

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 862**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

B01F 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2013 PCT/IB2013/000478**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13111016**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2013 E 13721381 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2807255**

54 Título: **Aislamiento de biomoléculas**

30 Prioridad:
25.01.2012 US 201261590499 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2017

73 Titular/es:
**GENCELL BIOSYSTEMS LIMITED (100.0%)
Ballycummin Avenue Raheen Business Park
Raheen, Limerick, IE**

72 Inventor/es:
**CURRAN, KIERAN y
MCGUIRE, DAVID**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 642 862 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

Aislamiento de biomoléculas

ANTECEDENTES

5 El aislamiento de biomoléculas es una parte crítica de cualquier sistema de procesamiento de muestras. Con el desarrollo de los sistemas de análisis molecular automatizados, la mayor restricción está ahora en la preparación de la muestra y la purificación de la muestra diana.

10 Para todos los procesos bioquímicos, el aislamiento y la purificación de la muestra diana es crítico para su éxito. Las limitaciones en el proceso de análisis bioquímico - piro-secuenciación, ligación de ácidos nucleicos, reacción en cadena de la polimerasa, PCR digital, qPCR, secuenciación de ácidos nucleicos, detección de proteínas / enriquecimiento de proteínas, recubrimiento de perlas genéticas, detección de células raras y enriquecimiento de células - y no se limitan a éstas, son debido a las concentraciones de partida de la diana y el nivel de inhibidores bioquímicos presentes dentro de la muestra de reacción usada en el análisis.

15 Para la mayoría de los análisis bioquímicos se realiza una serie de etapas de pre-análisis en la muestra para aislar la diana de la muestra inicial y eliminar los inhibidores bioquímicos. Estas etapas normalmente son trabajosas y, por último lugar, reducen las concentraciones de partida de la diana.

20 El método actual preferido de purificación de muestra hace uso de columnas de centrifugación. Sin embargo, las columnas de centrifugación requieren varias etapas de centrifugación y de ahí que no puedan ser integradas con una plataforma de preparación de genotecas de ADN automatizada. Similarmente, una técnica de purificación para la purificación de fragmentos de ácido nucleico a partir de geles de agarosa también requiere etapas de centrifugación para lograr el aislamiento de ácidos nucleicos.

Una técnica usada para la purificación de muestras es la purificación basada en perlas paramagnéticas. Este método ofrece un enfoque que puede proporcionar tasas de recuperación de ADN mejoradas y condiciones de tampón ajustables que pueden usarse para unir selectivamente tamaños de fragmentos de ADN específicos.

25 La purificación basada en perlas paramagnéticas es un proceso discontinuo en pocillos estáticos. El método actual implica pipetear la mezcla de perlas - perlas paramagnéticas y un tampón - en un pocillo de una placa de microtitulación junto con la muestra inicial. La disolución se pipetea, se mezcla y se incuba a temperatura ambiente para permitir que el ADN se una a las perlas. La placa de microtitulación se pone entonces sobre una placa magnética. Las perlas que mantienen el ADN unido se mueven hacia el borde de la placa y son mantenidas por el imán. A continuación, el sobrenadante (que contiene residuo) se elimina usando una pipeta y se desecha. Tras esto se realizan entonces varias etapas de lavado para eliminar el residuo residual presente sobre / en el sedimento de perlas. El etanol es pipeteado a la placa que contiene el sedimento de perlas, se incuba y luego se elimina usando una pipeta. Esta etapa de lavado se repite dos veces. Entonces se añade un tampón de elución. La placa se saca de la placa magnética y el tampón de elución se mezcla mediante mezcla con pipeta. La placa de microtitulación se coloca de nuevo sobre la placa magnética. El eluyente que contiene el ADN purificado se extrae entonces usando una pipeta.

El protocolo basado en perlas paramagnéticas es un proceso laborioso y no se automatiza fácilmente debido al gran número de etapas de pipeteado requeridas. Los altos números de etapas de pipeteado también producen grandes volúmenes iniciales y finales de muestra, produciendo altos costes de reactivo por punto de datos.

40 Una aplicación, y no se limita a esta aplicación, es para la purificación de muestras mejorada para las plataformas de secuenciación de nueva generación. Muchas de las plataformas de secuenciación de nueva generación requieren genotecas de ADN constituidas de fragmentos de ADN dentro de un intervalo específico de longitudes de pares de bases. Además, estos fragmentos de ADN necesitan ser marcados con secuencias de nucleótidos específicas (adaptadores) para permitir que las secuencias se amplifiquen usando PCR y para permitir que los fragmentos de genotecas se hibriden con la celda de flujo del secuenciador. También pueden añadirse índices específicos de secuencia a los fragmentos de ADN para identificar muestras individuales cuando se multiplexa la muestra dentro de una única celda de flujo. La tagmentación de ADN (el ADN se fragmenta y marca con adaptadores) y la adición de adaptadores e índices comunes se logran en dos reacciones biológicas separadas. Tras estas reacciones, la genoteca de ADN se limpia para eliminar el exceso de nucleótidos, enzimas, cebadores, sales y otros contaminantes. Por consiguiente, el flujo de trabajo requerido para tagmentar el ADN, purificar el ADN tagmentado, añadir adaptadores e índices comunes y purificar el producto de genoteca final es complejo y laborioso.

50 Los sistemas y métodos brevemente explicados en el presente documento pueden ayudar a lograr la manipulación de muestras que está libre de contaminación, de bajo volumen, alto rendimiento, bajo coste y/o de alta concentración de muestra.

SUMARIO

Dispositivos, sistemas y métodos de uso de perlas paramagnéticas para el aislamiento y procesamiento de biomoléculas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 La FIG. 1 es un diagrama que ilustra el sistema de purificación basado en capilares de flujo continuo.
La FIG. 2 es un diagrama que ilustra el sistema de purificación basado en capilares de flujo bidireccional.
La FIG. 3 es un diagrama que ilustra las etapas de limpieza magnética para el sistema de purificación basado en capilares de flujo continuo.
La FIG. 4 ilustra un método que puede implementarse como programación de controlador.
- 10 La FIG. 5 ilustra un método que puede implementarse como programación de controlador.
La FIG. 6 ilustra un método que puede implementarse como programación de controlador.
La FIG. 7 muestra los resultados de espectrofotometría que demuestran tasas de recuperación comparables entre el protocolo de control y el protocolo de limpieza capilar. La concentración de ADN recuperado / eluido (amplicón de actina-beta) se representa para tanto la purificación basada en perlas de control como la purificación basada en perlas en capilares.
- 15 La FIG. 8 muestra una imagen de gel que muestra las manchas del producto Nextera para la limpieza de control y limpieza en capilares.
La FIG. 9 muestra los resultados de qPCR que muestran el producto Nextera recuperado del protocolo de control y el protocolo de limpieza en capilares.
- 20 La FIG. 10 muestra un resultado de gel que confirma la recuperación del amplicón de 285 pb usando la purificación basada en perlas en un capilar. Comparando productos no purificados (carriles 102, 103) con productos purificados (carriles 104, 105), es evidente que no se eliminaron satisfactoriamente productos específicos tales como el dímero de cebador (el carril 101 es un marcador).
La FIG. 11 muestra un resultado de qPCR del ejemplo de Descontaminación de capilares - reutilización
- 25 La FIG. 12 ilustra un método que puede implementarse como programación de controlador.
La FIG. 13 ilustra un método que puede implementarse como programación de controlador.
La FIG. 14 ilustra un método de enriquecimiento de células con análisis óptico que puede implementarse como programación de controlador.
- 30 La FIG. 15 ilustra un método de enriquecimiento de células que puede implementarse como programación de controlador.
La FIG. 16 ilustra un método de funcionalización de perlas paramagnéticas que puede implementarse como programación de controlador.
La FIG. 17 ilustra un método de limpieza y eliminación de perlas paramagnéticas usadas que pueden implementarse como programación de controlador.
- 35 La FIG. 18 ilustra un método de interacción con tecnología de celdas de líquido compuesto que puede implementarse como programación de controlador.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 La presente divulgación proporciona en algunas realizaciones sistemas y métodos para el aislamiento de biomoléculas dentro de un conducto. El conducto puede tener flujo en cualquier dirección y está controlado por un controlador.

45 En una realización, con referencia a la FIG. 1A, una bala que contiene perlas paramagnéticas y muestra 2 y tampón de fluido inmiscible 3 circula dentro de un conducto 1. La muestra puede incluir biomoléculas diana, inhibidores de procesos bioquímicos y contaminantes. El conducto tiene, en una localización a lo largo de la longitud, una fuente para generar un campo magnético 4. Con referencia a la FIG. 1B, las perlas paramagnéticas y la bala de muestra 2 y la bala de tampón de elución 5 se separan por un fluido inmiscible 3. Las perlas paramagnéticas y la bala de muestra 2 llegan a la fuente de campo magnético 4 con lo que las perlas son capturadas dentro del campo magnético. Con referencia a la FIG. 1C, las perlas paramagnéticas y la bala de muestra 2 continúan circulando dentro del conducto 1

mientras que las perlas paramagnéticas con biomoléculas diana unidas 6 siguen capturadas por la fuente de campo magnético. Con referencia a la FIG. 1D, el tampón de elución 5 llega a la fuente de campo magnético y envuelve las perlas paramagnéticas capturadas. Las biomoléculas diana unidas son liberadas en el tampón de elución a medida que circula a lo largo del conducto 1. Con referencia a la FIG. 1E, el tampón de elución y las biomoléculas diana 7 continúan dentro del conducto 1 para dispensación o análisis adicional.

En una realización, con referencia a la FIG. 2A, tras la desunión de las biomoléculas diana en el tampón de elución 24 de las perlas paramagnéticas 23 en la fuente de campo magnético 22, en el conducto 20 se invierte el flujo. Con referencia a la FIG. 2C, el tampón de elución y las biomoléculas diana vuelven en el flujo sobre las perlas paramagnéticas capturadas 23 por la fuente de campo magnético 22 para volver a la localización de aspiración original para la dispensación.

En una realización, con referencia a la FIG. 3A, tras la desunión de las biomoléculas diana en el tampón de elución 36 de las perlas paramagnéticas 35 capturadas por la fuente de campo magnético 34 en el conducto 31, el fluido inmisible 33 va seguido de una bala de eliminación y limpieza de perlas 32. Con referencia a la FIG. 3B, como la bala de eliminación y limpieza de perlas 32 envuelve las perlas paramagnéticas 35, se elimina la fuente de campo magnético 34 (físicamente o se cambia a un estado apagado). Con referencia a la FIG. 3C, las perlas paramagnéticas 35 son respondidas en la bala de eliminación y limpieza 32 y continúan circulando a lo largo del conducto 31 como la bala 37. Este proceso de eliminación y limpieza de perlas permite la reutilización del conducto 31 y previene cualquier contaminación cruzada de muestras.

En una realización, el método comprende del uso de un tubo capilar, una bomba y un campo magnético localizado en una localización a lo largo de la longitud del tubo capilar. Primero, una bala de una mezcla de perlas, que incluye un tampón y perlas con un recubrimiento bioquímico, y la biomolécula diana es atraída en el tubo capilar. Las perlas pueden ser perlas magnéticas con un recubrimiento bioquímico o perlas no magnéticas (sílice, cerámica, un polímero, etc.) con un recubrimiento paramagnético. Esto va seguido de una bala de fluido inmisible, por ejemplo aire o aceite y luego seguido de balas discretas de etanol, aire, aceite y tampón de elución. Las balas circulan dentro del tubo pasando al campo magnético localizado, donde tras ser atrapadas las perlas paramagnéticas dentro del campo magnético, mientras los otros componentes de la bala de perlas-mezcla continúan circulando a lo largo del tubo, eliminando todas las moléculas no unidas de las perlas paramagnéticas. El flujo de balas continuo trae a continuación una bala de aceite o aire, que se usa como tampón para prevenir la mezcla de la bala de perlas-mezcla con la bala de etanol. La bala de etanol limpia cualquier contaminante restante de las perlas paramagnéticas. Esta etapa de limpieza puede repetirse dependiendo del protocolo de la secuencia de recogida de balas inicial. Después de que la bala de etanol haya pasado, pasa un tampón de aceite antes de la bala de tampón de elución para prevenir que cualquier elemento traza de etanol a lo largo del tubo se mezcle con la bala de tampón de elución. El tampón de elución circula entonces sobre las perlas paramagnéticas, liberando las dianas de biomolécula de las perlas paramagnéticas en la bala de tampón de elución. La bala continúa circulando a lo largo del tubo para procesamiento y análisis biológico adicional.

En una realización, tras el paso de la bala de tampón de elución sobre las perlas paramagnéticas, se invierte la dirección de flujo, y se dispensa el tampón de elución con biomoléculas diana del sistema.

En una realización, tras el paso de la bala de tampón de elución, se elimina el campo magnético y una siguiente bala de etanol devuelve las perlas paramagnéticas al flujo dentro del tubo capilar. Esta bala va seguida entonces de una bala de aceite, una bala de etanol y una bala de aceite para limpiar el tubo capilar y prevenir cualquier contaminación de las siguientes reacciones de bala.

En una realización, las balas de etanol van siempre seguidas de balas de aire; esto ayuda a garantizar la eliminación de cualquier etanol dentro del sistema. La bala de aire permite la evaporación de etanol en el aire.

Ejemplos de biomoléculas incluyen (y no se limitan a) células, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, sangre, saliva y material orgánico.

La mezcla de perlas normalmente está constituida de perlas en una disolución de tampón que incluye polietilenglicol (PEG) y sales.

El tamaño de perla normalmente está dentro del intervalo de 0,1 a 500 micrómetros.

Las perlas son magnéticas o tienen un recubrimiento magnético aplicado.

El material de perla puede ser un polímero, cerámica o metal con un recubrimiento magnético aplicado.

En una realización, las perlas están funcionalizadas para la unión a células.

En una realización, las perlas están funcionalizadas para la unión a ácido nucleico.

En una realización, las perlas están funcionalizadas para o limitadas a la unión de enzimas, reactivos, cebadores o material orgánico.

Los aceites usados para generar fases inmiscibles pueden incluir y no se limitan a aceite de silicona, aceite de perfluorocarbono y aceite de perfluoropoliéter.

Los tampones de elución pueden incluir y no estar limitados a agua estéril; agua estéril con tampones de pH añadidos para mantener un pH dentro de un intervalo deseado dependiendo de las aplicaciones.

5 El conducto puede ser un tubo capilar.

El material del conducto puede ser un polímero, cerámica o metal.

El conducto puede tener una superficie hidrófoba.

El conducto puede ser un tubo capilar de polímero, tal como un tubo capilar de material de PTFE.

El diámetro del conducto normalmente está dentro de un intervalo de 10 micrómetros a 10 milímetros de diámetro.

10 En una realización, el conducto tiene un espesor de pared de al menos 10 micrómetros o más.

La forma interna del conducto puede ser (y no está necesariamente limitada a) un perfil que es redondo, cuadrado, ovalado, rectangular, tener una superficie ondulada, tener al menos una superficie plana, o tener características de potenciamiento de la superficie.

El caudal dentro del conducto normalmente está dentro del intervalo de 0,00001 µl/hora a 1000 ml/min.

15 La forma externa del conducto puede ser (y no está necesariamente limitada a) un perfil que es redondo, cuadrado, ovalado, rectangular, tener una superficie ondulada, tener al menos una superficie plana, o tener características de potenciamiento de la superficie.

En una realización, el conducto es un canal grabado sobre un sustrato.

En una realización, el conducto es un canal moldeado sobre un chip.

20 En una realización, el conducto está integrado en un sistema de análisis basado en chip.

Al menos uno o más campos magnéticos están localizados a lo largo de la longitud del conducto. El campo magnético puede ser generado por un imán permanente o por algún método electromagnético.

En una realización, los campos magnéticos son controlables, pueden ser desactivados por cualquier movimiento / eliminación del imán o la desenergización / neutralización del campo electromagnético.

25 En una realización, las fuentes de campo magnético están dispuestas circunferencialmente alrededor del conducto que genera múltiples polos.

En una realización, las fuentes de campo magnético están dispuestas a lo largo de la longitud del conducto para generar múltiples polos.

En una realización, el flujo a través del sistema se genera por presión positiva.

30 En una realización, el flujo a través del sistema se genera por presión negativa.

En una realización, el método comprende el uso de un tubo capilar, una bomba y un campo magnético localizado en una localización a lo largo de la longitud del tubo capilar. Primero, una bala de una mezcla de perlas (tampón y perlas con un recubrimiento bioquímico) es atraída en el tubo capilar. Esto va seguido de una bala de fluido inmiscible, por ejemplo aire o aceite y luego seguido de una bala de la muestra para la purificación. Después de

35 esto, llega una bala inmiscible adicional y balas discretas adicionales de etanol, aire, aceite y tampón de elución. Las balas circulan dentro del tubo pasando por el campo magnético localizado, con lo cual las perlas paramagnéticas son atrapadas dentro del campo magnético, mientras que los otros componentes de la bala de perlas-mezcla continúan circulando a lo largo del tubo. El caudal y campo magnético están controlados para garantizar que se dejen tiempos de residencia suficientes para que el proceso bioquímico sea realizado. Los fluidos que circulan

40 continúan a lo largo del conducto, uniendo productos a las perlas y eliminando todas las moléculas no unidas de las perlas paramagnéticas. El flujo continuo de balas lleva balas de aceite o aire, que se usan como tampón para prevenir la mezcla de las balas basadas en agua, por ejemplo y sin limitación, mezcla de perlas, balas de etanol y de tampón de dilución. La bala de etanol limpia cualquier contaminante restante de las perlas paramagnéticas. Esta etapa de limpieza puede repetirse dependiendo del protocolo de la secuencia de recogida de balas inicial. Después

45 de que la bala de etanol haya pasado, pasa un tampón de aceite antes de la bala de tampón de elución para prevenir que cualquier elemento traza de etanol a lo largo del tubo se mezcle con la bala de tampón de elución. El tampón de elución circula entonces sobre las perlas paramagnéticas liberando las dianas de biomolécula de las perlas paramagnéticas en la bala de tampón de elución. La bala continúa circulando a lo largo del tubo para procesamiento y análisis biológicos adicionales.

Las balas atraídas en el sistema pueden incluir y no se limitan a las siguientes; mezcla de perlas; aceite; tampón de elución; etanol; agua; aire; muestra; mezcla bioquímica (reactivos, enzimas, etc.), mezcla de funcionalización de perlas; glucosa; tampón; aditivos; marcadores ópticos; marcadores fluorescentes; y células.

Las secuencias de balas usadas dentro del dispositivo incluyen y no se limitan a las siguientes:

- 5 Mezcla de perlas y muestra - aceite - tampón de elución.
 Mezcla de perlas y muestra - aceite - tampón de elución.
 Mezcla de perlas y muestra - aire - aceite - tampón de elución.
 Mezcla de perlas y muestra- aire - etanol - aceite - tampón de elución.
 Mezcla de perlas y muestra- aceite - etanol - aceite - tampón de elución.
- 10 Mezcla de perlas y muestra - aire - etanol - aire - etanol - aire - aceite - tampón de elución.
 Mezcla de perlas y muestra - aceite - etanol - aceite - etanol - aire - aceite - tampón de elución.
 Mezcla de perlas y muestra - aceite - etanol - aceite - etanol - aire - aceite - mezcla bioquímica - aceite - tampón de elución.
- 15 Mezcla de perlas - aceite - muestra - aceite - etanol - aire - aceite - mezcla bioquímica - aceite - tampón de elución.
 Mezcla de perlas - aceite - mezcla de funcionalización de perlas - aceite - tampón de suspensión
 Mezcla de perlas - aceite - mezcla de funcionalización de perlas - aceite - muestra - aceite - etanol - aire - aceite - mezcla bioquímica - aceite - tampón de elución.
- 20 Estas secuencias y otras pueden incluir una etapa adicional (es decir, paso de bala) para la eliminación de las perlas del sistema. Esta etapa puede realizarse con un controlador y una perturbación en el campo magnético a lo largo del tubo.
 En una realización se usa detección óptica en la fuente de campo magnético.
 En una realización se usa detección óptica aguas arriba de la fuente de campo magnético para el análisis de balas.
 En una realización se usa detección óptica aguas abajo de la fuente de campo magnético para el análisis de balas.
- 25 En una realización se usan múltiples líneas paralelas de tubos capilares pasado un único campo magnético.
 En una realización se usan múltiples líneas paralelas de tubos capilares pasados varios campos magnéticos localizados.
 En una realización se ensamblan juntas al menos una o más líneas de conductos en un casete para la integración en un sistema con una bomba y controlador.
- 30 En una realización se dispensa el tampón de elución con las moléculas diana en una celda de líquido compuesto para procesamiento y análisis bioquímico adicional.
 En una realización se usan tubos capilares desechables. Estos tubos son sustituidos para cada proceso de muestra.
 En una realización, el conducto es reutilizable.
- 35 En una realización, donde el conducto es reutilizable, se usa vapor dentro del sistema para descontaminar y limpiar el sistema.
 En una realización, donde el conducto es reutilizable, se usa blanqueador dentro del sistema para descontaminar y limpiar el sistema.
 En una realización, donde el conducto es reutilizable, se usan enzimas de digestión de ADN comerciales dentro del sistema para descontaminar y limpiar el sistema.
- 40 Algunas realizaciones engloban un sistema de manipulación de muestras que tiene una perla paramagnética y entrada de fluido de muestra, una entrada de fluido inmisible, una entrada de tampón de elución, un conducto de fluido, una fuente de campo magnético, un sistema de manipulación de líquidos y un controlador operativamente conectado al sistema de manipulación de líquidos y fuente de campo magnético. En algunas realizaciones, el controlador puede ser programado para: (1) atraer una bala de perlas paramagnéticas y muestra (a) pasada una fuente de campo magnético, (b) donde las perlas paramagnéticas y biomoléculas diana unidas son capturadas (c) y
- 45

5 los contenidos de muestra restante continúan circulando dentro de la bala pasada la fuente de campo magnético; (2) atraer una bala de fluido inmiscible; (3) atraer una bala de tampón de elución, (a) pasar un fuente de campo magnético, (d) donde las biomoléculas diana unidas son liberadas en el tampón de elución de las perlas paramagnéticas en el campo magnético (e) y la bala continúa circulando dentro del conducto para dispensar o para análisis adicional. Diagramas de flujo a modo de ejemplo se muestran en las FIGS. 4-6, 12-18.

10 En algunas realizaciones, el sistema de manipulación de líquidos comprende un conducto y driver. En algunas realizaciones, el controlador puede ser programado para accionar el driver para hacer que el conducto lleve a cabo las etapas (1) y (2), entonces atraer una bala para el protocolo de limpieza, que es generalmente una bala de etanol, y entonces llevar a cabo las etapas (3) y (4) (FIG. 5). En algunas realizaciones, el controlador también puede ser programado para accionar el driver para hacer que el conducto después de la etapa (5) y antes de la etapa (3), (6) atraiga una bala de reactivos bioquímicos (FIG. 6).

15 En algunas realizaciones, la fuente de campo magnético comprende un imán fijo. En algunas realizaciones, el controlador puede ser programado para accionar el driver para hacer que el conducto lleve a cabo las etapas (1), (2), (3) y (4) y atraiga (a) la bala pasada la fuente de campo magnético (FIG. 12). En algunas realizaciones, el controlador puede ser programado para accionar el driver para hacer que el conducto lleve a cabo las etapas (1), (2), (5), (6), (3), y (4) mientras que realiza la operación (a) (FIG. 13).

20 En algunas realizaciones, el controlador puede ser programado para accionar el driver para hacer que el conducto (7) atraiga una bala de perlas paramagnéticas, y (8) atraiga una bala de anticuerpos y (9) atraiga una bala de muestra biológica y entonces la etapa (3), mientras que realiza las operaciones (a) y (f) de detección óptica en la fuente de campo magnético, seguido de la etapa (4) (FIG. 14). En algunas realizaciones, el controlador puede no realizar la operación (f) (FIG. 15).

En algunas realizaciones, la fuente de campo magnético comprende una fuente de campo magnético de estado variable.

25 En algunas realizaciones, el controlador puede ser programado para accionar el driver para hacer que el conducto (10) atraiga una bala de perlas paramagnéticas y entonces (11) atraiga una bala de mezcla de funcionalización de perlas paramagnéticas mientras que realiza la operación (a), luego (12) atraiga la bala de tampón de perlas paramagnéticas y para que el controlador cambie el estado de la fuente de campo magnético para realizar (f) la circulación de las balas pasada la fuente de campo magnético en el estado apagado antes de (13) dispensar un volumen de perlas paramagnéticas funcionalizadas en un tampón (FIG. 16).

30 En algunas realizaciones, el controlador se programa además para la siguiente etapa (4), (5) y (6), mientras que se realiza (a), para (12) atraer una bala de tampón de perlas paramagnéticas y cambiar la fuente de campo magnético para realizar (f) seguido de las etapas (5) y luego (6) antes de (14) dispensar un volumen de perlas paramagnéticas usadas en una disolución de tampón (FIG. 17).

35 En algunas realizaciones, el controlador se programa además para (15) atraer líquido de encapsulación de la entrada de líquido de encapsulación y (16) descargar el líquido de encapsulación atraído sobre una superficie libre de un líquido portador y aproximar a una característica de estabilización antes de la etapa (4). En algunas realizaciones, el controlador puede ser programado para llevar a cabo la etapa (13) o etapa (14) en lugar de la etapa (4).

40 La purificación basada en perlas en capilares ofrece varias ventajas en comparación con el protocolo estándar. El modo automatizado de limpieza elimina el tiempo de manipulación, reduciendo significativamente el tiempo de protocolo total. Se cree que el enfoque también puede mejorar la repetibilidad de las etapas de purificación de ADN. El enfoque de capilares microfluidicos permite la limpieza de volúmenes de nanolitros sin las significativas pérdidas de volumen asociadas a pipetear pequeños volúmenes. Esto permite el procesamiento de volúmenes de muestra extremadamente pequeños y reduce el consumo de reactivos. Otro factor crítico en los protocolos de purificación estándar es la variabilidad inducida por el usuario. Los presentes sistemas y métodos eliminan esta variabilidad del protocolo de purificación.

Aplicaciones

Limpieza en capilares y procesamiento de celdas de líquido compuesto

50 En una realización, el tampón de elución con las biomoléculas diana se dispensa en una celda de fluido inmiscible dispuesta sobre una superficie libre de un fluido portador mutuamente inmiscible. La celda de fluido compuesto resultante puede ser transportada, y/o incorporada, y/o mezclada, y/o puede realizarse en ella procesamiento bioquímico.

55 En una realización, el tampón de elución con las biomoléculas diana se dispensa en una celda de fluido inmiscible dispuesta en una superficie libre de un fluido portador mutuamente inmiscible con una característica de estabilización mecánica.

En una realización, las secuencias de fluidos atraídas al conducto generan una celda de líquido compuesto tras la dispensación sobre una superficie libre de un fluido portador mutuamente inmiscible, desde el conducto.

En una realización, las perlas paramagnéticas se dispensan siguiendo un protocolo de limpieza de conductos en una celda de líquido compuesto para la re-funcionalización de la superficie.

- 5 En una realización, el fluido atraído en el conducto para procesamiento es una celda de líquido compuesto.

En una realización, la celda de líquido compuesto atraída en el sistema tiene perlas paramagnéticas y tampón.

En una realización, la celda de líquido compuesto atraída en el sistema contiene la muestra inicial.

En una realización, la celda de líquido compuesto atraída en el sistema contiene el tampón de elución para liberar las biomoléculas diana.

- 10 En una realización, la celda de líquido compuesto atraída en el sistema contiene una mezcla bioquímica para procesar las perlas paramagnéticas en la fuente de campo magnético en el conducto.

En una realización, la tecnología de celda de líquido compuesto se usa para incorporar las perlas paramagnéticas y la muestra inicial. La tecnología de líquido compuesto previene la contaminación y permite la facilidad de procesamiento y/o incubación; y/o almacenamiento; y/o transporte; y/o mezcla de la muestra antes de la purificación.

- 15 En una realización, se generan múltiples celdas de fluido compuesto en paralelo.

Ejemplos de sistemas de celdas de líquido compuesto a los que pueden adaptarse los presentes sistemas y métodos se desvelan, por ejemplo, en el documento WO/2012/011091.

- 20 Algunos métodos de manipulación de un líquido de muestra que contiene partículas magnéticas y un líquido de encapsulación inmiscible incluyen: hacer circular el líquido de encapsulación en un conducto; hacer circular el líquido de muestra en el conducto de manera que el líquido de muestra (a) sea rodeado por el líquido de encapsulación y (b) esté localizado en un sitio de atrapamiento predeterminado dentro del conducto; inmovilizar las partículas magnéticas en el sitio de atrapamiento aplicando un campo magnético en el sitio de atrapamiento; y hacer circular un líquido de elución en el conducto de manera que (a) el líquido de elución sea rodeado por el líquido de encapsulación, (b) el líquido de muestra circule lejos del sitio de atrapamiento, y (c) el líquido de elución circule al sitio de atrapamiento y rodee las partículas magnéticas inmovilizadas. Las moléculas diana pueden unirse a las partículas magnéticas. La unión puede producirse en el líquido de muestra antes de la circulación del líquido de muestra, o en otros puntos en el proceso o en otro medio líquido. Las moléculas diana, por ejemplo, biomoléculas, también pueden ser liberadas (no unidas) de las partículas magnéticas rodeando las partículas con el líquido de elución. Las partículas pueden o pueden no ser movilizadas durante el proceso. Por ejemplo, las partículas pueden ser movilizadas cuando el líquido de muestra está en el sitio de atrapamiento, cuando el líquido de elución está en el sitio de atrapamiento, o cuando otro fluido está en el sitio de atrapamiento. El método también puede incluir movilizar las partículas magnéticas en el líquido de elución, y hacer circular el líquido de elución lejos del sitio de atrapamiento junto con las partículas magnéticas y/o moléculas diana liberadas. El líquido de elución también puede hacerse circular lejos del sitio de atrapamiento con las moléculas diana, mientras que las partículas magnéticas siguen inmovilizadas.
- 25
- 30
- 35

- Los métodos también pueden incluir hacer circular uno o más fluidos de limpieza en el conducto al sitio de atrapamiento de manera que (a) el fluido de limpieza sea rodeado por el líquido de encapsulación, y (b) el fluido de limpieza rodee las partículas magnéticas inmovilizadas. Las partículas magnéticas pueden ser movilizadas en el fluido de limpieza mientras que el fluido de limpieza está en el sitio de atrapamiento. El fluido de limpieza también puede hacerse circular en el conducto lejos del sitio de atrapamiento. Si están movilizadas, las partículas magnéticas pueden ser llevadas junto con el fluido de limpieza. Alternativamente, las partículas magnéticas pueden ser movilizadas en el fluido de limpieza en el sitio de atrapamiento, luego inmovilizadas otra vez. Entonces, el fluido de limpieza puede hacerse circular en el conducto lejos del sitio de atrapamiento mientras que las partículas magnéticas quedan en el sitio de atrapamiento. También puede hacerse circular un segundo fluido de limpieza en el conducto.
- 40

- 45 Algunos métodos de manipulación de un primer líquido de muestra que contiene partículas magnéticas, un segundo líquido de muestra y un líquido de encapsulación, siendo ambos líquidos de muestra inmiscibles con el líquido de encapsulación, incluyen: hacer circular el líquido de encapsulación en un conducto; hacer circular el primer líquido de muestra en el conducto de manera que el primer líquido de muestra (a) sea rodeado por el líquido de encapsulación y (b) esté localizado en un sitio de atrapamiento predeterminado dentro del conducto; inmovilizar las partículas magnéticas en el sitio de atrapamiento aplicando un campo magnético en el sitio de atrapamiento; hacer circular el primer líquido de muestra en el conducto de manera que el primer líquido de muestra se haga circular lejos del sitio de atrapamiento mientras que las partículas magnéticas siguen inmovilizadas en el sitio de atrapamiento; y hacer circular el segundo líquido de muestra en el conducto de manera que el segundo líquido de muestra (a) sea rodeado por el líquido de encapsulación y (b) rodee las partículas magnéticas inmovilizadas.
- 50

El segundo líquido de muestra puede contener moléculas diana, por ejemplo, biomoléculas, que se unen a las partículas magnéticas cuando el segundo líquido de muestra rodea las partículas magnéticas. Las partículas magnéticas pueden o bien seguir inmobilizadas en el segundo líquido de muestra, o pueden ser movilizadas en el segundo líquido de muestra. Los métodos también pueden incluir, después de hacer circular el segundo líquido de muestra, hacer circular un líquido de elución en el conducto de manera que (a) el líquido de elución sea rodeado por el líquido de encapsulación, (b) el segundo líquido de muestra se haga circular lejos del sitio de atrapamiento, y (c) el líquido de elución circule al sitio de atrapamiento y rodee las partículas magnéticas inmobilizadas. Hacer circular el líquido de elución puede incluir liberar las biomoléculas diana de las partículas magnéticas rodeando las partículas magnéticas con el líquido de elución. Las partículas magnéticas pueden o bien estar movilizadas en el líquido de elución o seguir inmobilizadas en el líquido de elución.

Los métodos también pueden incluir usar un fluido de limpieza, por ejemplo: después de hacer circular el segundo líquido de muestra, hacer circular un primer líquido de limpieza en el conducto de manera que (a) el primer líquido de limpieza sea rodeado por el líquido de encapsulación, (b) el segundo líquido de muestra se haga circular lejos del sitio de atrapamiento, y (c) el primer líquido de limpieza circule al sitio de atrapamiento y rodee las partículas magnéticas inmobilizadas; y después de hacer circular el primer líquido de limpieza, hacer circular un líquido de elución en el conducto de manera que (a) el líquido de elución sea rodeado por el líquido de encapsulación, (b) el primer líquido de limpieza se haga circular lejos del sitio de atrapamiento, y (c) el líquido de elución circule al sitio de atrapamiento y rodee las partículas magnéticas inmobilizadas.

En cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento, el líquido de muestra y el líquido de encapsulación pueden constituir una celda de líquido compuesto en algún punto durante, o a través de, el método desvelado. Similarmente, en cualquiera de los métodos desvelados, pueden usarse marcadores conjuntamente con las moléculas diana. Tales marcadores pueden detectarse por interrogatorio óptico o fluorescente del sitio de atrapamiento. En cualquiera de estos métodos, el conducto podría ser, por ejemplo, un tubo capilar.

Un sistema de manipulación de líquidos puede incluir un conducto que tiene un sitio de atrapamiento predeterminado, una bomba configurada para aplicar presión positiva, presión negativa, o ninguna presión externa a una localización en el conducto, una fuente de campo magnético configurada para aplicar un campo magnético en el sitio de atrapamiento cuando se activa y sustancialmente ningún campo magnético cuando no se activa, y un controlador operativamente unido a la bomba y la fuente de campo magnético de manera que el controlador pueda activar la bomba y/o la fuente de campo magnético. El controlador puede ser programado para: activar la bomba de manera que un líquido de encapsulación se haga circular en el conducto; activar la bomba de manera que un líquido de muestra se haga circular en el conducto de tal forma que el líquido de muestra (a) sea rodeado por el líquido de encapsulación y (b) esté localizado en el sitio de atrapamiento dentro del conducto, conteniendo el líquido de muestra partículas magnéticas; activar la fuente de campo magnético de manera que las partículas magnéticas se inmobilicen en el sitio de atrapamiento; y activar la bomba de manera que un líquido de elución se haga circular en el conducto de tal forma que (a) el líquido de elución sea rodeado por el líquido de encapsulación, (b) el líquido de muestra se haga circular lejos del sitio de atrapamiento, y (c) el líquido de elución circule al sitio de atrapamiento y rodee las partículas magnéticas. Más generalmente, el controlador puede ser programado para activar la bomba y activar y/o desactivar la fuente de campo magnético, para llevar a cabo cualquiera de los métodos desvelados. El conducto puede ser, por ejemplo, un tubo capilar. La bomba puede configurarse para aplicar presión positiva y/o presión negativa al conducto. Por ejemplo, la bomba puede configurarse para hacer circular un fluido en el conducto en una dirección bajo presión positiva y hacer circular un fluido en el conducto en otra dirección bajo presión negativa.

Secuenciación

Muchas plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS) requieren genotecas de ADN constituidas de fragmentos de ADN dentro de un intervalo específico de longitudes de pares de bases. Además, estos fragmentos de ADN necesitan ser marcados con secuencias de nucleótidos específicas (adaptadores) para permitir que las secuencias se amplifiquen usando PCR y para permitir que los fragmentos de genoteca se hibriden con la celda de flujo del secuenciador. También pueden añadirse índices específicos de secuencia a los fragmentos de ADN para identificar muestras individuales cuando se multiplexa la muestra dentro de una única celda de flujo. La tagmentación de ADN (el ADN se fragmenta y marca con adaptadores) y la adición de adaptadores e índices comunes se logran en dos reacciones biológicas separadas. Tras estas reacciones, la genoteca de ADN se limpia para eliminar el exceso de nucleótidos, enzimas, cebadores, sales y otros contaminantes. Por consiguiente, el flujo de trabajo requerido para tagmentar el ADN, purificar el ADN tagmentado, añadir adaptadores e índices comunes y purificar el producto de genoteca final es complejo y laborioso. En una realización, el sistema de limpieza basado en capilares puede usarse para automatizar las etapas de purificación de muestras y aislamiento de ADN requeridas dentro de la secuenciación genética. Un ejemplo completo de este proceso se desvela a continuación.

Recubrimiento de perlas por secuenciación genética

La preparación de perlas por secuenciación genética es un proceso por el que pequeñas perlas son recubiertas en una química específica de la aplicación. En una realización, el recubrimiento de perlas con antelación al cribado genético se logra haciendo circular una bala de perlas-mezcla, seguido de la química de cebadores específicos

usada para recubrir las perlas dentro del conducto pasado el campo magnético estacionario. Entonces se pasa una bala de tampón de elución, en la que la concentración de perlas puede controlarse por el volumen de tampón de elución usado dentro de la bala. El campo magnético se elimina y la mezcla de perlas funcionalizadas circula a lo largo del conducto para el procesamiento adicional.

- 5 En una realización, el flujo dentro del conducto puede ser invertido y la mezcla de perlas funcionalizadas se dispensa para almacenamiento o procesamiento bioquímico adicional.

Estos métodos proporcionan una forma conveniente de manipulación y combinación de volúmenes inferiores al microlitro que actualmente no es posible lograr usando técnicas convencionales, reduciendo así los volúmenes iniciales de muestra y mejorando la eficiencia del recubrimiento de perlas que reduce el volumen de reacción. El procesamiento adicional usando PCR y ciclado térmico y secuenciación genética es específico de la aplicación.

10 El uso de esta tecnología simplifica enormemente el procedimiento de recogida para estos volúmenes diana relativamente pequeños. El sistema facilita el 100 % de recuperación de volumen, ya que la muestra biológica en procesamiento no causa ninguna pérdida por pipeteado. Estas características hacen más fácil la automatización del proceso bioquímico.

15 Selección de tamaño de ARN pequeños

La secuenciación de moléculas de ARN pequeño se complica por la arrolladora cantidad de productos no específicos de fondo después de la transcripción inversa, cuya longitud es marginalmente más pequeña que la de las moléculas diana pequeñas. Actualmente, las moléculas de ADNc diana pequeñas (transcritas de forma inversa a partir de ARN) son seleccionadas por tamaño cortando la banda de electroforesis en gel deseada. Normalmente, se extrae el ADN de la rebanada de gel, se añade a una reacción de PCR y luego se limpia usando un enfoque basado en columna de centrifugación. El flujo de trabajo es laborioso y la tasa de rendimiento / recuperación de ADN es mala.

20 En una realización, la purificación y la selección de tamaño se logran bombeando los reactivos necesarios en un capilar. Se extraen volúmenes específicos de disolución de ADN-perla, etanol, aire y tampón de elución y se hacen circular dentro de un conducto. Como la disolución de ADN-perla circula a través de un campo magnético, las perlas y el ADN unido se eliminan de la disolución para formar un sedimento en la pared del conducto. El sedimento de perla-ADN se lava a medida que las balas de etanol posteriores circulan pasado el sedimento inmovilizado. Entonces se eluye el ADN de las perlas y en disolución a medida que el tampón de elución circula pasado el sedimento de perlas. Las bombas se invierten y se recupera el eluyente que contiene ADN purificado para las etapas posteriores del flujo de trabajo de preparación de genotecas de NGS.

25 En una realización, se mezclan perlas paramagnéticas con producto de ADNc. Usando las propiedades de selección de tamaño de las perlas magnéticas seleccionando condiciones de tampón específicas (pueden unirse diferentes tamaños de ADN usando diferentes condiciones de tampón), las moléculas de ADNc pequeño pueden ser unidas exclusivamente a las perlas, mientras que las moléculas restantes quedan en disolución y se entregan a residuos. Las moléculas diana pequeñas se eluyeron entonces a medida que el tampón de elución pasó el sedimento de perlas fijas.

30 En una realización, el proceso de selección de tamaño se realiza sin balas de etanol.

Selección de tamaño de genotecas de ADN para la secuenciación de NGS

35 Cada uno de los siguientes secuenciadores de nueva generación tiene una longitud de lectura óptima (pares de bases). Durante la construcción de genotecas, el ADN se fragmenta en moléculas de ADN con un amplio intervalo de longitudes de pares de bases. La selección de tamaño se realiza actualmente usando perlas paramagnéticas sobre una placa de microtitulación y es laborioso y padece ineficiencias de errores de pipeteado y variaciones del protocolo de usuario. El sistema de conductos basados en capilares puede usarse para la selección de tamaño de genotecas de ADN.

40 Purificación de ácidos nucleicos

El sistema de conductos basados en capilares puede usarse para la purificación y/o aislamiento de muestras antes y/o después de la PCR. Las perlas paramagnéticas se usan como sitios para la purificación y/o aislamiento del ácido nucleico.

45 Pueden usarse perlas paramagnéticas para eliminar el exceso de trifosfatos de desoxinucleótido no incorporados, sales y enzimas después de la PCR. Se requiere la eficiente eliminación de estos contaminantes para garantizar el éxito en aplicaciones aguas abajo tales como genotipificación, secuenciación de Sanger y de nueva generación. La purificación basada en perlas ofrece alta tasa de recuperación de amplicones, eficiente eliminación de contaminantes y flexibilidad en la limpieza. Ejemplos de algunos de los posibles métodos de realización se dan a continuación.

Enriquecimiento de proteínas

También puede realizarse enriquecimiento de proteínas usando el sistema de conductos basados en capilares. Las perlas paramagnéticas se usan como sitios para enriquecer las proteínas diana.

5 Las perlas se recubren con un medio con una alta afinidad por los anticuerpos. Se añaden anticuerpos específicos para una proteína diana a las perlas, acoplándose a los sitios de unión localizados sobre la superficie de la perla. Entonces se añaden muestras biológicas que contienen proteínas diana, uniéndose a los anticuerpos. La aplicación de un campo magnético permite la separación y el aislamiento de la muestra biológica que contiene moléculas de fondo. Desechar el sobrenadante y añadir un tampón de elución proporciona proteína diana purificada. Puede lograrse el enfoque de enriquecimiento de proteínas basado en perlas usando el sistema basado en capilares, que
10 permite el enriquecimiento de proteínas en un modo automatizado de alto rendimiento.

Estructuras de ácido nucleico sintético construidas:

Pueden usarse perlas paramagnéticas en sistemas similares a los brevemente explicados aquí para ayudar en el ensamblaje de estructuras de ácido nucleico (oligonucleótidos).

15 Perlas magnéticas proporcionan grandes relaciones de superficie con respecto a volumen importantes en la exposición de química unida relevante. La síntesis de oligonucleótidos se lleva a cabo por una adición escalonada de restos de nucleótidos al extremo 5' de la cadena en crecimiento hasta que se ensambla la secuencia deseada. Las etapas incluyen desbloqueo (detrilación) donde los grupos funcionales se eliminan por una disolución de ácido antes del acoplamiento. El acoplamiento introduce y une fosforamido de nucleósido para formar la siguiente base. La terminación asegura entonces prevenir la elongación de cadena adicional. Esto se realiza normalmente tratando
20 los soportes sólidos con anhídrido acético y 1-metilimidazol. Entonces se realiza la oxidación para aumentar la estabilidad.

Enriquecimiento / aislamiento de células

25 Pueden usarse perlas paramagnéticas para aislar y enriquecer células diana de una muestra biológica. Este enfoque enriquece células directamente de la muestra biológica sin usar columnas, asegurando la alta viabilidad celular y rendimiento. Esto es particularmente importante en aplicaciones tales como el análisis de células tumorales en enfermedad residual mínima donde las células diana son extremadamente raras.

30 El enriquecimiento se logra añadiendo perlas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos contra marcadores celulares específicos a una muestra biológica. Las células diana se unen a las perlas y se separan usando un imán. Entonces se desecha el sobrenadante que contiene las células de fondo. Las células diana pueden entonces recuperarse para análisis. Este enfoque de aislamiento y enriquecimiento de células basado en perlas paramagnéticas puede implementarse en un sistema basado en capilares, que permite el enriquecimiento de células automatizado y la integración con otras tecnologías microfluídicas para el análisis aguas abajo.

EJEMPLOS

35 Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones particulares, pero no deben considerarse como limitantes del alcance de la materia desvelada.

Purificación y recuperación de un amplicón de 285 pb

Este ejemplo presenta datos del sistema de purificación de ácidos nucleicos basado en capilares de GenCell Biosystems. Este experimento se realizó para demostrar que el sistema de purificación en capilares era capaz de purificar y recuperar producto de PCR.

40 Se usaron cebadores directos e inversos que se dirigen a un fragmento de 285 pb en el gen de beta-actina para amplificar el producto previsto usando PCR. Este producto se usó entonces para evaluar el rendimiento del instrumento de purificación de perlas paramagnéticas basado en capilares. Se pipetearon 18 µl de mezcla de perlas-tampón (AMPure Xp, Agencourt) a 10 µl de producto de PCR en un tubo de PCR. La concentración de 1,8× de perlas-mezcla garantiza que se recuperen fragmentos superiores a 100 pb. Se mezcló con pipeta la mezcla de perlas-ADN y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir que el ADN se uniera a las perlas, como se recomendó por el protocolo AMPure Xp. Se aspiró la disolución de perlas-ADN de 28 µl en un tubo capilar de PTFE (400 micrómetros de diámetro interno), seguido de dos balas de 5 µl de etanol al 70 %, una bala de 10 µl de aire, 2,5 µl de aceite de polidimetilsiloxano y 10 µl de tampón de elución (agua libre de nucleasa). La secuencia de mezcla de ADN-perlas, balas de etanol, aire, aceite y tampón de elución se bombearon a un caudal constante de
45 10 µl/min usando una bomba de jeringa (PHD 2000, Harvard Apparatus). La secuencia descrita de reactivos imitó las etapas de purificación especificadas por el protocolo de AMPure Xp. Se retiraron las perlas y el ADN diana unido de la disolución de perlas-ADN a la pared del capilar a medida que la disolución pasó un imán. Las balas de etanol pasaron sobre el sedimento de ADN-perlas ahora fijo, lavando el sedimento y eliminando los contaminantes residuales. Entonces se administraron las balas de aire y aceite pasado el sedimento, eliminando el etanol residual.
50 En la etapa final del proceso de purificación, la bala de tampón de elución eluyó el ADN diana de las perlas y en

disolución a medida que pasó por el sedimento de perlas. Se invirtió la bomba y el eluyente se recuperó en un tubo de PCR estéril para análisis. Este experimento se realizó por duplicado. Los eluyentes se analizaron entonces usando electroforesis en gel.

- 5 Puede observarse un resultado de electroforesis en gel que compara las dos muestras de eluyente con el producto de beta-actina de 285 pb no purificado en la FIG 10. Observando la FIG. 10, es evidente que la técnica de purificación capilar descrita recuperó satisfactoriamente los 385 pb. Comparando las bandas de eluyente con las bandas de producto de PCR no limpiadas es evidente que el procedimiento de purificación no eliminó productos específicos tales como el dímero de cebador.

Tasas de recuperación de ADN: Comparación con protocolos de aislamiento de ADN convencionales

- 10 Este ejemplo presenta datos del sistema de purificación de ácidos nucleicos en capilares de GenCell Biosystems, comparando las tasas de recuperación entre el protocolo de purificación basado en perlas convencional y el protocolo de purificación basado en perlas en capilares. Estos experimentos se usaron para evaluar el rendimiento del enfoque de purificación basado en perlas en capilares.

- 15 Se usó el amplicón de beta-actina de 285 pb como el molde de ADN para la purificación. El amplicón se purificó y se recuperó siguiendo el protocolo de purificación basado en perlas en capilares brevemente expuesto anteriormente en el ejemplo Purificación y recuperación de un amplicón de 285 pb. Este experimento se realizó por cuadruplicado y las muestras de eluyente se almacenaron para el análisis.

- 20 En un experimento separado, se limpiaron 10 µl de la disolución de molde que contenía el amplicón de 285 pb siguiendo el protocolo de AMPure Xp. Se pipetearon 18 µl de la mezcla de perlas AMPure Xp a un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía 10 µl de la disolución de molde. Se mezcló con pipeta la mezcla de ADN-perlas y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La placa de microtitulación se dispuso en una placa magnética para separar las perlas que contenían ADN unido de la disolución. El sobrenadante se aspiró usando una pipeta y se desechó. Se añadieron 200 µl de etanol al 70 % al sedimento de perlas y se incubó durante 30 segundos a temperatura ambiente. Entonces se aspiró el etanol usando una pipeta y se desechó. Esto se repitió para un total de dos lavados. Tras la etapa de lavado final, el sedimento se dejó secar para garantizar que se eliminaron todas las trazas de etanol. Se añadieron 10 µl de tampón de elución (agua libre de nucleasa) al pocillo y se pipetearon al sedimento de perlas de la placa magnética, eluyendo el ADN de las perlas y en disolución. La placa de microtitulación se dispuso sobre la placa magnética y el eluyente se transfirió a una nueva placa. Este experimento se realizó por triplicado y las muestras se almacenaron para el análisis.

- 30 Los eluyentes recuperados del protocolo de limpieza convencional y los enfoques de limpieza en capilares se cuantificaron usando mediciones de espectrofotometría UV-vis (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Los resultados de cuantificación por espectrofotometría UV-vis pueden observarse en la FIG. 7. Los resultados de cuantificación mostrados en la FIG. 7 demuestran que las tasas de recuperación de limpieza en capilares son idénticas a las logradas usando el protocolo convencional. Este resultado confirma que la tasa de recuperación de ADN es igual a la lograda usando el protocolo de AMPure Xp convencional. El enfoque de purificación de ADN en capilares brevemente expuesto aquí ofrece purificación altamente automatizada sin una compensación en el rendimiento.

Preparación de genotecas de ADN

- 40 Este ejemplo ilustra cómo la purificación basada en perlas en capilares puede incorporarse en un protocolo de preparación de genotecas de ADN para secuenciación de nueva generación. Los datos presentados aquí demuestran que las etapas de purificación actualmente realizadas después de diversos procesos biológicos dentro de un protocolo de preparación de genotecas de ADN pueden sustituirse usando el enfoque de limpieza en capilares, que ofrece un enfoque de alto rendimiento automatizado a la preparación de genotecas de ADN para secuenciadores de nueva generación.

- 45 En este ejemplo, se implementó la limpieza en capilares en vez de las etapas de limpieza actualmente usadas en el kit de preparación de muestras Nextera (Illumina). Se preparó una reacción de tagmentación de 9 µl. Esta reacción contuvo ADN genómico de control, tampón molecular de alto peso, mezcla de enzimas Nextera y agua libre de nucleasa. En esta reacción, el ADN se fragmenta y se marca con adaptadores. La reacción de tagmentación se preparó e incubó a 55 °C durante 5 minutos. Tras la tagmentación, la muestra se purificó usando el sistema de purificación basado en perlas en capilares en lugar del kit Zymo DNA Clean and Concentrator (Zymo Research) recomendado. Se añadieron 9 µl de producto tagmentado a 16,2 µl de disolución de perlas AMPure Xp, se mezcló con pipeta y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Entonces se aspiró la disolución de ADN-perlas en un capilar de PTFE (400 micrómetros de diámetro interno). El capilar se cargó entonces con 2,5 µl de aire, una bala de 10 µl de tampón de unión de ADN, una bala de 2,5 µl de aire, dos balas de 5 µl de etanol, se separó por una bala de 2,5 µl de aire, una bala de 10 µl de aire, una bala de 2,5 µl de aceite y una bala de 15 µl de tampón eluyente (agua libre de nucleasa). Se bombeó el tren de las balas de reactivo a 10 µl/min usando una bomba de jeringa (PHD2000, Harvard). Se retiraron las perlas y el ADN diana unido de la disolución de perlas-ADN a la pared del capilar a medida que la disolución pasó un imán. Entonces, el tampón de unión de ADN (Zymo Clean and Concentrator Kit, Zymo Research) pasó el sedimento de perlas inmovilizado, disociando la enzima transposasa del

ADN diana fragmentado - un inhibidor de PCR conocido. Tras esto, las etapas de lavado en etanol pasaron el sedimento de perlas-ADN, eliminando los contaminantes residuales. Entonces, las balas de aire y de aceite pasaron el sedimento, eliminando el etanol residual. Finalmente, se eluyó el ADN tagmentado de las perlas a medida que el tampón de elución pasó el sedimento. Se invirtió la bomba y se recuperó el tampón de elución para las posteriores etapas del protocolo de preparación de genotecas Nextera.

Se añadieron 11 µl de la elución a una reacción de PCR (25 µl de volumen final). Entonces se realizó PCR de ciclos limitados usando un GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), según las condiciones de ciclado térmico especificadas por el protocolo Nextera. La reacción de PCR se calentó a 72 °C durante 3 minutos, 95 °C durante 30 segundos, seguido de 9 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 62 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 3 minutos. Durante la etapa de PCR, se añaden sitios compatibles de PCR en puente e índices específicos a los extremos del ADN tagmentado. Tras la etapa de PCR de ciclos limitados, se purificó el producto de genotecas de ADN usando la limpieza basada en perlas en capilar en lugar del kit Zymo DNA Clean and Concentrator (Zymo Research) recomendado o el kit de purificación AMPure Xp. Se añadieron 15 µl de la reacción de PCR de 25 µl a 25 µl de la disolución de perlas AMPure Xp, se mezcló con pipeta y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La disolución de perlas-ADN se aspiró en un capilar de PTFE (400 micrómetros de diámetro interno). Entonces, el capilar se cargó con 2,5 µl de aire, dos balas de 5 µl de etanol, se separó una bala de aire, y seguido de una bala de 10 µl de aire, una bala de 2,5 µl de aceite y una bala de 15 µl de tampón eluyente (agua libre de nucleasa). Se retiraron las perlas y el ADN diana unido de la disolución de perlas-ADN a la pared del capilar a medida que la disolución pasó un imán. Tras esto, las etapas de lavado de etanol pasaron el sedimento de perlas-ADN, eliminando los contaminantes residuales. Entonces, las balas de aire y de aceite pasaron el sedimento, eliminando el etanol residual. Finalmente, se eluyeron las secuencias de genotecas de ADN de las perlas a medida que el tampón de elución pasó el sedimento. Se invirtió la bomba y se recuperó el tampón de elución para el análisis. Este experimento se realizó por duplicado.

Se analizaron genotecas de ADN recuperadas usando electroforesis en gel. El resultado de la electroforesis en gel puede observarse en la FIG. 8. Examinando el resultado del gel, es evidente que las dos etapas de limpieza en capilar implementadas en el protocolo Nextera limpiaron y purificaron satisfactoriamente las secuencias de genotecas. Pueden observarse bandas manchadas correspondientes a los fragmentos de genotecas de ADN superiores a 200 pb en la FIG. 8, que demuestran que la limpieza basada en perlas en capilares es eficaz en eliminar la enzima transposasa después de la tagmentación y purificación de productos después de la tagmentación y PCR de ciclos limitados. Esto verifica que el sistema de limpieza basado en perlas en capilares es una alternativa factible a las etapas de purificación convencionales dentro de un protocolo de preparación de genotecas de ADN.

Preparación de genotecas de ADN: Comparación con protocolos de purificación de ADN convencional

Este ejemplo valida el sistema de purificación basado en perlas en capilares para su uso en un protocolo de preparación de genotecas de ADN. El protocolo de preparación de genotecas de ADN se condujo según protocolo y con las etapas de limpieza en capilares. Entonces se comparó el producto de genotecas final de ambos experimentos, confirmando la eficacia de las etapas de limpieza en capilares en lugar de las etapas de limpieza convencionales.

Se llevó a cabo el protocolo de preparación de genotecas Nextera usando las etapas de limpieza en capilares después de la tagmentación y después de la PCR de ciclos limitados, como se describe en la preparación de genotecas de ADN del ejemplo previo. Esto se realizó por duplicado y el producto de genoteca final se recuperó y se guardó para el análisis.

Se llevó a cabo el protocolo de preparación de genotecas Nextera según el protocolo recomendado con una alteración – se realizó la limpieza post-tagmentación usando el kit de purificación AMPure Xp. La reacción de tagmentación se preparó como se describe en la preparación de genotecas de ADN del ejemplo previo. Entonces se purificó la reacción de tagmentación de 9 µl usando el kit de purificación AMPure Xp. Se añadieron 9 µl de producto tagmentado a 16,2 µl de la disolución de perlas AMPure Xp en un pocillo de una placa de microtitulación, se mezcló con pipeta y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La placa de microtitulación se dispuso sobre una placa magnética para separar perlas que contenían ADN unido de la disolución. El sobrenadante se aspiró usando una pipeta y se desechó. Se añadieron 200 µl de tampón de unión de ADN al sedimento de perlas y se incubó durante 60 segundos a temperatura ambiente para disociar la enzima transposasa del ADN tagmentado. Se añadieron 200 µl de etanol al 70 % al sedimento de perlas y se incubó durante 30 segundos a temperatura ambiente. Entonces se aspiró el etanol usando una pipeta y se desechó. Esto se repitió para un total de dos lavados. Tras la etapa de lavado final, el sedimento se dejó secar para garantizar que se eliminaron todas las trazas de etanol. Se añadieron 15 µl de tampón de elución (agua libre de nucleasa) al pocillo y se pipetearon al sedimento de perlas, que se eliminó de la placa magnética para permitir la resuspensión de las perlas en el tampón de elución, eluyendo ADN de las perlas y en disolución. Se sustituyó la placa de microtitulación sobre la placa magnética y se separaron las perlas y el eluyente y el eluyente se transfirió a una reacción de PCR (25 µl de volumen final).

Se realizó PCR de ciclos limitados, como se describe en la preparación de genotecas de ADN de los ejemplos. Tras la PCR, se añadieron 15 µl de la reacción de PCR de 25 µl a 25 µl de disolución de perlas AMPure Xp en un pocillo de una placa de microtitulación. Se mezcló con pipeta la mezcla de ADN-perlas y se incubó a temperatura ambiente

durante 5 minutos. La placa de microtitulación se dispuso sobre una placa magnética para separar las perlas que contenían ADN unido de la disolución. Se aspiró el sobrenadante usando una pipeta y se desechó. Se añadieron 200 µl de etanol al 70 % al sedimento de perlas y se incubó durante 30 segundos a temperatura ambiente. Entonces se aspiró el etanol usando una pipeta y se desechó. Esto se repitió durante un total de dos lavados. Tras la etapa de lavado final, el sedimento se dejó secar para garantizar que se eliminaran todas las trazas de etanol. Se añadieron 15 µl de tampón de elución (agua libre de nucleasa) al pocillo y se pipeteó al sedimento de perlas, que se eliminó de la placa magnética para permitir la resuspensión de las perlas en el tampón de elución y la liberación del ADN de las perlas y en disolución. Se substituyó la placa de microtitulación sobre la placa magnética para separar las perlas de la disolución y el eluyente que contenía el producto de genoteca final se transfirió a una nueva placa para el análisis. Este experimento se realizó por duplicado.

Se analizaron los productos de genoteca finales recuperados usando el protocolo convencional y el protocolo con etapas de eliminación en capilar incorporadas usando electroforesis en gel. El resultado del gel puede observarse en la FIG. 8. Examinando este resultado del gel, es evidente que la intensidad de la mancha y el tamaño de los productos recuperados del protocolo de limpieza en capilar es aproximadamente igual al de las genotecas preparadas usando el protocolo convencional. Esto demuestra que implementar las etapas de purificación basadas en perlas en capilares en el protocolo da tasas de recuperación y calidad de genotecas similares a las obtenidas usando el protocolo convencional. El enfoque basado en capilares ofrece un enfoque de alto rendimiento libre de trabajo que puede integrarse con otras tecnologías de arquitectura abierta para ofrecer un sistema de preparación de genotecas de ADN completamente automatizado.

Preparación de genotecas de ADN de bajo volumen: Comparación con protocolos de purificación de ADN convencionales

Este ejemplo resalta la eficiencia del sistema de purificación basado en perlas en capilares en la preparación de genotecas de ADN de bajo volumen. El protocolo de preparación de genotecas de ADN se condujo según el protocolo y con las etapas de limpieza en capilares para volúmenes de reacción reducidos. Entonces se comparó el producto de genoteca final de ambos experimentos, confirmando las ventajas de emplear las etapas de limpieza en capilares en lugar de las etapas de limpieza convencionales cuando se preparan genotecas de ADN de volumen pequeño.

En la primera parte de este experimento, se preparó una reacción de tagmentación de 2,5 µl y se incubó a 55 °C durante 5 minutos. Tras la tagmentación, se añadió la reacción de tagmentación de 2,5 µl a 4,5 µl de disolución de perlas AMPure Xp, se mezcló con pipeta y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La disolución se purificó usando el protocolo AMPure Xp con la etapa de adición del tampón de unión de ADN, como se describe en el ejemplo previo. El producto tagmentado se eluyó en 1,1 µl de agua libre de nucleasa y se añadió a la reacción de PCR. Entonces se purificó la reacción de PCR de 2,5 µl según el protocolo de AMPure Xp y el producto de genoteca final se eluyó en 4 µl de agua libre de nucleasa y se guardó para el análisis. En la segunda parte de este experimento, se purificaron volúmenes idénticos usando etapas de limpieza en capilares, como se describe en el ejemplo previo. Ambos enfoques se realizaron por duplicado.

Los productos de genotecas de ADN finales se añadieron a una reacción de PCR de 20 µl y se analizaron usando PCR cuantitativa (qPCR). Los cebadores directos e inversos fueron específicos para los adaptadores añadidos al extremo de los fragmentos de genotecas de ADN, asegurando que solo serían cuantificados los fragmentos listos para el secuenciador. Se usó química de detección con SYBR green. Los patrones suministrados por KAPA Biosystems también se ejecutaron en la misma placa de qPCR, permitiendo la cuantificación absoluta del kit de genoteca recuperado. La placa de qPCR se sometió a 40 ciclos (ABi StepOne, LifeTechnologies) según el kit KAPA Biosystems Library Quant.

El resultado de qPCR puede observarse en la FIG. 9. Las dos genotecas recuperadas usando la limpieza en capilar tienen valores del ciclo de cuantificación (Cq) más tempranos que las genotecas recuperadas usando el protocolo convencional. El Cq se define como el número de ciclos al que la señal de fluorescencia supera el nivel de fluorescencia de fondo y está relacionado con la cantidad de producto de partida. Los valores de Cq para el producto limpiado en capilares fueron 2,8 y 2,9. Los valores de Cq para el producto limpiado usando métodos convencionales fueron 3,6 y 4,0, significativamente más tarde que el producto limpiado en capilares. Esto demuestra que la limpieza en capilares ofrece tasas de recuperación superiores cuando se preparan genotecas de ADN a partir de volúmenes pequeños. Esto puede atribuirse a las reducidas pérdidas de muestra asociadas al enfoque en capilares en comparación con el protocolo convencional donde los errores de pipeteado son significativos.

Las tasas de recuperación de genotecas de ADN superiores asociadas a la limpieza en capilares se sustentan además en el siguiente ejemplo.

Recuperación de ADN de volúmenes de muestra bajos usando aislamiento basado en perlas en capilares

Este ejemplo verifica que el enfoque de limpieza en capilares tiene excelentes tasas de recuperación cuando se manipulan volúmenes pequeños de genotecas de ADN. En este ejemplo, se realizaron varios experimentos para investigar la recuperación de genotecas de ADN usando limpieza en capilares.

- Se realizó el protocolo de Nextera completo, siguiendo el protocolo convencional. Se almacenó el producto de genoteca de ADN final y se usó como molde. Se añadieron 2,5 µl de genoteca de ADN a 4,5 µl de disolución de perlas AMPure Xp, se mezcló con pipeta y se sometió al procedimiento de limpieza en capilares brevemente expuesto en los ejemplos previos. El producto recuperado se añadió entonces a una reacción de PCR. Se realizaron controles positivos que contenían 2,5 µl de molde por triplicado y se analizaron. El producto de genoteca recuperado y los controles positivos se analizaron usando qPCR. El control positivo y los valores de Cq del eluyente se presentan en la Tabla 1. Los valores de Cq de control positivo representan la cantidad de partida del producto de genoteca de ADN antes de cualquier proceso de purificación. Debido a que se usaron 2,5 µl de producto de genoteca de ADN en los controles positivos y se introdujeron en el proceso de limpieza en capilar de volumen pequeño, los valores de Cq para ambos deben ser iguales, suponiendo una eficiencia de recuperación del 100 %. Examinando los valores de Cq para los controles positivos y el eluyente, es evidente que la mayoría, si no todo el producto de genoteca, se recupera después de someter la muestra a la limpieza basada en perlas en capilares. Los valores de Cq del eluyente son aproximadamente iguales a los controles positivos, que demuestran la eficiente recuperación del producto de genotecas de ADN.
- Este ejemplo confirma que el enfoque de limpieza en capilares es capaz de recuperar eficientemente la genoteca de ADN de volúmenes pequeños.

Tabla 1

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4
Descripción	Cq	Cq	Cq	Cq
Control positivo 1	4,8	5,0	4,5	5,4
Control positivo 2	5,1	4,9	4,4	5,3
Control positivo 3	5,0	5,1	4,4	5,2
Control positivo promedio	4,96	5,0	4,43	5,3
Eluyente	4,7	4,7	6,0	5,3

Descontaminación de capilares - reutilización

- El procedimiento de limpieza en capilares brevemente explicado en los ejemplos previos normalmente purifica muestras de alta concentración tales como producto de PCR o genoteca de ADN. Inevitablemente, el capilar está contaminado con pequeñas cantidades de ADN diana, ya que las perlas se separan de la disolución y se mantienen en la pared del capilar. Sin desechar la línea, esto conduciría a contaminación remanente entre muestras. Claramente, esto no es altamente deseable. Este ejemplo demuestra que una serie de etapas de lavado elimina o destruye suficientemente cualquier ácido nucleico que quede en el capilar después de realizar la purificación basada en perlas en capilares - que permite la reutilización del capilar.

- Se purificó el producto de PCR usando el enfoque de limpieza en capilar, siguiendo el protocolo exacto brevemente expuesto en el ejemplo de Recuperación de ADN de volúmenes de muestra bajos usando aislamiento basado en perlas en capilares. Entonces se pasó una bala negativa de 9 µl en capilar (agua libre de nucleasa) a lo largo del capilar y se recuperó para investigar si la línea estaba contaminada. Tras esto, se llenó el capilar con un reactivo de limpieza (LookOut DNA Erase, SigmaAldrich) durante 3 minutos. El reactivo de limpieza se bombeó al residuo y la línea se lavó con agua estéril. Tras la descontaminación, se pasaron dos balas negativas en capilar estéril de 9 µl a lo largo del capilar para investigar los niveles de contaminación después de las etapas de lavado. Se añadieron el eluyente recuperado y los negativos en capilar a reacciones de PCR. También se prepararon controles positivos y sin molde y se analizaron usando qPCR (ABi StepOne, LifeTechnologies). El resultado de qPCR puede observarse en la FIG. 11. Examinando la FIG. 11, es evidente que el capilar está significativamente contaminado directamente después de realizar la limpieza en capilares. Tras la etapa de descontaminación, los valores de Cq negativos en capilar entran dentro de los valores de Cq de control sin molde. Los valores de Cq presentados por los controles sin molde y los negativos en capilar se corresponden con el producto dímero de cebador. Los negativos en capilar siguen siendo negativos para el producto diana, que indica la eficaz descontaminación después de lavar el capilar.

La implementación de las etapas de lavado descritas permite la reutilización de la línea después de cada experimento de purificación / selección de tamaño.

Definición

- En la presente divulgación, el uso del término "bala" es intercambiable con el término tapón, e indica un volumen discreto de fluido que circula dentro del conducto.

REIVINDICACIONES

1. Un método de manipulación de un líquido de muestra que contiene partículas magnéticas que tienen moléculas diana unidas a las mismas y un líquido de encapsulación, siendo el líquido de muestra y el líquido de encapsulación inmiscibles, comprendiendo el método:
- 5 hacer circular el líquido de encapsulación en un conducto;
- hacer circular el líquido de muestra que contiene las partículas magnéticas en el conducto de manera que el líquido de muestra (a) sea rodeado por el líquido de encapsulación y (b) esté localizado en un sitio de atrapamiento predeterminado dentro del conducto;
- 10 inmovilizar las partículas magnéticas en el sitio de atrapamiento aplicando un campo magnético en el sitio de atrapamiento; y
- hacer circular un líquido de elución en el conducto de manera que (a) el líquido de elución esté rodeado por el líquido de encapsulación, (b) el líquido de muestra se haga circular lejos del sitio de atrapamiento, y (c) el líquido de elución circule al sitio de atrapamiento y rodee las partículas magnéticas inmovilizadas, liberando así las biomoléculas diana de las partículas magnéticas.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además:
- unir las biomoléculas diana a las partículas magnéticas antes de la circulación del líquido de muestra en el conducto.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además movilizar las partículas magnéticas en el líquido de elución eliminando el campo magnético después de hacer circular el líquido de elución; opcionalmente que
- 20 comprende además hacer circular el líquido de elución que contiene las partículas magnéticas movilizadas lejos del sitio de atrapamiento.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además hacer circular el líquido de elución que contiene las biomoléculas diana liberadas lejos del sitio de atrapamiento mientras que las partículas magnéticas siguen inmovilizadas por el campo magnético aplicado; opcionalmente que comprende además:
- 25 (a) hacer circular un primer fluido de limpieza en el conducto al sitio de atrapamiento de manera que (a) el fluido de limpieza esté rodeado por el líquido de encapsulación, y (b) el primer fluido de limpieza rodee las partículas magnéticas inmovilizadas;
- movilizar las partículas magnéticas en el primer fluido de limpieza eliminando el campo magnético; y
- 30 hacer circular el primer fluido de limpieza que contiene las partículas magnéticas movilizadas en el conducto lejos del sitio de atrapamiento; opcionalmente que comprende además hacer circular un segundo fluido de limpieza en el conducto; o
- (b) hacer circular un primer fluido de limpieza en el conducto al sitio de atrapamiento de manera que (a) el fluido de limpieza esté rodeado por el líquido de encapsulación, y (b) el primer fluido de limpieza rodee las partículas magnéticas inmovilizadas;
- 35 movilizar las partículas magnéticas en el primer fluido de limpieza eliminando el campo magnético;
- inmovilizar las partículas magnéticas movilizadas volviendo a aplicar el campo magnético; y hacer circular el primer fluido de limpieza en el conducto lejos del sitio de atrapamiento y las partículas magnéticas inmovilizadas; opcionalmente que comprende además hacer circular un segundo fluido de limpieza en el conducto.
- 40 5. Un método de manipulación de un primer líquido de muestra que contiene partículas magnéticas, un segundo líquido de muestra y un líquido de encapsulación, siendo ambos líquidos de muestra inmiscibles con el líquido de encapsulación, comprendiendo el método:
- hacer circular el líquido de encapsulación en un conducto;
- 45 hacer circular el primer líquido de muestra que contiene partículas magnéticas en el conducto de manera que el primer líquido de muestra (a) sea rodeado por el líquido de encapsulación y (b) esté localizado en un sitio de atrapamiento predeterminado dentro del conducto;
- inmovilizar las partículas magnéticas en el sitio de atrapamiento aplicando un campo magnético en el sitio de atrapamiento;

- hacer circular el primer líquido de muestra en el conducto de manera que el primer líquido de muestra se haga circular lejos del sitio de atrapamiento mientras que las partículas magnéticas siguen inmovilizadas en el sitio de atrapamiento; y
- 5 hacer circular el segundo líquido de muestra en el conducto de manera que el segundo líquido de muestra (a) esté rodeado por el líquido de encapsulación y (b) rodee las partículas magnéticas inmovilizadas.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el segundo líquido de muestra contiene biomoléculas diana que se unen a las partículas magnéticas cuando el segundo líquido de muestra rodea las partículas magnéticas inmovilizadas.
- 10 7. El método de la reivindicación 5 que comprende además, después de hacer circular el segundo líquido de muestra, hacer circular un líquido de elución en el conducto de manera que (a) el líquido de elución sea rodeado por el líquido de encapsulación, (b) el segundo líquido de muestra se haga circular lejos del sitio de atrapamiento, y (c) el líquido de elución circule al sitio de atrapamiento y rodee las partículas magnéticas inmovilizadas.
8. El método de la reivindicación 7, en el que hacer circular el líquido de elución comprende además liberar las biomoléculas diana de las partículas magnéticas rodeando las partículas magnéticas con el líquido de elución.
- 15 9. El método de la reivindicación 7 que comprende además movilizar las partículas magnéticas en el líquido de elución eliminando el campo magnético después de hacer circular el líquido de elución.
10. El método de la reivindicación 5 que comprende además:
- 20 después de hacer circular el segundo líquido de muestra, hacer circular un primer líquido de limpieza en el conducto de manera que (a) el primer líquido de limpieza sea rodeado por el líquido de encapsulación, (b) el segundo líquido de muestra se haga circular lejos del sitio de atrapamiento, y (c) el primer líquido de limpieza circule al sitio de atrapamiento y rodee las partículas magnéticas inmovilizadas; y
- 25 después de hacer circular el primer líquido de limpieza, hacer circular un líquido de elución en el conducto de manera que (a) el líquido de elución sea rodeado por el líquido de encapsulación, (b) el primer líquido de limpieza se haga circular lejos del sitio de atrapamiento, y (c) el líquido de elución circule al sitio de atrapamiento y rodee las partículas magnéticas inmovilizadas.
11. El método de la reivindicación 5, que comprende además movilizar las partículas magnéticas en el segundo líquido de muestra eliminando el campo magnético después de hacer circular el segundo líquido de muestra.
12. El método de la reivindicación 5, en el que el segundo líquido de muestra y el líquido de encapsulación constituyen una celda de líquido compuesto.
- 30 13. El método de la reivindicación 6 que comprende además detectar si un marcador está presente por interrogatorio óptico o fluorescente del sitio de atrapamiento.
14. El método de la reivindicación 1, en el que el conducto es un tubo capilar.
15. Un sistema de manipulación de líquidos que comprende un conducto que tiene un sitio de atrapamiento predeterminado, una bomba configurada para aplicar presión positiva, presión negativa, o ninguna presión externa a una localización en el conducto, una fuente de campo magnético configurada para aplicar un campo magnético en el sitio de atrapamiento cuando se active y sustancialmente ningún campo magnético cuando no se active,
- 35 un líquido de encapsulación,
- un líquido de muestra,
- partículas magnéticas,
- 40 un líquido de elución
- y un controlador operativamente unido a la bomba y la fuente de campo magnético de manera que el controlador pueda activar la bomba y/o la fuente de campo magnético, siendo el controlador programado para:
- 45 activar la bomba de manera que un líquido de encapsulación se haga circular en el conducto;
- activar la bomba de manera que un líquido de muestra se haga circular en el conducto de tal forma que el líquido de muestra (a) sea rodeado por el líquido de encapsulación y (b) esté localizado en el sitio de atrapamiento dentro del conducto, conteniendo el líquido de muestra partículas magnéticas;
- activar la fuente de campo magnético de manera que las partículas magnéticas se inmovilicen en el sitio de atrapamiento; y

5

activar la bomba de manera que un líquido de elución se haga circular en el conducto de tal forma que (a) el líquido de elución sea rodeado por el líquido de encapsulación, (b) el líquido de muestra se haga circular lejos del sitio de atrapamiento, y (c) el líquido de elución circule al sitio de atrapamiento y rodee las partículas magnéticas; opcionalmente en el que (a) el conducto es un tubo capilar; o (b) el líquido de encapsulación, líquido de muestra y líquido de elución se hacen circular por presión negativa aplicada por la bomba al conducto; o (c) el líquido de encapsulación, líquido de muestra y líquido de elución se hacen circular por presión positiva aplicada por la bomba al conducto.

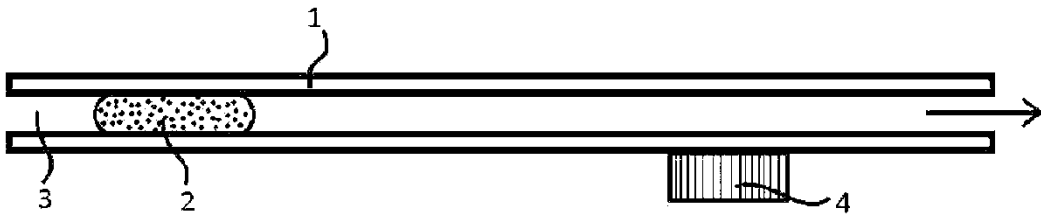


FIG. 1A

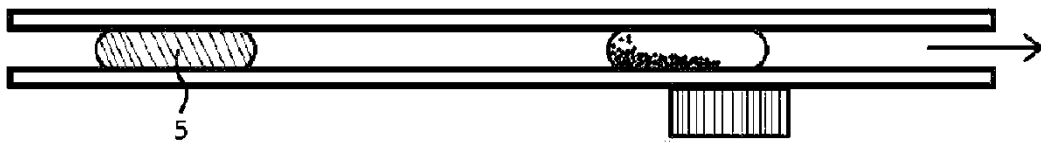


FIG. 1B

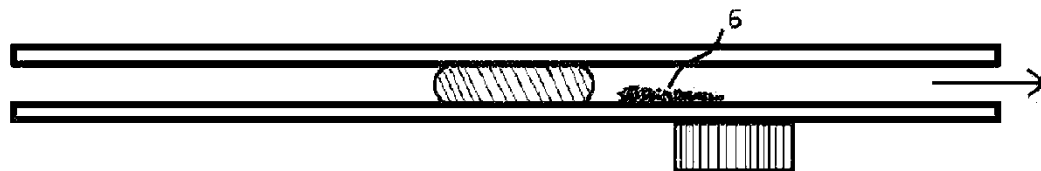


FIG. 1C

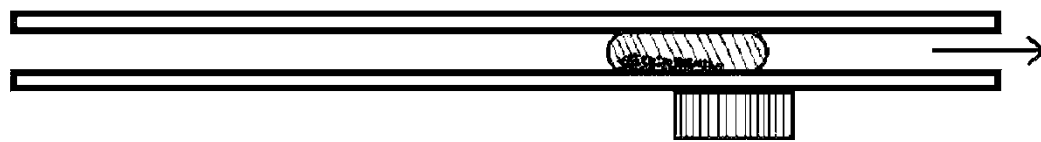


FIG. 1D

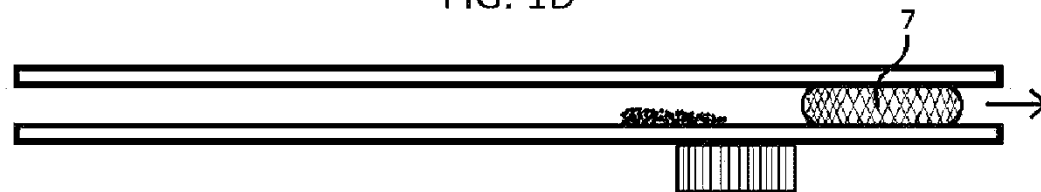


FIG. 1E

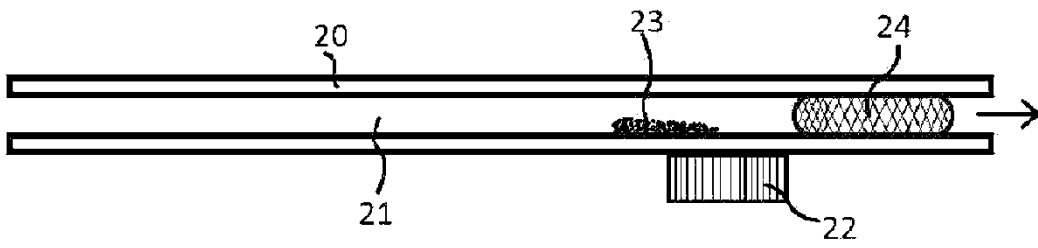


FIG. 2A

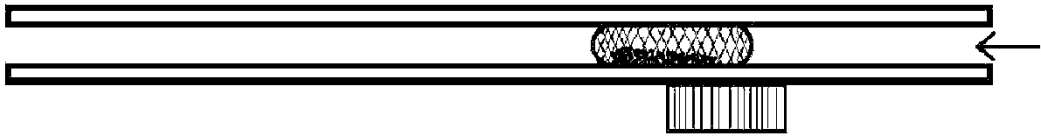


FIG. 2B

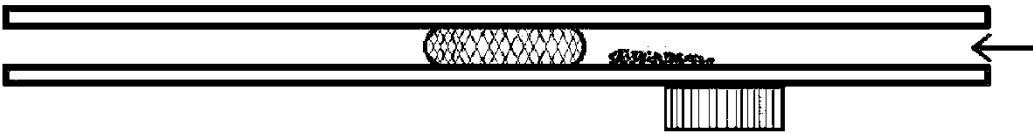


FIG. 2C

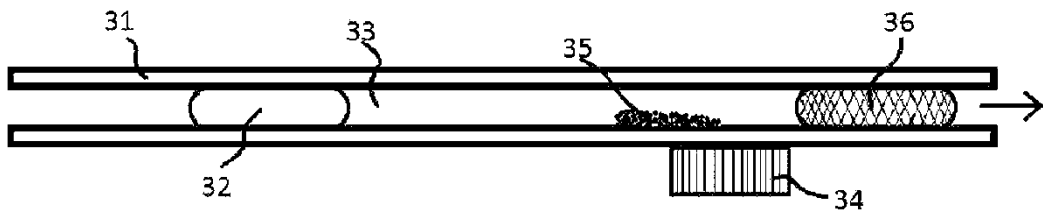


FIG. 3A

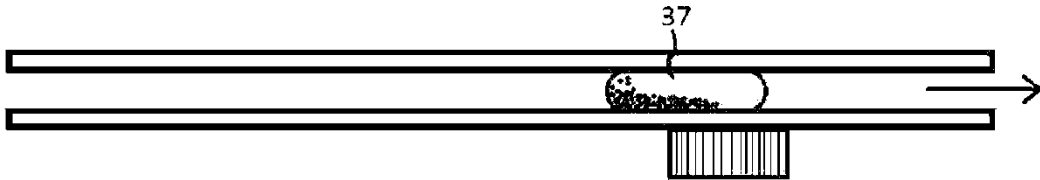


FIG. 3B

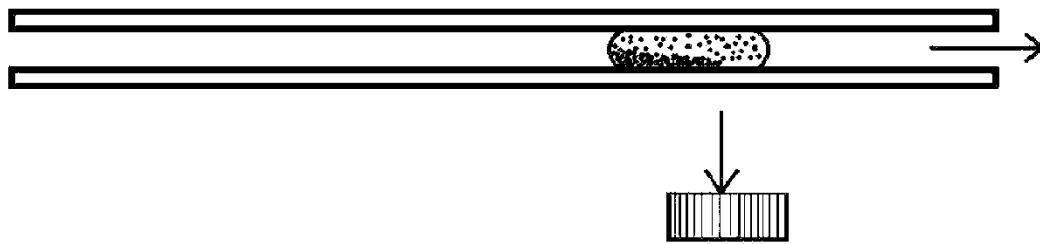


FIG. 3C



FIG. 3D

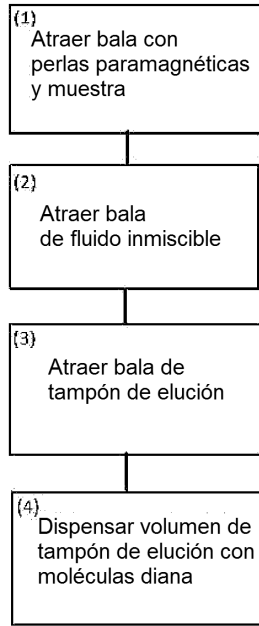


FIG. 4

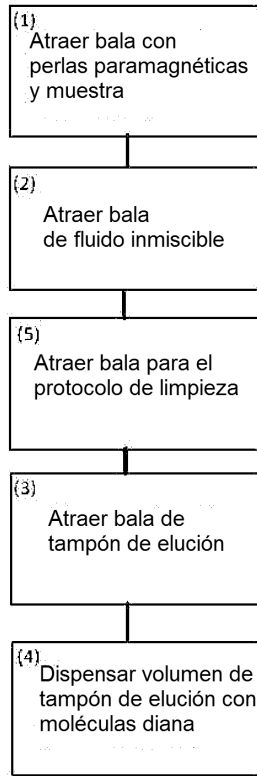


FIG. 5

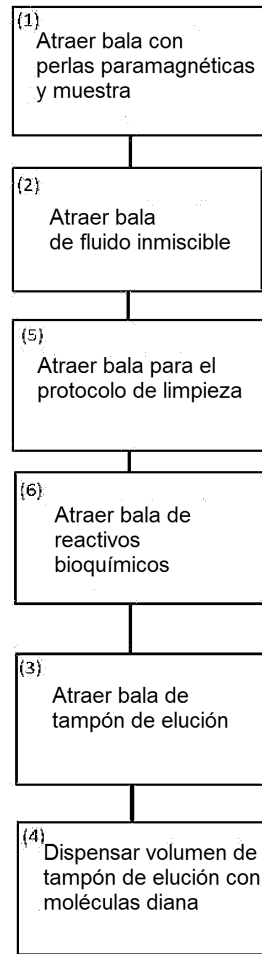


FIG. 6

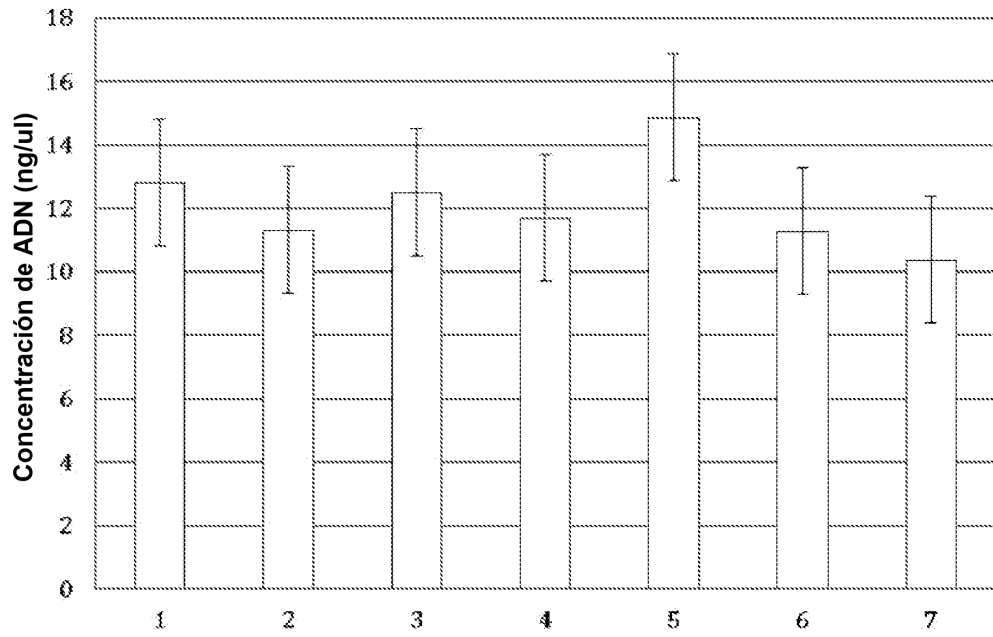


FIG. 7

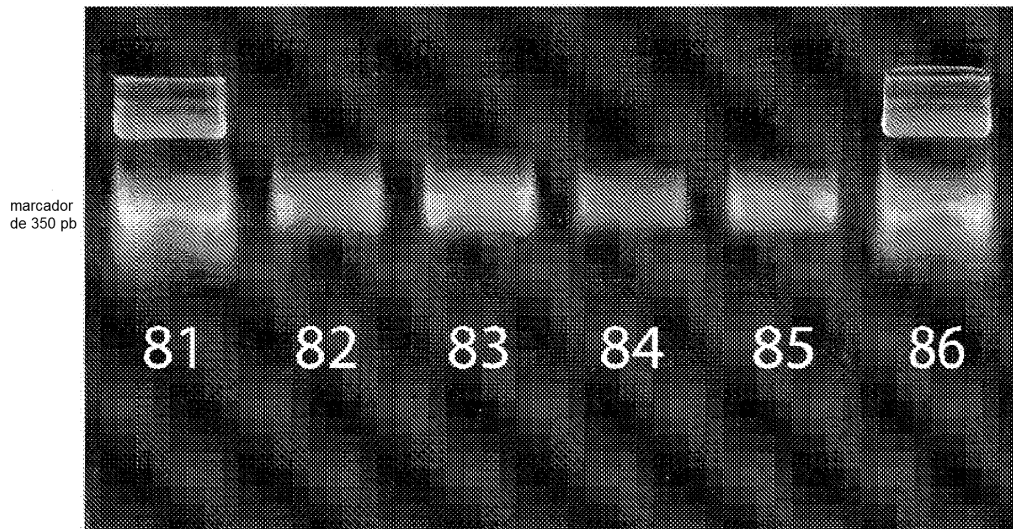


FIG. 8

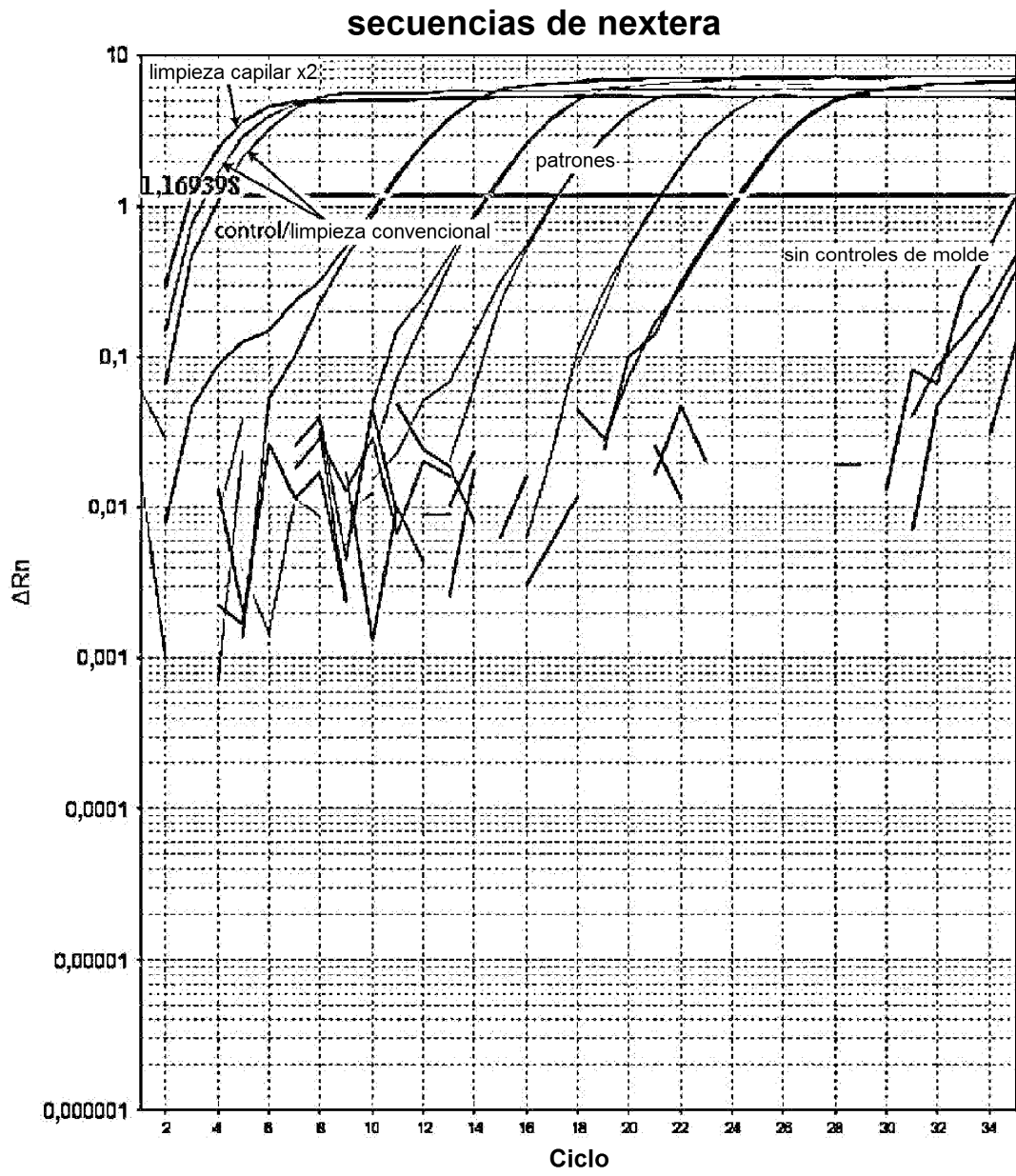


FIG. 9

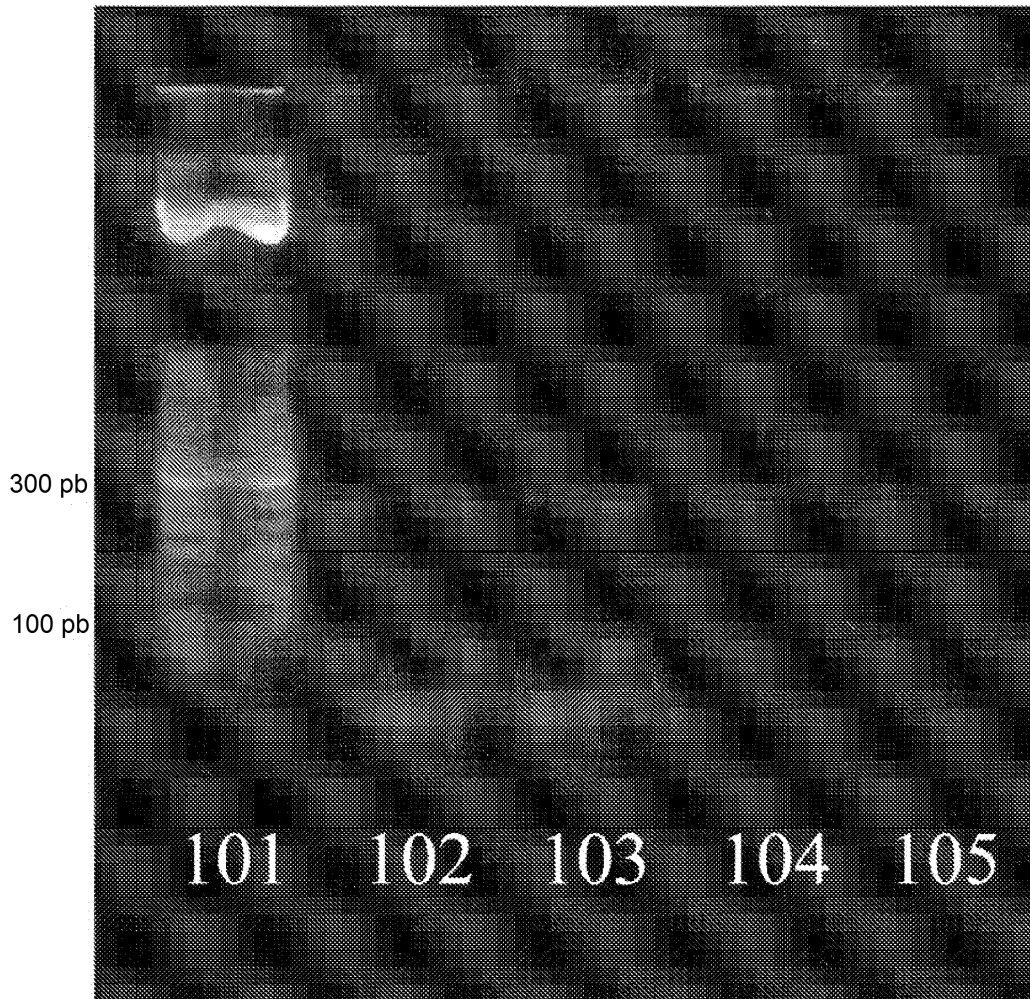


FIG. 10

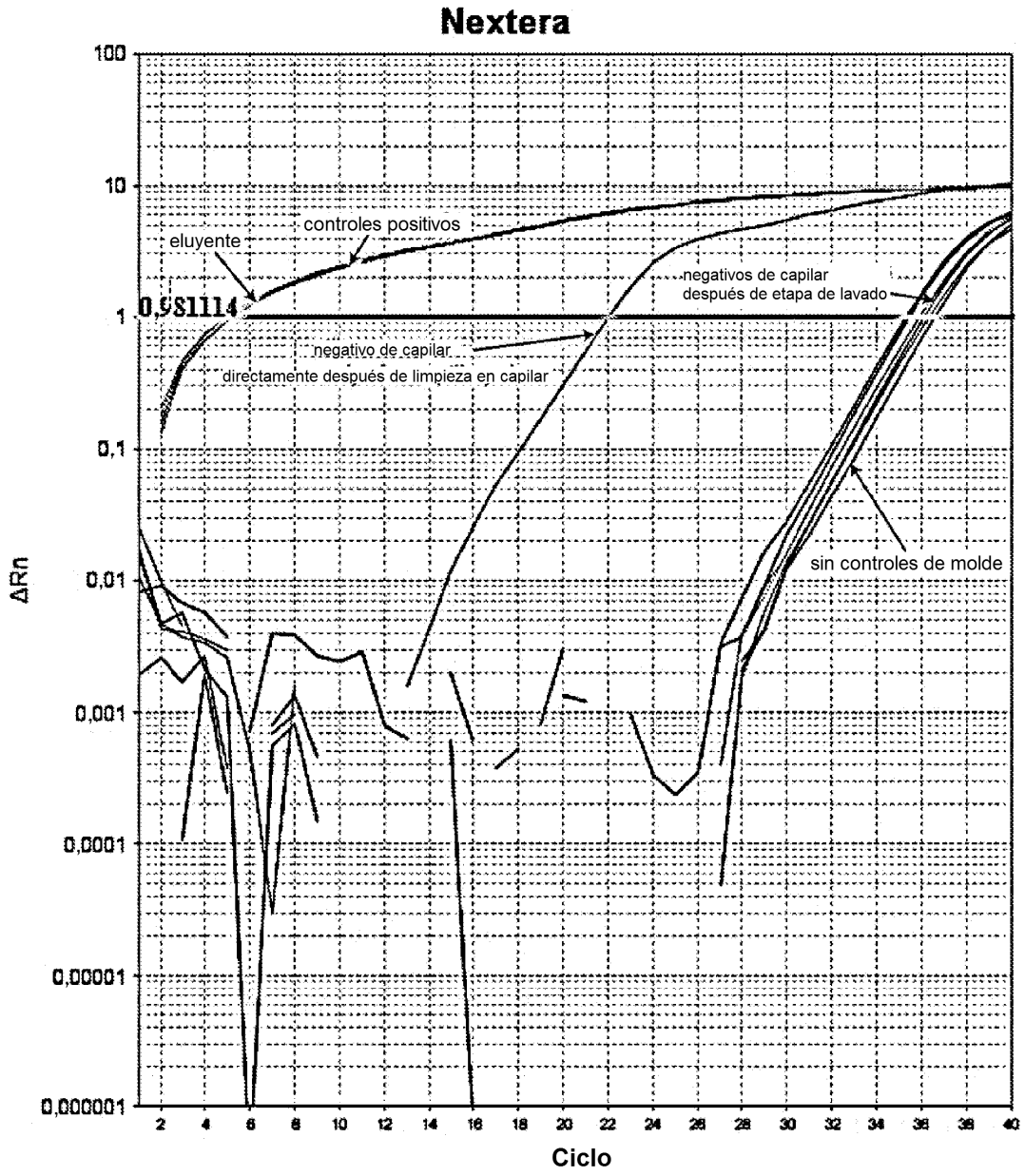


FIG. 11

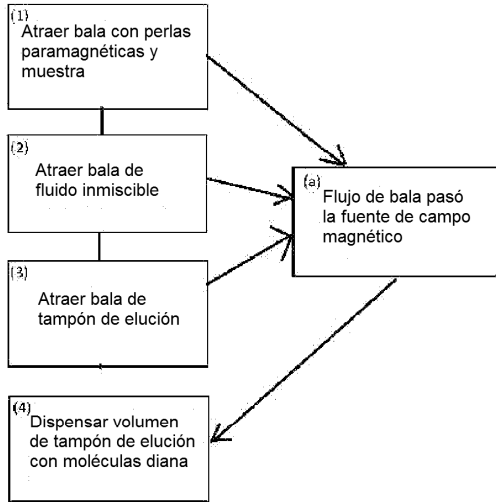


FIG. 12

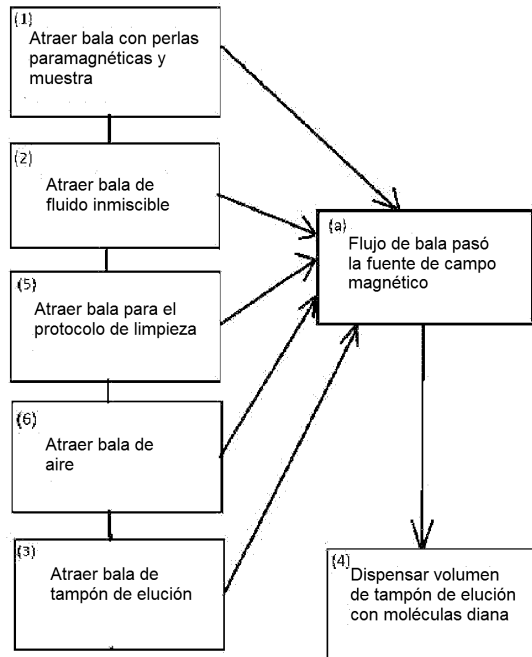


FIG. 13

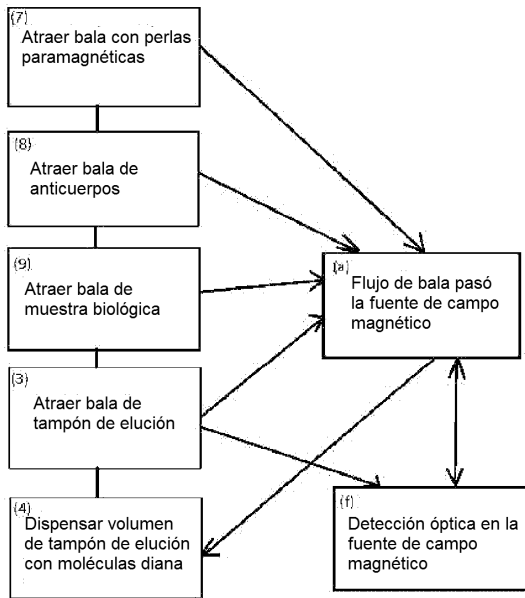


FIG. 14

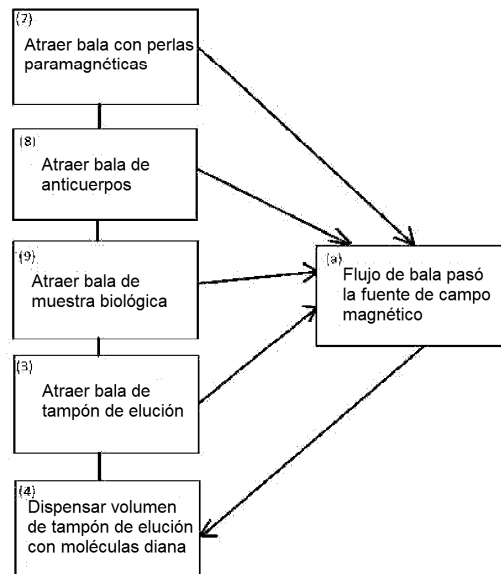


FIG. 15

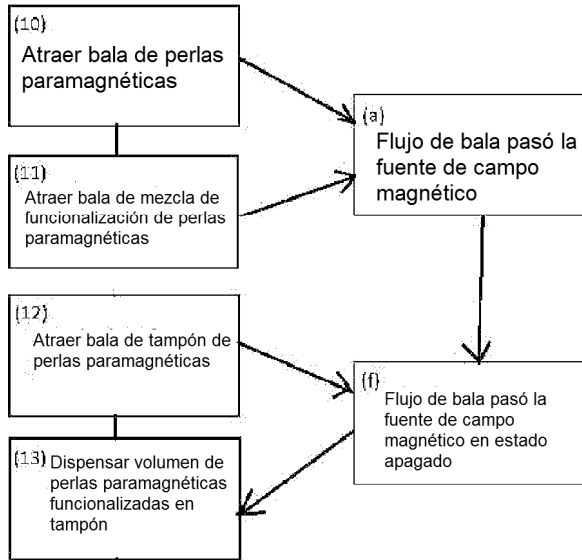


FIG. 16

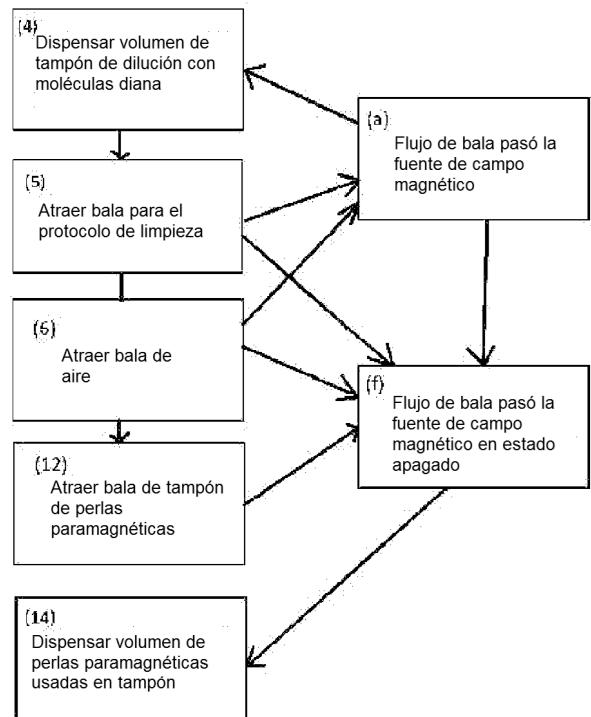


FIG. 17

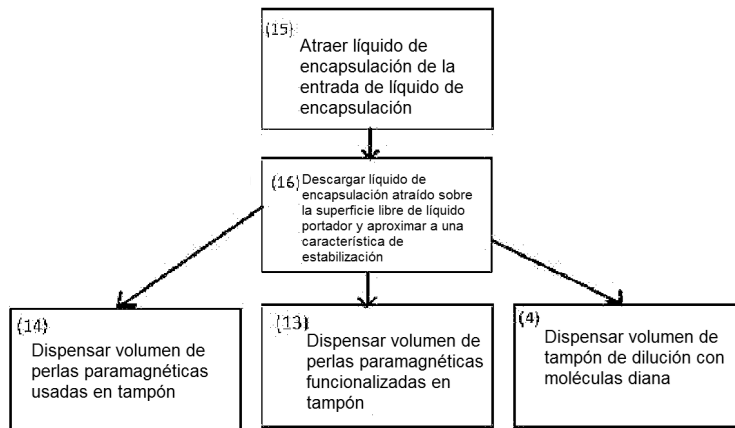


FIG. 18