

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 942**

51 Int. Cl.:

B01F 7/00 (2006.01)

B01F 13/10 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2013 PCT/EP2013/057625**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13153176**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2013 E 13720818 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2836294**

54 Título: **Agitador de bolas rotatorio integrado fluídicamente**

30 Prioridad:

11.04.2012 US 201261622858 P

15.03.2013 US 201313836741

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

27.12.2017

73 Titular/es:

STAT-DIAGNOSTICA & INNOVATION, S.L.

(100.0%)

Baldiri Reixac 4

08028 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

CARRERA FABRA, JORDI;

COMENGES CASES, ANNA;

MARTIN BLANCO, RICARD y

BRU GIBERT, RAFAEL

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 647 942 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

Agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente

5 **Antecedentes****Campo**

Las realizaciones de la presente invención se refieren a agitadores de bolas.

10

Antecedentes

15 Dada la complejidad de la automatización de los análisis moleculares y las técnicas de inmunoensayo, existe una carencia de productos que proporcionen un comportamiento adecuado para su uso clínico en situaciones de pruebas clínicas cerca del paciente. Los análisis moleculares normales incluyen diversos procesos que implican la dosis correcta de los reactivos, la introducción de la muestra, la homogeneización de la mezcla, la lisis de células para extraer ADN y/o ARN, etapas de purificación y la amplificación para su posterior detección. A pesar de que existen plataformas robóticas de laboratorio centrales que automatizan algunos de estos procesos, para muchas pruebas de laboratorio que requieren un breve tiempo de entrega, el laboratorio central no puede proporcionar los resultados conforme al tiempo requerido.

20

25 La homogeneización y/o lisis de una muestra biológica constituye generalmente la etapa inicial del proceso de análisis para obtener un analito o analitos adecuadamente purificados para análisis moleculares. En líneas generales, existen tres enfoques principales de lisis celular: químicos, enzimáticos y físicos. Estos procesos pueden utilizarse en solitario o en combinación, secuencialmente o en una sola etapa para optimizar el proceso. El uso de procesos químicos y enzimáticos puede resultar problemático, ya que algunas de las sustancias químicas utilizadas para romper la pared celular pueden desnaturalizar algunas enzimas presentes o generar problemas en procesos posteriores.

25

30 Los métodos físicos para la ruptura celular incluyen sonicación, calentamiento (normalmente a entre 90 °C y 100 °C), repetición de ciclos de congelación-descongelación, creación de grandes y rápidos cambios de presión y métodos mecánicos. Los métodos mecánicos incluyen la ruptura física de la pared celular mediante fuerzas físicas, como por ejemplo fuerzas de alta cizalla, molienda y bombardeo de la célula con partículas pequeñas, que suelen consistir en bolas. Los métodos mecánicos de alteración presentan varias ventajas. Suele emplearse un proceso de una sola etapa, por lo general, son muy rápidos, son susceptibles de automatización y tienen capacidad de alterar las muestras sólidas, como por ejemplo, huesos, en los casos en los que no es posible obtener el (los) analito(s) de interés sin homogeneización mecánica.

35

40 El documento US 2010/331522 A1 describe un método de lisis que puede incluir la agitación de una muestra en una cámara junto con un medio que incluye un material lisante en partículas que tiene afinidad con un material biológico. El material lisante incluye bolas y un medio que incluye un fluido con un alto contenido en sal o un bajo nivel de pH. Se eluye el material biológico reduciendo la concentración de sal o aumentando el nivel de pH. Se pueden emplear materiales lisantes con dos o más afinidades diferentes, así como calentamiento. La lisis se realiza en un aparato de flujo continuo.

45

Breve sumario

50 La invención se define por un sistema de acuerdo con la reivindicación 1 y un método para la homogeneización o lisis de una muestra de acuerdo con las reivindicaciones 18 y 19.

50

Se proporcionan métodos y sistemas de agitadores de bolas mecánicos que se pueden integrar en un sistema de pruebas cerca del paciente.

55 En una realización, un sistema para realizar al menos una entre homogeneización y lisis de una muestra incluye una o más paredes que forman una cámara cerrada que tiene una entrada y una pluralidad de conexiones fluidicas. Una primera red fluidica está acoplada con al menos una de la pluralidad de conexiones fluidicas y una segunda red fluidica está acoplada con al menos una de la pluralidad de las conexiones fluidicas. El sistema incluye asimismo un elemento rotatorio dentro de la cámara y un accionador configurado para hacer girar el elemento rotatorio. La primera red fluidica está configurada para introducir al menos una muestra en la cámara desde al menos un primer depósito. La segunda red fluidica está configurada para expulsar al menos la muestra desde la cámara hacia al menos un segundo depósito. El elemento rotatorio gira en virtud de un accionador en torno al eje que se extiende a lo largo de un tramo del elemento rotatorio.

60

65 En una realización, un sistema para realizar análisis moleculares incluye una carcasa con una o más cámaras de fluido y una red fluidica, un agitador de bolas dispuesto dentro de la carcasa y un accionador. La red fluidica conecta al menos una o más cámaras de fluido con una cámara central móvil. El agitador de bolas incluye además una o

más paredes que forman una cámara cerrada con una entrada y una pluralidad de conexiones fluidicas y un elemento rotatorio dentro de la cámara cerrada. Al menos una porción de la pluralidad de conexiones fluidicas está acoplada a la red fluidica de la carcasa. El elemento rotatorio gira en virtud de un accionador en torno al eje que se extiende a lo largo de un tramo del elemento rotatorio.

5 Se describe un ejemplo del método de lisis de una muestra. Dicho método incluye introducir una muestra en una cámara cerrada a través de una conexión fluidica acoplada a una red fluidica que está acoplada además a otra u otras más cámaras. El método incluye además la rotación de un elemento rotatorio dentro de la cámara cerrada a lo largo de un eje que se extiende a lo largo de un tramo del elemento rotatorio.

10 El método incluye además, la lisis de la muestra dentro de la cámara cerrada en virtud del movimiento del elemento rotatorio.

15 Se describe otro ejemplo del método de lisis de una muestra. Dicho método incluye introducir una muestra en una cámara cerrada a través de una conexión fluidica acoplada a una red fluidica que está acoplada además a otra u otras cámaras. Dicho método incluye además la rotación de un elemento rotatorio dentro de la cámara cerrada a lo largo de un eje que se extiende a lo largo de un tramo del elemento rotatorio. El método incluye además excitar una pluralidad de bolas dentro de la cámara cerrada con el movimiento del elemento rotatorio. El método incluye asimismo la lisis de la muestra dentro de la cámara cerrada en virtud del movimiento del elemento rotatorio y la pluralidad de bolas.

20 Se describe un ejemplo de método de homogeneización de una muestra. El método incluye introducir una muestra en una cámara cerrada a través de una conexión fluidica acoplada a una red fluidica que está acoplada además a otra u otras cámaras. El método incluye además la rotación de un elemento rotatorio dentro de la cámara cerrada a lo largo de un eje que se extiende a lo largo de un tramo del elemento rotatorio. El método incluye asimismo la homogeneización de la muestra dentro de la cámara cerrada en virtud del movimiento del elemento rotatorio.

25 Se describe otro ejemplo de método de homogeneización de una muestra. El método incluye introducir una muestra en una cámara cerrada a través de una conexión fluidica acoplada a una red fluidica que está acoplada además a otra u otras cámaras. El método incluye además la rotación de un elemento rotatorio dentro de la cámara cerrada a lo largo de un eje que se extiende a lo largo de un tramo del elemento rotatorio. El método incluye además excitar una pluralidad de bolas dentro de la cámara cerrada con el movimiento del elemento rotatorio. El método incluye además la homogeneización de la muestra dentro de la cámara cerrada en virtud del movimiento del elemento rotatorio y la pluralidad de bolas.

35 **Breve descripción de los dibujos/figuras**

Los dibujos adjuntos, que se incorporan al presente documento y forman parte de la memoria descriptiva, ilustran las realizaciones de la presente invención y junto con la descripción sirven además para explicar los principios de la invención y permiten a la persona especializada en la técnica correspondiente fabricar y utilizar la invención.

40 FIG. 1 es una representación gráfica de una plataforma de cartucho de análisis de acuerdo con una realización.

45 FIG. 2A - 2B despliega un sistema de agitador de bolas de acuerdo con realizaciones.

FIG. 3A – 3B despliega más vistas de un sistema de agitador de bolas de acuerdo con realizaciones.

FIG. 4 despliega una vista despiezada d un sistema de agitador de bolas de acuerdo con una realización.

50 FIG. 5 despliega una vista en la que se presenta el interior de un sistema de agitador de bolas de acuerdo con una realización.

FIG. 6A-6B despliega vistas transversales de un sistema de agitador de bolas de acuerdo con realizaciones.

55 FIG. 7A-7E despliega vistas de un elemento rotatorio de acuerdo con realizaciones.

FIG. 8-11 son diagramas que ilustran los métodos realizados con el sistema de agitador de bolas de acuerdo con las realizaciones.

60 FIG. 12 es un gráfico de la concentración de ADN medida a partir de esporas de *Bacillus subtilis*.

FIG. 13 es un gráfico de la concentración de ADN medida a partir de células vegetales de *Bacillus subtilis*.

65 FIG. 14 es un gráfico de ADN recuperado desde células vegetales de *Bacillus subtilis*.

FIG. 15 es un gráfico de la concentración de ADN y ARN de células vegetales de *Bacillus subtilis*.

FIG. 16 es un gráfico de recuperación de ARN desde células vegetales de *Bacillus subtilis*.

FIG. 17A-17C son perfiles de ARNr del bioanalizador de *Bacillus subtilis*.

5

Las realizaciones de la presente invención se describirán haciendo referencia a los dibujos adjuntos.

Descripción detallada

10 Si bien se explican configuraciones y disposiciones específicas, debe entenderse que se hace exclusivamente con el fin de ilustrar la invención. Las personas especializadas en la técnica correspondiente reconocerán que es posible utilizar otras configuraciones y disposiciones sin por ello alejarse del espíritu y alcance de la presente invención. Para las personas especializadas en la técnica correspondiente será evidente que la presente invención se puede emplear en otras aplicaciones diversas.

15

Debe señalarse que las referencias en presente memoria descriptiva a “una realización”, “realización”, “un ejemplo de realización”, etc. indican que la realización descrita puede incluir un elemento, estructura o característica en particular, pero no todas las realizaciones tienen porqué incluir necesariamente dicho elemento, estructura o característica en particular. Por otra parte, este tipo de frases no se refieren necesariamente a la misma realización.

20

Asimismo, cuando se describe un elemento, estructura o característica en particular en relación con una realización, entrará dentro del conocimiento de la persona especializada en la técnica la aplicación de dicho elemento, estructura o característica en relación con otras realizaciones, ya se describan o no de forma explícita.

25

Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren a un sistema de agitador de bolas para la homogeneización y/o lisis de una muestra. La muestra puede ser un líquido, sólido, semisólido o una combinación de los mismos. En una realización, el sistema de agitador de bolas está integrado con una plataforma de cartucho de análisis. La plataforma de cartucho de análisis incluye una red de canales fluidicos, pudiendo estar acoplada una porción de la misma a un agitador de bolas integrado. Los canales fluidicos pueden transportar la muestra hasta la cámara del agitador de bolas, extraer la muestra desde la cámara del agitador de bolas y/o se pueden utilizar para presurizar la cámara del agitador de bolas.

30

El sistema del agitador de bolas está diseñado para alterar físicamente las muestras, por ejemplo, mediante la rotación de un elemento rotatorio dentro de la cámara del agitador de bolas. La alteración física a su vez puede favorecerse por la presencia de bolas (p.ej., bolas inertes hechas de vidrio y/u otros materiales). En un ejemplo, el proceso de lisis y/o homogeneización se optimiza además mediante el uso de un tampón de lisis dentro de la cámara agitador de bolas. En otro ejemplo, se realiza una lisis enzimática aplicando calor a la muestra. En algunos ejemplos, el calentamiento de la muestra puede realizarse antes del batido de bolas real de la muestra. En una realización, todos los reactivos y componentes necesarios del agitador de bolas están contenidos en una plataforma de cartucho de análisis.

35

En algunas realizaciones, tanto la plataforma del cartucho de análisis como el agitador de bolas integrado están diseñados para su eliminación una vez utilizados. Una vez que se colocan los reactivos o la muestra dentro de cartucho de análisis, no vuelven a entrar en contacto con el entorno exterior ni con ninguna parte del instrumento de medición externa. Este elemento es importante para muchos laboratorios y hospitales para eliminar de forma segura los productos después de su uso.

45

La cámara del agitador de bolas está diseñada para tener la capacidad de procesar una amplia variedad de muestras y alterar una amplia variedad de tipos de células. Esto se consigue en parte gracias a la disponibilidad de diferentes plataformas de cartucho de análisis que son específicas para cada combinación de muestra/tipo de célula en particular. En otro ejemplo, la variación de las condiciones controladas con un analizador, como por ejemplo la velocidad y duración de la rotación del elemento rotatorio, permite procesar una amplia variedad de tipos de muestras.

50

Otros detalles relativos a los componentes del sistema de agitador de bolas se describen en el presente documento haciendo referencia a las figuras. Debe entenderse que no se pretende que las ilustraciones de cada uno de los componentes físicos sean exhaustivos y que las personas especializadas en la técnica correspondiente puedan reconocer, dada la descripción del presente documento, las formas de volver a disponer o alterar de otro modo cualquiera de los componentes sin por ello desviarse del alcance o espíritu de la invención.

55

La FIG. 1 ilustra un ejemplo del sistema de cartucho de análisis en el que puede ir integrado el agitador de bolas de acuerdo con una realización. Aunque se haga referencia en el presente documento a la estructura del ejemplo de sistema de cartucho de análisis, las personas especializadas en la técnica reconocerán que las realizaciones del agitador de bolas descritas en el presente documento pueden emplearse en cualquier tipo y configuración de sistema de análisis.

60

El sistema de cartucho de análisis incluye una carcasa de cartucho 102 y un módulo de transferencia 104. Se

65

5 pueden considerar otros componentes también para su inclusión en el sistema de cartucho, tales como un módulo analizador u otros componentes activos, tales como bombas o calentadores. El módulo de transferencia 104 incluye una carcasa interior 110, una cubierta 108 y una tapa 106. La cubierta 108 está diseñada para encajar alrededor de la carcasa interior 110 de acuerdo con una realización. La tapa 106 está diseñada para sellar el extremo del módulo de transferencia 104 para evitar la filtración. El módulo de transferencia 104 está diseñado para su inserción en la carcasa del cartucho 102 a través de un área de estacionamiento de la cámara 120.

10 La carcasa del cartucho 102 incluye una serie de canales fluidicos, cámaras y depósitos. Por ejemplo, la carcasa del cartucho 102 puede incluir una pluralidad de cámaras de almacenamiento 116 que pueden contener diversos tampones u otros reactivos para su uso durante un ensayo o protocolo de PCR. Es posible rellenar previamente las cámaras de almacenamiento 116 con diversos líquidos de manera que el usuario final no necesite cargar las cámaras de almacenamiento 116 antes de colocar el sistema de cartucho de análisis en el analizador. La carcasa del cartucho 102 puede incluir además una o más cámaras de procesamiento 124a-b conectadas a canales fluidicos a lo largo de un lateral de la carcasa del cartucho 102. Las cámaras de procesamiento 124a-b pueden utilizarse para diversos procesamientos y/o aplicaciones de residuos. En un ejemplo, la cámara 124a es una cámara de residuos y la cámara 124b es una cámara dimensionada para recibir la longitud de una torunda que tiene una muestra encima.

15 Se introducen las muestras en la carcasa del cartucho 102 a través de un puerto de muestra 114, de acuerdo con una realización. El usuario puede colocar una torunda completamente dentro del puerto de muestra 114 y su cámara correspondiente 124b y, a continuación, sellar el puerto con la tapa de puerto 112. En otro ejemplo, el puerto de muestra 114 recibe muestras sólidas, semisólidas o líquidas. En una realización, la carcasa del cartucho 102 incluye más de una entrada para introducir las muestras.

20 Las distintas cámaras y canales en torno a la carcasa del cartucho 102 pueden sellarse mediante el uso de cubiertas 118, 126, 127 y 128. Las cubiertas pueden ser películas capaces de sellar el fluido dentro de la carcasa del cartucho 102. En otro ejemplo, las cubiertas pueden ser paneles de plástico. En un ejemplo, una o más de las cubiertas son transparentes. Adicionalmente, una o más de las cubiertas pueden controlarse térmicamente para calentar porciones de la carcasa 102.

25 El sistema de cartucho de análisis integrado permite al usuario, por ejemplo, colocar una muestra en el puerto de muestra 114, colocar después el sistema de cartucho de análisis en un analizador. En realizaciones, pueden realizarse etapas de la reacción, incluyendo por ejemplo purificación, lisis, mezclado, unión, etiquetado y/o detección, dentro del sistema de cartucho de análisis, a través de la interacción con el analizador sin necesidad de que tenga que intervenir el usuario final. Por otra parte, dado que todos los líquidos permanecen sellados dentro del sistema de cartucho de análisis, una vez completado el análisis, se puede retirar el sistema de cartucho de análisis del analizador y desecharse de una forma segura sin contaminar el analizador.

30 El sistema de cartucho de análisis puede incluir además canales fluidicos que conducen a una cámara de procesamiento interior que tiene una apertura 132. En una realización, la cámara de procesamiento interior es una cámara de agitador de bolas integrada dispuesta dentro de la carcasa del cartucho 102. Aunque la cámara en sí está oculta a la vista en la FIG. 1, en la vista despiezada se muestran otros componentes diversos del sistema. Por ejemplo, el sistema de agitador de bolas incluye una tapa de procesamiento 134 que encaja sobre la apertura 132. Dentro de la propia cámara, hay dispuesto un elemento rotatorio 136, de acuerdo con una realización. En una realización, el elemento rotatorio 136 está acoplado con un accionador (no se muestra) a través de un sello 138 y un cojinete 139. El sello 138 y el cojinete 139 pueden sostenerse con un soporte 140. En un ejemplo, el sello 138 es un sello de labios. Se pueden emplear otros tipos de componentes de sellado. El soporte 140 también puede encajar en un extremo de la cámara de procesamiento interior y sellarla contra cualquier filtración. En el presente documento se explicará con más detalle cada uno de los componentes del sistema de agitador de bolas.

35 Las FIG. 2A y 2B ilustran ejemplos de realizaciones de un sistema de agitador de bolas rotatorio. Se da la misma etiqueta numérica a elementos similares en ambas realizaciones. Se expone la descripción de cada una de las realizaciones para describir los elementos que pueden estar presentes encima o dentro del sistema de agitador de bolas, pero no deberán ser exhaustivos en cuanto a la ubicación o las propiedades dimensionales de dichos elementos.

40 Las FIG. 2A y 2B proporcionan una vista en perspectiva del agitador de bolas 201 que puede ir integrado en el sistema de cartucho de análisis de acuerdo con realizaciones. La vista exterior del agitador de bolas 201 ilustrado en la FIG 2B expone la entrada al procesamiento 132 en la superficie superior del agitador de bolas 201 de acuerdo con una realización. En la realización del agitador de bolas ilustrado en la FIG. 2A, la entrada al procesamiento está a un lado del agitador de bolas 201 en el frontal contrario del que muestra la página y por lo tanto no se muestra. La entrada al procesamiento 132 está configurada para aceptar cualquier tipo de muestra incluyendo líquidas, sólidas, semisólidas o cualquier combinación de las mismas. La entrada al procesamiento 132 conduce hasta una cámara cerrada en la que tiene lugar el proceso de batido de bolas. En otro ejemplo, se guía las muestras que entran en la entrada al procesamiento 132 hasta una primera cámara y después se transfieren de la primera cámara a una segunda cámara en la que tiene lugar el proceso de batido con bolas.

En uno de los lados del agitador de bolas 201, se proporcionan entradas de fluido con acoplamiento a la red fluidica. La realización del agitador de bolas de la FIG 2A tiene tres entradas de fluido 203a-c, mientras que la realización del agitador de bolas de la FIG. 2B tiene dos entradas de fluido 203a 203b. Por ejemplo, las entradas 203a-c se pueden acoplar a cualquiera de las cámaras de almacenamiento 116 de la carcasa del cartucho 102. En una realización, las

5 entradas de fluido 203a-c conducen hacia la cámara en la que tiene lugar el batido de bolas. Como tales, las entradas de fluido 203a-c pueden utilizarse para introducir cualquier líquido en la cámara del agitador de bolas, extraer cualquier líquido de la cámara del agitador de bolas o aplicar una presión diferencial en la cámara del agitador de bolas, o cualquier combinación de los mismos. Debe entenderse que puede existir cualquier número de conexiones fluidicas que lleven hasta una o más cámaras de batido de bolas. Asimismo una cualquiera de la

10 pluralidad de conexiones fluidicas puede conducir a una o más cámaras de la carcasa del cartucho 102. En una realización, se acopla una primera red fluidica a las entradas del fluido y se introduce al menos una muestra en la cámara desde un primer depósito, al tiempo que se acopla una segunda red fluidica con las conexiones fluidicas y se utiliza para expulsar al menos la muestra desde la cámara a un segundo depósito. En esta realización, la red fluidica, el agitador de bolas y los depósitos forman un sistema cerrado.

15 Fuera del agitador de bolas 201, está fijado un sistema de accionador 202 con el elemento rotatorio 136 (no se muestra) dispuesto dentro de la cámara del agitador de bolas de acuerdo con una realización. En un ejemplo, el sistema accionador 202 es un accionador rotatorio. El sistema accionador 202 es un accionador rotatorio. El sistema accionador 202 puede recibir varias señales por acoplamiento 204. Las señales pueden incluir por ejemplo señales de potencia y control. El acoplamiento 204 puede representar cables, señales de RF o señales ópticas. El sistema accionador 202 puede hacer girar el elemento rotatorio 136 a una velocidad dentro de la capacidad del sistema accionador 202. En un ejemplo, el sistema accionador 202 hace girar el elemento rotatorio 136 a velocidades comprendidas entre 50 rpm y 30.000 rpm.

25 La realización del agitador de bolas 201 ilustrado en la FIG. 2A también incluye una cavidad 205 dispuesta en la pared lateral del agitador de bolas 201. La cavidad 205 puede estar cubierta con un material térmicamente conductor, como por ejemplo una hoja de aluminio. Al calentar el material térmicamente conductor, es posible calentar el contenido dentro de la cámara de procesamiento interior del agitador de bolas 201 a través de la cavidad 205. Debe entenderse que la ubicación de la cavidad 205 no está limitada al lateral del agitador de bolas 201. La

30 cavidad puede estar dispuesta también en la parte superior del agitador de bolas 201 o sobre la superficie posterior del agitador de bolas 201. En otro ejemplo, una o más de las paredes de la cámara de procesamiento interior pueden ser una superficie térmicamente controlada para calentar el contenido de la cámara de procesamiento interior sin necesidad de una cavidad. Una o más de las paredes de la cámara de procesamiento interior pueden estar fabricadas de metales que tengan una alta conductividad térmica, tales como aluminio, cobre, etc. La

35 introducción de calor en la cámara de procesamiento interior puede permitir que tenga lugar la lisis enzimática. En un ejemplo, es posible realizar la lisis enzimática aplicando el calor apropiado a la muestra antes de que comience el batido de bolas de la muestra real.

40 La FIG. 3A ilustra otra vista del agitador de bolas 201 con el accionador 202 separado del cuerpo principal del agitador de bolas 201. Se proporciona un elemento de acoplamiento 302 para fijar el accionador 202 al elemento rotatorio 136 (no se muestra) dentro de la cámara del agitador de bolas. El elemento de acoplamiento 302 puede ser por ejemplo un eje, una rosca o un rebaje para recibir otro elemento. El accionador 202 está configurado para desprenderse manual o automáticamente del elemento rotatorio 136 dentro de la cámara del agitador de bolas requiriéndose poco esfuerzo por parte del usuario. El elemento de acoplamiento 302 puede estar moldeado

45 adecuadamente para encajar dentro de la porción receptora del elemento rotatorio 136 o puede recibir él mismo una porción del elemento rotatorio 136. De acuerdo con una realización, la rotación del elemento de acoplamiento 302 causa la rotación del elemento rotatorio 136.

50 La FIG. 3B ilustra otra vista del agitador de bolas 201, de acuerdo con una realización. La FIG. 3B ilustra otra vista en ángulo del agitador de bolas 201, tal como se muestra en la FIG. 2A eliminándose el accionador 202. Se muestra el soporte 140 que conecta con un orificio en el lado del agitador de bolas 201 de acuerdo con una realización. Una porción exterior del soporte 140 incluye un rebaje 304. Dentro del rebaje 304, parte del elemento rotatorio 136 se extiende fuera de la cámara cerrada, de acuerdo con un elemento. Esta sección del elemento rotatorio 136 incluye una estructura 306. La estructura 306 se puede designar para que encaje perfectamente en el elemento de

55 acoplamiento 302 desde el accionador 202. En un ejemplo, la rotación del elemento de acoplamiento 302 a través del accionador 202 provoca sustancialmente la misma rotación de la estructura 306 en el extremo del elemento rotatorio 136.

60 La FIG. 4 ilustra una vista despiezada de varios componentes del elemento rotatorio 136 y el accionador 202 de acuerdo con una realización. La apertura 401 del agitador de bolas 201 acepta el soporte 140 que facilita la conexión del accionador 202 con el elemento rotatorio 136, de acuerdo con una realización. Se pueden incluir otros elementos adicionales también para conectar el elemento rotatorio 136 al accionador 202, como por ejemplo un sello 138 y un cojinete 139. Estos elementos también pueden proporcionar una barrera para evitar la filtración de las muestras dentro de la cámara del agitador de bolas desde el área circundante cuando se extiende el elemento rotatorio 136

65 fuera de la cámara.

El eje 402 conecta la estructura 306 en el extremo del elemento rotatorio 136 con un cuerpo rotatorio 404 de acuerdo con una realización. El cuerpo rotatorio 404 puede adoptar diversas formas y tamaños. La longitud del eje 402 puede ajustarse para diversos tamaños de las cámaras del agitador de bolas. Debe advertirse que, en algunas realizaciones, se pretende que todos los componentes mostrados, excepto el accionador 202, sean desechables tras un único uso, o una serie de usos durante un único análisis, del agitador de bolas 201.

Se ilustra asimismo en un lado del agitador de bolas 201 una pluralidad de fritas 406. Cada frita 406 puede incluir diversos materiales diseñados para filtrar o atrapar varios tamaños de partícula. En un ejemplo, la frita 406 es un material plástico que tiene una malla fina con los tamaños de poro seleccionables que pueden oscilar en cualquier punto entre 5 micrómetros y 500 micrómetros. En una realización, la frita 406 tiene un tamaño de poro en torno a 20 micrómetros. El fluido extraído de la cámara del agitador de bolas puede pasar a través de al menos una de las fritas 406 para su filtración.

La FIG. 5 ilustra una vista en el interior de la cámara del agitador de bolas del agitador de bolas 201. Una cámara cerrada 502 proporciona el área en el que tiene lugar la homogeneización y/o lisis de las muestras. En una realización, la cámara cerrada 502 tiene una forma sustancialmente cilíndrica. La forma cilíndrica da lugar a un movimiento fluido eficiente en torno al elemento rotatorio a medida que gira. La cámara cerrada 302 puede tener también una sección transversal rectangular. Es posible considerar también otras formas de cámara cerrada 502 para potenciar la agitación, por ejemplo, de una pluralidad de bolas dispuestas dentro de la cámara cerrada 502. El uso de una pluralidad de bolas para mejorar la homogeneización y/o proceso de lisis se describe con mayor detalle en relación con la FIG. 6B.

Se incluyen varias conexiones fluidicas a la cámara cerrada 502, de acuerdo con una realización. Las entradas de fluido 203a-c se muestran a lo largo de un lateral, tal como se ha descrito anteriormente. En un ejemplo, se puede introducir una muestra y/u otros líquidos en la cámara cerrada 502 a través de la entrada de fluido 203a o 203b. En otro ejemplo, se puede expulsar la mezcla resultante tras la lisis o la homogeneización desde la cámara cerrada 502 a través de la entrada de fluido 203c. Es posible colocar varias conexiones fluidicas en cualquier parte alrededor de la cámara cerrada 502 y en cualquier ángulo. La entrada al procesamiento 132 y la cavidad de calentamiento 205 están ilustradas también en los laterales de la cámara cerrada 502. Una superficie térmicamente controlada puede sellar la cavidad de calentamiento 205 y calentar el contenido de la cámara cerrada 502. En un ejemplo, el calentamiento del contenido de la cámara cerrada 502 hace que tenga lugar la lisis enzimática. En otro ejemplo, se puede hacer girar el eje 402 para agitar la muestra y homogeneizar la temperatura dentro de la cámara cerrada 502 durante el proceso de calentamiento.

La FIG. 6A ilustra una vista lateral del agitador de bolas 201 hacia la entrada del procesamiento 132 en la que se ha retirado la cubierta de acuerdo con una realización. En un ejemplo, se observa el cuerpo rotatorio 404 sustancialmente centrado dentro de la cámara cerrada 502.

La FIG. 6B ilustra una vista transversal del interior de la cámara cerrada 502 que incluye un soporte 140 de acuerdo con una realización. El eje 402 se extiende a través del soporte 140 y conecta el cuerpo rotatorio 404 dentro de la cámara cerrada 502. Uno de los extremos del eje 402 está configurado para encajar en una muesca 602 de la cámara cerrada 402, de acuerdo con una realización. La muesca 602 puede utilizarse para estabilizar la posición del eje 402 dentro de la cámara cerrada 502, al tiempo que sigue permitiendo la rotación del cuerpo rotatorio 404. La cámara cerrada 502 también puede incluir una pluralidad de bolas 604. Las bolas pueden incluirse para favorecer la homogeneización y/o el proceso de lisis de la muestra dentro de la cámara cerrada 502. La rotación del elemento rotatorio 404 también excita una pluralidad de bolas 604 para que entren en movimiento. El tamaño de cada una de las bolas de la pluralidad de bolas 604 puede oscilar entre un micrómetro de diámetro y 300 micrómetros de diámetro. Asimismo, la pluralidad de bolas 604 puede fabricarse con distintos materiales inertes, incluyendo plásticos, vidrio, cerámica y sílice.

Las FIG. 7A – 7E ilustran diversas realizaciones del elemento rotatorio 136. Estas realizaciones son ejemplos y debe entenderse que las personas especializadas en la técnica podrían contemplar otros diseños dada la descripción del presente documento. El elemento rotatorio 136 de cada realización incluye el eje 402 con la estructura 306 en un extremo, tal como se ha descrito anteriormente. Se ilustran diversos diseños para el cuerpo 702 y elementos 704. El cuerpo 702 puede ser de cualquier material adecuado lo suficientemente duro como para realizar la homogeneización de tipos de muestras resistentes, como huesos y tejido. Asimismo, el cuerpo 702 puede ser un material biocompatible. Se proporcionan los elementos 704 para dar al cuerpo 702 una forma según patrón. La rotación de los elementos 704 dentro de la cámara cerrada 502 provoca el rápido movimiento de la muestra y cualquier otro material en torno a la cámara. En otro ejemplo, la rotación de los elementos 704 causa la excitación y el movimiento de la pluralidad de bolas 604. Cada diseño ilustrado incluye también una estacilla 706 en un extremo del elemento rotatorio 136, de acuerdo con algunas realizaciones. La estacilla 706 puede configurarse para que encaje dentro de la muesca 602 de la cámara cerrada 502. Debe entenderse que la estacilla 706 no es un elemento necesario del elemento rotatorio 136, pero puede utilizarse para potenciar la estabilidad dentro de la cámara cerrada 502.

5 Las FIG. 8-11 describen ejemplos de métodos que se pueden emplear para homogeneizar o lisar una muestra con o sin bolas de acuerdo con realizaciones. Debe entenderse que los métodos 800, 900, 1000 y 1100 describen ejemplos de secuencias de operación que se pueden realizar con el agitador de bolas 201 y no deberán considerarse como exhaustivas. Cualquiera de los métodos 800, 900, 1000 y 1100 pueden incluir una etapa de calentamiento del contenido dentro del agitador de bolas 201 para realizar la lisis enzimática. En un ejemplo, se realiza la lisis enzimática antes de que tenga lugar el batido de bolas.

10 La FIG. 8 despliega un organigrama de un ejemplo del método 800 para lisar una muestra utilizando un agitador de bolas 201. El objetivo de la lisis celular es liberar el contenido celular que se requiere para el análisis. Entre los ejemplos de contenido celular se incluyen, sin limitarse a ellos, ADN, ARN, polipéptidos, enzimas, priones, proteínas, anticuerpos, antígenos, alérgenos y virones.

15 En el bloque 802, se introduce al menos una muestra en una cámara cerrada a través de un puerto de entrada conectado a una red fluidica. Se puede introducir la muestra, por ejemplo, a través de las entradas de fluido 203a-c.

En el bloque 804, se hace girar un elemento rotatorio dentro de la cámara rotatoria. El elemento rotatorio está configurado para girar a lo largo de un eje que se extienden a lo largo de un tramo del elemento rotatorio mediante un accionador externo.

20 En el bloque 806, se lisa la muestra dentro de la cámara cerrada en virtud del movimiento del elemento rotatorio. Se puede transferir el lisado de la cámara cerrada a una segunda cámara a través de una de las entradas de fluido 203a-c.

25 La FIG. 9 despliega un organigrama de un ejemplo del método 800 para lisar una muestra utilizando un agitador de bolas 201 que contiene una pluralidad de bolas. El objetivo de la lisis celular es liberar el contenido celular que se requiere para el análisis. Entre los ejemplos de contenidos celulares se incluyen, sin limitarse a ellos, ADN, ARN, polipéptidos, enzimas, priones, proteínas, anticuerpos, antígenos, alérgenos y virones. Las bolas incluidas actúan para acelerar el proceso de desgarrar de las paredes celulares para liberar el contenido celular

30 En el bloque 902, se introduce al menos la muestra en una cámara cerrada a través de un puerto de entrada conectado a una red fluidica. Se puede introducir la muestra, por ejemplo, a través de las entradas de fluido 203a-c.

35 En el bloque 904, se hace girar un elemento rotatorio dentro de la cámara rotatoria. El elemento rotatorio está configurado para girar a lo largo de un eje que se extiende a lo largo de un tramo del elemento rotatorio mediante un accionador externo.

40 En el bloque 906, se excita una pluralidad de bolas dentro de la cámara en virtud del movimiento del elemento rotatorio. Las bolas pueden variar en su forma, tamaño y/o material, tal como se ha descrito anteriormente. El movimiento añadido a las bolas dentro de la cámara proporciona un mayor batido de las células y conduce a un proceso de lisis más eficiente.

45 En el bloque 908, se lisa la muestra dentro de la cámara cerrada en virtud del movimiento del elemento rotatorio y la pluralidad de las bolas. Se puede transferir el lisado de la cámara cerrada a una segunda cámara a través de una de las entradas de fluido 203a-c.

La FIG. 10 despliega un organigrama de un ejemplo del método 1000 para homogeneizar una muestra utilizando un agitador de bolas 201.

50 En el bloque 1002, se introduce al menos una muestra en una cámara cerrada a través de un puerto de entrada conectado a una red fluidica. Se puede introducir la mezcla, por ejemplo, a través de las entradas de fluido 203a-c, o a través de cualquier otro puerto adecuado. En una realización, se puede proporcionar para su homogeneización una muestra sólida, semisólida o líquida. Por ejemplo, las muestras con una alta viscosidad (p.ej., esputos, tejidos, huesos) son muy adecuadas para homogeneización para su descomposición en matrices complejas que retienen los componentes celulares de la muestra.

55 En el bloque 1004, se hace girar un elemento rotatorio dentro de la cámara rotatoria. El elemento rotatorio está configurado para girar a lo largo de un eje que se extienden a lo largo de un tramo del elemento rotatorio mediante un accionador externo.

60 En el bloque 1006, se homogeneiza una muestra dentro de la cámara cerrada en virtud del movimiento del elemento rotatorio. Se puede lisar la muestra homogeneizada utilizando el agitador de bolas 201 o transferirse a otra cámara para posterior procesamiento.

65 La FIG. 11 despliega un organigrama de un ejemplo del método 1000 para la homogeneización de una muestra utilizando un agitador de bolas 201 que contiene una pluralidad de bolas.

En el bloque 1102, se introduce al menos una muestra en una cámara cerrada a través de un puerto de entrada conectado a una red fluidica. Se puede introducir la mezcla, por ejemplo, a través de las entradas de fluido 203a-c, o a través de cualquier otro puerto adecuado. En una realización, se puede proporcionar para su homogeneización una muestra sólida, semisólida o líquida. Por ejemplo, las muestras con una alta viscosidad (p.ej., esputos, tejidos, huesos) son muy adecuadas para su homogeneización para su descomposición en matrices complejas que retienen los componentes celulares de la muestra.

En el bloque 11004, se hace girar un elemento rotatorio dentro de la cámara rotatoria. El elemento rotatorio está configurado para girar a lo largo de un eje que se extienden a lo largo de un tramo del elemento rotatorio mediante un accionador externo.

En el bloque 1106, se excita una pluralidad de bolas dentro de la cámara en virtud del movimiento del elemento rotatorio. Las bolas pueden variar en su forma, tamaño y/o material, tal como se ha descrito anteriormente. El movimiento añadido a las bolas dentro de la cámara proporciona un mayor batido de las muestras y un proceso de homogeneización más eficiente.

En el bloque 1108, se homogeniza la muestra dentro de la cámara cerrada en virtud del movimiento del elemento rotatorio y la pluralidad de bolas. Se puede lisar la muestra homogenizada utilizando el agitador de bolas 201 o transferirse a otra cámara para posterior procesamiento.

Ejemplos

A continuación, se describen ejemplos de protocolos realizados aplicando las realizaciones del agitador de bolas 201. Dichos protocolos son ejemplos únicamente y no limitan las realizaciones de la presente invención. Para los ejemplos de los protocolos se analizaron ADN y ARN extraídos de varias muestras y se compararon con los controles para determinar la eficacia del agitador de bolas. Debe entenderse que las etapas citadas en el presente documento proporcionan únicamente algunos ejemplos del uso del sistema posibles.

EJEMPLO 1: ADN extracción de endosporas de Bacillus subtilis

Bacillus subtilis, conocido también como bacilo del heno o bacilo de la hierba, es una bacteria catalasa positiva y Gram-positiva. Miembro del género *Bacillus*, *B. subtilis*, es baciliforme y tiene la capacidad de formar una endospora protectora y resistente que permite al organismo tolerar condiciones del entorno extremas. Las endosporas de diversas especies de *Bacillus* se forman en esporulación, un proceso inducido generalmente por una reducción de los niveles de nutrientes en el entorno. Las endosporas contienen una corteza esporal externa que es extremadamente resistente a los tratamientos físicos y químicos duros, que conlleva que la identificación de un método de lisis de esporas que pueda completarse en unos minutos constituya un reto.

Un ejemplo de protocolo para la lisis de células de *Bacillus subtilis* es el adaptado de W. Nicholson and P. Setlow, *Molecular Biological Methods for Bacillus*, Nueva York, John Wiley, pp. 391-450, 1990. En este ejemplo de protocolo, se agitan con vórtice 100 ml de cultivo de *Bacillus subtilis*, subespecie *spizizenii* (ATCC 6633) desarrolladas en un medio de esporulación (MS), a continuación, se separa en dos volúmenes de 50 ml. Después de la centrifugación a 3705 g durante 15 minutos, se lava el aglomerado de tres a cinco veces con 50 ml de agua destilada fría esterilizada, centrifugándose cada lavado a 3750 g durante 15 minutos. Se vuelven a suspender los aglomerados finales en 50 ml de agua destilada fría esterilizada. Se tratan las suspensiones de esporas con ADNasa para extraer el ADN residual externo, se cuantifican y se diluyen a una concentración final de 5×10^9 endosporas/ml. Se preparan diluciones en serie con factor de dilución de 10 (5×10^8 , 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 y 50 endosporas/ml) en tampón Tris-EDTA para su uso como material de partida en el agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente.

En primer lugar, se introducen 400 ml de bolas de vidrio lavadas con ácido estériles con un diámetro de 150-212 μm (SIGMA G1145-100G) en la cámara del agitador de bolas. En segundo lugar, se vuelven a suspender 200 μl de dilución de endosporas en 200 μl de tampón Tris-EDTA 1 x y se transfirió a una cámara del agitador de bolas a través de la entrada al procesamiento. Se pone en funcionamiento el agitador de bolas a una velocidad de rotación de 10.000 rpm durante aproximadamente 2 minutos. Se liberan los ácidos nucleicos bacterianos al alterarse las esporas por la acción mecánica del agitador de bolas. Las extracciones de ácido nucleico permanecen estables durante unos meses cuando se almacenan congeladas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ o $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y pueden congelarse y descongelarse varias veces sin una pérdida significativa de la sensibilidad analítica de la PCR.

Se realiza la amplificación y la detección de ADN desde endosporas de *Bacillus subtilis* en el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ de Applied Biosystems con PremixExTaq (sonda PCRq) de Takara (cat. RR390A), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añaden 1,5 μl del lisado preparado directamente a una reacción de PCRq que consiste en 1 x PremixExTaq (que contiene TaKaRa Ex Taq HS, mezcla dNTP, Mg^{2+} y Tli RNaseH), 1 x colorante de referencia ROX, 0,50 μM de cada cebador específico de *Bacillus subtilis* SpoA, 0,20 μM de sonda SpoOA TaqMan® y 0,2 mg/ml de BSA; en un volumen final de 15 μl . De forma paralela, se sometieron a ensayo esporas sin procesado como controles no tratados (a las mismas concentraciones). Se añadieron también 1,5 μl de agua destilada a una reacción PCRq como control negativo. Las condiciones óptimas de los ciclos para una

5 sensibilidad y especificidad máxima son 10 segundos a 95 °C para una desnaturalización inicial, a continuación 50 ciclos de dos etapas de consisten en 1 segundo a 95 °C y 10 segundos a 60 °C. Se lleva un seguimiento de la amplificación durante cada ciclo de elongación midiendo el nivel de fluorescencia. También se calculan las concentraciones de ADN interpolando los valores Ct (número de ciclos PCR necesarios para producir una señal positiva) en una curva de calibración. En la Tabla 1 a continuación, se proporcionan cebadores específicos de *Bacillus subtilis* SpoOA y la secuencia de sonda utilizada en la reacción de PCRq TaqMan®.

Tabla 1

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Longitud (pb)	Tamaño de producto (pb)
SpoOA F	ccatcatcgcaaagcagatt	21	70
SpoOA R	tgggacgccgatttcag	18	
Sonda SpoOA	ctcgacgcgagcatcacaagcatt	24	

10 La FIG. 12 proporciona un gráfico de los resultados del protocolo de extracción de ADN para *Bacillus subtilis*. Se muestran los resultados sobre la base de la concentración de ADN extraído en comparación con la concentración de partida de las esporas *Bacillus subtilis*. Los resultados son la media de 15 replicados a cada concentración. Tal como se observa, las endosporas, lisadas con el agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente produjeron concentraciones de ADN más altas que las endosporas sin tratar para cada concentración de partida de las esporas de *Bacillus subtilis*.

EJEMPLO 2: Extracción de ADN de células vegetales de *Bacillus subtilis*

20 En este ejemplo, en primer lugar se carga el agitador de bolas con 400 mg de bolas de vidrio lavadas con ácido estériles con un diámetro de 150-212 µm (SIGMA G1145-100G). Se centrifuga un volumen de 3 ml de caldo de cultivo de células vegetales de la subespecie de *Bacillus subtilis spizizenii* (ATCC 6633) en la fase de crecimiento media-log (Diámetro exterior O.D. 550 = 0,60-070) y se vuelve a suspender el aglomerado en tampón Tris-EDTA para obtener una concentración final de *Bacillus subtilis* a 5×10^8 UFC/ml. Se preparan diluciones con un factor de dilución 10 (5×10^8 , 5×10^6 , 5×10^4 , 5×10^2 y 5 UFC/ml) en tampón Tris-EDTA. Se vuelven a suspender 200 µl la dilución de células vegetales en 200 µl de tampón Tris-EDTA 1 x y se transfiere la mezcla final al dispositivo del agitador de bolas por la entrada al procesamiento. Se pone en funcionamiento el agitador de bolas con una velocidad de rotación de 10.000 rpm durante aproximadamente 2 minutos.

30 Se realiza la amplificación y la detección de ADN fijado de células vegetales de *Bacillus subtilis* en el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ de Applied Biosystems con PremixEx Taq (sonda PCRq) de Takara (cat. RR390A), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añaden 1,5 µl del lisado preparado directamente a una reacción PCRq que consistió en 1 x de Premix Ex Taq (contiene TaKaRa Ex. Taq HS, mezcla dNTP, Mg²⁺ y Tli RNaseH), 1 x colorante de referencia ROX, 0,50 µM de cada cebador específico de *Bacillus subtilis* SpoA, 0,20 µM de sonda TaqMan® SpoOA (véase tabla 1 del Ejemplo 1) y 0,2 mg/ml de BSA; en un volumen final de 15 µl. De forma paralela, se someten a ensayo células vegetales sin procesar como controles sin tratar (a las mismas concentraciones). Se añaden 1,5 µl de agua destilada también a una reacción de PCRq como control negativo. Las condiciones de ciclo óptimas para la máxima sensibilidad y especificidad son 10 segundos a 95 °C durante la desnaturalización inicial, a continuación, 50 ciclos de dos etapas que consisten en 1 segundo a 95 °C y 10 segundos a 60 °C. Se lleva un seguimiento de la amplificación durante cada ciclo de elongación midiendo el nivel de fluorescencia. Se calculan asimismo las concentraciones de ADN por interpolación de los valores Ct en una curva de calibración.

45 La FIG. 13 proporciona un gráfico de los resultados del protocolo de extracción de ADN para células vegetales de *Bacillus subtilis*. Los resultados se muestran sobre la base de la concentración de ADN extraído en comparación con la concentración de partida de las células. Los resultados son la media de 15 replicados a cada concentración. La detección del lisado de células vegetales de *B. subtilis* con el agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente fue aproximadamente entre 50 y 500 UFC/ml (10-100 UFC por reacción). No se observó ninguna señal de amplificación en las células vegetales de *B. subtilis* sin tratar hasta una concentración de $5,0 \times 10^4$ UFC/ml.

50 EJEMPLO 3: Comparación de la recuperación de ADN para células vegetales de *Bacillus subtilis*

En este ejemplo, se extrae control de ADN de células vegetales de la subespecie de *Bacillus subtilis spizizenii* (ATCC 6633) utilizando un kit de purificación ARN/ADN/Proteína de Norgen. Para cada muestra, se fijan 1,6 ng de ADN en 800 µl de una solución tamponada que también incluye un agente quelante (tampón Tris-EDTA 1 x, preparado de SIGMA tampón Tris-EDTA 100 x concentrado).

60 De forma paralela, se lleva a cabo el protocolo de lisis en las células vegetales de *Bacillus subtilis* preparadas sustancialmente de la misma manera y utilizando el agitador de bolas que tiene sustancialmente las mismas bolas de vidrio que las descritas en los ejemplos anteriores. Se pone en funcionamiento el agitador a una velocidad de rotación de 20.000 rpm durante aproximadamente 3 minutos para lisar la muestra.

En este ejemplo, se realiza la amplificación y detección del ADN fijado en el sistema de PCR en tiempo real StpOnePlus™ de Applied Biosystem con PremixEx Taq (sonda PCRq) de Takara (cat. RR390A), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añaden 1,5 µl del lisado preparado directamente a una reacción PCRq que consistió en 1 x de Premix Ex Taq (contiene TaKaRa Ex. Taq HS, mezcla dNTP, Mg²⁺ y Tli RNaseH), 1 x colorante de referencia ROX, 0,50 µM de cada cebador específico de *Bacillus subtilis* SpoA, 0,20 µM de sonda TaqMan® SpoOA (véase tabla 1 del Ejemplo 1) y 0,2 mg/ml de BSA; en un volumen final de 15 µl. De forma paralela, se somete a ensayo ADN sin procesamiento como control positivo (a la misma concentración). Se añade asimismo 1,5 µl de agua destilada a una reacción de PCRq como control negativo.

La Tabla 2 proporciona los resultados de la concentración de ADN de la lisis del agitador de bolas frente al control positivo. Las muestras de control negativo indicaron que no estaba presente ADN. Asimismo se dan los valores Ct para ambos métodos de lisis. La FIG. 14 ilustra un gráfico del promedio de ADN recuperando utilizando el agitador de bolas en comparación con el control positivo. La recuperación de ADN tras la lisis mecánica con el agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente es comparable a la del control positivo (diferencia de aproximadamente 7,6 %). No se observó la degradación de ADN tras el proceso con el agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente.

Tabla 2

Tratamiento	Valores medios Ct	Conc. ADN promedio de PCRq (ng/µl)	% Recuperación
ADN fijado – Agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente	30,20	1,04E-03	92,4
Control positivo ADN	29,54	1,12E-03	100,0
Control Negativo	Sin D	Sin D	No

EJEMPLO 4: Extracción de ADN y ARN de células vegetales de *Bacillus subtilis*

Este ejemplo de experimento muestra que ARN, adecuado para la síntesis de ADNc y la amplificación por PCRp-RT, puede extraerse desde células bacterianas utilizando el agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente. Se centrifuga un volumen de 3 ml de caldo de cultivo de células vegetales de la subespecie de *Bacillus subtilis spizizenii* (ATCC 6633) en la fase de crecimiento media-log (Diámetro exterior O.D. 550 = 0,60-0,70) y se vuelve a suspender el aglomerado en tampón Tris-EDTA para obtener una concentración final de *Bacillus subtilis* a 5 x 10⁶ UFC/ml. Se prepara una dilución de 5 x 10⁴ UFC/ml en tampón Tris-EDTA para utilizarla como material de partida en el agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente.

Se prepara el agitador de bolas sustancialmente con las mismas bolas de vidrio que las descritas en los ejemplos anteriores y se carga con una dilución de 200 µl de células vegetales re-suspendidas en 200 µl de tampón Tris-EDTA 1 x. Se pone en funcionamiento el agitador de bolas a una velocidad de rotación de 20.000 rpm durante aproximadamente 3 minutos para lisar la muestra.

Se lleva a cabo la purificación de los lisados de *Bacillus subtilis* en este ejemplo con dos kits de purificación diferentes comerciales de Norgen (kit de purificación de ARN/ADN/proteína) y Fermentas (GeneJET Viral, kit de purificación de ADN viral /ARN). Se lleva a cabo la amplificación y detección de ARN y ADN desde células vegetales de *Bacillus subtilis* en el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ de Applied Biosystems con un kit de PCR en tiempo real Step PrimeScript™ (Tiempo Real Perfecto) de Takara (cat. RR064A), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añaden 2,0 µl del lisado preparado directamente en dos mezclas de PCRq en tiempo real con y sin enzima transcriptasa inversa (Mezcla II de enzima PrimeScript RT) para detectar ARN y ADN. Las mezclas finales consisten en 1 x tampón III PCR-RT OneStep (incluye mezcla de dNTP, Mg²⁺), 0,1 U/µl TaKaRa ex Taq HS, 1x mezcla II de enzima PrimeScript RT (en la mezcla RT+), 1 x colorante de referencia ROX, 0,38 µM de cada cebador específico de *Bacillus subtilis* SpoA, 0,15 µM de sonda TaqMan® SpoOA (véase tabla 1 del Ejemplo 1); en un volumen final de 20 µl. De forma paralela, se someten a ensayo células vegetales sin procesar como control sin tratar (a las mismas concentraciones). Se añaden 2,0 µl de agua destilada también a una reacción de PCRq en tiempo real (± enzima TR) como control negativo. La primera etapa es de 5 min a 42 °C para la transcripción inversa (síntesis ADNc). Las condiciones de ciclo óptimas para la máxima sensibilidad y especificidad son 10 segundos a 95 °C durante la desnaturalización inicial, a continuación, 50 ciclos de dos etapas que consisten en 1 segundo a 95 °C y 10 segundos a 60 °C. Se lleva un seguimiento de la amplificación durante cada ciclo de elongación midiendo el nivel de fluorescencia. Se calculan asimismo las concentraciones de ADN y ARN por interpolación de los valores Ct en su correspondiente curva de calibración.

La FIG. 15 muestra una presentación gráfica de las concentraciones medias de recuperación de ARN y ADN (ng/µl) en las diferentes condiciones de análisis: Del lisado de NA tras el agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente, del lisado AN tras el agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente y purificación con kit de purificación Norgen, del lisado AN tras el agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente y purificación con el kit de purificación Fermentas y de la re-suspensión de *B. subtilis* sin tratar. Los resultados son la media de 15 replicados a cada concentración. La recuperación de ácido nucleico en lo que se refiere a las concentraciones de ADN y ARN aumentó tras la lisis mecánica con el agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente en comparación con el estado sin tratar, especialmente en lo que se refiere a la recuperación de ARN. Después de la purificación de ácido nucleico, disminuyó el % de recuperación de AN (25-30 % frente al estado no purificado) debido al proceso de purificación de

membrana.

EJEMPLO 5: Comparación de recuperación de ARN de células vegetales de *Bacillus subtilis*

- 5 En este ejemplo, se extrae control de ARN de células vegetales de la subespecie de *B. subtilis spizizenii* (ATCC 6633) utilizando el kit de purificación de ARN/ADN/Proteína de Norgen. Se fija para cada una de las muestras, 9,00 ng de ARN, en 800 µl de una solución tamponada que también incluye un agente quelante (tampón Tris-EDTA 1 x, nucleasas libres de SIGMA).
- 10 De forma paralela, se lleva a cabo un protocolo de lisis sobre células vegetales e *Bacillus subtilis* preparadas de la misma forma sustancialmente y utilizando un agitador de bolas que tiene sustancialmente las mismas bolas de vidrio que las descritas en los ejemplos previos. Se pone en funcionamiento el agitador rotatorio a una velocidad de rotación de 20.000 rpm durante aproximadamente 3 minutos para lisar la muestra.
- 15 En este ejemplo, se lleva a cabo la amplificación y la detección de ARN fijado en un sistema de PCR tiempo real StepOnePlus™ de Applied Biosystems con un kit de PCR en tiempo real Step Prime Script™ (Tiempo Real Perfecto) de TaKaRa (cat. RR064A), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añaden 2,0 µl de lisado preparado directamente a la reacción de PCRq en tiempo real que consiste en 1 x One Step RT-tampón III de PCR (incluye mezcla de dNTP, Mg²⁺), 0,1 U/µl TaKaRa ex Taq HS, 1x mezcla II de enzimas PrimeScrip RT, 1 x colorante de referencia ROX, 0,38 µM de cada uno de cebador específico de *Bacillus subtilis* SpoA y 0,15 µM de sonda SpoA TaqMan® (véase la Tabla 1 del Ejemplo 1), en un volumen final de 20 µl. De forma paralela, se somete a ensayo ARN sin procesar como control positivo (a la misma concentración). Se añaden también 2,0 µl de agua destilada a una reacción de PCRq en tiempo real como control negativo.
- 20
- 25 La Tabla 3 proporciona los resultados de la concentración de ARN recuperado de la lisis con agitador de bolas frente al control positivo. Las muestras de control negativo indicaron que no estaba presente ARN. Se dan también valores Ct (número de ciclos de PCR necesario para producir una señal positiva) para ambos métodos de lisis. La FIG. 16 ilustra un gráfico del promedio de ARN recuperado utilizando el agitador de bolas en comparación con el control positivo. La recuperación de ARN después de la lisis mecánica con el agitador de bolas rotatorio integrado
- 30 fluidicamente es comparable con el control positivo (diferencia de aproximadamente 5,3 %). No se observó degradación de ARN tras el proceso con agitador de bolas rotatorio integrada fluidicamente.

Tabla 3

Tratamiento	Valores medios Ct	Conc. ADN promedio de PCRq (ng/µl)	% Recuperación
ARN fijado – Agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente	30,04	5,24E-03	105,3
Control positivo ARN	30,10	4,98E-03	100,0
Control Negativo	Sin D	Sin D	No

35 **EJEMPLO 6: Análisis de integridad de ARN**

- En este ejemplo, un bioanalizador Agilent con un kit LabChip® asociado proporciona un método particularmente eficaz para evaluar la integridad de ARN. El analizador Agilent 2100 es una plataforma basada en tecnología microfluidica para determinar el tamaño, cuantificar y realizar el control de calidad de ADN, ARN, proteínas y células.
- 40 Se puede utilizar para examinar la calidad de ARN total observando los picos ribosómicos 16S y 23S de procariotas y su relación. La relación de las áreas por debajo de los picos 23S:16S es una medida de pureza de ARN y debería entrar dentro del intervalo de 1,5-2,0.

- Se ponen en circulación en un bioanalizador Agilent 2100 muestras de ARN (1 µl) de ARN sin tratar y lisados de ácido nucleico de agitador de bolas rotatorio integrado fluidicamente utilizando un kit RNA 6000 Pico de Agilent (cat. No. 5067-1513) y kit RNA 6000 Nano de Agilent (cat. No. 5067-1511) para el análisis del total de ARN (eucariota y procariota) y muestras de ARNm. La FIG. 16A proporciona un perfil de ARNr de bioanalizador para el control de ARN sin tratar (referencia), mientras que las FIG. 16B y 16C proporcionan perfiles de ARNr del bioanalizador para dos muestras diferentes lisadas con el agitador de bolas rotatorio. Tal como se observa, las relaciones de ARNr en los dos ejemplos de las muestras de ácido nucleico procesadas en el agitador de bolas rotatorio integrado
- 50 fluidicamente están dentro de las especificaciones (1,5-2,0), lo que significa que la integridad de ARN es correcta. Los picos 23S y 16S de las muestras del agitador de bolas son llamativamente más pequeños que la muestra de control. Esto se debe a que los lisados son una mezcla de ARN y ADN y la presencia de ADN en las muestras del agitador de bolas afecta a la resolución del electroferograma del bioanalizador Agilent.
- 55

- La descripción que se ha expuesto de realizaciones y ejemplos concretos revelará totalmente la naturaleza general de la invención según la cual son posibles otros aplicando los conocimientos que tienen las personas especializadas en la técnica, modificando fácilmente y/o adaptando dichas realizaciones concretas para diversas aplicaciones sin una experimentación indebida y sin alejarse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, se pretende que dichas adaptaciones y modificaciones entren dentro del significado el alcance de los equivalentes de las
- 60

realizaciones divulgadas sobre la base de las instrucciones y la guía expuesta en el presente documento. Debe entenderse que la fraseología o terminología en el presente documento tiene como fin la descripción y no la limitación, de modo que las personas especializadas deberán interpretar la terminología o fraseología de la presente memoria descriptiva a la luz de dichas instrucciones y guía.

5 Se han descrito las realizaciones de la presente invención con la ayuda de bloques de construcción funcionales que ilustran la implementación de funciones concretas y sus relaciones. Los límites de estos bloques de construcción funcional se han definido en el presente documento de forma arbitraria para facilitar la descripción. Se pueden definir otros límites siempre y cuando se realicen las funciones concretas y sus relaciones de forma apropiada.

10 Las secciones del sumario y el resumen pueden exponer uno o más, pero no todos los ejemplos de realizaciones de la presente invención tal como las contemplan el (los) autor(es) de la invención y por tanto no se pretende que limiten la presente invención ni las reivindicaciones adjuntas en forma alguna.

15 El espíritu y alcance de la presente no deberá quedar limitado en absoluto con los ejemplos de realizaciones descritas sino que se deberá definir únicamente de acuerdo con las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para realizar al menos una entre homogeneización y lisis de una muestra, comprendiendo el sistema:
- 5 un sistema de cartucho de análisis desechable configurado para acoplarse de forma extraíble a un analizador y que comprende:
- un primer depósito (124B);
 un segundo depósito (116);
 10 una o más paredes que forman una cámara cerrada (502) que tiene una entrada (132) y una pluralidad de conexiones fluídicas (203a-c), en las que al menos una de las una o más paredes de la cámara cerrada comprende una superficie térmicamente controlada;
 una primera red fluídica acoplada a al menos una entre la pluralidad de conexiones fluídicas (203a-c) y configurada para introducir al menos la muestra en la cámara cerrada (502) del al menos un primer depósito (124B);
 15 una segunda red fluídica acoplada a al menos una entre la pluralidad de conexiones fluídicas (203a-c) y configurada para expulsar al menos la muestra de la cámara cerrada (502) a al menos un segundo depósito (116); y
 un elemento rotatorio (136) dispuesto dentro de la cámara cerrada; y
- 20 un accionador (202) acoplado al elemento rotatorio (136) del sistema de cartucho de análisis desechable y configurado para hacer girar el elemento rotatorio (136) en torno a un eje que se extiende a lo largo de un tramo del elemento rotatorio (136).
- 25 2. El sistema de la reivindicación 1, en el que una o más de las paredes forman una cámara cerrada sustancialmente cilíndrica (502).
3. El sistema de la reivindicación 1, en el que una o más de las paredes forman una cámara cerrada (502) que tiene una sección transversal rectangular.
- 30 4. El sistema de la reivindicación 1, en el que la entrada (132) está configurada para introducir muestras sólidas, semisólidas o líquidas desde un entorno exterior.
5. El sistema de la reivindicación 1, en el que la entrada (132) está localizada en la parte superior de la cámara cerrada (502).
- 35 6. El sistema de la reivindicación 1, en el que la entrada (132) está localizada a un lado de la cámara cerrada (502).
7. El sistema de la reivindicación 1, que comprende además una tapa (134) configurada para encajar sobre la entrada (132) y prevenir fugas.
- 40 8. El sistema de la reivindicación 1, en el que al menos una porción de la primera red fluídica o la segunda red fluídica está configurada para presurizar o despresurizar la cámara cerrada (502).
- 45 9. El sistema de la reivindicación 1, que comprende además una tercera red fluídica acoplada a la cámara cerrada (502) y configurada para presurizar o despresurizar la cámara cerrada (502).
10. El sistema de la reivindicación 1, que comprende además una pluralidad de bolas (604) dispuestas dentro de la cámara cerrada.
- 50 11. El sistema de la reivindicación 10, en el que la pluralidad de bolas (604) comprende materiales seleccionados del grupo que consiste en plástico, vidrio, cerámica o sílice.
12. El sistema de la reivindicación 10, en el que la pluralidad de bolas (604) oscila en su diámetro entre 1 micrómetro y aproximadamente 3000 micrómetros.
- 55 13. El sistema de la reivindicación 10, en el que el elemento rotatorio (136) está configurado para excitar la pluralidad de bolas (604).
- 60 14. El sistema de la reivindicación 1, en el que el accionador (202) está acoplado extraíblemente con el elemento rotatorio (136) a través de un mecanismo de acoplamiento (302).
15. El sistema de la reivindicación 14, que comprende además un soporte (140) dispuesto sustancialmente en el mecanismo de acoplamiento (302) y configurado para prevenir fugas.
- 65

16. El sistema de la reivindicación 1, que comprende además una cavidad (205) dispuesta en un lado de la cámara cerrada (502), tal que una superficie calentada ubicada contra la cavidad (205) eleva sustancialmente la temperatura dentro de la cámara cerrada (502).
- 5 17. El sistema de la reivindicación 1, en el que el sistema de cartucho de análisis desechable comprende además una cámara central móvil (104) acoplada con al menos una entre la primera red fluidica y la segunda red fluidica.
18. Un método para homogeneizar una muestra que comprende:
- 10 introducir al menos la muestra en una cámara cerrada (502) a través de una conexión fluidica (203a-c) acoplada a una red fluidica que está acoplada además a otra u otras cámaras (116), en las que una o más paredes de la cámara cerrada (502) comprende una superficie térmicamente controlada, en el que la cámara cerrada (502), la conexión fluidica (203a-c), la red fluidica y la otra u otras cámaras (116) están dispuestas dentro de un sistema de cartucho de análisis desechable;
- 15 hacer girar un elemento rotatorio (136) dispuesto dentro de la cámara cerrada (502) a lo largo de un eje que se extiende a lo largo de un tramo del elemento rotatorio (136); y homogeneizar la muestra dentro de la cámara cerrada (502) en virtud del movimiento del elemento rotatorio (136).
- 20 19. Un método para lisar una muestra que comprende:
- introducir al menos la muestra en una cámara cerrada (502) a través de una conexión fluidica (203a-c) acoplada a una red fluidica que está acoplada además a otra u otras cámaras (116), en la que una o más paredes de la cámara cerrada (502) comprende una superficie térmicamente controlada, en el que la cámara cerrada (502), la conexión fluidica (203a-c), la red fluidica y la otra u otras cámaras (116) están dispuestas dentro de un sistema de cartucho de análisis desechable;
- 25 hacer girar un elemento rotatorio (136) dispuesto dentro de la cámara cerrada (502) a lo largo de un eje que se extiende a lo largo de un tramo del elemento rotatorio (136); y lisar la muestra dentro de la cámara cerrada (502) a través del movimiento del elemento rotatorio (136).
- 30 20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19 que comprende además la expulsión de al menos la muestra desde la cámara cerrada (502) a través de otra conexión fluidica (203a-c) acoplada a la red fluidica.
- 35 21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, que comprende además la presurización o despresurización de la cámara cerrada (502) a través de la red fluidica.
22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, que comprende además fijar un accionador (202) a un elemento rotatorio (136) a través de un mecanismo de acoplamiento (302).
- 40 23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, que comprende además introducir al menos la muestra en la cámara cerrada (502) a través de una entrada (132) configurada para introducir muestras desde un entorno exterior.
- 45 24. El método de la reivindicación 23, en el que la introducción de al menos la muestra a través de la entrada (132) comprende introducir muestras sólidas, semisólidas o líquidas.
25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, que comprende además calentar la muestra a través de una cavidad (205) dispuesta en un lado de la cámara cerrada (502).
- 50 26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, que comprende además excitar una pluralidad de bolas (604) dispuesta dentro de la cámara cerrada (502) en virtud del movimiento del elemento rotatorio.

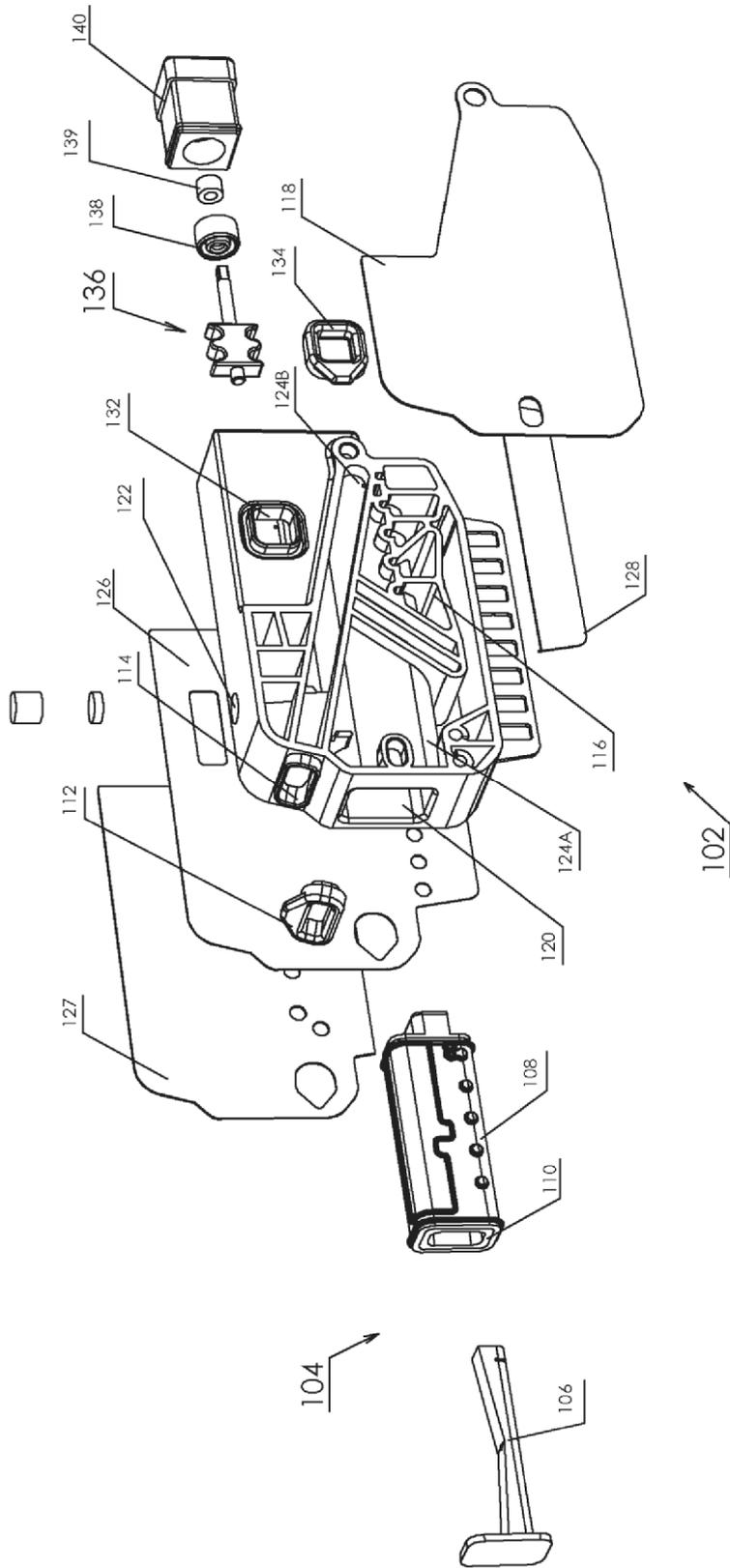


Fig. 1

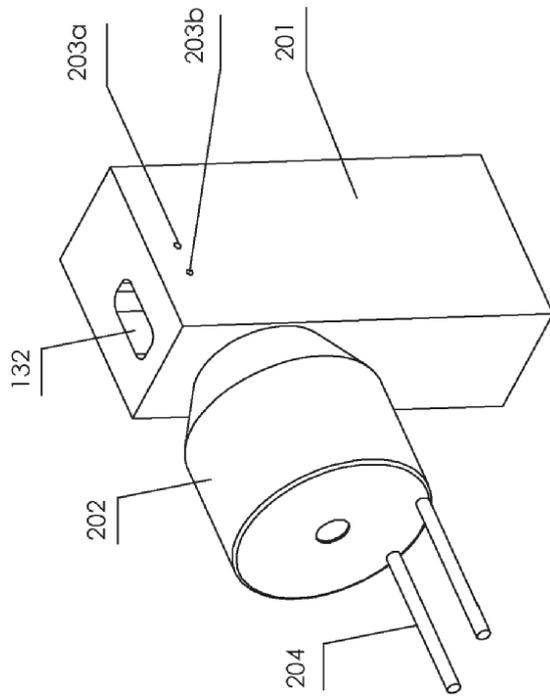


Fig. 2B

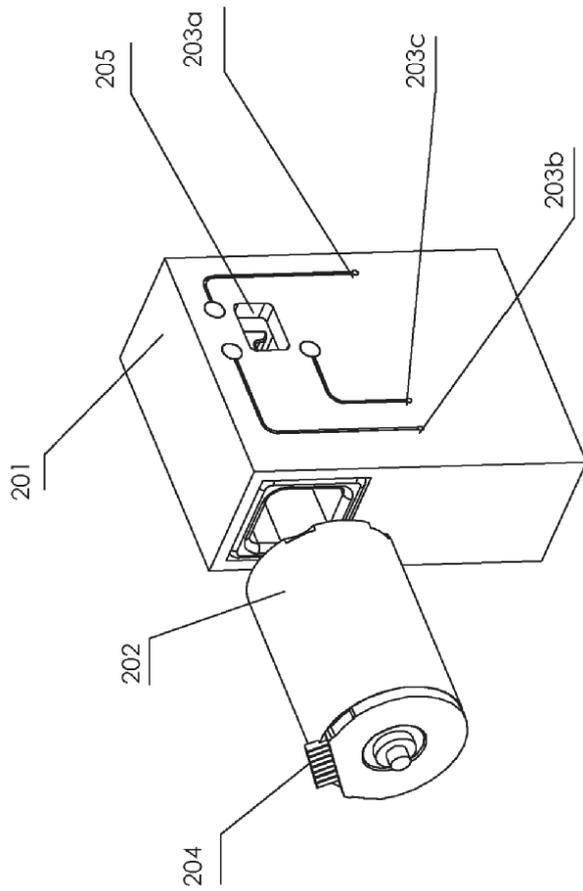


Fig. 2A

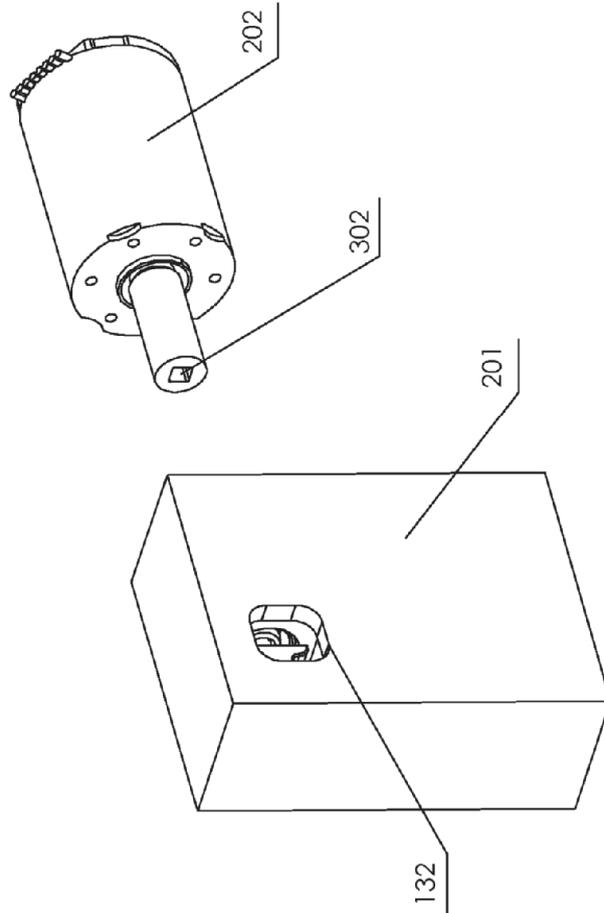


Fig.3A

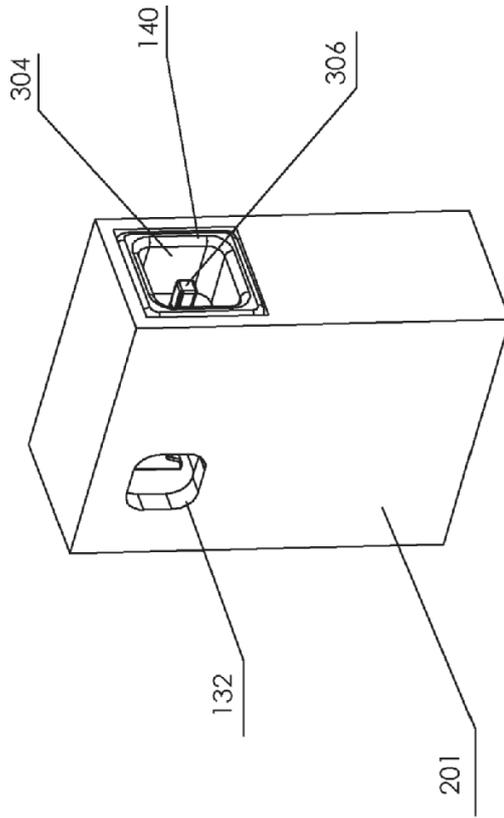


Fig. 3B

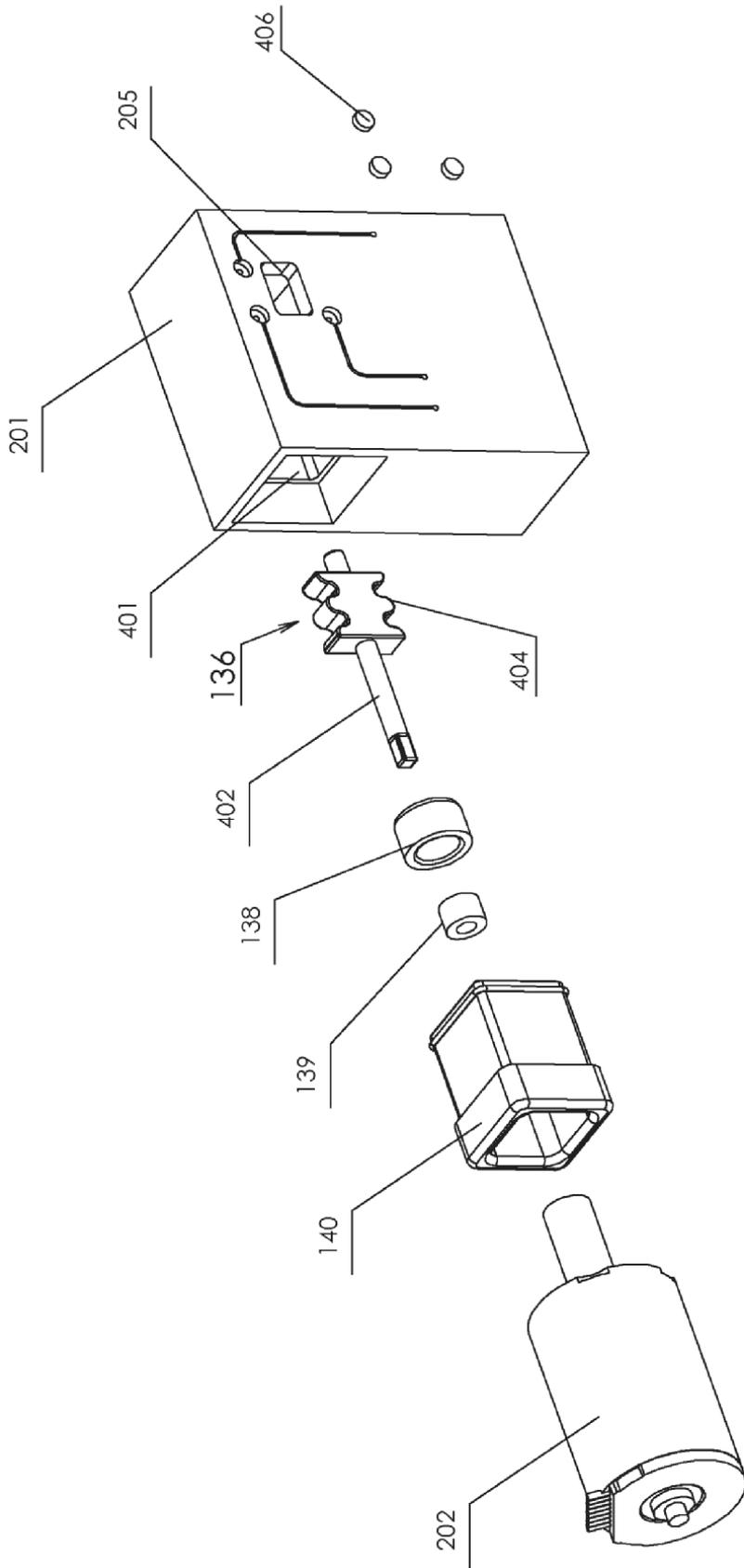


Fig.4

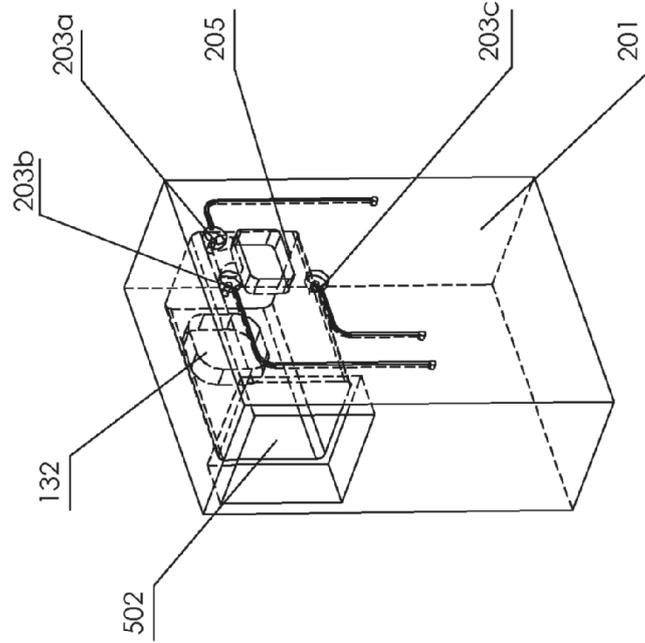


Fig.5

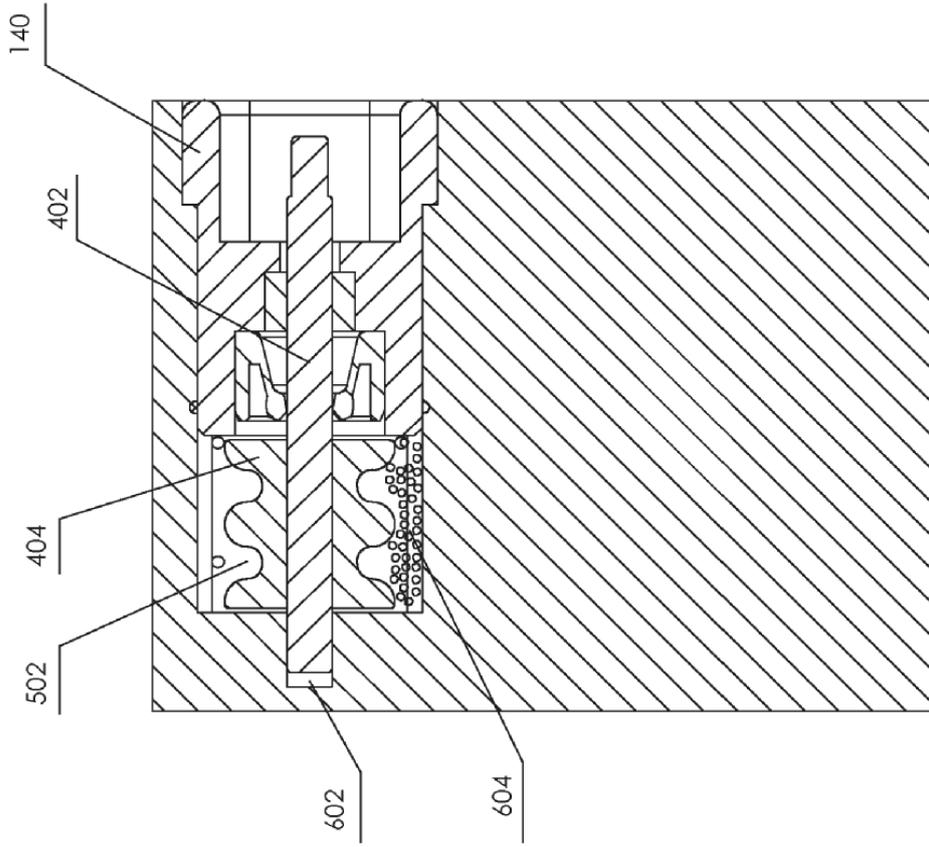


Fig.6B

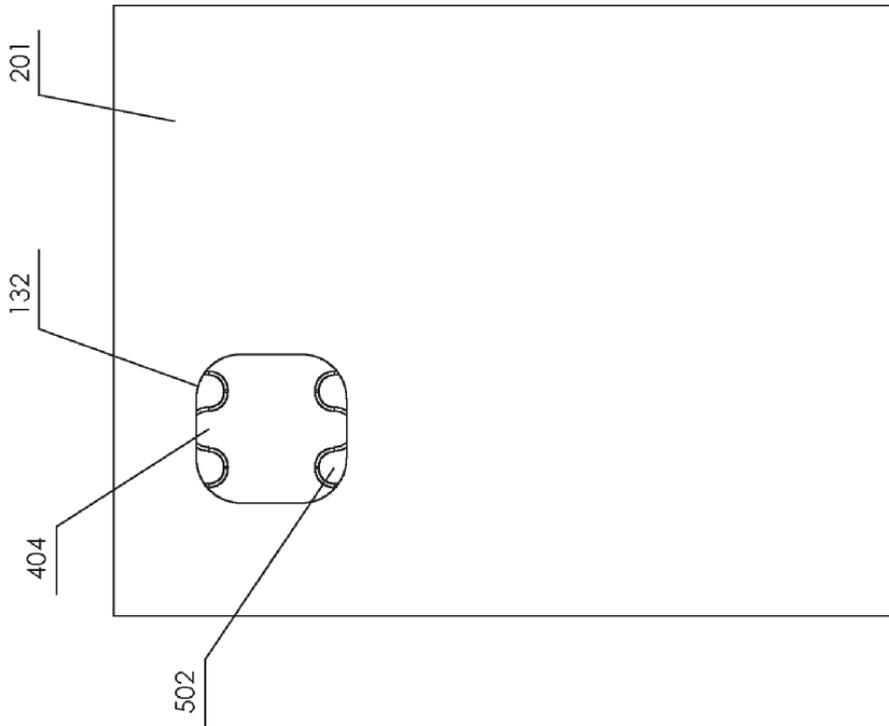


Fig.6A

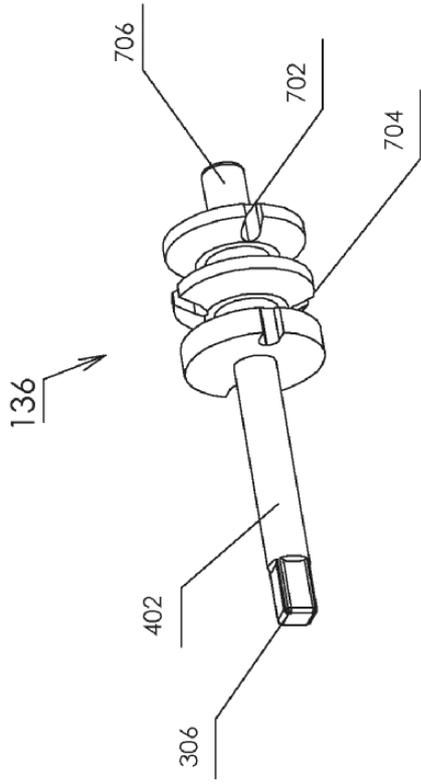


Fig. 7A

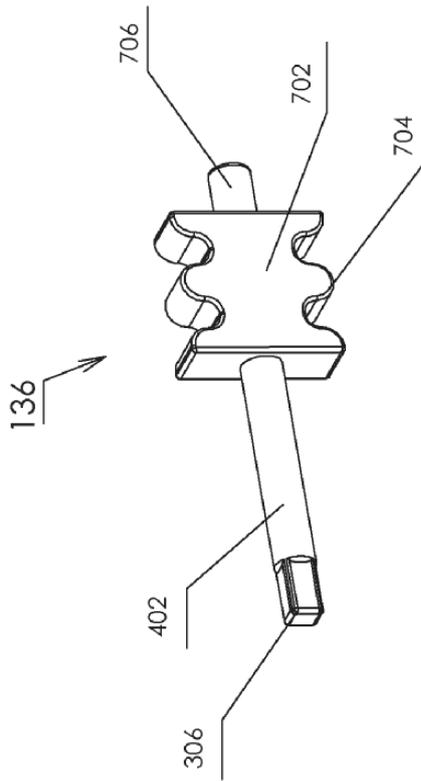


Fig. 7B

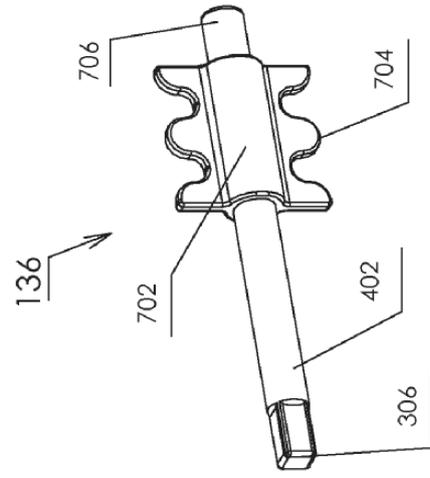


Fig. 7C

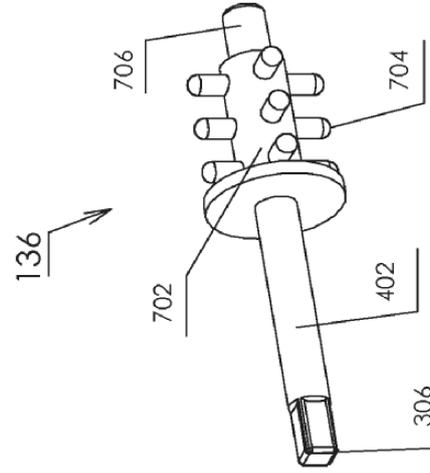


Fig. 7D

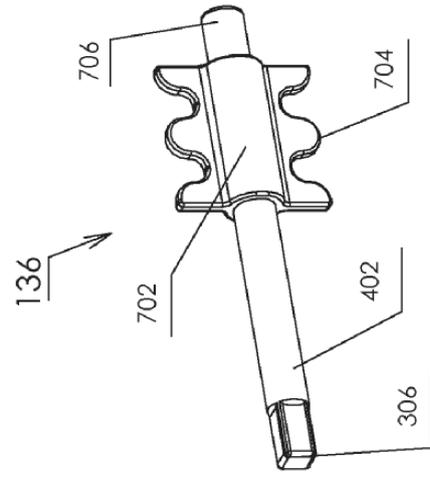


Fig. 7E

800

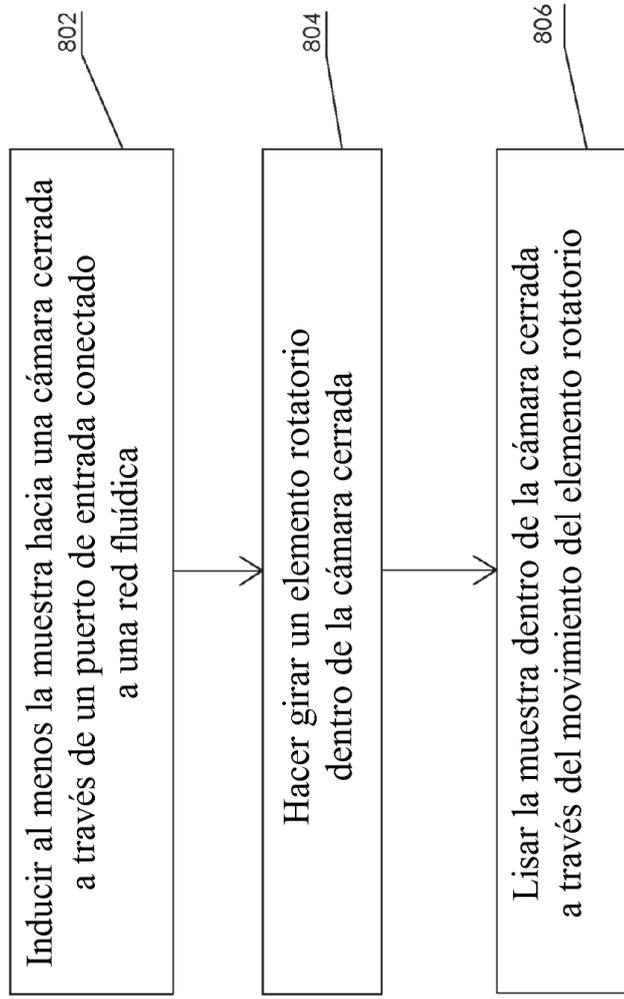


Fig.8

900

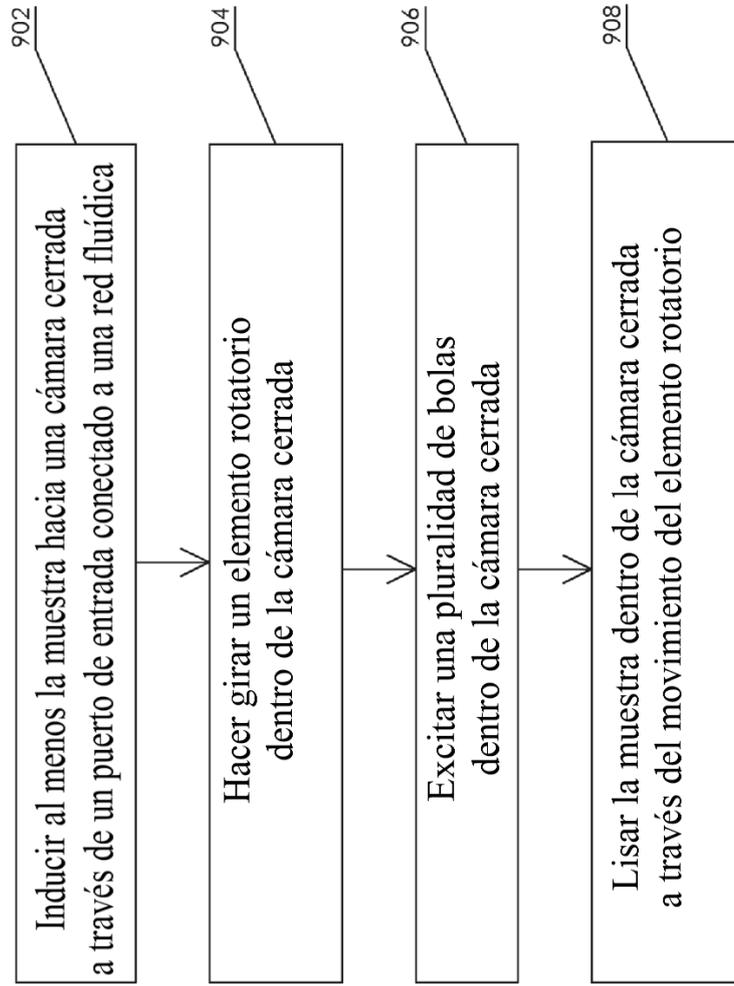


Fig.9

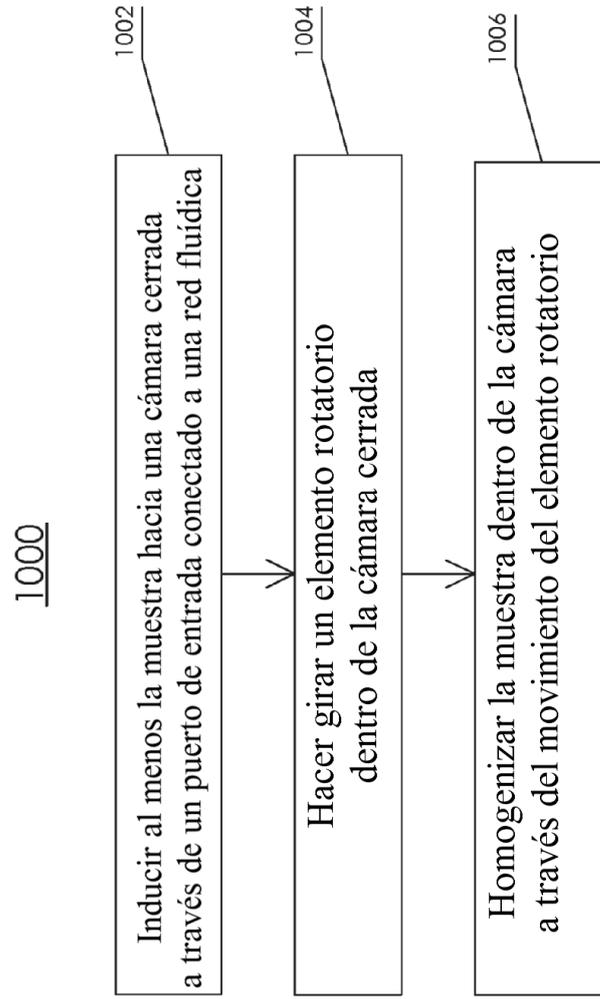


Fig.10

1100

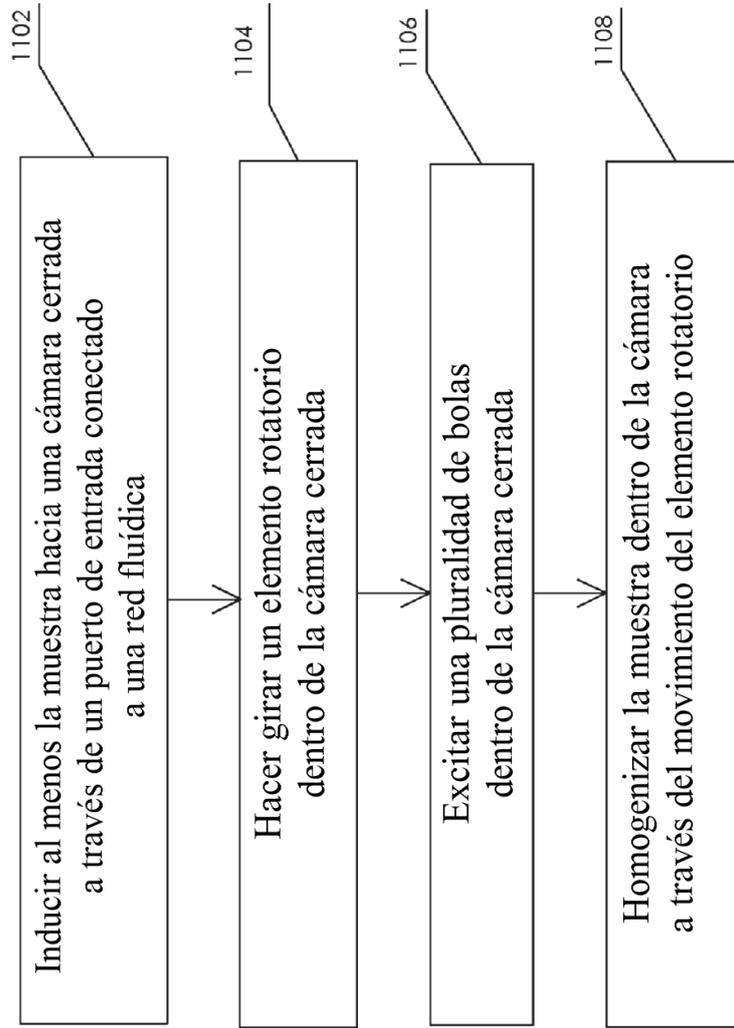


Fig.11

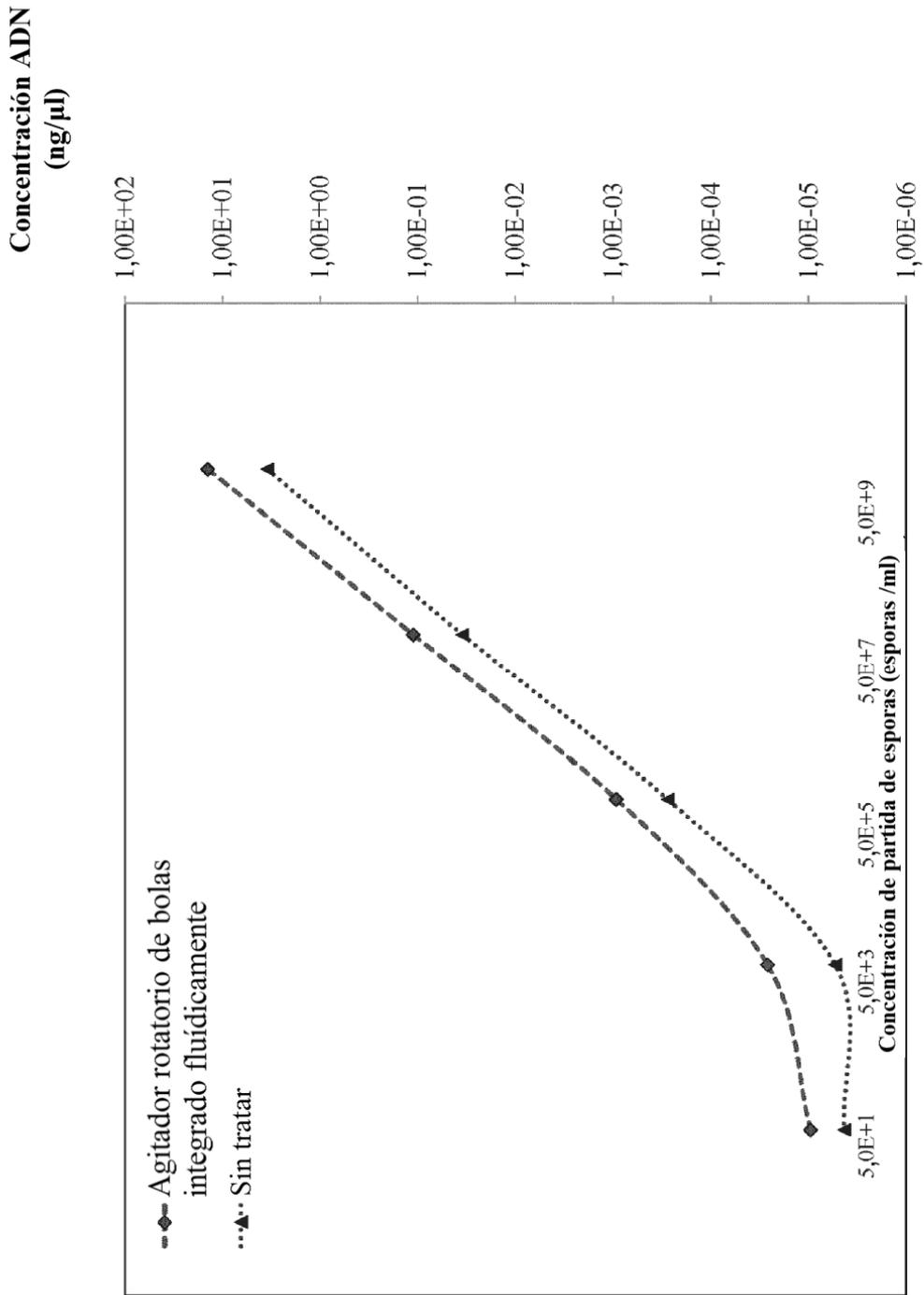


Fig. 12

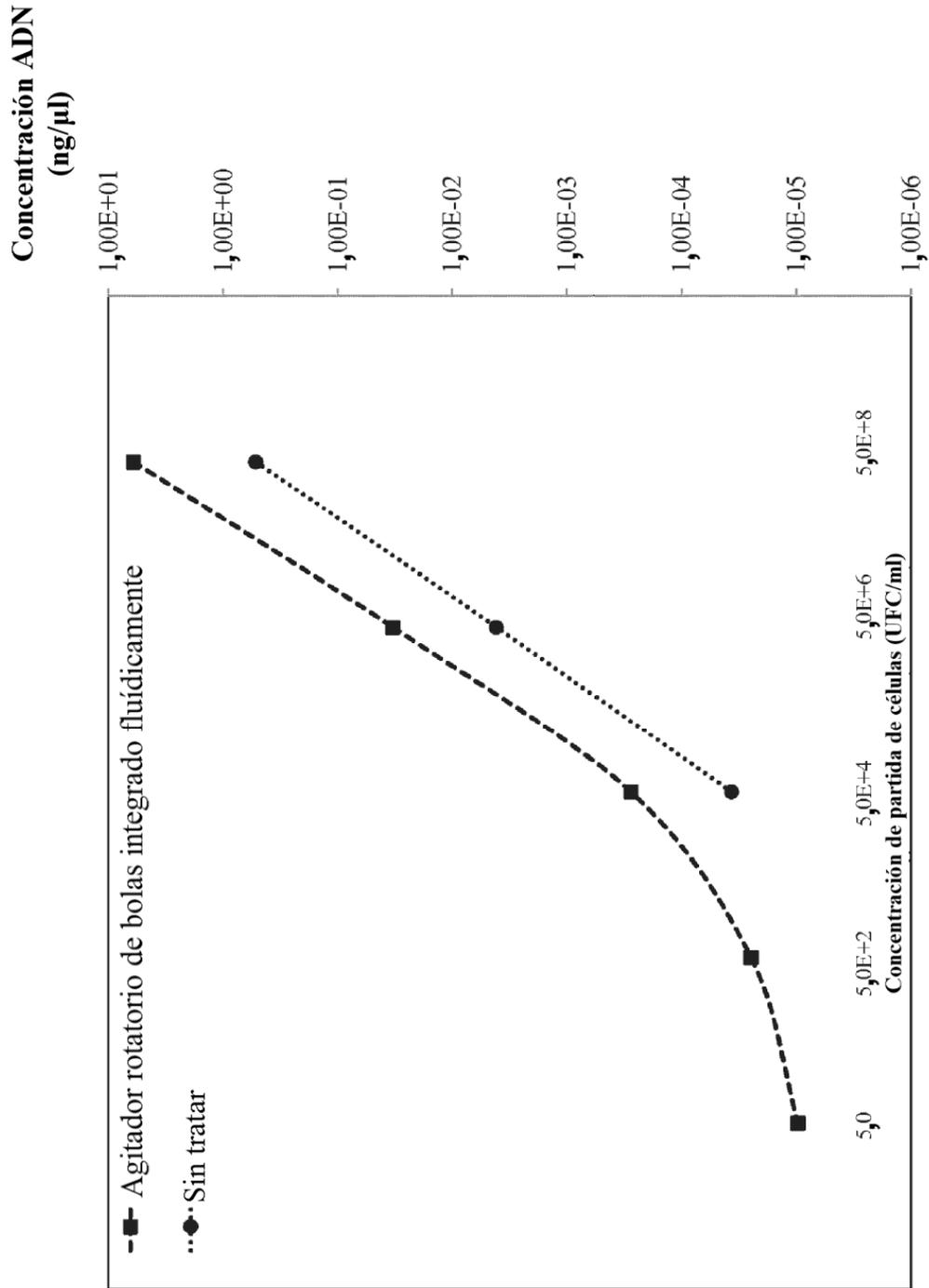


Fig. 13

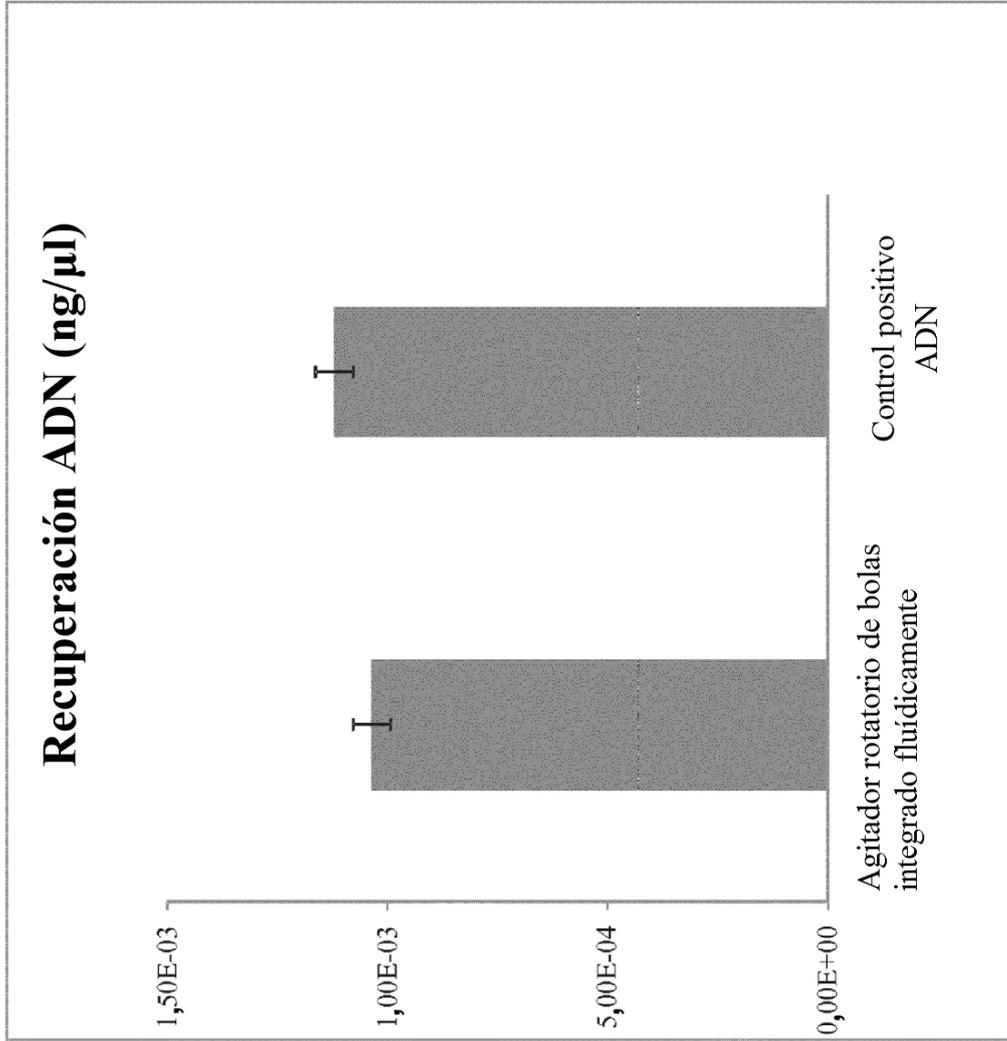


Fig. 14

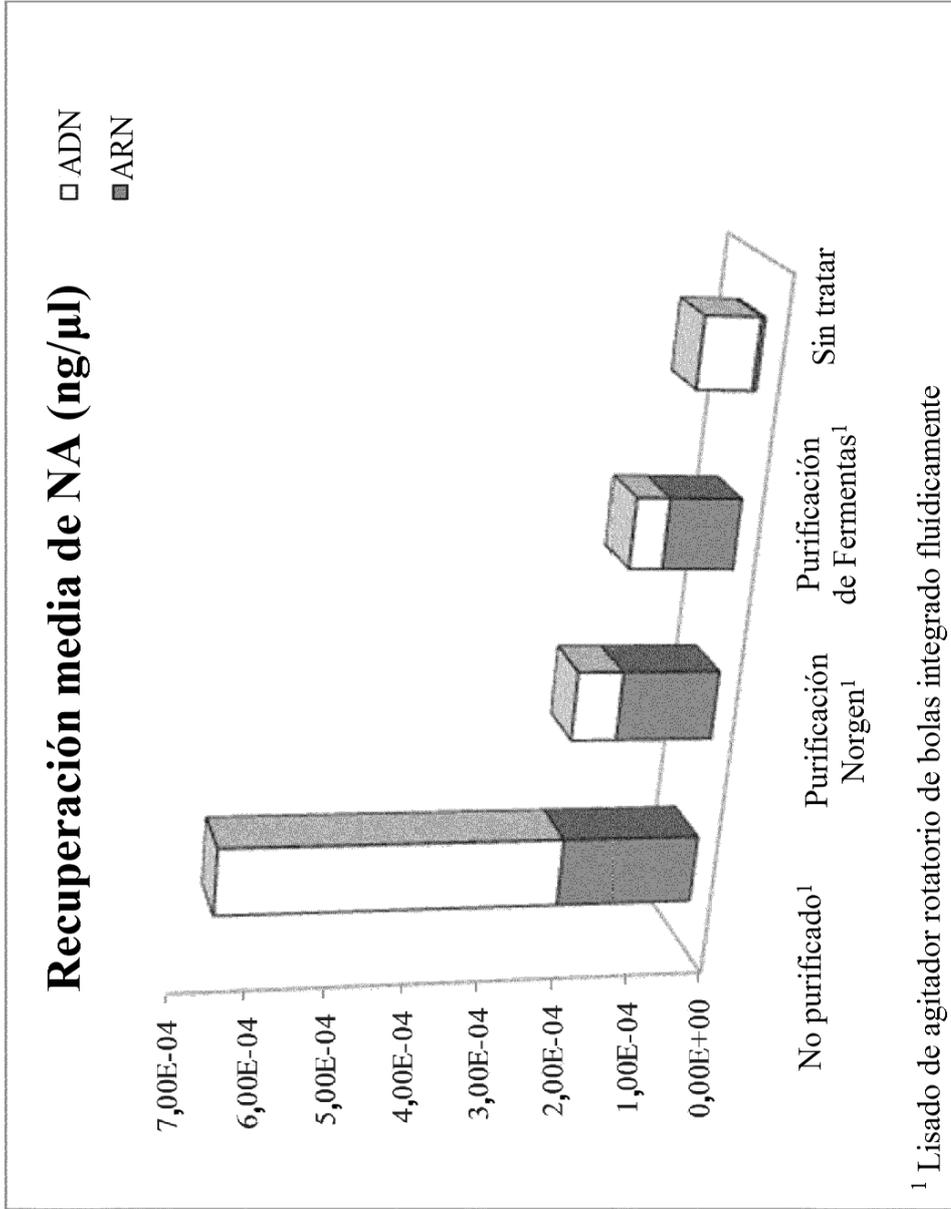


Fig. 15

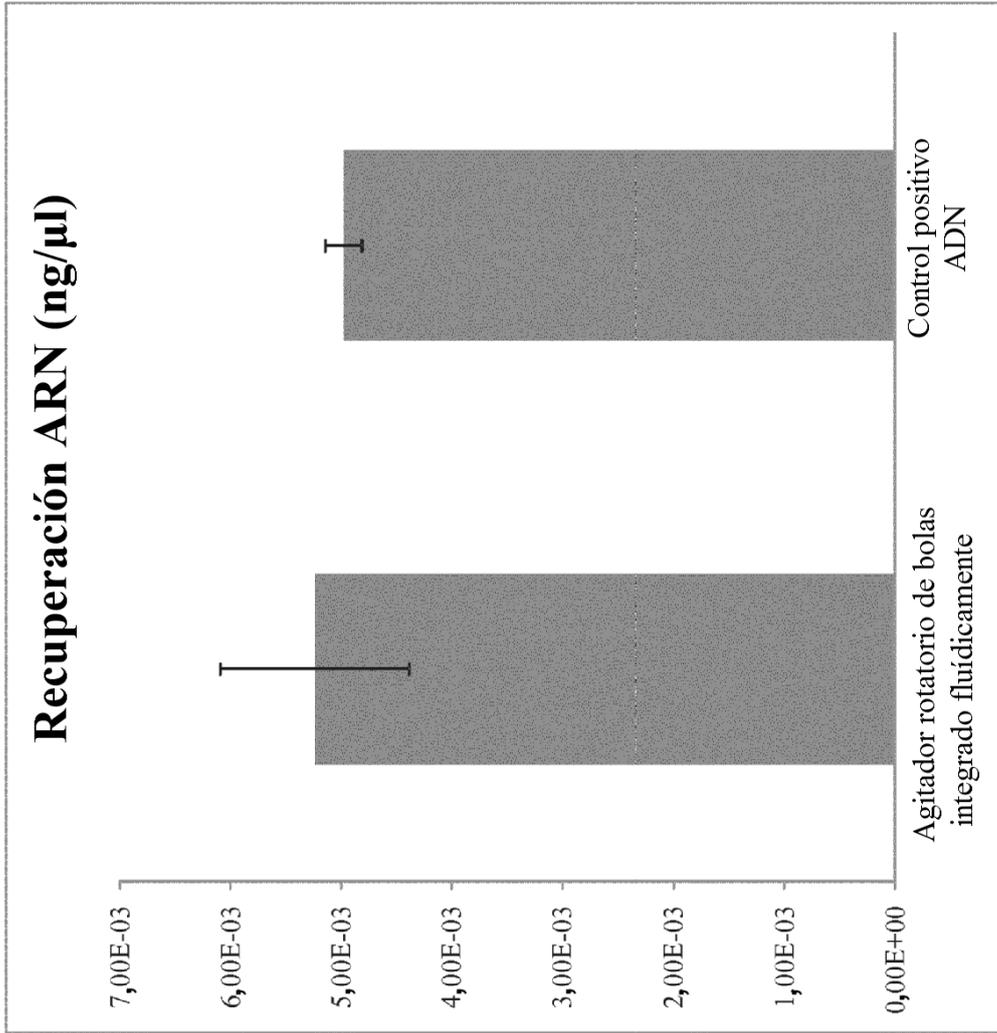
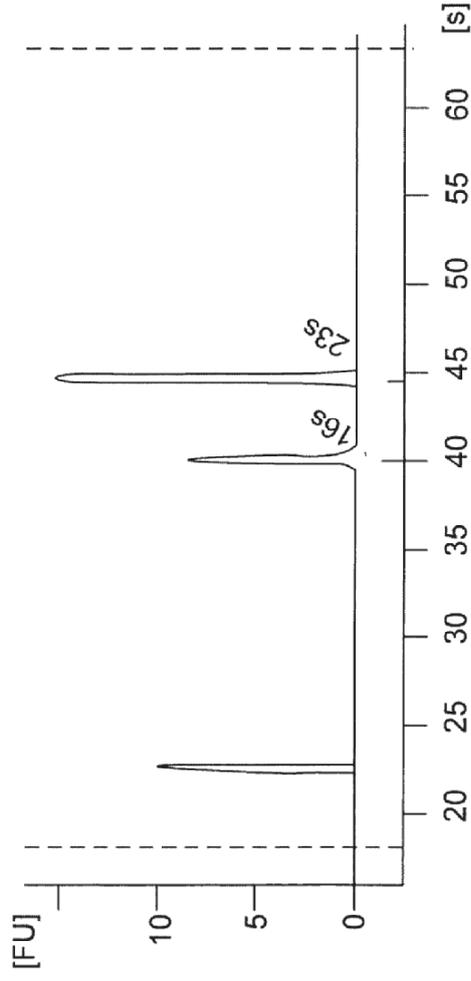


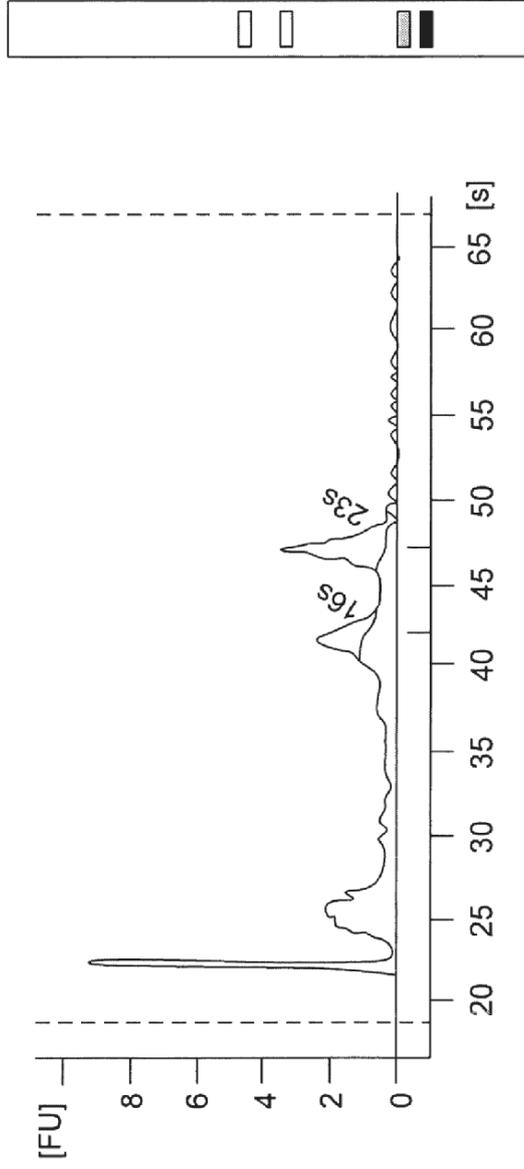
Fig. 16



Resultados globales como referencia:

Área ARN:	23,0
Concentración ARN:	16 pg/ul
Relación ARNr [23 s / 16s]:	1,7

FIG. 17A



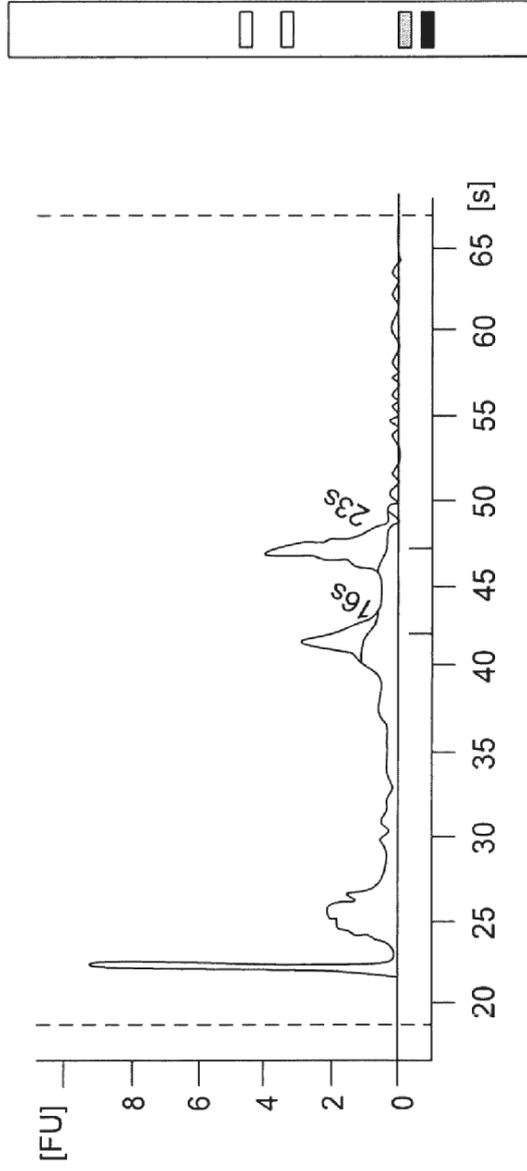
Resultados globales para la muestra 1:

Área ARN: 59,5

Concentración ARN: 32 ng/ul

Relación ARNr [23 s / 16s]: 1,6

FIG. 17B



Resultados globales para la muestra 2:

Área ARN:

57,7

Concentración ARN:

31 ng/ul

Relación ARNr [23 s / 16s]:

1,5

FIG. 17C