficiencia del 85-90%. Alternativamente, la eficiencia de la lisis de esporas se puede medir por determinación de la supervivencia de esporas después de la sonicación. Como se muestra en la Tabla 1, basada en ensayos de supervivencia, la eficiencia después de dos minutos de sonicación durante los experimentos fue que el 86% de las esporas se abrieron.

Eficiencia de lisis de esporas determinada por la supervivencia de esporas (En base a esporas)

<u>Tiempo de sonicación</u>	<u># esporas supervivientes</u>	<u>% de eficiencia</u>
Sin sonicación	235	
30 seg.	105	55%
1 min.	61	74%
2 min.	32	86%

35 Tabla 1

Sin embargo, el batido con perlas por sonicación ha tenido un inconveniente en que las moléculas de ácido nucleico se degradan durante la etapa de lisis. El batido ultrasónico con perlas rompe las moléculas de ácido nucleico en fragmentos cortos que ya no son utilizables. Para la mayoría de usos, los fragmentos necesitan ser más grandes de 100 bases de longitud. El batido con perlas a menudo da como resultado fragmentos de mucho menos de 100 bases de longitud.

Usando un estabilizador de tamaño en solución con la muestra se pueden proteger las moléculas de ácido nucleico para limitar el tamaño mínimo alcanzable a la longitud de pares de bases más deseable. La adición de estabilizadores de tamaño en la preparación de la muestra da como resultado un alto rendimiento de ácidos nucleicos de intervalo de tamaño limitado. Los estabilizadores de tamaño incluyen detergentes, tensioactivos, polímeros, sales y jabones.

Otros estabilizadores de tamaño de esta invención incluyen sales caotrópicas como tiocianato de guanidinio. Tales sales se sabe que desorganizan el plegamiento normal de proteínas asociadas con ácidos nucleicos, liberando de este modo los ácidos nucleicos en forma libre.

La suspensión de la muestra biológica se realiza mezclando con un tampón. Para conservar el tamaño de muestra deseado el tampón sirve como un estabilizador de tamaño. El estabilizador de tamaño es una solución de agua que puede contener sales, detergentes, co-disolventes o polímeros. El estabilizador de tamaño previene que en la etapa de cizallamiento posterior se produzcan fragmentos de moléculas de ácido nucleico que son muy pequeñas para ser útiles en operaciones como hibridación, secuenciación y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la hibridación, los fragmentos de moléculas de ácido nucleico que son más pequeños que aproximadamente 18 pares de bases pierden especificidad y son inestables a temperatura ambiente. Para secuenciación genética y aplicaciones de PCR, son deseables los fragmentos de moléculas de ácido nucleico de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 pares de bases. El uso de un tampón de agua pura da fragmentos de moléculas de ácido nucleico de menos de aproximadamente 100 pares de bases, que son demasiado pequeños para muchas aplicaciones.

El uso del estabilizador de tamaño permite la recolección de fragmentos de moléculas de ácido nucleicos en un intervalo de pares de bases deseado. En procesos tradicionales de batido con perlas la fuerza mecánica de cizallamiento se apaga después de un tiempo particular para maximizar la cantidad de fragmentos de moléculas de ácido nucleico en el intervalo de pares de bases deseado. Sin embargo, debido a que el proceso es sensible al tiempo permanecen presentes en la muestra un amplio intervalo de longitudes de pares de bases. Usando un estabilizador de tamaño la longitud de pares de bases de la mayor parte de la muestra se puede dividir en el intervalo de pares de bases deseado. En una realización, al menos el 60% de los fragmentos de molécula de ácido nucleico están dentro del 50% de la longitud de la longitud media de pares de bases del fragmento de la molécula de ácido nucleico en la muestra. Dicho de otra manera, si el fragmento de la molécula de ácido nucleico medio tiene 400 pares de bases, el 60% de la muestra tendría entre 200 y 600 pares de bases. En otra realización, al menos el 75% de fragmentos de moléculas de ácido nucleico están dentro del 50% de la longitud de la longitud media de pares de bases del fragmento de la molécula de ácido nucleico en la muestra. En aún otra realización, al menos el 75% de fragmentos de moléculas de ácido nucleico están dentro del 30% de la longitud de la longitud media de pares de bases del fragmento de la molécula de ácido nucleico en la muestra.

Sin un estabilizador de tamaño presente, las moléculas de ácido nucleico tienden a degradarse cuando se aplica una fuerza mecánica como la sonicación. El batido ultrasónico con perlas con un estabilizador de tamaño presente rompe las moléculas de ácido nucleico en fragmentos cortos que son menores de 100 bases de longitud (Véase Figura 27, carriles 5 y 6). Para la mayoría de aplicaciones, los fragmentos necesitan ser mayores de 100 bases. Como se muestra en la Figura 35, se realizaron una serie de pruebas para sonicar polímeros cortados de ADN y ARN purificados no más pequeños de 400 bases, incluso en largos tiempos de sonicación. En muestras complejas, las moléculas de ácido nucleico se adhieren a membranas y proteínas sin dejar de romperse en fragmentos más pequeños. Para superar este problema, se modifica el tampón de lisis para contener un estabilizador de tamaño como un detergente como dodecilsulfato sódico (SDS). Como se muestra en la Figura 27, la adición del estabilizador de tamaño mostrada en los carriles 3 y 4 protege las moléculas de ácido nucleico de más cizallamiento. Las muestras sin el estabilizador de tamaño se cortaron hasta muy por debajo de 100 bases, como se muestra en los carriles 5 y 6.

Es estabilizador de tamaño está contenido en una solución tampón protectora. Se entiende que el tampón protector puede contener numerosos estabilizadores de tamaño para lograr el intervalo de pares de bases deseado. Las sales que pueden usarse en el tampón protector incluyen, fosfato sódico, hidrócloruro de guanidinio y sulfato de dextrano. El tampón protector puede contener además detergentes como dodecilsulfato sódico, dodecibencenosulfato sódico, y polietilenglicol. También se pueden usar muchos tensioactivos aniónicos comerciales como Alkanol XC. En otra realización el tampón protector incluye co-disolventes. Los co-disolventes incluyen disolventes apróticos dipolares como dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dimetilacetamida, hexametil fosforamida y tetrametilurea. En otra realización la solución protectora contiene polímeros como alcohol polivinílico, polietilenimina, ácido poliacrílico y otros ácidos poliméricos. La concentración de las sales, detergentes, co-disolventes y polímeros pueda variar de 10 mM a 5 M, y está preferiblemente entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 1 M.

Para cizallamiento mecánico como disrupción por perlas para ser usado como un enfoque universal de preparación de muestra, es necesario caracterizar y optimizar los parámetros de funcionamiento con respecto a diferentes materiales diana (ADN, ARN o proteína) y su fuente (ambiental, sangre o tejido). Aunque es adecuado un solo sistema para la disrupción de diferentes tipos de muestras, para optimizar los resultados los parámetros como potencia de entrada y la duración de la aplicación de la agitación sónica pueden variar con respecto a los diferentes tipos celulares. Además, se entiende que la concentración del estabilizador de tamaño, el tamaño de las perlas de vidrio y la inclusión de enzimas como colagenasa y hialuronidasa son todas realizaciones adicionales de la invención y de ninguna manera son limitantes.

Se entiende que las partículas magnéticas, perlas de vidrio o una combinación de ambas se pueden usar para la disrupción sin apartarse de la invención. En una realización, las partículas magnéticas se forman de óxidos de hierro.

En una realización, las partículas están en el intervalo de tamaño de 40-200 nm. Las partículas se pueden acelerar mediante una fuerza ultrasónica y pueden triturar la muestra. En una realización, se usan perlas de vidrio en la mezcla de extracción para la lisis eficaz de esporas.

5 En una realización la fuerza mecánica usada para liberar las moléculas de ácido nucleico es la vibración sónica alcanzada poniendo en contacto un contenedor de los fragmentos resuspendidos en tampón protector con fuente de vibraciones sónicas. Tal fuente puede ser un transductor ultrasónico comercial o un cristal piezoeléctrico activado por una tensión alterna. Tales dispositivos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las frecuencias cizalladoras pueden ser de 10.000 Hz a 10 MHz, preferiblemente entre 20 KHz y 4 MHz, y lo más preferiblemente entre 20 KHz y 40 KHz. Para favorecer el cizallamiento de muestras de moléculas de ácido nucleico protegidas como, por ejemplo, esporas, se pueden añadir a la muestra pequeñas perlas. El movimiento sónico inducido de las perlas rompe las paredes de esporas para liberar las moléculas de ácido nucleico contenidas dentro. Las perlas pueden variar en tamaño de aproximadamente 1 micra a aproximadamente 1 mm, preferiblemente de aproximadamente 10 micras a aproximadamente 500 micras y lo más preferiblemente de aproximadamente 50 micras a aproximadamente 200 micras. Las perlas pueden ser de un metal como acero inoxidable, vidrio o un óxido metálico denso como óxido de circonio. El tiempo requerido para romper las moléculas de ácido nucleico depende en parte del tamaño de la muestra y la potencia transmitida desde el transductor a la muestra. Sin embargo, cuando la muestra sometida a cizallamiento alcanza un estado estable, que depende de la composición del tampón protector, no hay más cambio en la distribución de tamaño de las moléculas de ácido nucleico con sonicación adicional. En la práctica, son suficientes tiempos de sonicación de 15 segundos a 2 minutos a un nivel de potencia de 1 a 2 vatios con un tamaño de muestra de 100 μ l de tampón que contiene 1 microgramo de moléculas de ácido nucleico para alcanzar un estado estable.

En otra realización, el proceso de preparación de la muestra además incluye la adición de inhibidores de ARNasa para prevenir la degradación de la muestra. En una realización, el proceso de preparación de la muestra incluye dietilpircarbonato (DEPC), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), proteinasa K, o una combinación de los mismos.

25 En otra realización, la presencia de un estabilizador de tamaño también estabiliza ARN. El SDS y el tiocianato de guanidinio rompen las ARNasas en la muestra preservando así el ARN.

En una realización, la nanopartícula magnética es una nanopartícula de magnetita. Las partículas de magnetita son comunes en la naturaleza, y se pueden recoger de arenas de playa en el borde del océano mediante el cribado con un imán. Moler estas partículas producirá un polvo magnético relativamente grueso. Se pueden producir partículas de tamaño más pequeño añadiendo una solución de cloruro férrico y ferroso agitados con una solución alcalina acuosa agitada de hidróxido sódico o amónico. Se producen partículas de tamaño aún más pequeño por la descomposición térmica de acetilacetato de hierro en éter dibencílico en presencia de hexadecanodiol, oleil amina y ácido oleico. Se conocen numerosos métodos para la fabricación de magnetita. Por ejemplo, Sun et al. describe la adición lenta de una mezcla de cloruro férrico y ferroso en amoníaco agitado. *Langmuir*, 2009, 25 (10), pp 5969-5973. Patente de E.E.U.U. N° 4.698.302 enseña la mezcla de cloruro ferroso y férrico con hidróxido sódico. Samanta et al, describe la adición de amoníaco a una mezcla agitada de cloruro férrico y ferroso en una atmósfera inerte. *Journal of Materials Chemistry*, 2008, 18, 1204-1208. Duan et al. enseña la disolución de óxido de hierro en ácido oleico para formar un complejo que forma nanopartículas de magnetita cuando se calienta a 300 grados C. *J. Phys. molécula de ácido nucleico Chem. C*, 2008, 112 (22), pp 8127-8131. Adicionalmente, Yin et al. describe la descomposición térmica de pentacarbonilo de hierro en presencia de ácido oleico, *Journal of Materials Research*, 2004, 19, 1208-1215.

Tipos de muestra procesada

45 Numerosos tipos de muestras pueden provenir aplicando una fuerza de cizallamiento para romper la muestra con el fin de liberar moléculas de ácido nucleico. El proceso de preparación de la muestra es adecuado para usar en líquidos, sólidos, muestras de tierra, tejido animal, carcasas de insectos, ADN, células bacterianas, esporas y virus. Como se muestra en la Figura 28, se procesaron varias muestras dispares usando parámetros idénticos. Se trataron todas las muestras de ADN purificado, células bacterianas, esporas, virus y moscas de la fruta usando la siguiente técnica: cada muestra se sometió a tratamiento de sonicación durante dos minutos en presencia de nanopartículas magnéticas y perlas magnéticas de 100 micras. Como se muestra en la Figura 28, todos los tipos de muestra proporcionaron una distribución de fragmentos similar.

50 Ya que se pueden usar una variedad de tipos de muestras, se puede usar un solo sistema con una amplia variedad de organismos diana sin la necesidad de modificar el proceso de preparación. Además, incluso si la muestra contiene dos dianas diferentes, se pueden purificar las moléculas de ácido nucleico de ambos componentes. Por ejemplo, los procedimientos estándar pueden no funcionar con una muestra que contiene tanto un virus como una espora- o los parámetros se deben ajustar para lisar eficientemente las esporas, en cuyo caso se pierde material viral, o se ajustan para maximizar la muestra viral, en cuyo caso no se lisan las esporas. Así, los beneficios de la inclusión de un estabilizador de tamaño o evidente.

Mediante la utilización de una sola técnica de preparación de muestra se reduce el potencial de falsos negativos. Como el estabilizador de tamaño limita el intervalo de longitudes de pares de bases de las moléculas de ácido nucleico, se disminuye el potencial para la pérdida de material debida a la sonicación en exceso.

5 En una realización, el sistema de preparación de la muestra funciona con pequeñas cantidades y produce una estrecha distribución de fragmentos de moléculas de ácido nucleico. Opcionalmente, el sistema de preparación pasa muestra a través de etapas que filtran la muestra antes de aplicar una fuerza de cizallamiento.

10 En una realización, las moléculas de ácido nucleico se usan para la aplicación de PCR después de la preparación. Se sabe que las aplicaciones de PCR no funcionan satisfactoriamente en presencia de detergentes y alcohol. Por lo tanto, se utiliza aplicación de PCR y filtrado adicional o etapa de limpieza para preparar la muestra antes de la prueba.

La Figura 28 demuestra que el uso de este proceso, las moléculas de ácido nucleico de una amplia variedad de diferentes muestras se pueden tratar con los mismos niveles de potencia y tiempo de sonicación para dar la misma distribución de tamaño de fragmentos.

15 En una realización, el proceso contiene además las etapas necesarias para limpiar las moléculas de ácido nucleico. Después de la liberación de las moléculas de ácido nucleico y del cizallamiento a un intervalo de tamaño útil, es ventajoso limpiar las moléculas de ácido nucleico de los desechos celulares, proteínas, perlas de sonicación y tampón protector para proporcionar una solución de molécula de ácido nucleico purificada en un tampón compatible con las siguientes operaciones y procedimientos de moléculas de ácido nucleico.

20 En una realización, se utiliza un imán para generar un campo magnético. El imán puede atraer o repeler partículas magnéticas. El imán puede concentrar una muestra de partículas magnéticas o acelerar el proceso de difusión al guiar las partículas magnéticas.

25 En una realización, las nanopartículas magnéticas se localizan en una cámara de muestra junto con un analito diana. Las nanopartículas magnéticas tienen una afinidad por el analito diana. Uniendo las nanopartículas magnéticas al analito diana y aplicando un campo magnético, se manipula el analito diana a ubicaciones deseadas dentro de la cámara de muestra.

30 En una realización, un tampón de precipitación en solución con los fragmentos de analito diana y la nanopartícula magnética. El tampón de precipitación precipita el analito diana de la disolución y el analito diana se recoge con las nanopartículas magnéticas. El tampón de precipitación puede ser cualquier tampón que precipita el analito diana de la solución. Para las proteínas, el tampón de precipitación incluye, pero no se limita a precipitantes orgánicos como, sulfato amónico, ácido tricloroacético, acetona, o una mezcla de cloroformo y metanol. Para moléculas de ácido nucleico como ADN, tampones de precipitación adecuados incluyen, pero no se limitan a, disolventes orgánicos miscibles en agua, acetona, dioxano y tetrahidrofurano. Aunque se proporcionan ejemplos de tampones de precipitación, se entiende que se puede utilizar cualquier tampón de precipitación sin desviarse de esta invención reivindicada.

35 En otra realización, las nanopartículas magnéticas contienen partículas superparamagnéticas. Las partículas superparamagnéticas incluyen óxidos metálicos, como óxidos de hierro. Un óxido de hierro preferido es magnetita (Fe_3O_4).

40 Una vez que se lisa la muestra, las moléculas de ácido nucleico se pueden separar magnéticamente del resto de la muestra. En una realización, la unión tiene lugar en una condición de alto contenido en sal/alcohol y se eluye usando un tampón quelante de bajo contenido en sal como citrato sódico con un aumento de temperatura. En una realización la muestra se calienta hasta al menos 60°C para aumentar el rendimiento de elución.

45 Una vez que las nanopartículas magnéticas se unen al analito diana se aplica un campo magnético a la cámara de reacción. La aplicación del campo magnético hace que las nanopartículas magnéticas y cualquier analito diana unido se concentren en una porción de la cámara de reacción. La muestra se extrae de la región concentrada de la cámara de muestra proporcionando una gran cantidad de analitos diana en comparación con la cantidad de volumen extraído. Mediante la concentración de la muestra se pueden realizar pruebas más sensibles.

En otra realización, el campo magnético mantiene la nanopartícula magnética estable según se retira la muestra restante de la cámara. La fuerza de unión entre la nanopartícula magnética y el analito diana es suficiente para prevenir que el analito diana sea eliminado.

50 En una realización se añade una dispersión de nanopartículas magnéticas a la muestra. La mezcla se incuba a continuación a aproximadamente 60°C para facilitar la unión. Después se añade un tampón de precipitación a la mezcla. El complejo unido de moléculas de ácido nucleico y magnetita se recoge después en un campo magnético. En una realización, el complejo se recoge en una pared lateral del recipiente para que cualquier sólido pueda caer al fondo del recipiente para facilitar su extracción. El tampón y cualquier sólido no unido se eliminan después de la muestra.

55

Opcionalmente, se usan etapas de aclarado adicionales para purificar la muestra. La limpieza elimina compuestos que podrían inhibir la unión de las moléculas de ácido nucleico. Soluciones de lavado adecuadas incluyen, pero no se limitan a soluciones de alcohol como etanol. El complejo se puede lavar con tampón de precipitación adicional, o un tampón de lavado que no perturbe el complejo. Después del lavado, el tampón se drena del complejo dando lugar a una muestra concentrada, purificada.

Se pueden añadir opcionalmente a la solución tampones de unión adecuados. Tampones de unión para el complejo molécula de ácido nucleico/magnetita son, en su mayor parte, tampones en los que las moléculas de ácido nucleico son insolubles. La precipitación de las moléculas de ácido nucleico promueve la unión de las moléculas de ácido nucleico a las partículas de magnetita. El tampón de unión para moléculas de ácido nucleico y nanopartículas de magnetita puede contener agua, acetato sódico, cloruro sódico, cloruro de litio, acetato amónico, cloruro de magnesio, etanol, propanol, butanol, glucógeno u otros azúcares, poliacrilamida o mezclas de los mismos. En una realización el tampón de unión es isopropanol. La unión de las moléculas de ácido nucleico a las nanopartículas de magnetita no es instantánea. En una realización la mezcla se incuba por encima de la temperatura ambiente para acelerar el proceso de unión.

Para procesamiento posterior de las moléculas de ácido nucleico, para algunos procesos, es necesario eliminar las partículas de magnetita. En una realización la molécula de ácido nucleico se eluye del complejo de moléculas de ácido nucleico y magnetita calentando una mezcla de un tampón de elución y el complejo a 95°C. La magnetita se puede recoger por un campo magnético, o por centrifugación, proporcionando moléculas de ácido nucleico en tampón de elución. En una realización los tampones de elución contienen una sal que interacciona fuertemente con superficies de óxido de hierro. Son tampones preferidos soluciones salinas de fosfato y citrato.

Manipulación magnética:

En una realización, se utiliza un imán 114 para generar un campo eléctrico. El imán puede atraer o repeler partículas magnéticas en el depósito inserto. El imán 114 puede concentrar una muestra de partículas magnéticas o acelerar el proceso de difusión guiando cualquier partícula magnética.

Las nanopartículas magnéticas de entrelazamiento se sitúan en la cámara de muestra junto con un analito diana. Las nanopartículas magnéticas de entrelazamiento tienen una afinidad por el analito diana. Mediante la unión de las nanopartículas magnéticas de entrelazamiento al analito diana y aplicando un campo magnético se manipula el analito diana a localizaciones deseadas dentro de la cámara de muestra.

En una realización, el elemento de unión al analito diana está unido a la nanopartícula magnética de entrelazamiento a través de al menos un grupo conector intermedio como, pero no limitado a enlazadores, andamiajes, estabilizadores o estabilizadores estéricos.

La nanopartícula de nucleación contiene partículas que exhiben propiedades magnéticas. Hay un número de partículas que exhiben propiedades magnéticas. En una realización se usa cobalto, níquel, hierro o una combinación de los mismos para crear una nanopartícula magnética de entrelazamiento. Opcionalmente, la nanopartícula magnética de entrelazamiento contiene además una partícula catalítica. En una realización la partícula catalítica es paladio, platino, plata u oro.

En otra realización, las nanopartículas magnéticas de entrelazamiento contienen partículas superparamagnéticas. Las partículas superparamagnéticas incluyen óxidos metálicos, como óxidos de hierro. Es un óxido de hierro preferido la magnetita (Fe_3O_4).

En una forma, una nanopartícula de níquel-paladio, estabilizada por una capa superficial de 4-dimetilaminopiridina como se describe en Flanagan et al, Langmuir, 2007, 23, 12508-12520, se trata por adsorción con una pluralidad de moléculas de bromuro de etidio intercaladoras para crear sitios de unión a ácido nucleico. El resto etidio se une con el polímero de ácido nucleico uniéndose de este modo la nanopartícula de níquel-paladio con el polímero de ácido nucleico.

En otra forma, una molécula de andamiaje de cadena lineal simple, como oligoetilenglicol (PEG), se fija con un elemento de unión a ácido nucleico a un extremo y un enlazador en el otro extremo. El elemento de unión a ácido nucleico se une al polímero de ácido nucleico y el enlazador se une a la nanopartícula de nucleación magnética. El elemento de unión a ácido nucleico es un intercalador, como bromuro de etidio, o un ligando del surco menor como distamicina. El enlazador es un derivado de fenantrolina. Hainfeld, J. Structural Biology, 127, 177-184 (1999) informa de la ventaja de los derivados de fenantrolina en la creación de partículas de paladio. El andamiaje puede ser una simple cadena lineal difuncional como se muestra, o puede ser un andamiaje ramificado multifuncional que conecta múltiples nanopartículas de nucleación catalíticas o elementos de unión a ácido nucleico. El elemento de unión a ácido nucleico se une al polímero de ácido nucleico, uniéndose de este modo la nanopartícula al polímero de ácido nucleico. Se entiende que los elementos de unión a ácido nucleico adicionales y los grupos conectores intermedios están dentro del alcance y se pueden usar.

Concentración del analito diana:

La muestra que contiene el analito diana se localiza en una cámara de reacción. La cámara de reacción contiene tanto la muestra y como las nanopartículas magnéticas de entrelazamiento. Las nanopartículas magnéticas de entrelazamiento se unen al analito diana. En una realización la cámara de reacción contiene además perlas disruptoras para ayudar a desmantelar muestras para proporcionar acceso al analito diana.

5 Una vez que se lisa la muestra, se pueden separar magnéticamente las moléculas de ácido nucleico a partir del recordatorio de la muestra. Las moléculas de ácido nucleico se unen a partículas magnéticas. En una realización, la unión tiene lugar en una condición de alto contenido en sal/alcohol y se eluye usando un tampón quelante de bajo contenido en sal como citrato sódico con aumento de temperatura. En una realización la muestra se calienta hasta al menos 95°C para aumentar el rendimiento de elución.

10 Una vez que las nanopartículas magnéticas de entrelazamiento se unen al analito diana se aplica un campo magnético a la cámara de reacción. La aplicación del campo magnético hace que las nanopartículas magnéticas de entrelazamiento y cualquier analito diana unido se concentren en una porción de la cámara de reacción. La muestra se extrae de la región concentrada de la cámara de muestra proporcionando una gran cantidad de analitos diana en comparación con la cantidad de volumen extraído. Mediante la concentración de la muestra se pueden realizar pruebas más sensibles.

En otra realización, el campo magnético mantiene la nanopartícula magnética de entrelazamiento estable según se retira la muestra restante de la cámara. La fuerza de unión entre la nanopartícula magnética de entrelazamiento y el analito diana es suficiente para prevenir que el analito diana sea eliminado. Opcionalmente, se usan etapas de aclarado adicionales para purificar la muestra.

20 Movimiento rápido y aumento de sensibilidad:

Típicamente un analito diana en solución está limitado en movimiento por las velocidades de flujo y difusión del fluido. Para acelerar el movimiento de un analito diana a través del sistema se aplica un campo magnético para hacer progresar la nanopartícula magnética de entrelazamiento a la localización deseada. La aplicación del campo magnético permite el transporte rápido del analito diana de una cámara a otra.

25 Se usan una serie de sensores para detectar rápidamente el analito diana. Se aplica un campo magnético para guiar las nanopartículas magnéticas y analitos unidos a la proximidad de un primer sensor. Un campo magnético distinto guía entonces las nanopartículas magnéticas y cualquier analito unido hacia un segundo sensor. Se manipula el campo magnético para mover los analitos diana a cada sensor en la serie. En una realización, el sensor une un analito diana particular con suficiente fuerza para prevenir que el campo magnético rompa el enlace. Aplicando sistemáticamente campos magnéticos se reduce considerablemente el tiempo de análisis comparado con el análisis de difusión normal.

Nanopartículas magnéticas de entrelazamiento:

35 El uso de soles o agrupaciones en forma de nanopartículas magnéticas de entrelazamiento permite la unión del material magnético a un polímero de ácido nucleico diana u otro analito diana. Aplicando un campo magnético a la muestra se puede manipular el polímero de ácido nucleico a través del material paramagnético unido.

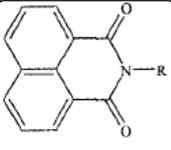
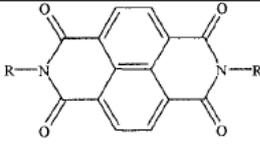
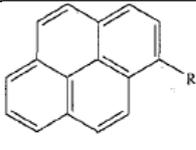
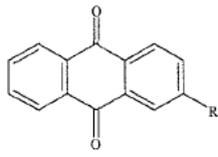
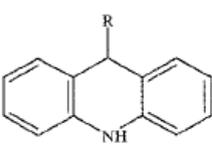
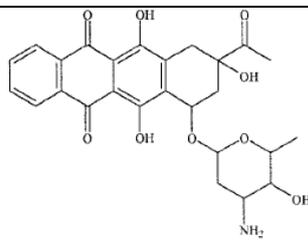
40 Las nanopartículas de nucleación paramagnética se forman en solución con un estabilizador. En una realización se usa una sal metálica. Se añade un agente reductor, como dimetilaminoborano o borohiduro sódico a la solución. Si es necesario, se pueden eliminar los disolventes y excesos de sales por centrifugación, decantación, lavado, y resuspensión de las agrupaciones de metales. Alternativamente, se puede aplicar un campo magnético a la solución que mantiene las nanopartículas magnéticas de entrelazamiento en su lugar mientras se aplica un drenaje y un lavado.

Elemento de unión al analito diana:

45 El elemento de unión al analito diana se une a la nanopartícula magnética de entrelazamiento, ya sea directamente o por medio de un grupo conector intermedio. El elemento de unión al analito diana se une además al polímero de ácido nucleico. En una realización el elemento de unión al analito diana es un elemento de unión a ácido nucleico como una molécula, fragmento o grupo funcional que se une a polímeros de ácido nucleico. Los elementos de unión a ácidos nucleicos potenciales consisten en intercaladores, ligandos del surco menor, cationes, grupos amino reactivos como aldehídos y agentes alquilantes, proteínas, y asociación con grupos hidrofóbicos de tensioactivos. Además, se usan grupos funcionales como aldehídos para crear una conexión por reacción con aminos libres en el

50 ácido nucleico. Son adecuados otros grupos amino reactivos como la adición de Michael.

Ejemplos de estructuras que forman la base de estructuras que se intercalan y se unen al surco menor son:

		
Naftalimidias	Naftalén diimidias	Pirenos
		
Antraquinonas	Acridinas	Idarubicina

La gama de estructuras intercaladoras y de unión del surco menor específicas es enorme ya que el campo ha sido objeto de intenso estudio durante más de 50 años. Véase R. Martínez y L. Chacón-García, *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12, 127-151. Por lo tanto, los grupos R incluyen una amplia gama de grupos funcionales orgánicos. En muchos casos, se puede mejorar la interacción si R contiene uniones de hidrógeno, de carácter catiónico o hidrófilo.

Además, compuestos como polímeros catiónicos, como polietilenimina, interaccionan con ácido nucleico y se han propuesto como portadores de genes como se evidencia por Xu et al, *International Journal of Nanoscience*, 2006, 5, 753-756 y Petersen et al, *Bioconjugate Chemistry*, 2002, 13, 845-854. Las proteínas son otra clase bien conocida de materiales que ofrecen una interacción útil con ácido nucleico y podrían ser la base para la unión de nanopartículas a ácidos nucleicos. La reacción directa con grupos funcionales en el ácido nucleico está también dentro del alcance de esta invención. Por ejemplo, los grupos amino pueden hacerse reaccionar con aldehídos para crear un enlace (Braun et al, *Nano Letters*, 2004, 4, 323-326).

En una realización los elementos de unión a ácido nucleico son agentes de unión específicos que se dirigen específicamente a moléculas de ácido nucleico de doble cadena, mientras que no se unen con moléculas de ácido nucleico de cadena sencilla. Por ejemplo, los compuestos que se unen al surco menor se unen específicamente a moléculas de ADN de doble cadena, pero no se unen a sondas de captura de oligonucleótidos de cadena sencilla. En contraste, el reactivo cloruro de paladio se une indiscriminadamente a ambos, a moléculas diana y a sondas de captura. El elemento de unión se une específicamente a la molécula de ácido nucleico diana mientras tiene poca o ninguna afinidad hacia moléculas no-diana. Se entiende que los elementos de unión específicos pueden incluir pero no se limitan a intercaladores, compuestos de unión al surco menor, compuestos de unión al surco mayor, anticuerpos, y proteínas de unión a ADN. El elemento de unión específico se une a un sitio específico en un ácido nucleico diana sin unirse a otras áreas no deseadas. En una realización, el elemento de unión específico es bromuro de etidio. En realizaciones alternativas, el elemento de unión específico es distamicina, idarubicina, o colorante Hoescht.

En una realización el elemento de unión a ácido nucleico también sirve como un estabilizador como se describe a continuación.

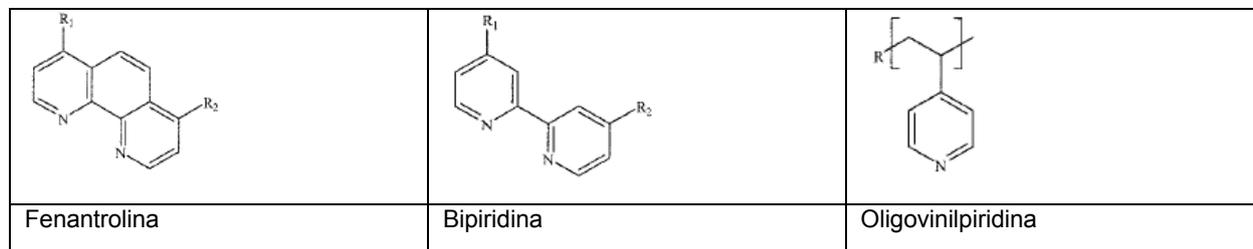
Estabilizadores:

Las nanopartículas magnéticas de entrelazamiento están funcionalizadas en la superficie con estabilizadores para impartir propiedades deseables. Estas nanopartículas de nucleación estabilizadas manifiestan estabilidad coloidal y mínima unión no-específica. Además, la presencia del estabilizador en solución mientras se forma la nanopartícula magnética de entrelazamiento controla el tamaño de la nanopartícula.

El estabilizador proporciona estabilidad coloidal y previene la coagulación y sedimentación de la nanopartícula magnética de entrelazamiento. El estabilizador sirve además para limitar el tamaño de la nanopartícula magnética de entrelazamiento durante el proceso de formación. En una realización, la nanopartícula magnética de entrelazamiento metálica se forma en una solución que contiene estabilizador e iones metálicos. En una realización los estabilizadores son compuestos quelantes. Son deseables nanopartículas magnéticas de entrelazamiento grandes ya que son más propensas a precipitar fuera de la solución. En una realización, la nanopartícula de nucleación es generalmente de forma esférica con un diámetro de aproximadamente 0,5 -1000 nm. Preferiblemente, la nanopartícula de nucleación es generalmente de forma esférica y tiene un diámetro de aproximadamente 1 -100 nm.

Estabilizadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, polietiloxazolina, polivinilpirolidinona, polietilenimina, polivinilalcohol, polietilenglicol, ionómeros de poliéster, polímeros iónicos de silicona, polímeros iónicos, copolímeros, almidones, goma Arábica, tensioactivos, tensioactivos no iónicos, tensioactivos iónicos, tensioactivos de fluorocarbono y azúcares. En una realización el estabilizador es una fenantrolina, biperidina y oligovinilpiridina de las siguientes fórmulas:

5



donde R₁ es COOH, CH₂OH, CH₂NH₂, o CH₂NHCH₃; y

R₂ es H, COOH, CH₂OH, CH₂NH₂, NH o CH₂NHCH₃.

En una realización donde la nanopartícula magnética de entrelazamiento contiene paladio, estos estabilizadores se unen actuando como ligandos para los iones paladio y están por lo tanto estrechamente asociados con la formación de partícula. Además de unirse, los estabilizadores tienen grupos hidrófilos que interactúan con la fase de agua. La función de unión y estabilización de moléculas como fenantrolinas en la formación de partículas de paladio se describe además en Hainfeld, J. Structural Biology, 127, 177-184 (1999).

10

Se entiende que partículas derivadas de una amplia clase de materiales (plásticos, pigmentos, aceites, etc.) se pueden estabilizar en agua por una amplia serie de tensioactivos y dispersantes que no se basan en la coordinación específica. Estas clases de estabilizadores están también contemplados para usar en esta invención.

15

En una realización el estabilizador estabiliza la nanopartícula magnética de entrelazamiento de la precipitación, coagulación y minimiza la unión no específica a superficies aleatorias. En otra realización, el estabilizador funciona además como un elemento de unión a ácido nucleico como se describe a continuación.

Enlazador:

El enlazador se une directamente a la partícula magnética de entrelazamiento para permitir la unión de otros grupos conectores intermedios o elementos de unión al analito diana. Se entiende que el enlazador también puede servir como un estabilizador o un andamiaje.

20

El enlazador se puede unir a través de diversas energías de enlace. La energía total de unión se compone de la suma de todas las fuerzas covalentes, iónicas, entrópicas, Van der Waals y cualquier otra fuerza de unión del enlazador a la nanopartícula de nucleación catalítica. En una realización, la energía total de unión entre el enlazador y la partícula magnética de entrelazamiento es mayor de aproximadamente 10 kJ/mol. En otra realización la energía total de unión entre el enlazador y la partícula magnética de entrelazamiento es mayor de aproximadamente 40 kJ/mol. Enlazadores adecuados incluyen, pero no se limitan a ligandos, fenantrolinas, bidentatos, tridentatos, biperidinas, piridinas, tripiridinas, polivinilpiridinas, porfirinas, disulfuros, acetoacetatos de amina, aminas, tioles, ácidos, alcoholes y grupos hidrófobos.

25

30

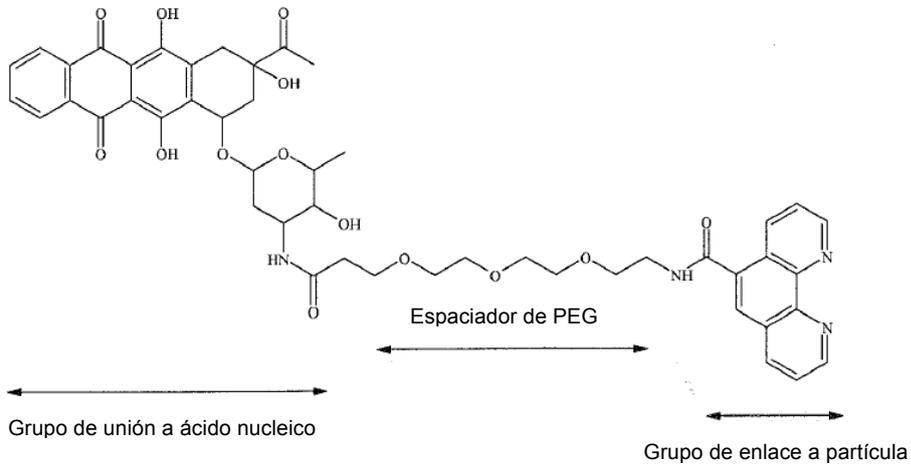
Composiciones de andamiaje:

El elemento de unión a ácido magnético puede estar directamente conectado a la partícula de nucleación catalítica o a un enlazador. Alternativamente, el elemento de unión a ácido nucleico se une a un andamiaje, ya sea individualmente o como una multiplicidad. En cualquier caso, el conjugado final está dotado con las dos propiedades esenciales - reconocimiento-unión específica de ácido nucleico y una nanopartícula magnética de entrelazamiento. La unión del elemento de unión a ácido nucleico al andamiaje puede ser por medio de cualquiera de los grupos de enlaces orgánicos comunes como ésteres, amidas y similares.

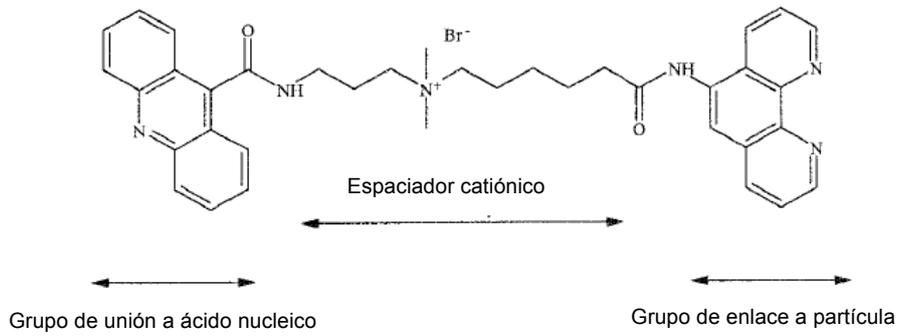
35

La unión a un andamiaje común crea una enorme gama de tamaños, formas, arquitecturas y funciones adicionales posibles. En una realización la composición del andamiaje es una cadena lineal con los dos grupos funcionales a los extremos. La propia cadena puede ser de cualquier composición, longitud y carácter iónico. En una realización alternativa, usada a menudo en aplicaciones biológicas, se utiliza polietilenglicol con grupos terminales amina, ácido o alcohol reactivos como se incluye en el siguiente ejemplo.

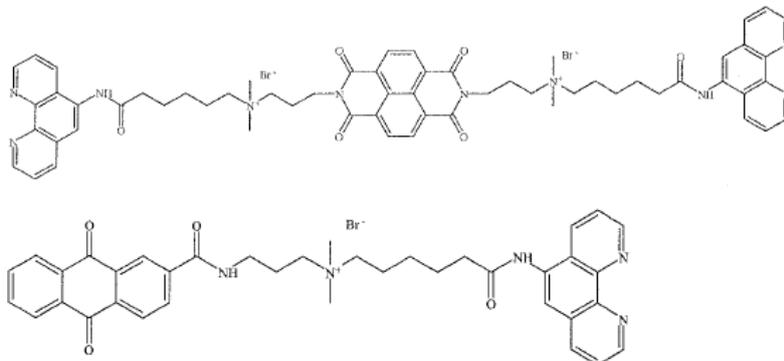
40



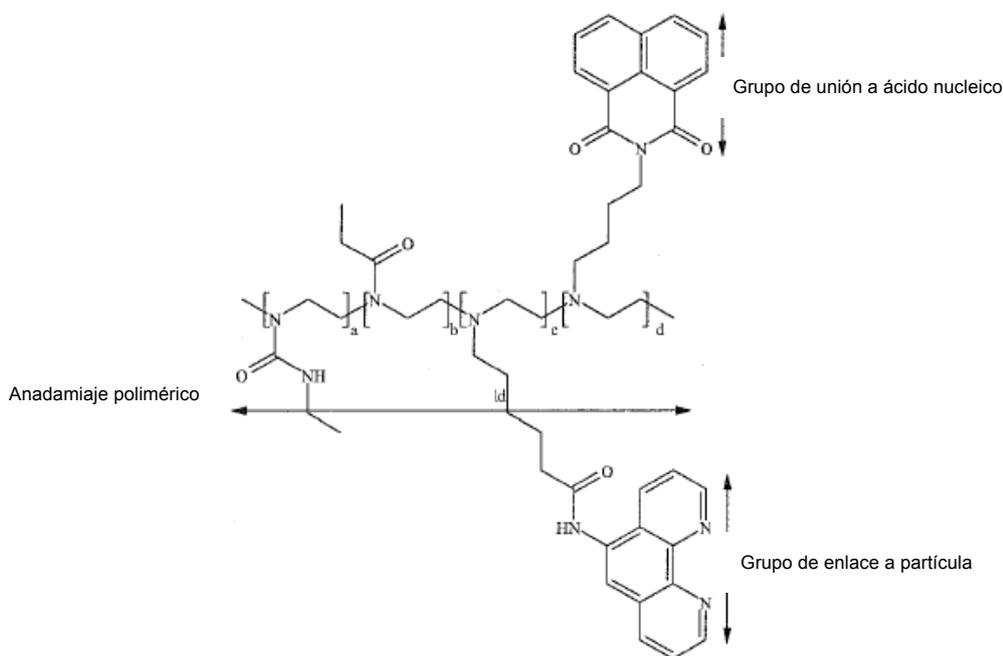
Pueden ser deseables espaciadores lineales cortos con carácter catiónico ya que pueden mejorar la ejecución del intercalado.



5



Un andamiaje polimérico u oligomérico permite que se unan múltiples grupos en la misma estructura donde está limitado el número de grupos sólo por el tamaño de la cadena.



Además de estructuras de cadena corta y larga los andamiajes se pueden construir con arquitecturas ramificadas o muy altamente ramificadas. Además, los andamiajes pueden ser una partícula de microgel con nanopartículas unidas a una polivinilpiridina hinchada, se ilustran elementos de unión a ácido nucleico interiores y periféricos. En otra realización el andamiaje es una partícula de látex de núcleo-envoltura con centros de partículas de nucleación y con grupos de reconocimiento de ácidos nucleicos periféricos que pueblan la superficie. Se entiende que cualquier composición de andamiaje se puede conectar a grupos conectores intermedios, nanopartículas de nucleación catalíticas o elementos de unión a ácido nucleico.

Estabilizadores estéricos:

En una realización se usa un estabilizador estérico para unir el elemento de unión al analito diana a la nanopartícula magnética de entrelazamiento. El estabilizador estérico es capaz de funcionar como un estabilizador, enlazador y andamiaje como se describe anteriormente. En una realización el estabilizador estérico es polietilénimina, polietiloxazolina o polivinilpirrolidona. El estabilizador estérico se une a la partícula magnética de entrelazamiento con una energía total de unión de al menos 10 kJ/mol. En otra realización el estabilizador estérico se une a la partícula magnética de entrelazamiento con una energía total de unión de al menos 40 kJ/mol. El uso de estabilizadores estéricos eliminan cualquier necesidad de estabilizantes, enlazadores, o andamiajes distintos. Se pueden unir uno o múltiples elementos de unión a ácido nucleico al estabilizador estérico. Además, se pueden unir una o múltiples nanopartículas magnéticas de entrelazamiento al estabilizador estérico.

Sustancia de unión al analito diana:

En una realización para formar la sustancia de unión al analito diana en una nanopartícula de nucleación, se forman las nanopartículas de nucleación en solución con un estabilizador como dimetilaminopiridina (DMAP). Las nanopartículas de nucleación estabilizadas se purifican para conservar agrupaciones del tamaño deseado. Las nanopartículas se tratan luego directamente con un elemento de unión a ácido nucleico conectado a un enlazador o con una composición de andamiaje que contiene el elemento de unión a ácido nucleico. La composición de andamiaje puede ser un polímero que contiene elementos de unión a ácido nucleico como naftalimida o acridina. El polímero desplaza algunos de los DMAP y se une a la partícula. Se entiende que el elemento de unión a ácido nucleico se puede unir químicamente a la composición de andamiaje antes de la unión de la composición de andamiaje a la partícula.

En otra realización para formar la sustancia de unión al analito diana en la partícula de nucleación, se forman las nanopartículas de nucleación en solución en presencia de un elemento de unión a ácido nucleico como bromuro de etidio o en presencia de un elemento de unión a ácido nucleico conectado a un enlazador o en presencia de una composición de andamiaje que contiene el elemento de unión a ácido nucleico. La composición de andamiaje puede ser un polímero que contiene elementos de unión a ácido nucleico como naftalimida o acridina. Se entiende que la sustancia de unión a ácido nucleico conecta a la partícula durante el proceso de formación de partícula y puede ofrecer alguna estabilidad coloidal a la dispersión. Además, también se pueden añadir estabilizadores en forma de tensoactivos iónicos, tensoactivos no iónicos, oligómeros y polímeros solubles en agua para aumentar la estabilidad coloidal y controlar el tamaño de partícula.

Refiriéndose a las Figs. 4A-4D se muestran varias vistas de una realización del cuerpo del cartucho 102. Se entiende que se pueden usar varios diseños para alojar el depósito inserto. El cuerpo del cartucho 102 tiene una superficie cilíndrica interior 140. La superficie cilíndrica interior aloja el depósito inserto (no mostrado). La superficie cilíndrica interior 140 es lisa para permitir que el depósito inserto gire libremente. El cuerpo del cartucho se construye de cualquier material que es a la vez suficientemente estriado para soportar el cuerpo del cartucho y suficientemente liso para permitir la rotación del depósito inserto. En una realización, la superficie cilíndrica interior 140 tiene una ligera conicidad para facilitar la unión del depósito inserto (no mostrado) que tiene una superficie cilíndrica exterior con una ligera conicidad.

En una realización el cuerpo del cartucho tiene una moldura de jeringa 141. Aunque solo se muestra una jeringa se entiende que se pueden usar una pluralidad de jeringas. La moldura de jeringa 141 es capaz de alojar un émbolo. El émbolo extrae y empuja fluidos a través de las vías de fluidos de los depósitos insertos. En una realización el émbolo 144 está retenido dentro de la moldura de jeringa 141. Opcionalmente, el cuerpo del cartucho tiene una cámara de reacción 142 y un sensor de montaje 143. El sensor de montaje 143 es capaz de alojar un panel sensor. El panel sensor está alineado con el sensor de montaje 143 por postes de alineación 146. El émbolo suministra fluidos a través de las vías de fluidos y a la cámara de reacción 142. Los fluidos reaccionan químicamente con otros fluidos o dispositivos en comunicación con la cámara de reacción 142. Se entiende que una salida de fluido puede estar unida al cuerpo del cartucho para permitir que el fluido se transfiera desde la válvula rotatoria hacia una ubicación deseada. Además, una entrada de fluido permite la introducción de fluidos a la válvula rotatoria. A pesar de que se ha descrito un émbolo en esta realización, se entiende que se puede sustituir cualquier dispositivo de suministro de fluido adecuado para transferir eficazmente los fluidos dentro del cartucho.

En una realización el panel sensor contiene un chip que tiene una superficie reactiva. El chip se coloca de tal manera que esté en comunicación con la cámara de reacción 142. En una realización el chip forma un lado de la cámara de reacción 142. El fluido fluye dentro de la cámara de reacción 142 y se pone en contacto con la superficie reactiva del chip (no mostrado). El chip está en comunicación eléctrica con un dispositivo de detección para proporcionar lecturas y resultados de la prueba.

Refiriéndose a las Figs. 5A-5B se muestra una vista en sección transversal de una válvula rotatoria montada que tiene un émbolo 150. El émbolo 150 es capaz de extraer fluido de los depósitos 103. Una vez que el émbolo 150 extrae el fluido, la válvula rotatoria reposiciona la vía de fluido para alinear un puerto distinto con la moldura de jeringa. El émbolo 150 empuja entonces el fluido a través de la vía de fluido 151 en la cámara de reacción 142, un depósito diferente, o una cámara de pre-tratamiento.

Refiriéndose a las Figs. 6A-6G se muestran varias vistas del depósito inserto. El depósito inserto tiene una superficie cilíndrica exterior 106. En una realización la superficie cilíndrica exterior 106 es cónica. El depósito inserto contiene múltiples depósitos 103. Los depósitos 103 pueden contener muestras, estándares, lavado, catalizador o cualquier otro fluido deseable. En una realización los depósitos 103 incluyen un depósito de residuos para descargar líquidos. El depósito inserto contiene además múltiples puertos 160. Cada puerto 160 tiene una trayectoria única de fluido. Cada cámara y depósito tiene una trayectoria de fluido que está en comunicación con un puerto para transferir fluido a o desde la cámara o depósito. Una moldura de jeringa en el cuerpo del cartucho (no mostrado) se alinea con un puerto para extraer o empujar fluido. Para evitar diferencias de presión a partir de la formación de presión se colocan puertos de alivio de presión 164 a lo largo del depósito inserto. Además de las trayectorias de fluido únicas, el depósito inserto contiene al menos un fluido a través del canal 161. El fluido a través del canal 161 permite que el fluido fluya desde un extremo del depósito inserto al otro. Por ejemplo, el fluido puede fluir desde la moldura de jeringa hasta la cámara de reacción del cuerpo del cartucho (no mostrado).

Para evitar la interacción de fluido en el fluido a través del canal 161 se usan una pluralidad de fluidos a través de canales. El fluido secundario a través del canal 162 se usa para prevenir reacciones tempranas u otras interacciones de fluido adversas. En una realización el depósito inserto contiene una región de contacto del calentador 163. La región de contacto del calentador se localiza debajo de los depósitos para los que es deseable calentar el fluido en el depósito. Además, el calentador es capaz de calentar el fluido a través del canal 161.

Refiriéndose a las Figs. 7A-16C se muestran múltiples vistas de una válvula rotatoria ensamblada girada en varias posiciones. Como se muestra en las Figs. 7A-7B el depósito inserto 101 está en una posición cerrada. No hay puertos en línea con la moldura de jeringa (no mostrado). Esto previene cualquier fuga de fluido del depósito. En una realización al menos un depósito es un depósito de muestra. El depósito de muestra permite al usuario inyectar una muestra de fluido dentro del depósito a través de la película de termosellado. En una realización el depósito de muestra contiene objetos disruptores, como perlas de vidrio, para ayudar a la ruptura de muestras en cadenas de ácido nucleico comprobables.

Refiriéndose a las Figs. 8A-8B el depósito inserto 101 se posiciona de tal manera que el puerto 3 está en línea con la moldura de jeringa. Una vez posicionado se puede extraer fluido desde el depósito 3 a través del puerto 3 y dentro de la moldura de jeringa 141. Una vez que el fluido se empuja desde un depósito, y no se requiere fluido adicional desde ese depósito, se puede usar ese depósito como un depósito alternativo para el almacenamiento de residuos. Refiriéndose a las Figs. 9A-9B, el depósito inserto 101 se posiciona de tal manera que el puerto 11 está en línea con

la moldura de jeringa. El émbolo empuja el fluido extraído desde el depósito 3 al puerto 11 y el fluido pasa a la cámara de reacción 142.

Refiriéndose a las Figs. 10A-10B el depósito inserto 101 se posiciona de tal manera que el puerto 8 está en línea con la moldura de jeringa. En una realización el fluido es empujado desde la moldura de jeringa 141 dentro del puerto 8 y dentro de la cámara de calentamiento. Una vez en la cámara de calentamiento 170 el fluido se calienta a la temperatura deseada durante una cantidad de tiempo predeterminada. Una vez que se ha completado el calentamiento el fluido se extrae de nuevo a la moldura de jeringa. Se entiende que se puede extraer el fluido a través del mismo puerto 8 o único puerto en comunicación con la cámara de calentamiento. Como se muestra en las Figs. 11A-11B se introduce el fluido dentro de la moldura de jeringa desde un puerto único 9 en comunicación con la cámara de calentamiento 170.

Refiriéndose ahora a las Figs. 12A-12C se muestra el flujo a través de la trayectoria del fluido 161 desde la moldura de jeringa hasta la cámara de reacción 142. En esta realización el flujo a través de la trayectoria del fluido corresponde con el puerto 11.

Refiriéndose a las Figs. 13A-13B se muestra el depósito inserto 101 posicionado de tal manera que el puerto 14 está en línea con la moldura de jeringa. El depósito 14 está en comunicación con el puerto 14. El fluido contenido en el depósito 14 se tira dentro de la moldura de jeringa. El depósito inserto 101 se gira entonces hacia el puerto 13 como se muestra en las Figs. 14A-14C. El fluido del depósito 14 se empuja entonces a través del puerto 13 hacia la cámara de reacción 142. El fluido pasa a través de un canal que es distinto del canal asociado con el puerto 11. Esto evita que los fluidos entren en contacto con y reaccionen juntos mientras están en el canal. Los fluidos entran en contacto primero en la cámara de reacción 142.

Después del tiempo de reacción deseado el émbolo empuja el fluido desde la cámara de reacción 142 dentro del depósito de residuos 7. El émbolo extrae el fluido de vuelta a través del puerto 11 y el depósito inserto gira a un puerto en comunicación con el depósito de residuos 7. El émbolo empuja entonces el fluido dentro del depósito de residuos 7. Se entiende que después de su uso se puede utilizar cualquier depósito como un depósito de residuos. En una realización alternativa, el émbolo deja de empujar el fluido una vez que alcanza la cámara de reacción 142. Al finalizar el tiempo de reacción, el émbolo continúa empujando el fluido a través de la cámara de reacción y en un puerto en comunicación con un depósito de residuos o depósito archivador separado. Un depósito archivador guarda muestra para pruebas adicionales o verificación.

Refiriéndose a las Figs. 15A-15B se muestra el depósito inserto 101 posicionado de tal manera que el puerto 4 está en línea con la moldura de jeringa. El puerto 4 está en comunicación con el depósito 4 que contiene un fluido de lavado. El fluido de lavado se extrae del depósito 4 a través del puerto 4 y dentro de la moldura de jeringa. El depósito inserto 101 se gira entonces hacia el puerto 11 y el émbolo empuja el fluido de lavado dentro del puerto 11 y a la cámara de reacción 142 como se muestra en las Figs. 16A-16C.

Una vez completado la válvula rotatoria puede retirarse y desecharse. Luego se inserta una válvula rotatoria nueva con los mismos o únicos fluidos en el dispositivo de detección.

Refiriéndose a la Fig. 17 se muestra un esquema de una válvula rotatoria de una realización. El depósito inserto contiene seis fluidos en varios depósitos. Cinco fluidos pasan desde sus depósitos respectivos dentro de la moldura de jeringa y a través del canal principal 180 dentro de la cámara de reacción 142. Un fluido pasa desde la moldura de jeringa a través de un canal secundario 181 y dentro de la cámara de reacción 142 para evitar cualquier contaminación o reacciones prematuras.

Refiriéndose a la Fig. 18 se muestra un flujo del proceso de acuerdo con una forma de realización. Una vez que se inyecta una muestra dentro del depósito de muestra y está activado el dispositivo de detección, comienza la prueba. Los canales se pre-acondicionan primero con una pequeña cantidad de tampón. La muestra se transfiere entonces del depósito de muestra al depósito de calentamiento y se calienta a 95°C durante 5 minutos. La muestra calentada se transfiere a una cámara de reacción para hibridar durante 20 minutos. El proceso de hibridación permite a la muestra unirse químicamente con sondas biológicas halladas en el chip en comunicación con la cámara de reacción. Las sondas biológicas se unen específicamente a moléculas de ácido nucleico diana halladas en la muestra como se describe en la Patente de Estados Unidos Número 6.399.303 expedida a Connolly el 4 de Junio, 2002. Se entiende que un solo chip puede contener una pluralidad de sondas biológicas redundantes y distintas para aumentar la sensibilidad y para probar una variedad de moléculas de ácido nucleico diana. Se entiende además que la válvula rotatoria se puede usar en cualquier sistema que requiera la manipulación y el transporte de una pluralidad de fluidos.

Después de la hibridación la muestra se lava con tampón para eliminar cualquier exceso de compuestos. Opcionalmente se transfiere un catalizador como paladio a la cámara de reacción y se deja incubarse durante 10 minutos. El catalizador restante se lava entonces con agua. Se introduce una mezcla de un agente reductor y metal, como níquel, dentro de la cámara de reacción. El metal recubre la muestra diana creando un conductor sobre el chip. El exceso de metal no unido se lava con agua. Se reduce dramáticamente la resistencia a través de sondas

biológicas unidas entre sí por una muestra diana recubierta con metal, lo que indica la presencia de la muestra diana. El dispositivo de detección escribe los resultados de la prueba y la prueba se ha completado.

Refiriéndose ahora a las Figs. 19A-19B se muestran unas variaciones del depósito inserto. Se muestran las cámaras del inserto en una configuración rectangular. Se pueden realizar cambios en los tamaños y formas de la cámara para optimizar las cámaras de reactivos y residuos particulares.

Refiriéndose ahora a las Figs. 20A-20B se muestran unas variaciones del depósito inserto. Se muestra que las cámaras en esta realización tienen cámaras radiales. En una realización las cámaras son de tamaño y forma uniforme alrededor del radio del inserto.

Refiriéndose ahora a las Figs. 21A-21B se muestran variaciones del depósito inserto. Las cámaras son de varios tamaños a lo largo del radio del inserto para alojar diferentes cantidades de reactivos dentro de cada cámara. Si bien se muestran las variaciones del inserto en varias realizaciones, se entiende que se puede usar cualquier variación del depósito inserto que contiene una pluralidad de puertos.

Refiriéndose a la Fig. 22 se muestra un dispositivo de muestreo que tiene un accionamiento de válvula rotatoria y un accionamiento de émbolo. La válvula rotatoria 100 se coloca en la parte superior del accionamiento de la válvula rotatoria. El accionamiento del émbolo 220 contiene una sección cilíndrica larga 221 que tiene una punta 220. La punta 220 se conecta al émbolo en el interior de la moldura de jeringa 141. En una realización la punta 220 es cónica para mejorar el contacto con el émbolo. El accionamiento del émbolo mueve la sección cilíndrica 221 axialmente dando lugar que el émbolo ya tire o bien empuje los fluidos desde los depósitos en la válvula rotatoria 100.

Refiriéndose a la Fig. 23 se muestra el accionamiento de la válvula rotatoria según una realización. La válvula rotatoria se coloca encima de la superficie de contacto 230. La superficie de contacto 230 gira entonces para posicionar el depósito inserto a la ubicación deseada dentro de la válvula rotatoria. En una realización la superficie de contacto 230 es parte de un conjunto de accionamiento 231. Un engranaje helicoidal 232 está unido al conjunto de accionamiento 231. Un accionamiento helicoidal 233 se acopla al engranaje helicoidal 232 dando lugar a que el conjunto de accionamiento 231 gire. Se entiende que se puede emplear cualquier medio adecuado para hacer girar el depósito inserto.

Refiriéndose a la Fig. 24 se muestra otra vista del accionamiento de la válvula rotatoria. El accionamiento helicoidal 233 es un motor paso a paso posicionado para avanzar el engranaje helicoidal 232. Una bandera interina 240 está unida al conjunto de accionamiento para poner a cero el dispositivo. En cualquier momento durante el muestreo de fluidos se puede poner a cero la bandera interna permitiendo avanzar al accionamiento helicoidal 233 a la distancia apropiada.

Refiriéndose a la Fig. 25 se muestra la superficie de contacto que tiene un calentador. La superficie de contacto se carga con resorte para mejorar el contacto con la válvula rotatoria. Al menos un resorte 254 se posiciona para permitir el movimiento de la superficie de contacto. En una realización la superficie de contacto contiene un soporte de calentador 250 para montar los elementos de calentamiento. Al menos se coloca una resistencia 251 sobre el soporte de calentador 250. Una placa de calentamiento 252 transfiere el calor desde las resistencias a través de la placa de calentamiento 252 y a la ubicación deseada en la válvula rotatoria. En una realización la placa de calentamiento es una placa de calentamiento de aluminio. Opcionalmente, se coloca un sensor de temperatura 253 cerca de la resistencia o placa de calentamiento para detectar la temperatura aplicada. Se entiende que la superficie de contacto (no mostrado) se puede colocar sobre la placa de calentamiento. La superficie de contacto está hecha de un material que permite una transferencia térmica eficiente de la placa de calentamiento a la válvula rotatoria.

Ejemplos:

Disrupción por sonicación con perlas

Se prepararon y aislaron esporas de *Bacillus subtilis* de medios de esporulación+. A una alícuota de 100 μ l de esporas tomadas del cultivo se le añadió un volumen igual de perlas de vidrio de 0,1 mm en un tubo de microcentrífuga. La punta del tubo de microcentrífuga se colocó en la cavidad de un sonicador Branson Ultrasonic. Las perlas se agitaron dentro del tubo durante dos minutos usando un ajuste de potencia de 2. Después, la tinción de gram mostró que más del 90% de las esporas se rompieron por este proceso. Esto se confirmó con ensayos en placas contando colonias formadas a partir de esporas supervivientes del proceso. Se logra una estimación de la cantidad de ADN liberado ubicando una alícuota del lisado sobre la superficie de un gel de agarosa al 1% que contiene 1 mg/ml de bromuro de etidio. Un generador de imágenes de Bio-Rad Fluor-S comparó la intensidad de la fluorescencia de la muestra frente a cantidades estándar conocidas de ADN ubicadas también sobre la superficie del gel. Usando esta técnica, se pueden aislar aproximadamente 10 ng de ADN de $2,5 \times 10^5$ esporas.

Ejemplos magnéticos:

Se disuelven sales metálicas (níquel, cobalto, hierro) con una pequeña cantidad de sal de paladio en un disolvente (agua y/o disolvente orgánico polar) junto con un estabilizador (fenantrolina, biperidina, polivinilpirrolidona). Se

añade un agente reductor (dimetilaminoborano, borohidruro sódico) y la mezcla se mantiene hasta que se formen las agrupaciones de metal. Si se necesita, se pueden eliminar disolventes y exceso de sales por centrifugación, decantación, lavado, y resuspensión de los agrupamientos de metal.

Solución A- Se disolvieron 24 g de cloruro de níquel hexahidrato y 44 g de citrato sódico en 500 ml de agua.

5 Solución B- Se disolvieron 24 g de etanolamina en 500 ml de agua.

Solución C- Se disolvieron 5 g de cloruro de cobalto hexahidrato en 100 ml de agua.

Solución D- Se disolvieron 2 g de tetracloropalidato potásico y 6g de cloruro potásico en 100 ml de agua.

Solución E- Se disolvió 1 g del hidrato de la sal disódica del ácido batofenantrolina-disulfónico en 100 ml de agua.

Solución F- Se disolvieron 3 g de borano de dimetilamina en 100 ml de agua.

10 Ejemplo magnético 1:

En un vial de vidrio de 20 ml, se mezclaron 1 ml de solución A y 1 ml de solución B. Se añadió 0,1 ml de solución D, seguido inmediatamente de 0,2 ml de solución E. Entonces se añadieron 0,5 ml de solución F y se mantuvo la muestra a 60 grados C durante 30 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se colocó la mezcla en un fuerte campo magnético durante 10 segundos (el campo magnético era a partir del magnético permanente retirado de un disco duro de un ordenador desechado) y se observó que la mayoría de las agrupaciones de metal se movían hacia la pared del vial más cercana al imán.

15

Ejemplo magnético 2:

En un vial de vidrio de 20 ml, se mezclaron 0,2 ml de solución A, 0,8 ml de solución C y 1 ml de solución B. Se añadió 0,1 ml de solución D, seguido inmediatamente de 0,2 ml de solución E. Entonces se añadieron 0,5 ml de solución F y se mantuvo la muestra a 60 grados C durante 30 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, se colocó la mezcla en un fuerte campo magnético durante 10 segundos (el campo magnético era a partir del magnético permanente retirado de un disco duro de un ordenador desechado) y se observó que la mayoría de las agrupaciones de metal se movían hacia la pared del vial más cercana al imán.

20

Preparación de agrupaciones de magnetita ejemplo

Se mezcló una primera solución de cloruro férrico (0,8 M), cloruro ferroso (0,4 M) y ácido clorhídrico (0,4 M) y se filtró con 0,2 micras. Se preparó una segunda solución con 72 ml de hidróxido amónico (30%) con agua para hacer 1 litro.

Se añadió 1 ml de solución de cloruro férrico/ferroso a 20 ml de la solución de hidróxido amónico con agitación. Se continuó la agitación durante 15 segundos. La solución (en un vial de 20 ml) se colocó en un imán fuerte y se dejó estar durante 1 minuto, después del cual se retiró todo el producto al fondo del vial. Se decantó el líquido sobrenadante transparente, se reemplazó con agua, se mezcló y se colocó cerca del imán. De nuevo, el producto se retiró al fondo del vial. Se repitió este proceso tres veces para lavar el producto libre de cualquier sal de amonio y hierro residuales. Se llenó el vial con 20 ml de agua y se ultra-sonicó durante 5 minutos a 4 vatios de potencia. Se filtró la suspensión a través de un filtro de vidrio de 1 micra para dar una solución estable de partículas de magnetita que permanecen en suspensión hasta que fuerzas magnéticas o centrifugación las retiran hacia abajo.

30

35 Unión de partículas magnéticas ejemplo

Se purificaron moléculas de ácido nucleico a partir de moscas de la fruta, a continuación se lisaron con partículas de ferrita seguido de separación magnética y elución. Las perlas magnéticas capturaron más del 90% de las moléculas de ácido nucleico disponibles.

Hibridación con sondas de captura ejemplo

Una vez que se preparan las moléculas de ácido nucleico, se hibridan con sondas de captura en los electrodos del sensor. Se prepararon muestras de moléculas de ácido nucleico de Bacillus subtilis a través de lisis ultrasónica y concentración magnética. El ADN eluido se unió a sondas sobre el chip sensor para demostrar que no hay inhibidores de hibridación.

40

Limpieza de la muestra:

En una realización, se lava la muestra para eliminar compuestos que podrían potencialmente inhibir la unión de moléculas de ácido nucleico a sensores. Uniendo partículas magnéticas a la muestra y manipulando la muestra con un campo magnético, la muestra se concentra y se limpia de impurezas.

45

Ejemplo de limpieza

Se procesaron muestras bacterianas y de esporas mezcladas con tierra para evaluar muestras complejas. La tierra es un medio complejo que se sabe que inhibe los sistemas basados en PCR. Se añadió tierra a las muestras que contienen seis moscas de la fruta entera. Se intenta que las moscas representen insectos que podrían ser evaluados por portar una enfermedad como malaria. Se añadieron hasta 320 microgramos de tierra por mililitro de muestra. Las moscas de la fruta se lisaron y se capturaron el ADN y el ARN usando partículas de ferrita con la adición de etanol. Las partículas se recogieron magnéticamente, se lavaron con tampón y etanol para eliminar contaminantes y después se concentraron con magnetismo. Las moléculas de ácido nucleico se eluyeron después en tampón de hibridación a 90°C para desnaturalizar el componente de ADN. Las partículas férricas funcionaron bien en presencia de tierra. Se vió una mínima pérdida hasta que el nivel de tierra en la muestra alcanzó 32 miligramos por 100 microlitros donde la solución se vuelve viscosa y el movimiento de las partículas es difícil.

ADN a partir de muestras complejas ejemplo

Se mezclaron células de Bacillus con tejido de oreja de ganado o moscas de la fruta entera y se toman muestras a través del proceso de preparación de la muestra. Los ácidos nucleicos resultantes se hibridan con sondas sobre chips sensores. Los chips se trataron entonces con colorante YOYO-1 para detectar ADN hibridado. Las secuencias de ADN diana en las células hibridaron con los chips sensores a niveles comparables con células de Bacillus procesadas por separado. Los controles negativos sin Bacillus no mostraron ADN hibridado. El experimento se repitió con suciedad añadida a las muestras como se describe anteriormente. La eficiencia de hibridación se mantuvo al menos al 60% de la hibridación vista en la muestra sin células eucariotas y suciedad.

Lavado de partículas con un flujo ejemplo

Se unieron las partículas magnéticas a ADN y después se introdujo la solución en un tubo de plástico transparente con un diámetro de 2 mm. Se colocó un imán bajo el centro del tubo. Se empujó un tampón de lavado a través del tubo usando una bomba de jeringa. Las partículas se mantuvieron visualmente en su lugar a través del lavado. Después de lavar se eliminó el imán y se lavaron las partículas fuera del tubo. Se eluyó el ADN a alta temperatura y se corrió en un gel. No se observó pérdida aparente de ADN.

Eficiencia de unión y liberación de partículas magnéticas ejemplo

Se usó ADN radiomarcado para determinar la eficiencia de unión a ferrita y la liberación de moléculas de ácido nucleico. Se mezclaron ADN radiomarcado con la suspensión de magnetita y tres volúmenes de etanol. La magnetita se retiró al fondo del tubo usando un imán. Se eliminó el fluido sobrenadante del precipitado y se contaron ambas fracciones en un contador de centelleo. Se midió la unión como una función de la fracción de etanol en la mezcla. Los resultados se muestran en la Fig. 29.

Para determinar la eficiencia de liberación, se resuspende el precipitado de ADN unido en 100 µl de tampón como se indica en la tabla inferior, se incubó durante 10 minutos a 95°C, después se recogió en el imán. Se separó el sobrenadante del precipitado y ambos se contaron.

Tampón	Sobrenadante cpm	Precipitado ppm	% libre
Fosfato 500 mM	43.450	1925	96%
Fosfato 50 mM	18.409	684	96%
Citrato 60 mM	33.276	2164	94%
Tris 100 mM SDS 0,2% Dextrán sulfato 1,5%	911	35.878	3%

El tampón Tris con SDS se puede usar para hibridación con ADN unido a magnetita con el fin de permitir la concentración magnética de ADN y ARN cerca del sensor.

Movimiento rápido de partículas ejemplo

Se fabricaron microchips con bobinas metálicas que tienen anchos de línea de una micra. Se corrió una corriente a través de las bobinas para producir un campo magnético. Después se situó una solución que contiene nanopartículas magnéticas sobre las bobinas. Se colocó el chip bajo el microscopio y se encendió la corriente a lo largo de la bobina. Las agrupaciones se congregan en las esquinas dentro de la bobina en 10 segundos. Una vez que se apaga la corriente las partículas se desmagnetizan y empiezan a difundirse de nuevo en solución.

Muestras de tejido

Como se muestra en la Fig.30, para muestras de diagnóstico, se evaluó un enfoque usando tejido de la oreja de una vaca. El tejido de la oreja se toma a menudo del ganado para evaluación y tiene piel, pelo, grandes cantidades de cartílago y es rico en sangre. Se ensayaron tacos de oreja de aproximadamente 3 mm de diámetro. Se aisló una muestra sólida de aproximadamente 1 microgramo de moléculas de ácido nucleico de un taco de oreja usando ultrasonificación y partículas de ferrita de 40 nm. Las moléculas de ácido nucleico estaban en el intervalo de tamaño esperado. No se necesitaron perlas de vidrio para la extracción del tejido y el tratamiento siguiente de un taco de oreja con batido con perlas no dio lugar a una extracción adicional de molécula de ácido nucleico. Los ajustes de potencia y tiempo de sonicación eran idénticos a los usados en los ejemplos anteriores.

Muestras contaminadas con tierra

Como se muestra en la Fig. 31, para evaluar muestras complejas, se procesaron muestras bacterianas y de esporas mezcladas con tierra. La tierra es un medio complejo que se sabe que inhibe los sistemas basados en PCR. Se añadió tierra a las muestras que contienen seis moscas de la fruta entera. Se intenta que las moscas representen insectos que podrían ser evaluados por portar una enfermedad como malaria. Se añadieron hasta 32 microgramos de tierra por mililitro de muestra. Las moscas de la fruta se rompieron usando sonicación en presencia de partículas de ferrita durante dos minutos. Se capturaron el ADN y el ARN usando partículas de ferrita con la adición de etanol. Las partículas se recogieron magnéticamente, se lavaron con tampón y etanol para eliminar contaminantes y después se concentraron con magnetismo. Las moléculas de ácido nucleico se eluyeron después en tampón de hibridación a 90°C para desnaturalizar el componente de ADN. Se vió una mínima pérdida hasta que el nivel de tierra en la muestra alcanzó 32 miligramos por 100 microlitros (carril 8) donde la solución se vuelve viscosa y el movimiento de las partículas es difícil en las condiciones de ensayo actuales. Se entiende que aumentando la potencia de disrupción, modificando la solución, o cambiando el tamaño de partícula disruptora o las características se pueden optimizar los resultados para muestras muy contaminadas.

Preparación de agrupaciones magnéticas

Se mezcló una primera solución de cloruro férrico (0,8 M), cloruro ferroso (0,4 M) y ácido clorhídrico (0,4 M) y se filtró con 0,2 micras. Se preparó una segunda solución con 72 ml de hidróxido amónico (30%) con agua para hacer 1 litro.

Se añadió 1 ml de solución de cloruro férrico/ferroso a 20 ml de la solución de hidróxido amónico con agitación. Se continuó la agitación durante 15 segundos. La solución (en un vial de 20 ml) se colocó en un imán fuerte y se dejó estar durante 1 minuto, después del cual se retiró todo el producto al fondo del vial. Se decantó el líquido sobrenadante transparente, se reemplazó con agua, se mezcló y se colocó cerca del imán. De nuevo, el producto se retiró al fondo del vial. Se repitió este proceso tres veces para lavar el producto libre de cualquier sal de amonio y hierro residuales. Se llenó el vial con 20 ml de agua y se ultra-sonicó durante 5 minutos a 4 vatios de potencia. Después se filtró la suspensión a través de un filtro de vidrio de 1 micra para dar una solución estable de partículas de magnetita que permanecen en suspensión hasta que fuerzas magnéticas o de centrifugación las retiran hacia abajo.

Ejemplo A

Tres moscas de la fruta se colocaron cada uno de dos tubos Eppendorf de 1,5 ml. Uno se cargó con 100 microlitros de una mezcla de TRIS clorhídrico 100 mM (pH 7,5), dextrán sulfato al 1,5% y dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,2%. El otro se cargó con 100 microlitros de alcohol isopropílico y 10 microlitros de dodecilsulfato sódico al 20%. Ambos tubos se cargaron con 10 microlitros de nanopartículas de magnetita al 0,6% en agua. Se sonicaron ambos tubos a 20 kHz durante 45 segundos (2 vatios). Entonces se añadió 1 ml de alcohol isopropílico al primer tubo y se añadió ½ ml de alcohol isopropílico al segundo tubo. Se recogió el precipitado magnético mediante un imán permanente, se decantó el líquido sobrenadante y se añadieron 50 µl de fosfato sódico 100 mM a cada tubo, se resuspendió el precipitado mediante pipeteo repetitivo, y se incubó después a 95 grados C durante 2 minutos. Se recogió de nuevo el precipitado en un imán y el ADN eluido se corrió en un gel de agarosa al 1% a 77 voltios en tampón TEA. Se corrió también en el gel una escalera de ADN.

Como se muestra en la Fig. 32, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió con una excitación de 302 nm y un filtro de 610 nm sobre la cámara. El ADN purificado es claramente visible en la fotografía. El carril superior representa el segundo tubo, el carril central representa el primer tubo y el carril inferior representa una escalera de ADN.

Ejemplo B

Se sonicaron cuatro tubos, cada uno con tres moscas de la fruta, 100 microlitros de tampón y 10 µl de nanopartículas de magnetita al 0,6% durante 30 segundos a 5 vatios a 20 kHz. Se recogió el ADN, se eluyó, se corrió en un gel, se tiñó y fotografió como en el Ejemplo A y se muestra en la Figura 33. Los cuatro tampones fueron como sigue:

1. TRIS 100 mM, Dextran sulfato al 1,5% y SDS al 0,2%

2. Alcohol isopropílico (IPA)

3. IPA al 90%, dodecilbencenosulfato al 1%, agua al 9%

4. IPA al 90%, la sal de sodio del ácido poliacrílico al 1%, agua al 9%

Ejemplo 13

- 5 Se sonicaron porciones de levadura, hierba y arándanos en TRIS 100 mM, Dextran sulfato al 1,5% y SDS al 0,2% como en el Ejemplo A. La purificación, el gel y la fotografía fueron como en el Ejemplo A y se muestran en la Figura 34.

Ejemplo C

- 10 Tres tubos Eppendorf de 1,5 ml que contienen cada uno aproximadamente 10 mil millones de células de E. Coli y 33 mg de perlas de vidrio (100 micras de diámetro) y 40 microlitros de fosfato sódico 0,5 molar, pH 7,5 se sonicaron durante 15, 30 y 60 segundos a 40 kHz, amplitud del 10% con una punta de sonicación de 4 mm insertada dentro del tubo. La purificación, el gel y la fotografía se hicieron como en el Ejemplo A y se muestran en la Figura 35.

Este ejemplo muestra que tiempos de sonicación más largos no cambian la distribución de tamaño, es decir, que se aplican condiciones de estado estable.

- 15 Ejemplo D

En este ejemplo, se recuperó el ADN de volúmenes crecientes de un cultivo bacteriano usando dos métodos estándar - el kit comercial de Quiagen para recuperación de ADN y el método bibliográfico del Fenol/Cloroformo. Estos se compararon con el método dado en el Ejemplo A, que usa SDS al 0,2% y fosfato sódico 0,5 M como tampón. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 36.

- 20 El gráfico muestra que el método de esta invención es superior a tanto el kit de Quiagen como al método del fenol/cloroformo.

Tampón protector ejemplo

En este ejemplo se muestra en la Figura 37 una comparación de tampones protectores para cortar el ADN por ultrasonicación.

- 25 Se mezclaron 5 µl de plásmido de ADN G1 que contenía 5 µg de ADN con 50 µl de tampón con 44 mg de perlas de zirconia de aproximadamente 100 micras de tamaño en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Se insertó el tubo en la cavidad de un ultrasonicador Branson SLPt 40 kHz. El sonicador se hizo funcionar a 50% de amplitud durante 12 minutos con un ciclo de pulsos de 10" encendido y 20" apagado. Después de la sonicación, se sometió a electroforesis una porción de 20 µl de la mezcla en un gel de agarosa al 1% a 100 voltios en tampón TAE. Todos los tampones se ajustaron a un pH entre 7 y 8. Se corrió una escalera de ADN en ambos lados de los carriles de muestras. Los carriles contenían:
- 30

Carril 1. TE (Tris-(hidroximetil)aminometano) con EDTA (ácido etiléndiaminotetra-acético)

Carril 2. Tris-(hidroximetil)aminometano 10 mM

Carril 3. Fosfato sódico 500 mM

- 35 Carril 4. Fosfato sódico 50 mM

Carril 5. Citrato sódico 60 mM

Carril 6. Cloruro sódico al 6,3%

Este ejemplo muestra que tampones de alta fuerza iónica, como sales metálicas son eficaces en la protección del ADN durante la sonicación. El tampón deja fragmentos de ADN más grandes en una sonicación en estado estable.

40 Tampones de fuerza iónica más baja como Tris-(hidroximetil)aminometano son menos protectores y producen fragmentos de ADN más pequeños adecuados para aplicaciones particulares.

- En una realización, el estabilizador de tamaño es un tampón protector de alta fuerza iónica que incluye sales solubles de cationes que incluyen los metales del Grupo 1 y del Grupo 2 de la tabla periódica con aniones del Grupo 7 de la tabla periódica, así como aniones más complejos ejemplificados por sulfatos, fosfatos, y acetatos. En otra realización el tampón es capaz de ser estable y soluble a valores de pH entre 7 y 8. La concentración soluble de los tampones es preferiblemente mayor que 1%, y lo más preferiblemente mayor que 5%.
- 45

Ejemplos de tensioactivos

5 Se colocaron dos moscas de la fruta en cada uno de 3 tubos eppendorf que contenían 25 μ l de perlas de vidrio de 100 micras de Biospec Products. Se añadieron 100 μ l de agua al primer tubo. Se añadieron 100 microlitros de dodecilsulfato sódico al 1% al segundo tubo. Se añadieron 100 microlitros de dodecilsulfato sódico al 1% al tercer tubo. Todos los tres tubos se sonicaron durante 2 minutos en nivel de potencia 2 en un sonicador Branson 150, colocando el tubo en el orificio de rosca del convertidor ultrasónico donde están normalmente enroscadas las puntas en el convertidor. El medidor de potencia mostró una lectura inicial de aproximadamente 8 vatios que cayó durante los 30 segundos a aproximadamente 4 vatios, cuyo nivel se mantuvo durante el resto del tiempo de sonicación. Después de la sonicación, se retiraron 20 microlitros del fluido superior de las perlas de vidrio y se colocó en los pocillos de un gel de electroforesis de agarosa, hecho con tampón TAE. Se incluyó una escalera de ADN en el primer carril para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN sonicados. Después de la electroforesis a 70 voltios durante 90 minutos, el gel se empapó con agitación suave con una solución de bromuro de etidio. A continuación, se tomó una fotografía del gel en luz negra, como se muestra en la Figura 38.

15 Refiriéndose a la Figura 38, el primer carril por encima de la escalera de ADN muestra el resultado de sonicación con agua. Se ve un bajo rendimiento de ADN, y los fragmentos son más pequeños de 400 pares de bases. El segundo carril por encima de la escalera muestra el resultado con dodecilsulfato sódico. El rendimiento es mucho más alto, y los tamaños de los fragmentos oscilan de 300 a 2000 pares de bases de tamaño. El tercer carril por encima de la escalera muestra el resultado con dodecibencenosulfonato sódico. De nuevo, el rendimiento de ADN es alto, lo demuestra el punto brillante en la fotografía, y el intervalo de tamaño es de 300 a 1000 pares de bases. Este ejemplo muestra que la sonicación en presencia de un tensioactivo seleccionado puede proporcionar un alto rendimiento de ADN en un intervalo de tamaño limitado a partir de una fuente viva como moscas de la fruta.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar moléculas de ácido nucleico de una muestra biológica que comprende las etapas de:
 - 5 distribuir la muestra biológica en un cartucho desechable con un depósito cilíndrico inserto que tiene una pluralidad de cámaras que incluye una primera cámara con un primer puerto que termina en una pared exterior del depósito cilíndrico inserto, siendo el depósito cilíndrico inserto giratorio alrededor de un eje de rotación y siendo la pared exterior paralela al eje de rotación y definiendo un perímetro del depósito cilíndrico inserto, estando la pluralidad de cámaras dentro del perímetro de la pared exterior, un canal a través que se extiende a lo largo de una superficie inferior del depósito cilíndrico inserto, teniendo el canal a través un segundo puerto y un tercer puerto en los extremos respectivos del canal a través y terminando cada uno en la pared exterior;
 - 10 mezclar dicha muestra biológica en un primer volumen de tampón en dicha primera cámara;
 - fragmentar dicha muestra en presencia de un estabilizador de tamaño al 0,1-10%, seleccionado de un detergente, tensioactivo, jabón, y una sal caotrópica, para obtener las moléculas de ácido nucleico;
 - 15 unir dichas moléculas de ácido nucleico a nanopartículas magnéticas y aplicar seguidamente un campo magnético para concentrar dichas nanopartículas magnéticas y cualquier molécula de ácido nucleico unida a las mismas a una primera porción de un primer depósito en dicho cartucho desechable;
 - alinear el primer puerto con un émbolo;
 - accionar el émbolo para retirar las moléculas de ácido nucleico fuera del cartucho desechable y dentro del émbolo;
 - 20 alinear el segundo puerto con el émbolo girando el depósito cilíndrico inserto alrededor del eje de rotación; y
 - accionar el émbolo para inyectar las moléculas de ácido nucleico fuera del émbolo y dentro del canal a través.
2. El método de la reivindicación 1 que comprende además la etapa de pasar dicha muestra biológica a través de un filtro para suministrar a la etapa de mezcla.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de unión de dichas moléculas de ácido nucleico a nanopartículas magnéticas se lleva a cabo en presencia de una solución alcohólica.
4. El método de la reivindicación 1 que comprende además la etapa de eluir las moléculas de ácido nucleico de las nanopartículas magnéticas con un tampón para proporcionar una muestra concentrada de las moléculas de ácido nucleico.
- 30 5. El método de la reivindicación 1 que comprende además la etapa de sacar la muestra concentrada de la primera porción de un primer depósito, a través de un puerto de distribución y distribuir la muestra concentrada a un segundo depósito en dicho cartucho desechable.
6. El método de la reivindicación 4 que comprende además la etapa de aplicar un campo magnético para mantener dichas nanopartículas magnéticas.
- 35 7. El método de la reivindicación 1 que comprende además la etapa de lavar dicha muestra concentrada con una solución de lavado para eliminar cualquier objeto no unido, en donde dicho campo magnético es suficiente para mantener dichas nanopartículas magnéticas y cualquier molécula de ácido nucleico unida a la misma en su lugar.
8. El método de la reivindicación 1 que comprende además las etapas de:
 - 40 aplicar un campo magnético suficientemente fuerte para manipular dichas nanopartículas magnéticas con el fin de concentrar las nanopartículas y las moléculas de ácido nucleico unidas;
 - proporcionar una solución de lavado para lavar cualquier muestra no unida a dichas nanopartículas magnéticas.

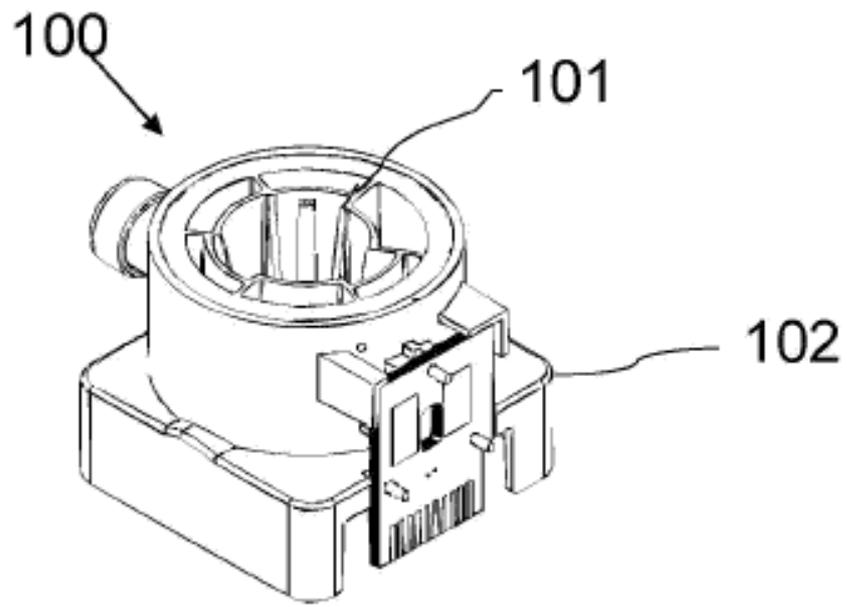


Fig. 1A

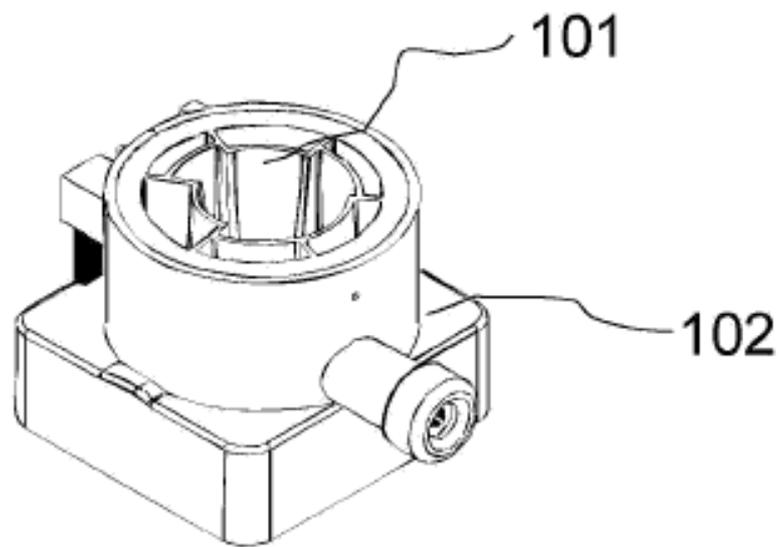


Fig. 1B

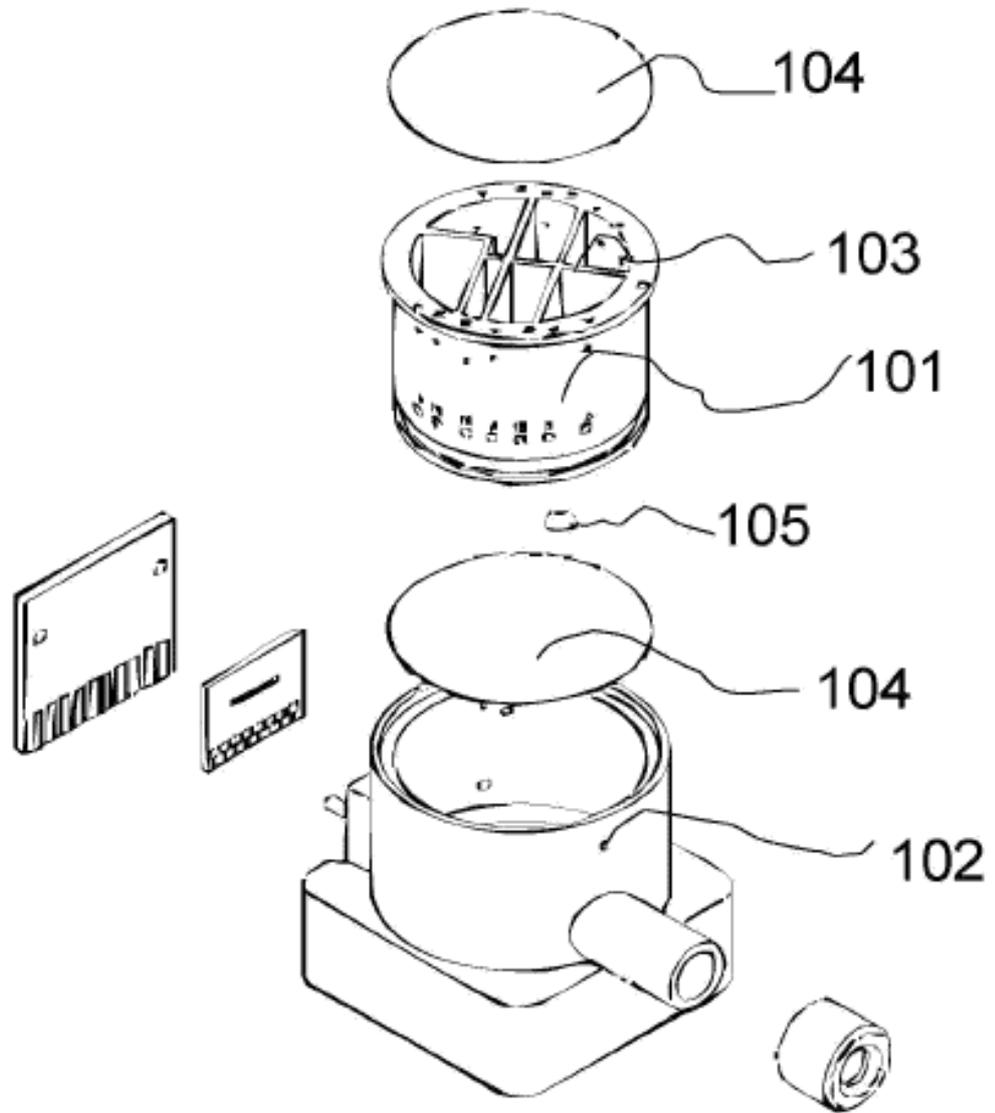
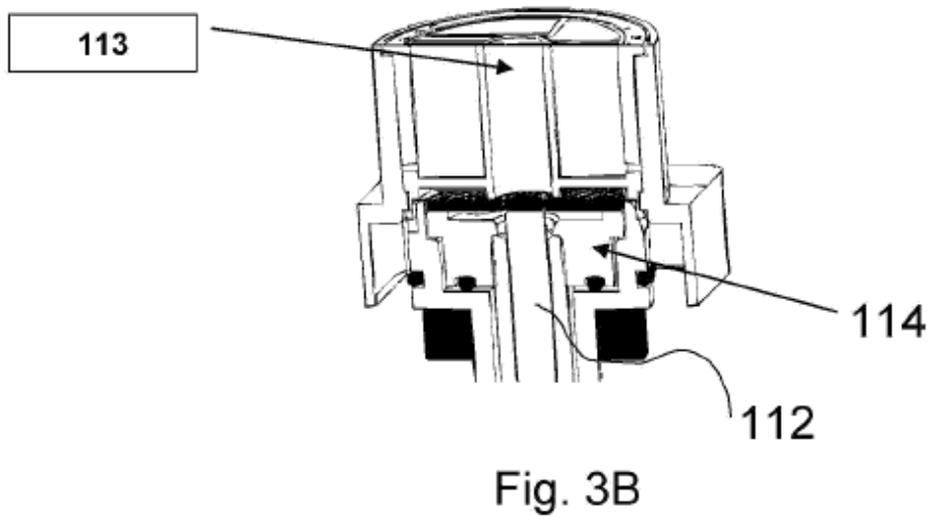
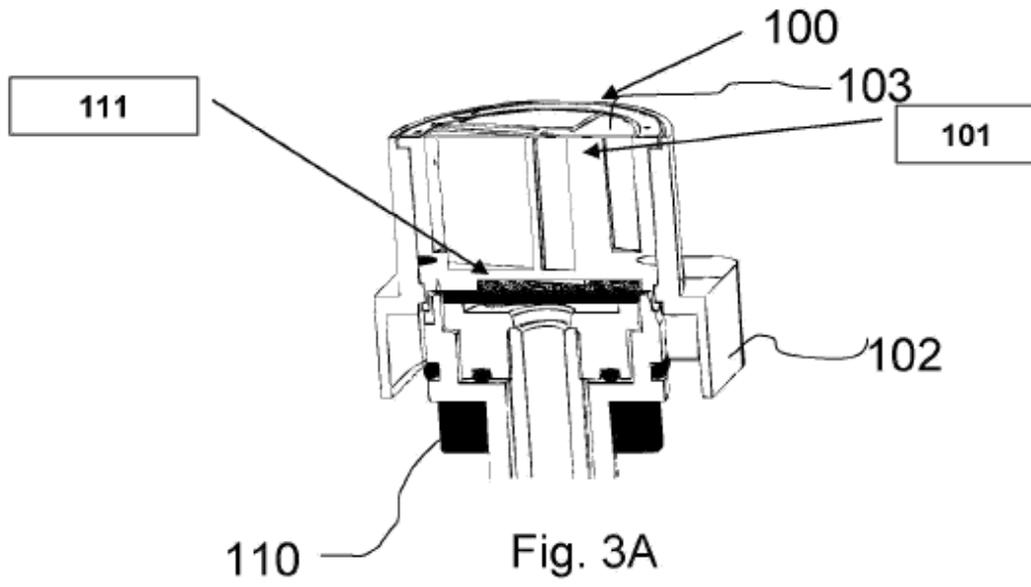


Fig. 2



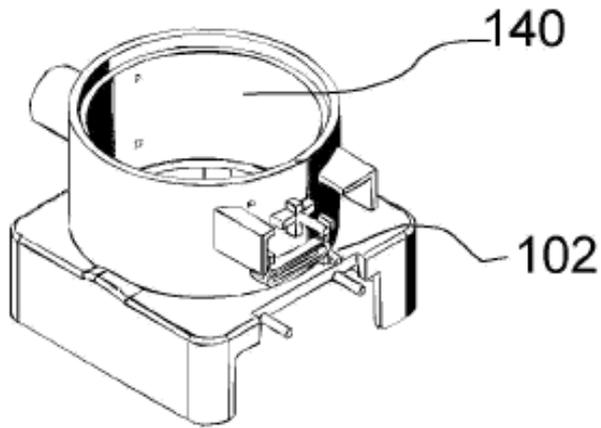


Fig. 4A

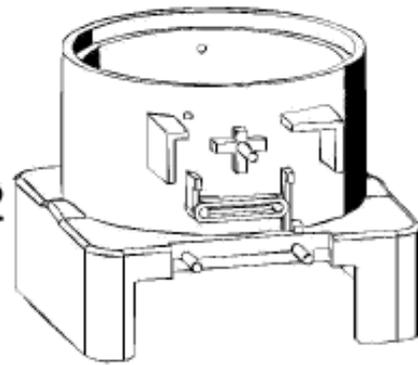


Fig. 4B

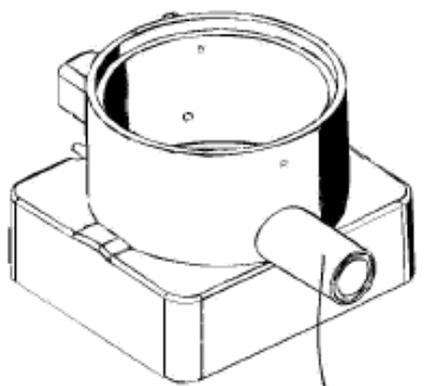


Fig. 4C 141

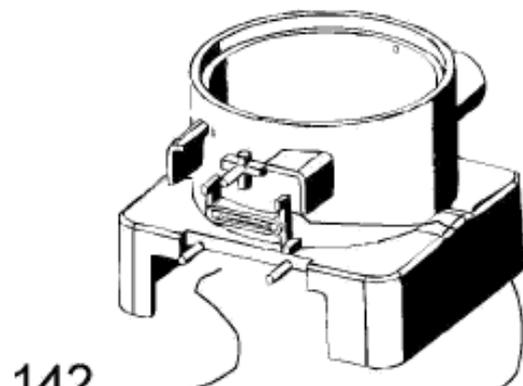


Fig. 4D 142 143

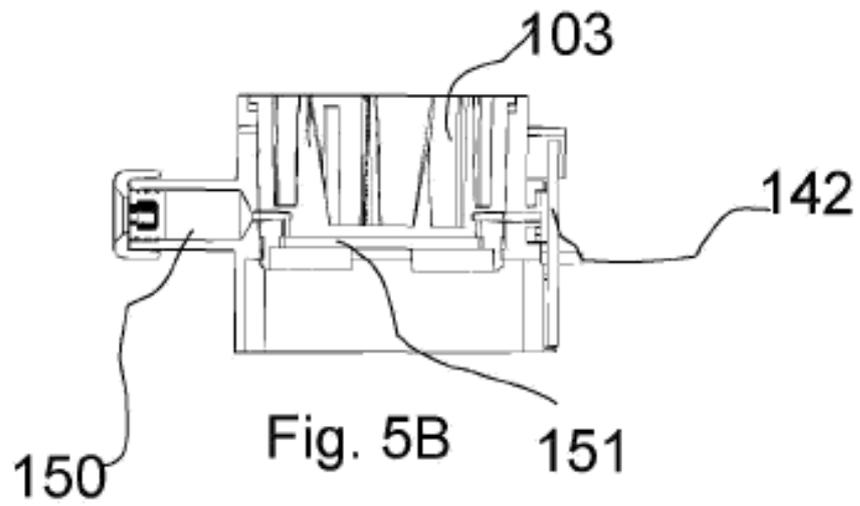
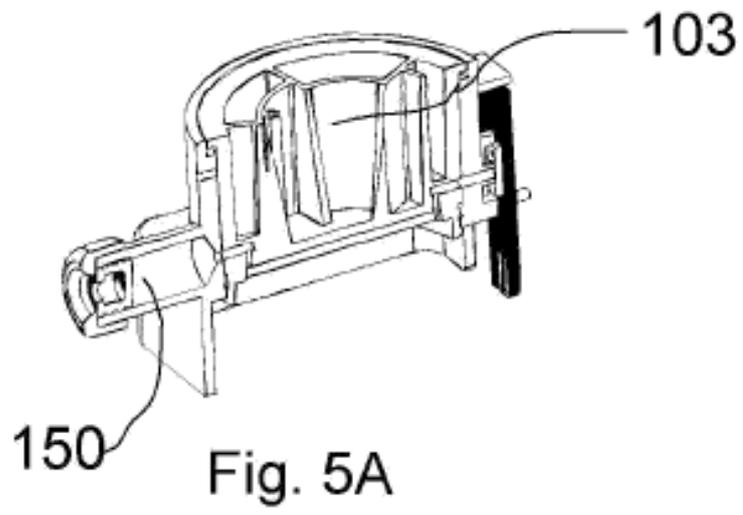




Fig. 6A

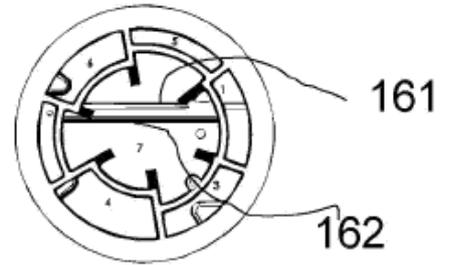


Fig. 6B



Fig. 6C

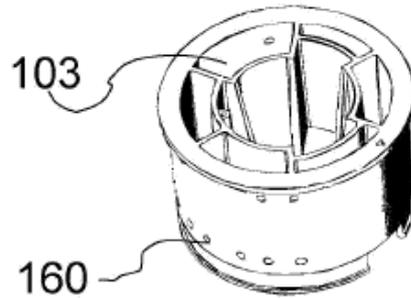


Fig. 6D

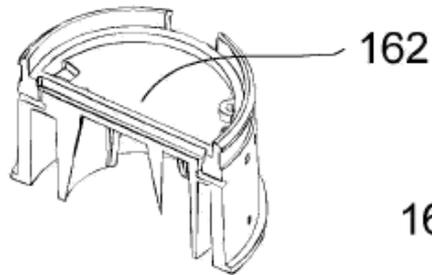


Fig. 6E

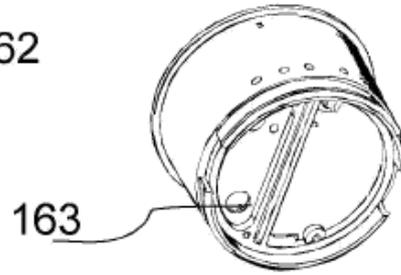


Fig. 6F

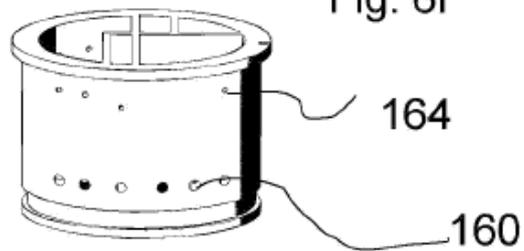


Fig. 6G

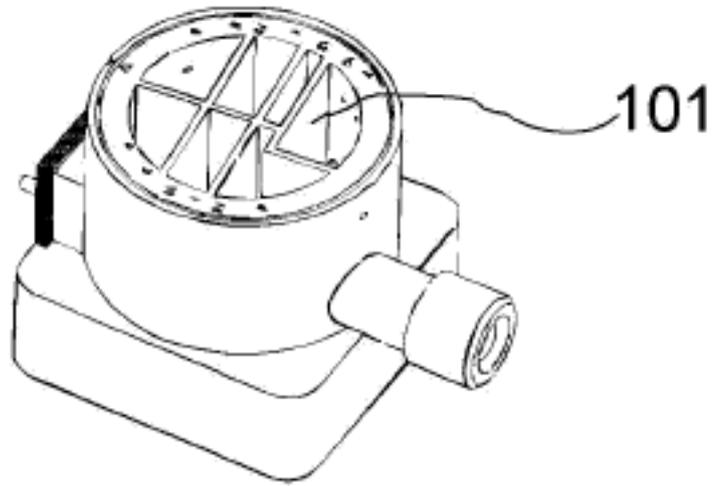


Fig. 7A

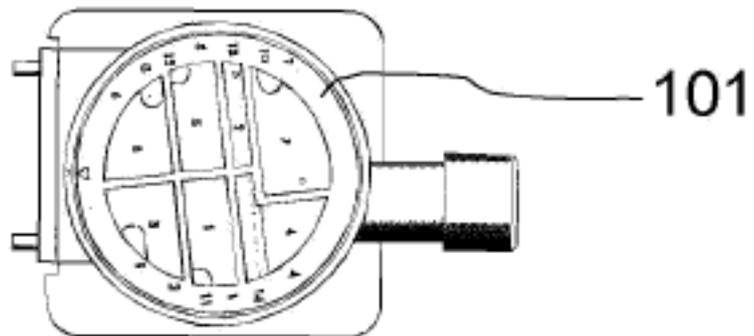


Fig. 7B

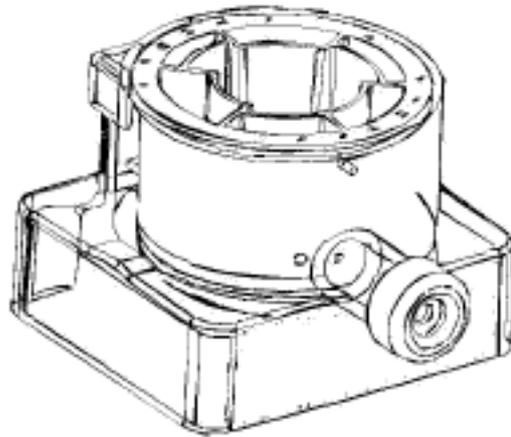


Fig. 8A

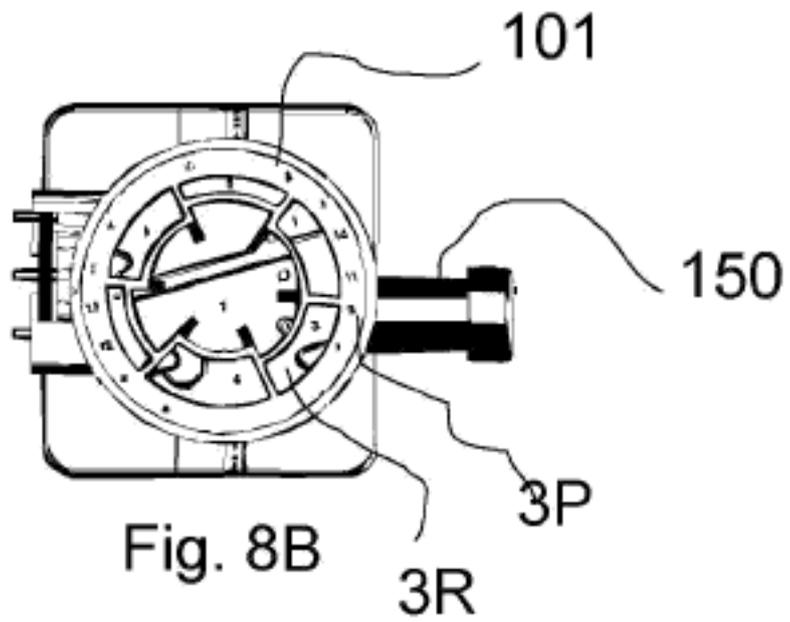


Fig. 8B

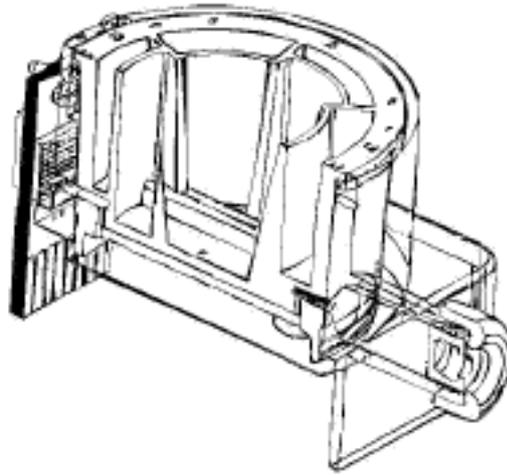


Fig. 9A

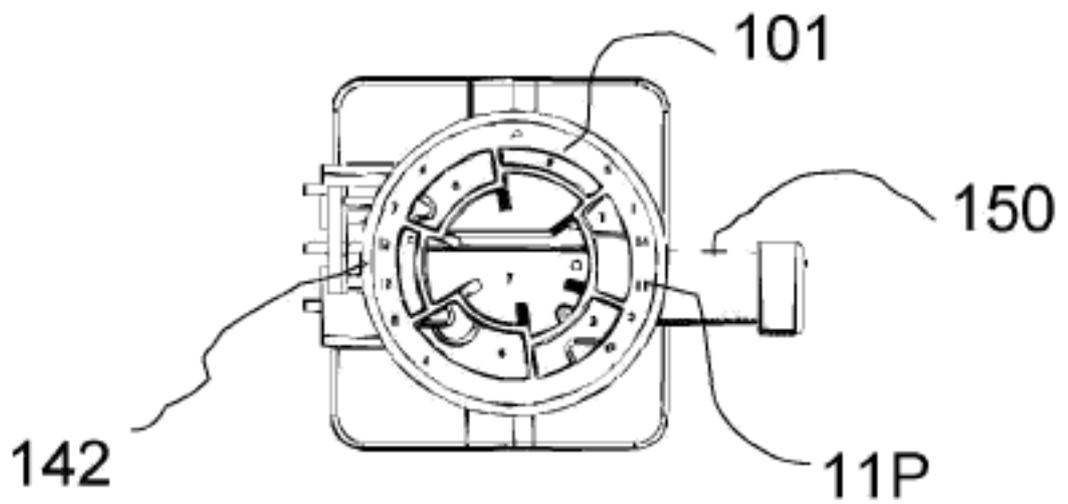


Fig. 9B

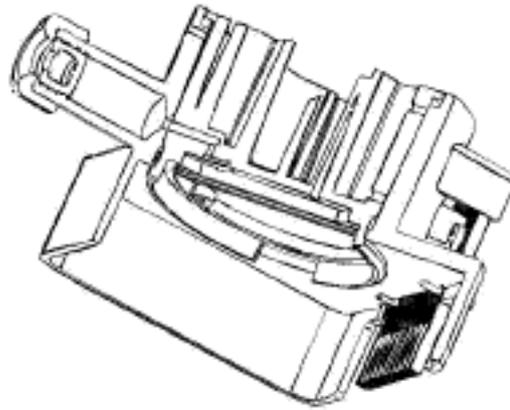


Fig. 10A

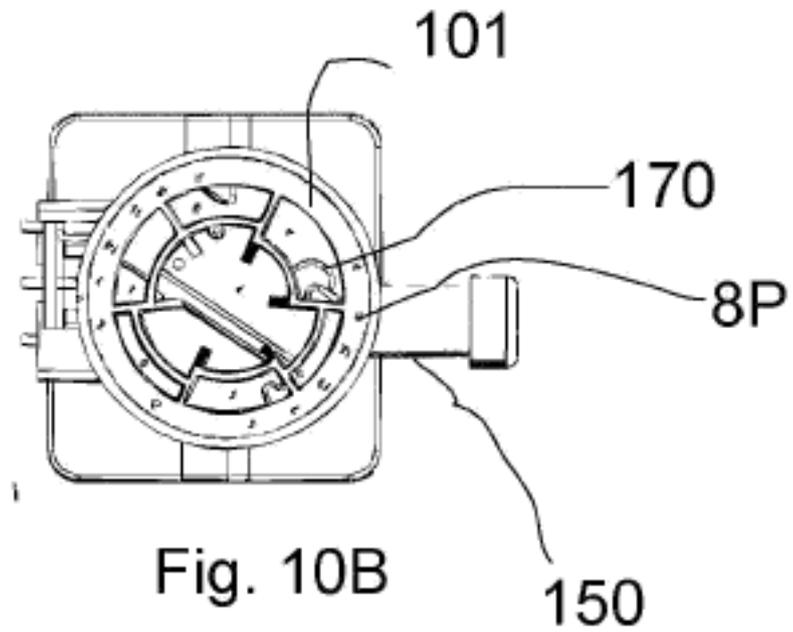


Fig. 10B

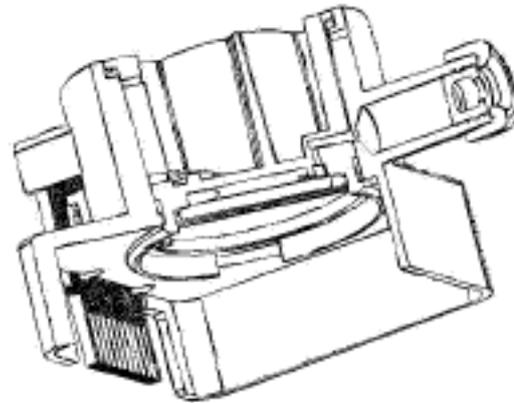


Fig. 11A

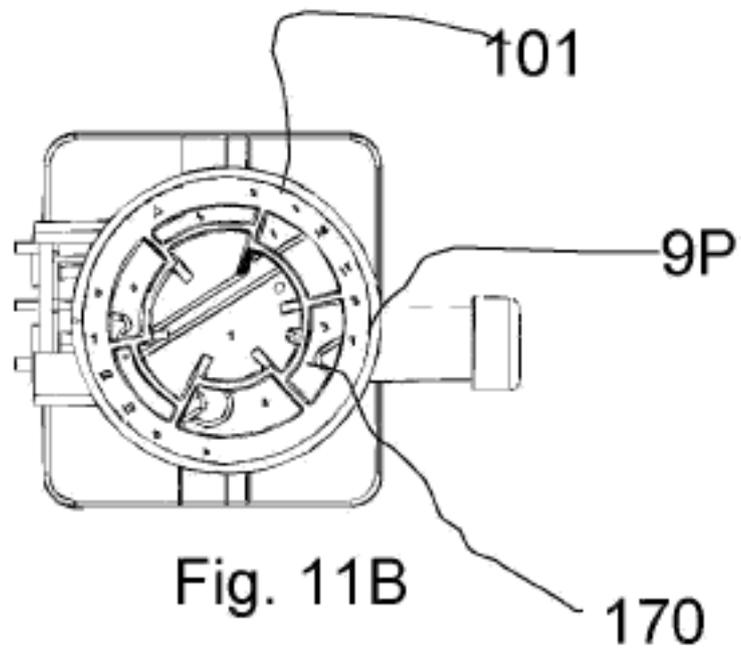


Fig. 11B

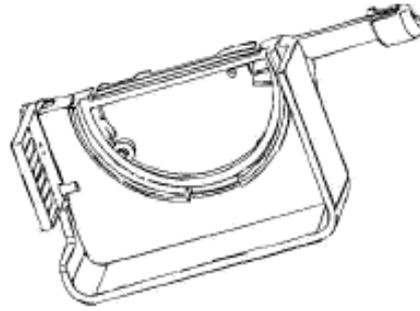


Fig. 12A

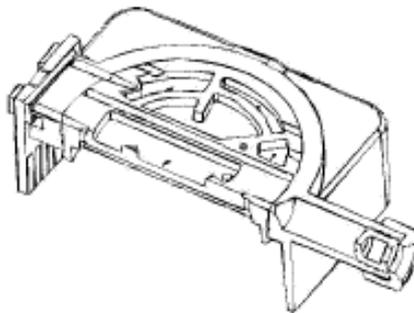


Fig. 12B

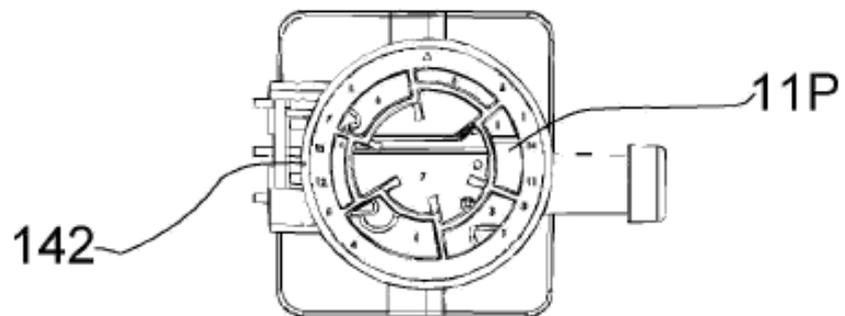


Fig. 12C



Fig. 13A

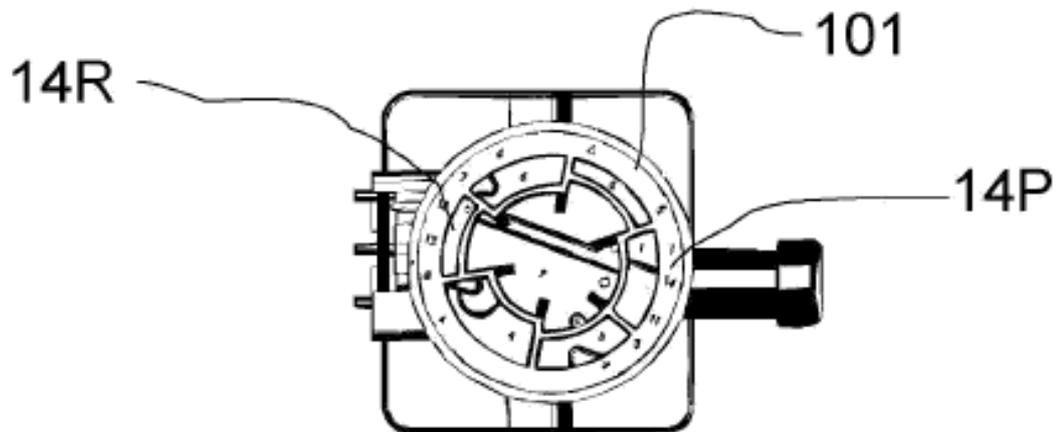


Fig. 13B

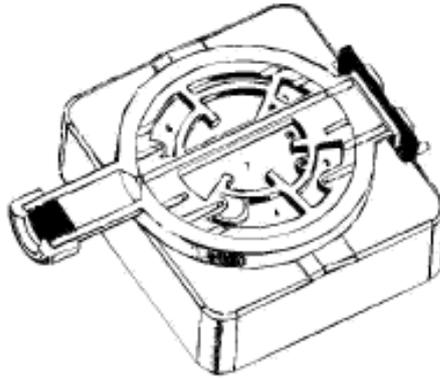


Fig. 14A

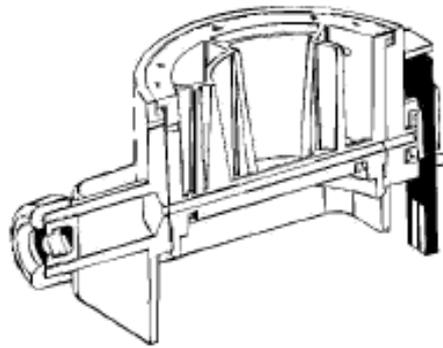


Fig. 14B

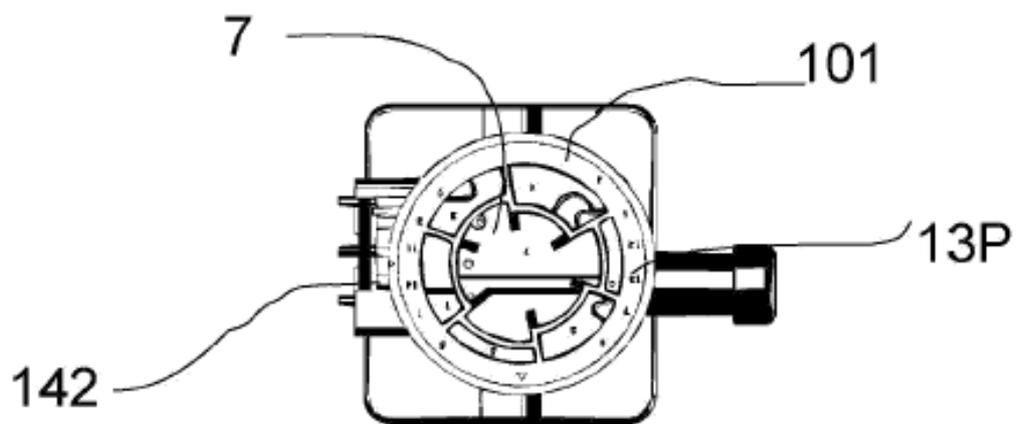


Fig. 14C

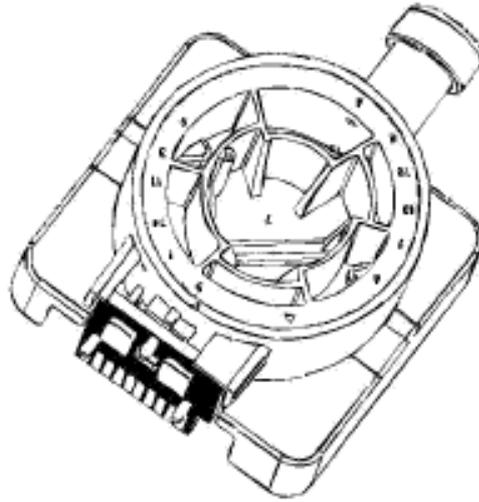


Fig. 15A

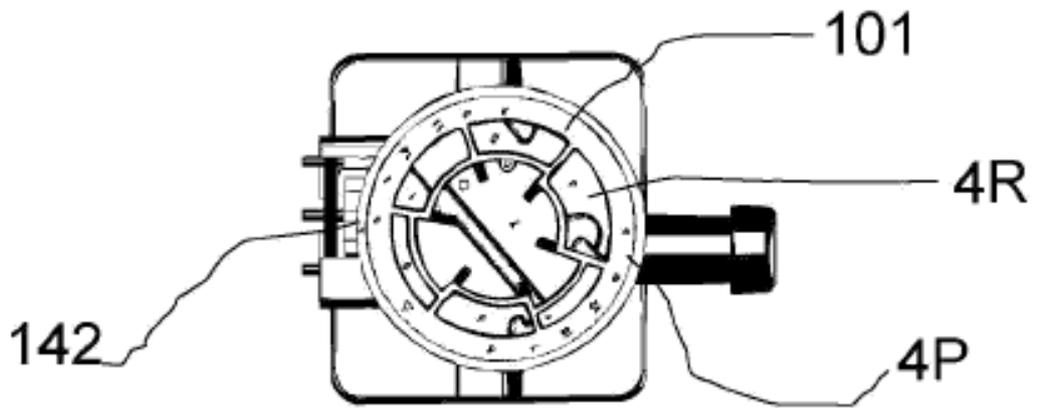


Fig. 15B

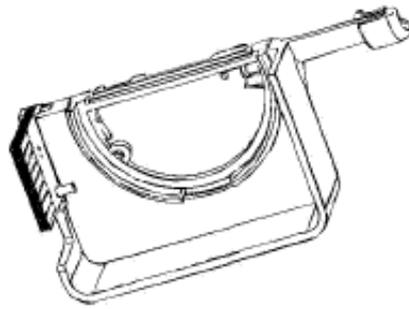


Fig. 16A

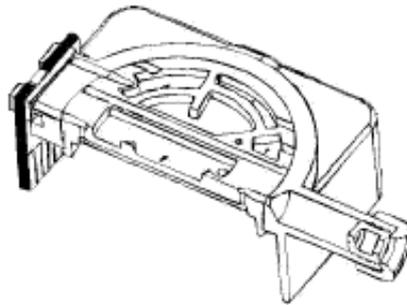


Fig. 16B

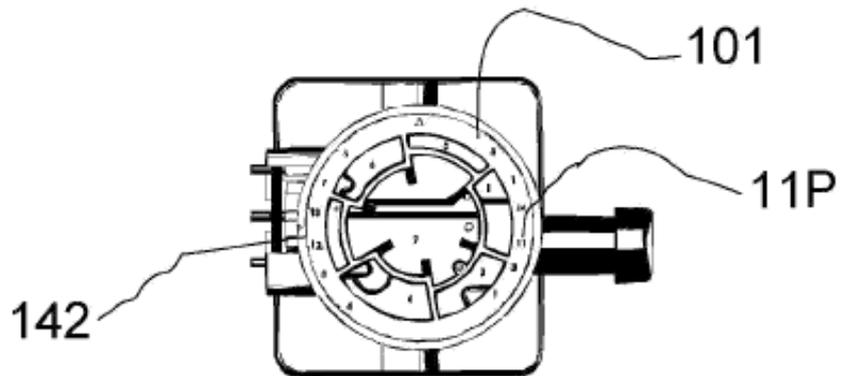


Fig. 16C

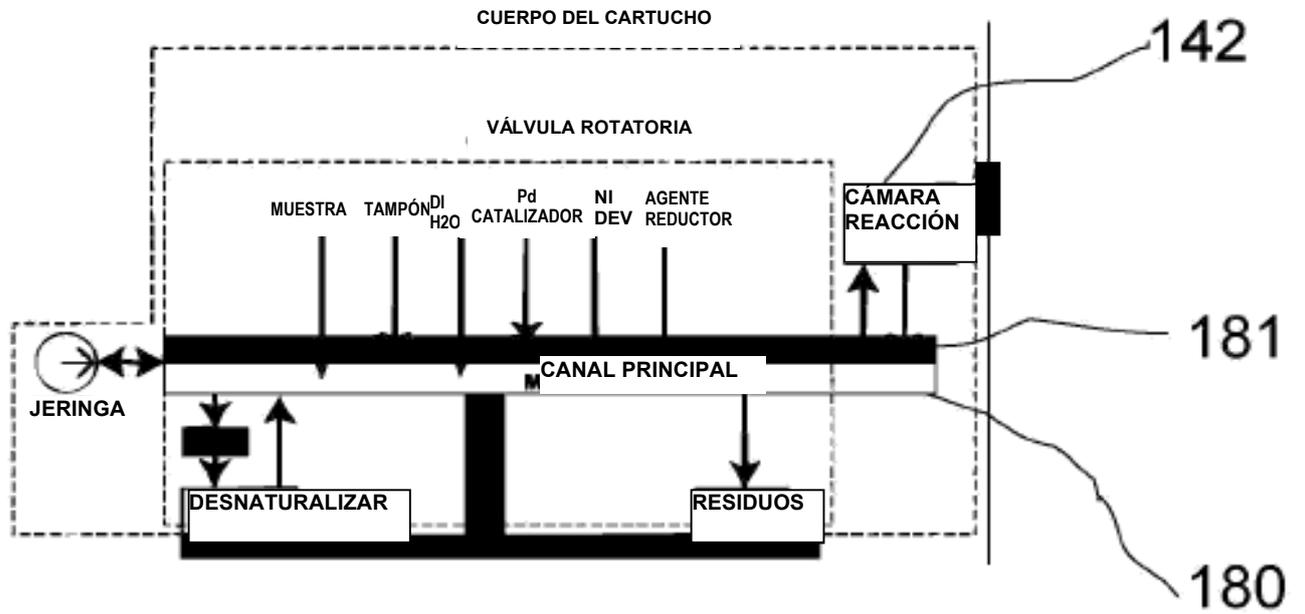


Fig. 17

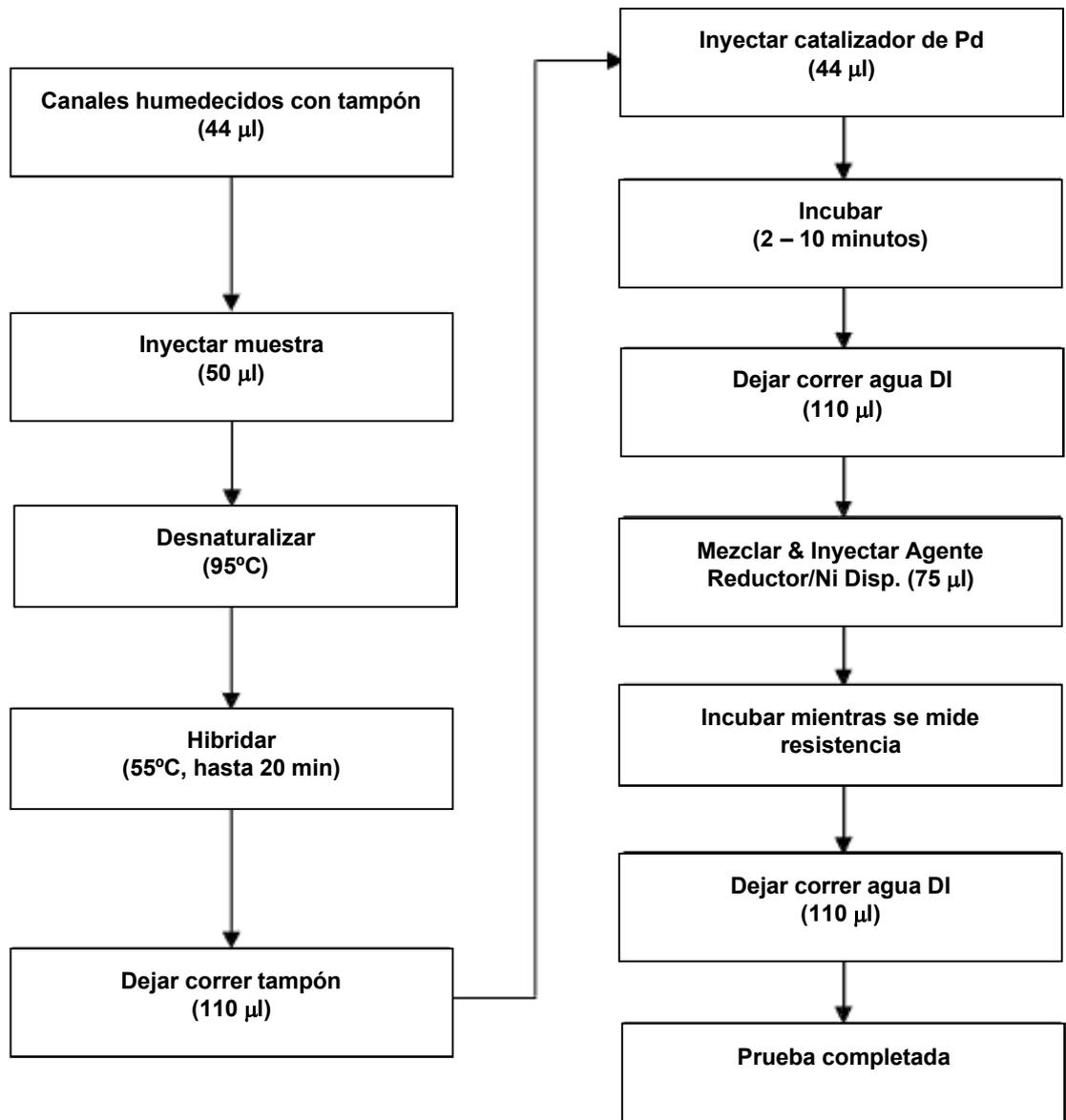


Fig. 18

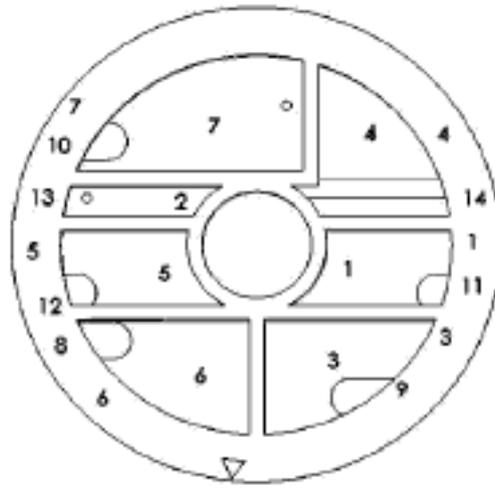
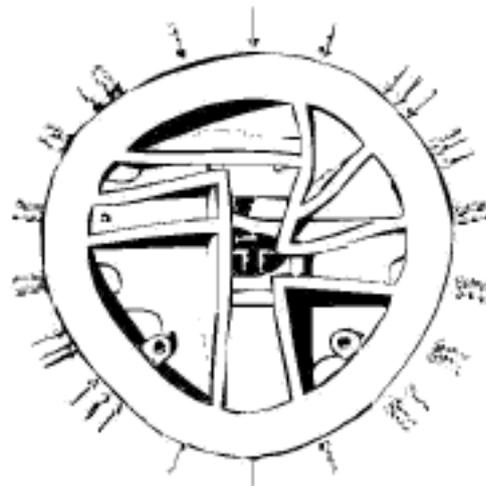


Fig. 19A

Configuración rectangular



- (Fig. 19)
- 1.010a.017
- 1.010a.017
- 1.010a.017
- 1.010a.017
- + 1.010a.017
- 1.010a.017
- 1.010a.017
- 1.010a.017
- 1.010a.017

Fig. 19B

Rectangular

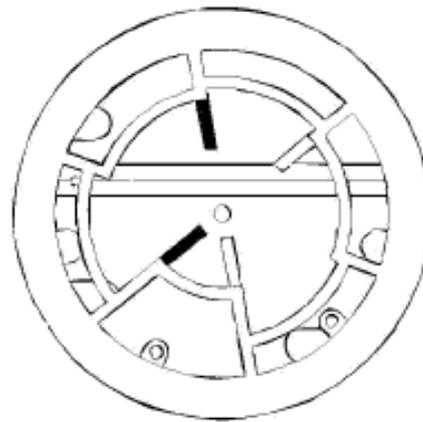
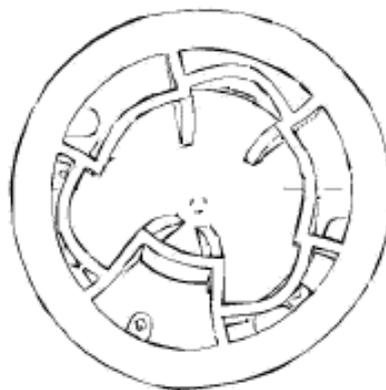


Fig. 20A

Configuración Radial constante, Variable ID



- 0.750e 00
- 0.800e 00
- 0.850e 00
- 0.900e 00
- 0.950e 00
- 1.000e 00
- 1.050e 00
- 1.100e 00
- 1.150e 00
- 1.200e 00
- 1.250e 00
- 1.300e 00
- 1.350e 00
- 1.400e 00

Fig. 20B

Radial constante, Variable ID

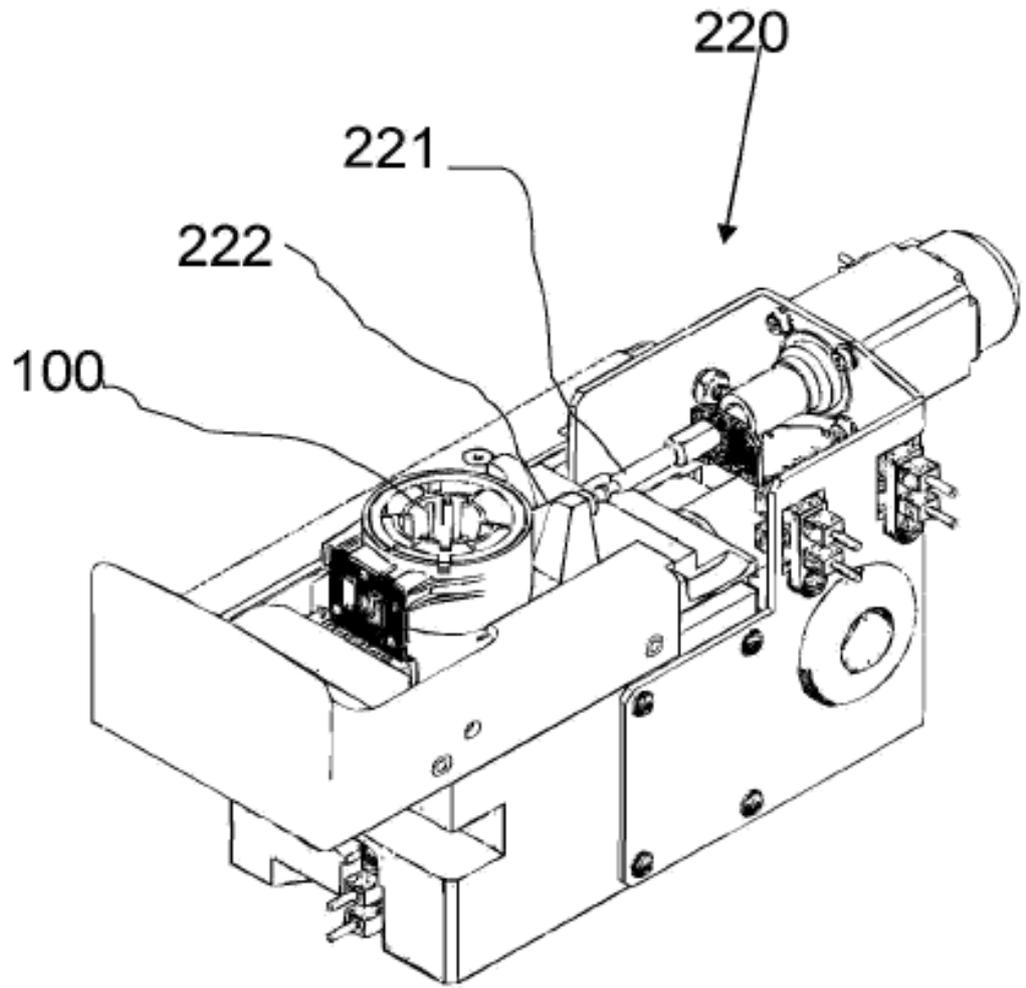


Fig. 22

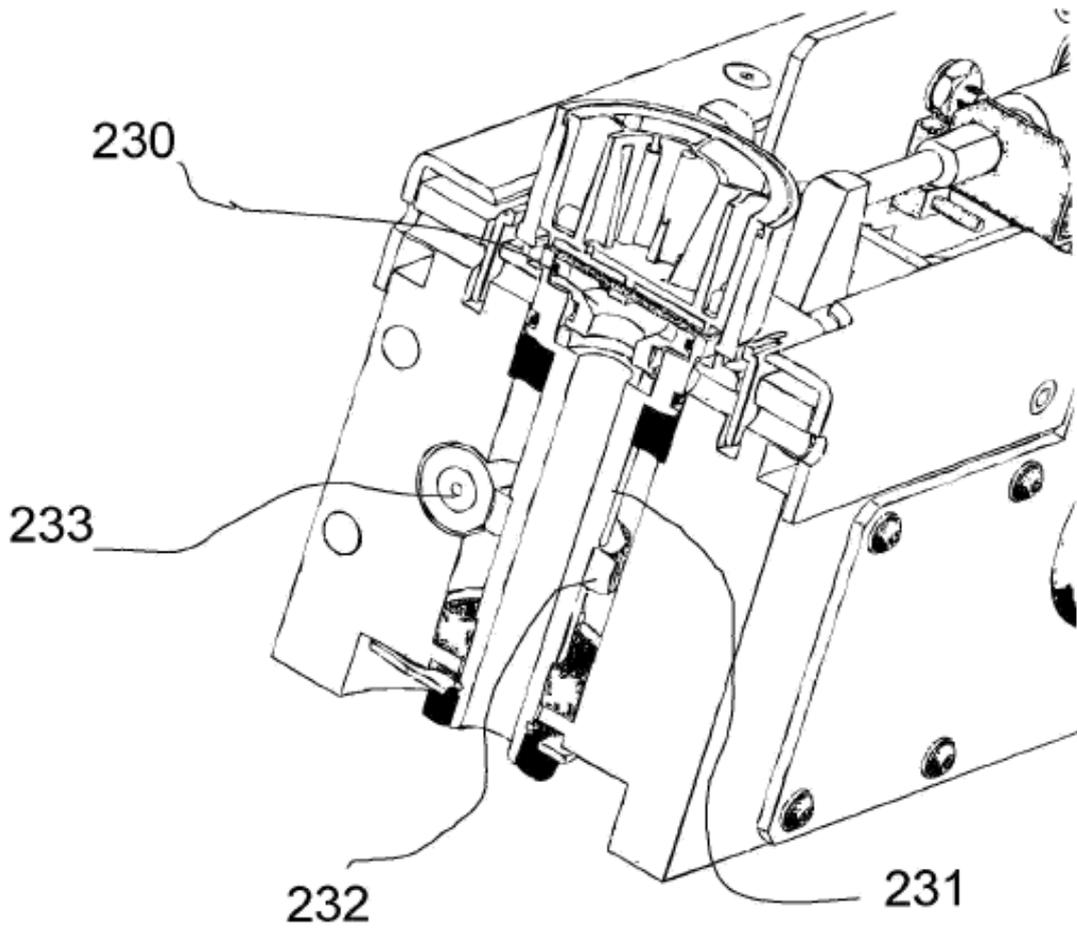


Fig. 23

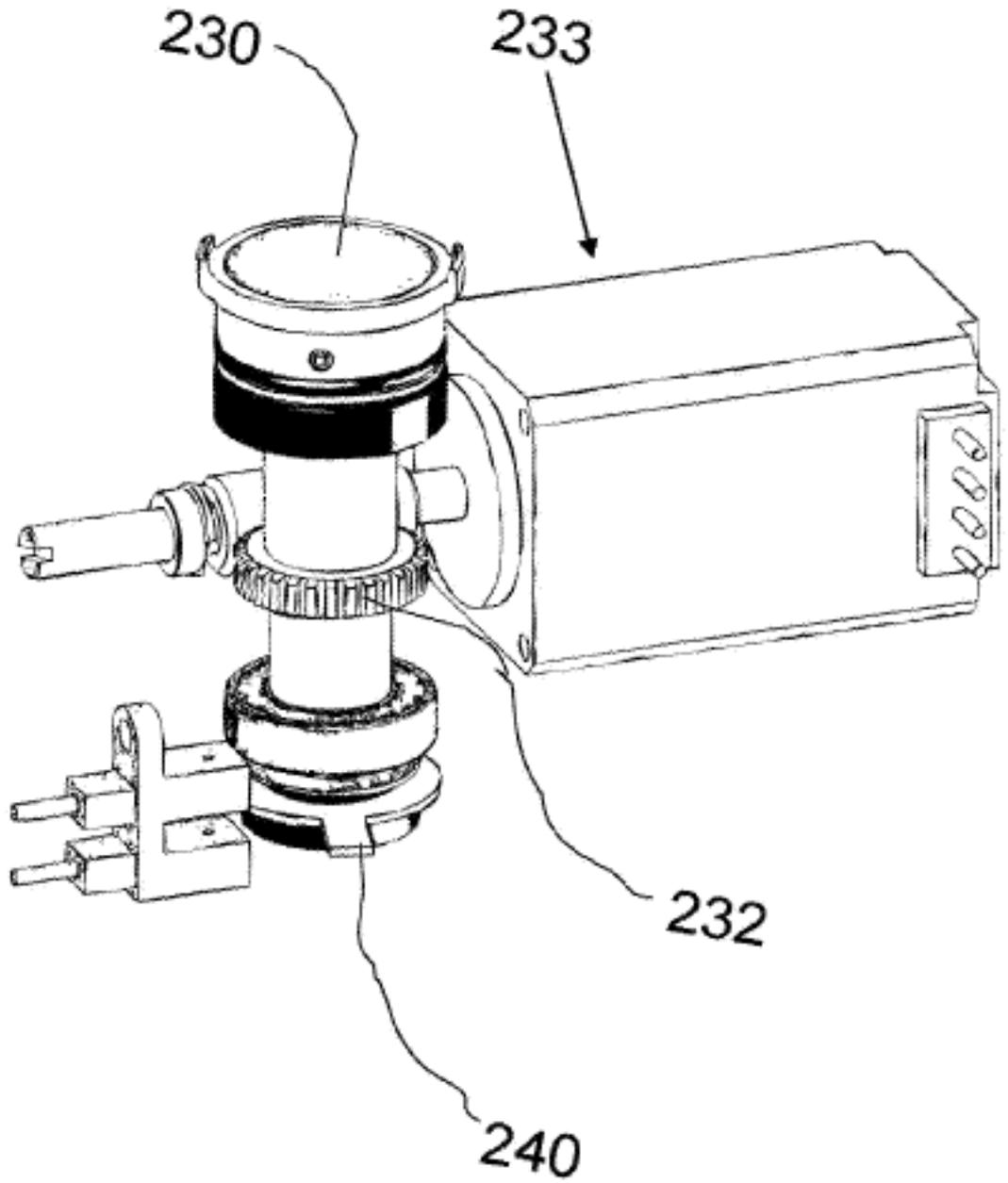


Fig. 24

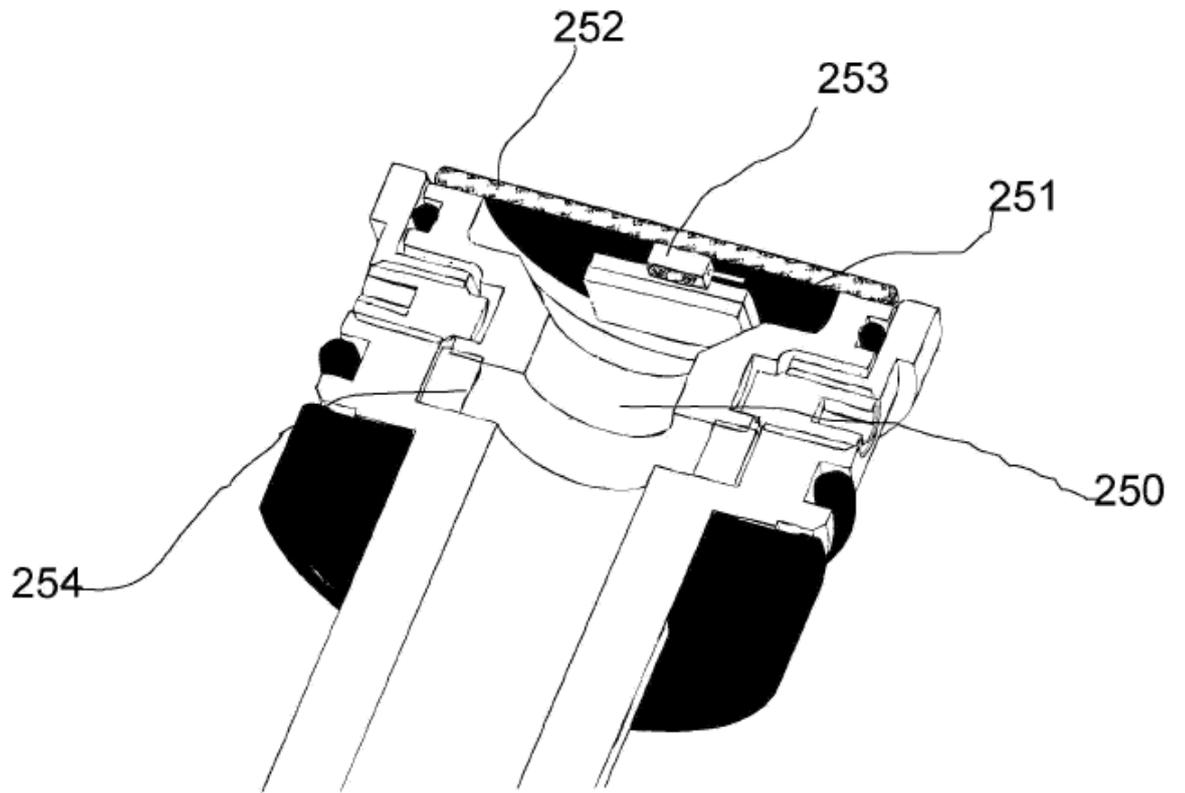


Fig. 25

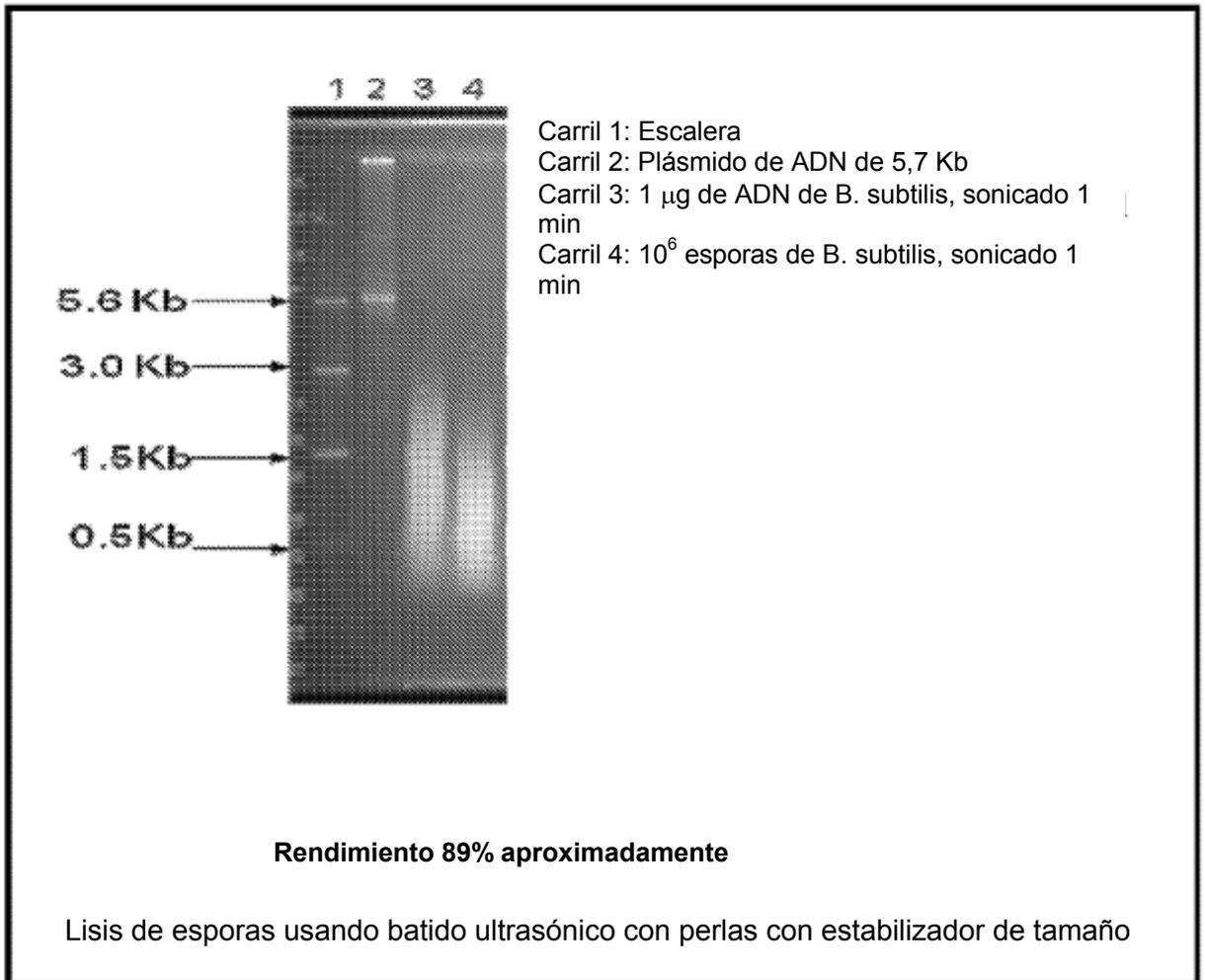


Figura 26

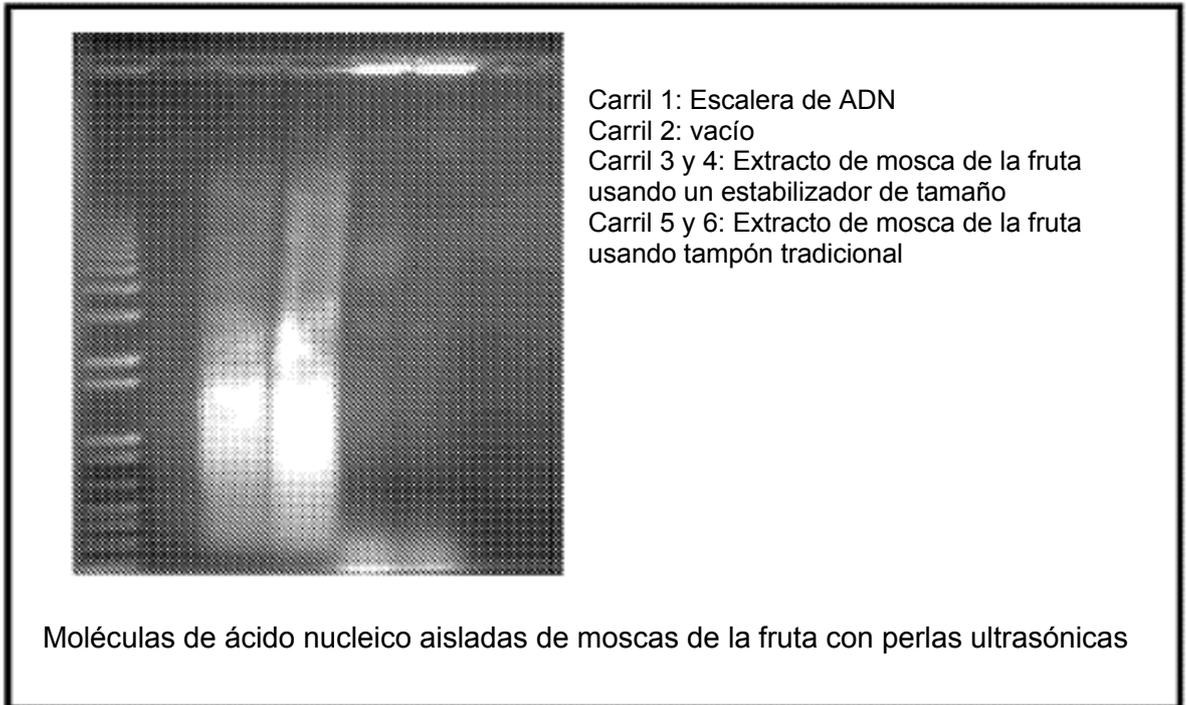


Figura 27

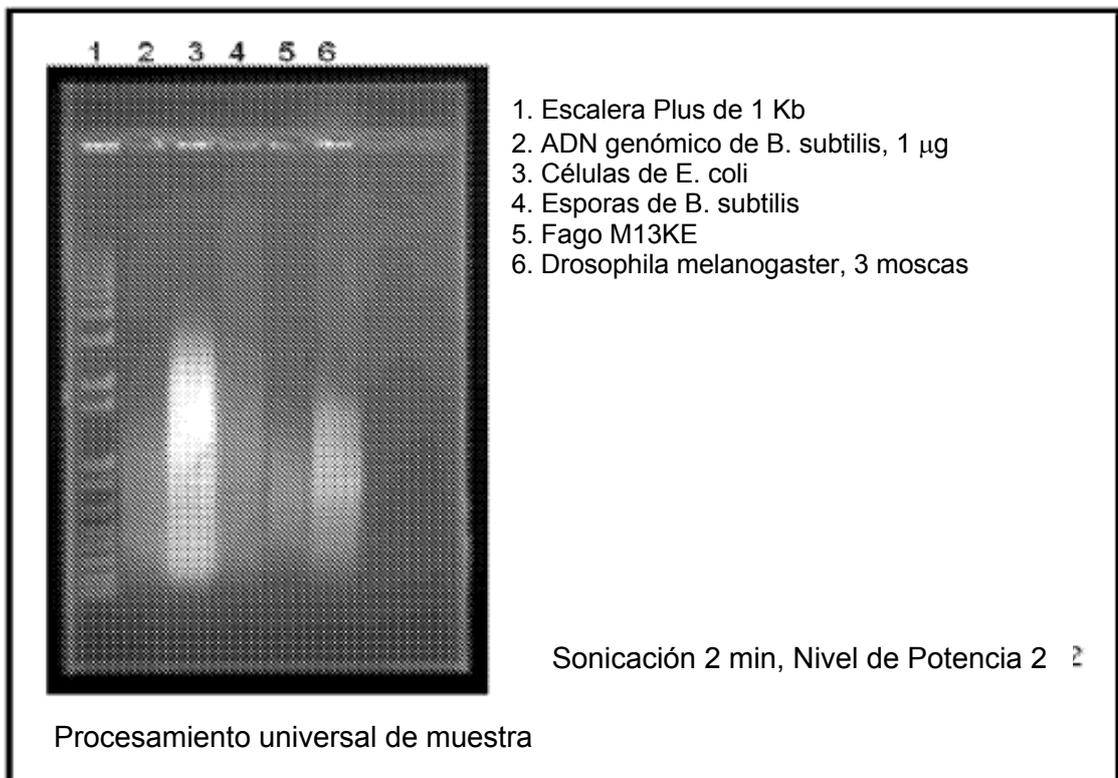


Figura 28

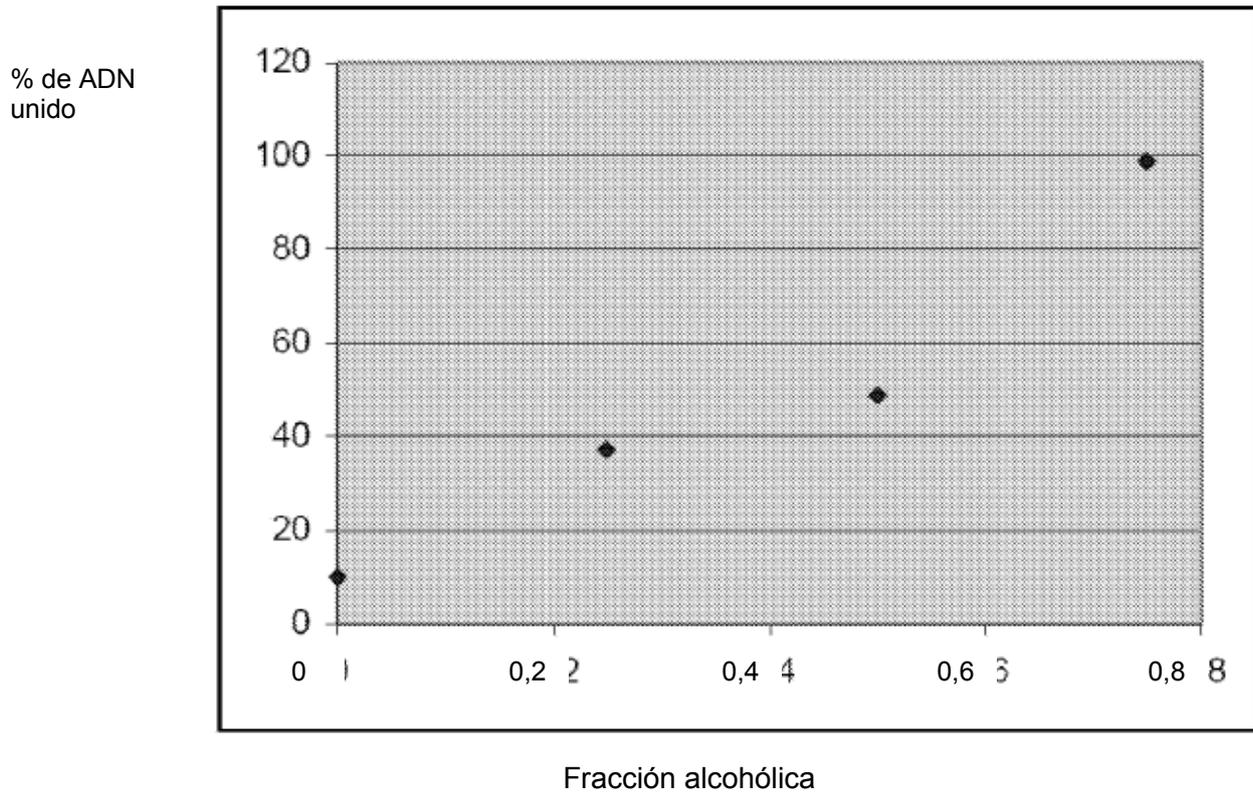


Figura 29

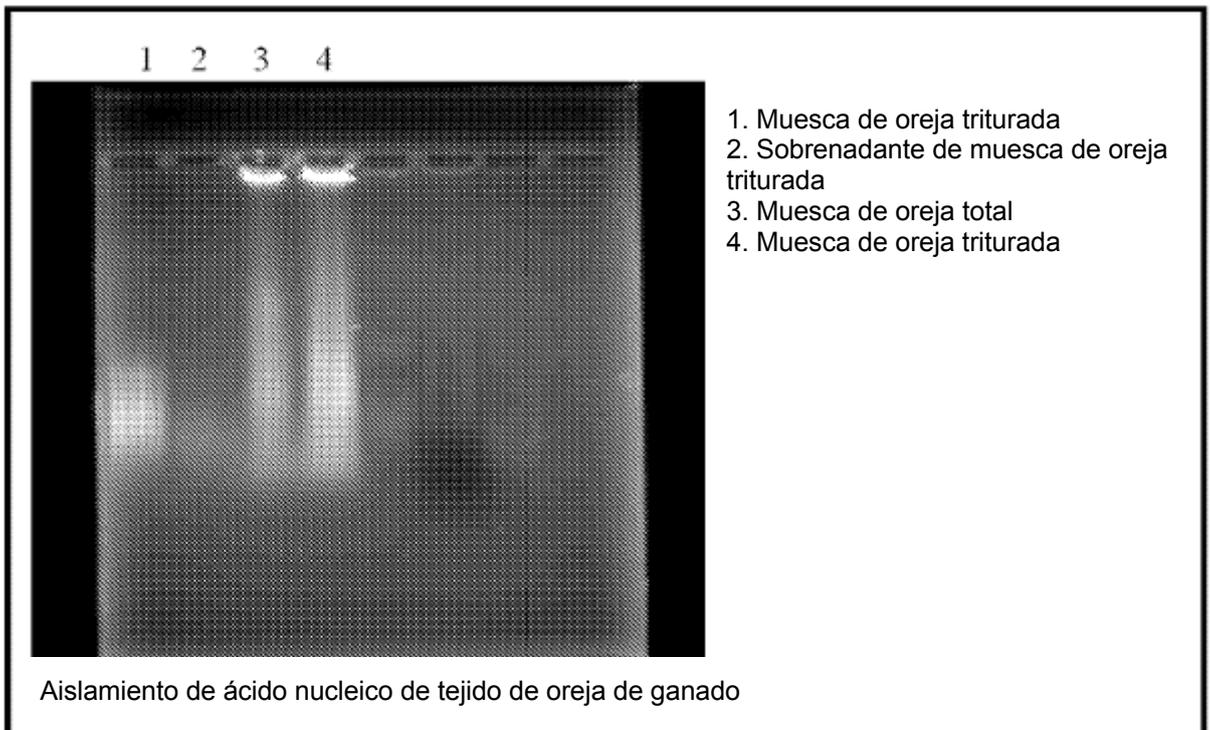


Figura 30

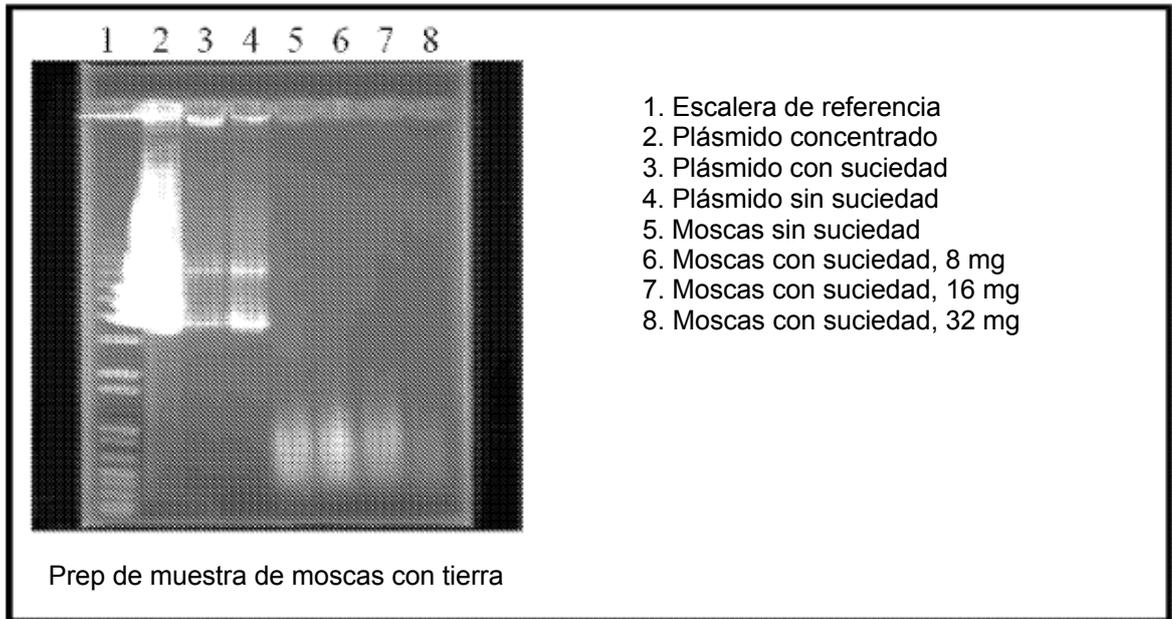


Figura 31

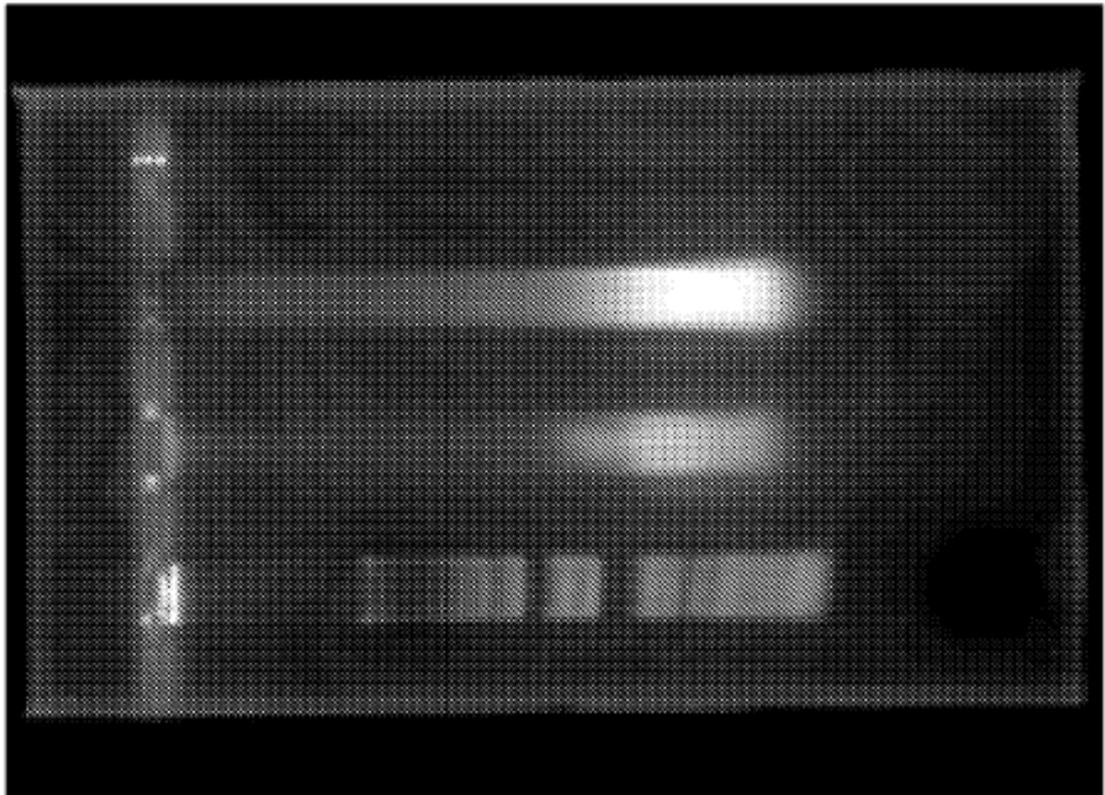


Figura 32

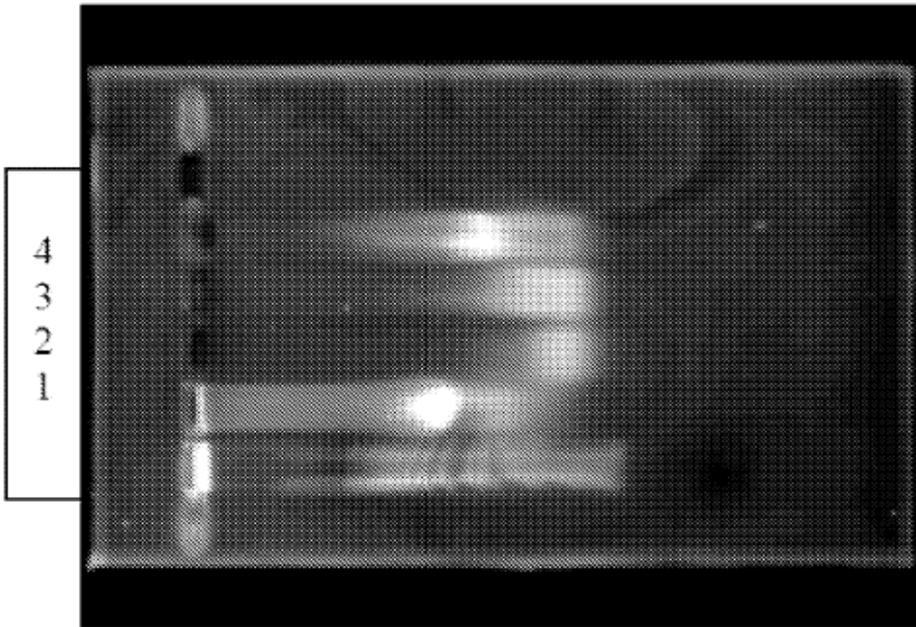


Figura 33



Levadura
Hierba
Arándano

Figura 34

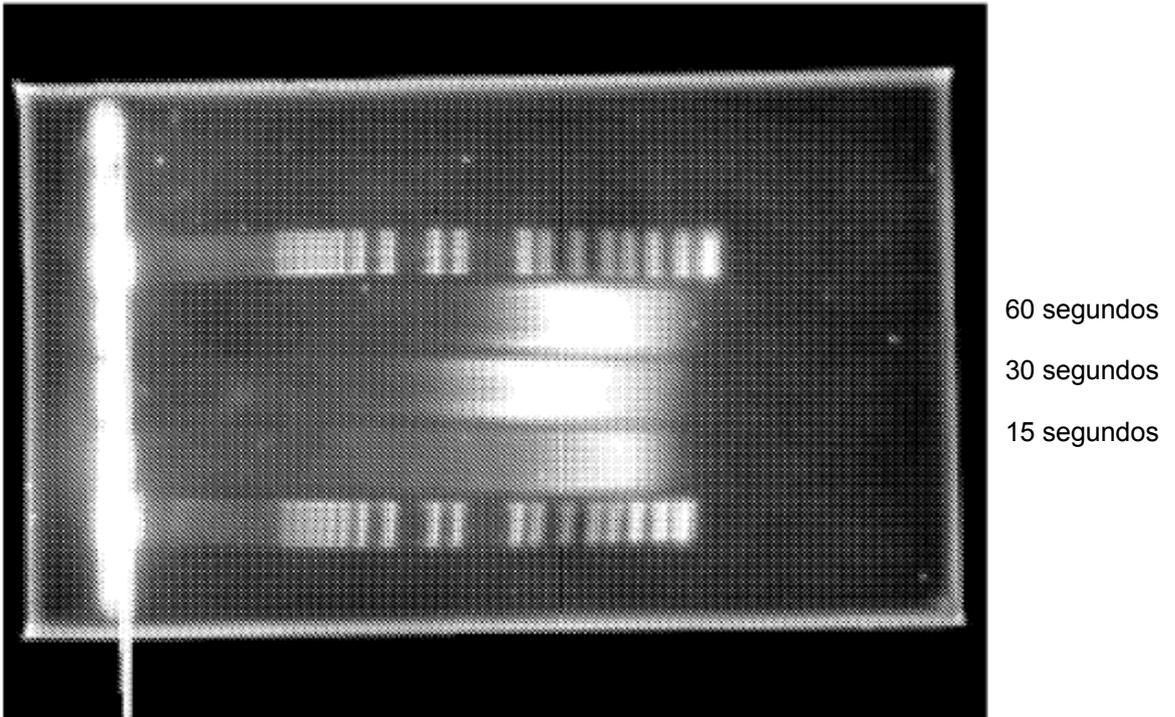


Figura 35

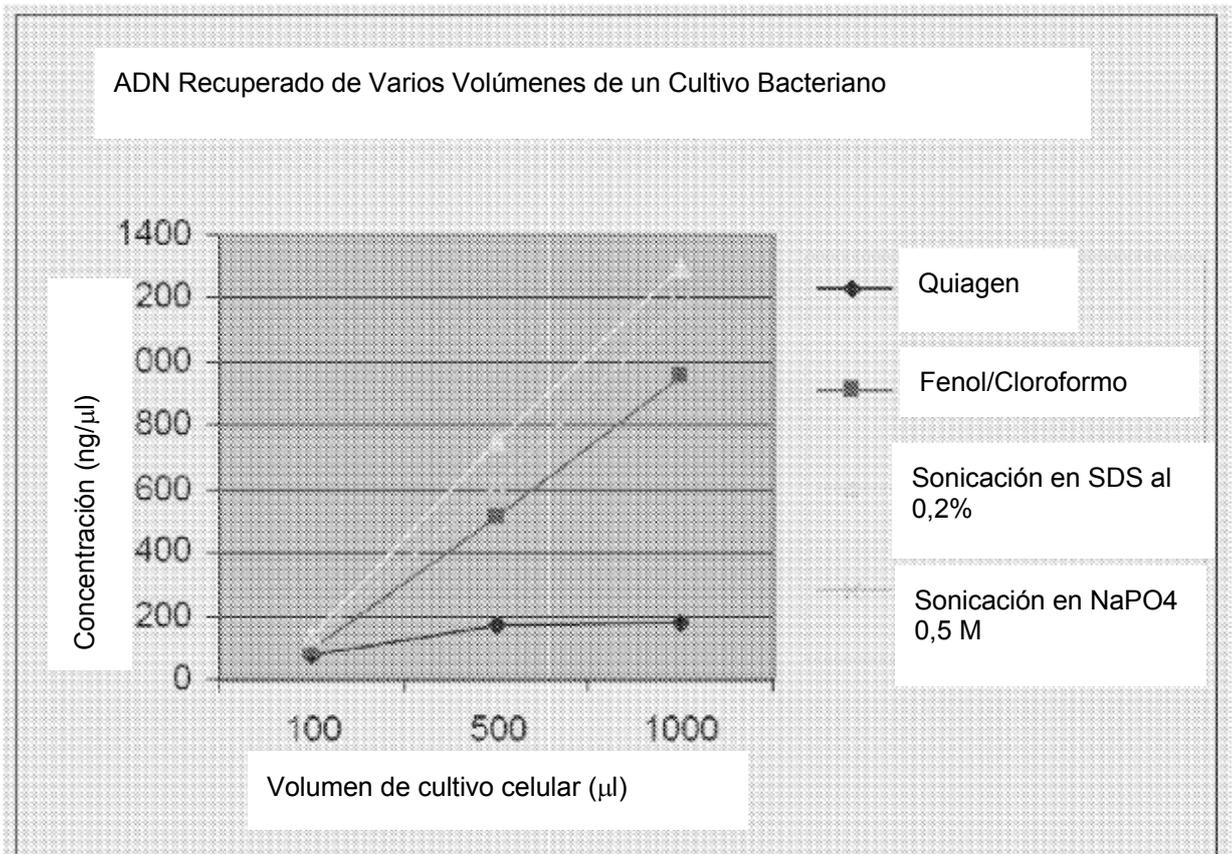
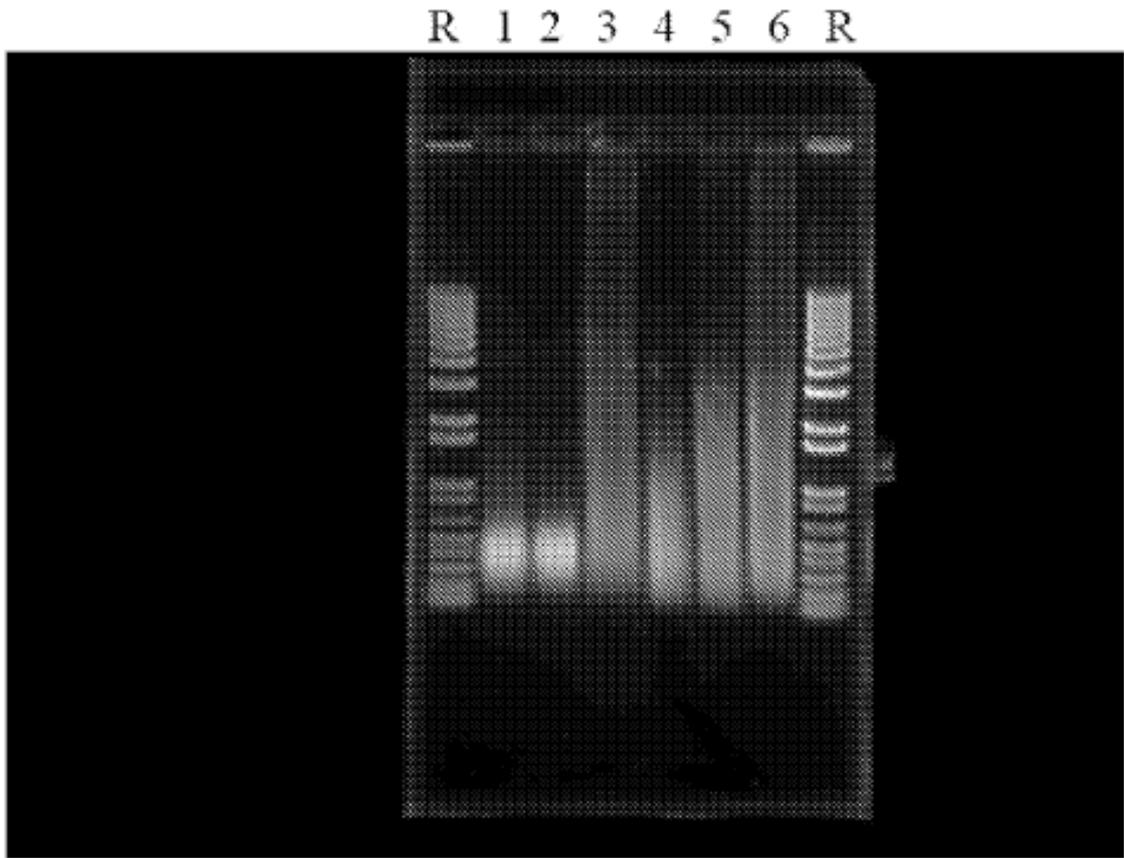


Figura 36



1. TE (Tris-(hidroximetil)aminometano) con EDTA (ácido etilén diamino tetra-acético)
2. Tris-(hidroximetil)aminometano 10 mM
3. Fosfato sódico 500 mM
4. Fosfato sódico 50 mM
5. Citrato sódico 60 mM
6. Cloruro sódico al 3%
- R. Escalera de referencia

Figura 37

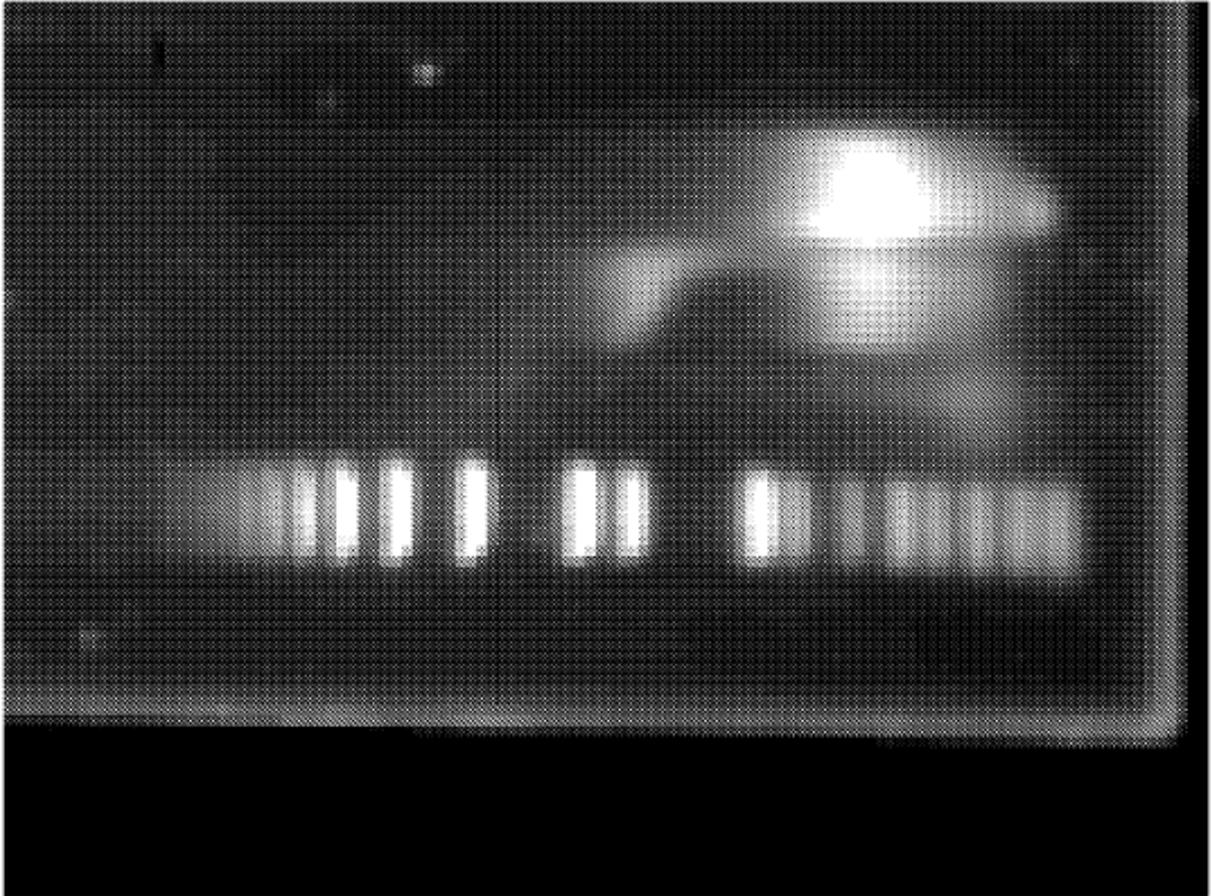


Figura 38