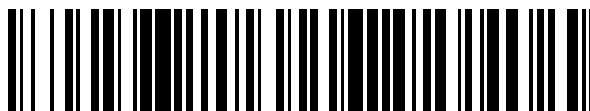


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 315**

51 Int. Cl.:

G01N 1/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2013** **PCT/US2013/056835**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014** **WO14035986**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2013** **E 13832099 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018** **EP 2890966**

54 Título: **Método y kit para purificar ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

28.08.2012 US 201261693963 P
05.09.2012 US 201261697116 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2018

73 Titular/es:

AKONNI BIOSYSTEMS, INC. (100.0%)
400 Sanger Avenue, Suite 300
Frederick, MD 21701, US

72 Inventor/es:

HOLMBERG, REBECCA;
GINDLESPERGER, ALISSA ERIN;
STOKES, TINSLEY JANNA y
BELGRADER, PHILLIP

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 673 315 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método y kit para purificar ácidos nucleicos.

La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 61/693.963, presentada el 28 de agosto de 2012, y la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 61/697.116, presentada el 5 de septiembre de 2012.

5 **Campo**

La presente invención en general se refiere a métodos para aislar y/o purificar ácidos nucleicos y, en particular, a métodos para aislar y/o purificar ácidos nucleicos de una muestra utilizando filtros monolíticos sólidos que pueden automatizarse.

Antecedentes

10 La purificación de ácidos nucleicos es necesaria para la mayoría de las aplicaciones de diagnóstico molecular y uso exclusivo de investigación, incluyendo purificación de ADN fetal para diagnósticos prenatales no invasivos (DPNI). El proceso de extracción se ha simplificado y automatizado mediante el uso de formatos en base a perlas magnéticas y membranas. Si bien son eficaces, se sabe que las partículas y membranas tienen limitaciones cuando se confrontan con matrices clínicas desafiantes. Por ejemplo, las membranas y columnas en base a perlas son compatibles, tienen
15 tamaños de poro pequeños y requieren algún tipo de soporte para ser procesadas mediante un sistema de centrifuga o vacío. Las características físicas de las membranas y columnas de perlas resultan en una resistencia fluidica significativa que limita el tipo de muestras que pueden procesarse eficientemente sin obstruir el artículo consumible ni el volumen de la muestra total (de entrada) que puede procesarse unidireccionalmente a través de la trayectoria del flujo. Por el contrario, deben distribuirse partículas magnéticas por toda la muestra mediante agitación. La necesidad
20 de distribuir homogéneamente partículas magnéticas en una solución limita el volumen de muestra de entrada total que puede procesarse con la mayoría de los productos consumibles de perlas magnéticas. Los atributos de las muestras clínicas (tal como viscosidad o complejidad) pueden conducir a una concentración ineficiente de partículas magnéticas en el lado de un tubo o varilla. Y finos de sílice pueden desprenderse de las perlas durante el proceso de extracción, perdiendo así su magnetización y contaminando la muestra final.

25 La alta demanda de pruebas moleculares tanto con fines de detección como de diagnóstico ha aumentado los requisitos de rendimiento de muestras en los laboratorios. La automatización de los pasos de procesamiento de extracción a través de la detección es fundamental para aliviar estas cargas de los procesamiento de muestras. Con las limitaciones inherentes de las otras tecnologías de extracción mencionadas anteriormente, aún existe la necesidad de un sistema de purificación de ácidos nucleicos simple y de bajo costo que pueda automatizarse.

30 Quiagen GmbH: "QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook", enero de 2011, XP002753499 divulga un kit para purificar ácidos nucleicos circulantes de plasma, suero u orina humanos.

LO Y M et al, "Quantitative Analysis of Fetal ADN in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis", American Journal of Human Genetics, 62:4, 1 de abril de 1998, p768 — 775, divulgan un ensayo de PCR
35 cuantitativa en tiempo real para medir la concentración de ADN fetal en plasma y suero maternos. Los resultados muestran que el ADN fetal está presente en altas concentraciones en plasma materno.

El documento US2011/120558 divulga materiales semiconductores preparados a partir de copolímeros de rilenio-(π -aceptor).

Compendio

40 En la presente se divulga un método automatizado para purificar ácidos nucleicos de una muestra líquida que comprende: (a) cargar la plataforma robótica con una pluralidad de puntas de pipeta, comprendiendo cada punta un receptáculo que define un pasaje entre una primera abertura y una segunda abertura y un filtro que ocupa una sección del pasaje, en donde el filtro se une específicamente a ácidos nucleicos y en donde la plataforma robótica automatizada es capaz de dispensar automáticamente reactivos, retirar contenidos de muestras y mover puntas de pipeta y/o tubos de muestras; (b) hacer fluir al menos una porción de una muestra líquida que comprende ácidos nucleicos a través de
45 la primera abertura de una punta de pipeta de forma tal que los ácidos nucleicos pasan a través de la punta de pipeta y se unen al filtro que allí se encuentra; (c) expeler la porción de muestra líquida de la punta de pipeta a través de la primera abertura, en donde la porción de muestra líquida pasa a través del filtro una segunda vez mientras sale de la punta de pipeta; y (d) eluir los ácidos nucleicos del filtro haciendo fluir hacia adentro una solución amortiguadora de elución a través de la primera abertura de la punta de pipeta y expeliendo la solución amortiguadora de la punta de pipeta a través de la primera abertura, en donde la solución amortiguadora pasa a través del filtro mientras entra y
50 sale de la punta de pipeta.

De acuerdo con la invención, se proporciona un método para separar y aislar ácidos nucleicos fetales de ácidos nucleicos maternos en una muestra de plasma que comprende: (a) hacer fluir una muestra de plasma que comprende ácidos nucleicos fetales y ácidos nucleicos maternos a través de un primer filtro en condiciones que permiten la unión
55 específica de los ácidos nucleicos fetales y maternos al primer filtro; (b) eluir los ácidos nucleicos fetales y maternos

unidos del primer filtro para formar una muestra de ácidos nucleicos concentrada que comprende ácidos nucleicos fetales y ácidos nucleicos maternos; (c) hacer fluir la muestra de ácidos nucleicos concentrada a través de un segundo filtro en condiciones que permiten a los ácidos nucleicos maternos unirse al segundo filtro y a los ácidos nucleicos fetales fluir a través del segundo filtro; y (d) recolectar la fracción de flujo del segundo filtro, en donde la fracción de flujo del segundo filtro contiene ácidos nucleicos fetales, en donde las condiciones que permiten la unión específica de los ácidos nucleicos fetales y maternos al primer filtro en el paso (a) comprenden formar una primera mezcla de unión que comprende la muestra de plasma, un alcohol alifático en un rango entre aproximadamente 17-25% (v/v) y una sal caotrópica en un rango de concentración entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 4,0 M y en donde las condiciones para unir los ácidos nucleicos maternos al segundo filtro de fritas de vidrio en el paso (c) comprenden formar una segunda mezcla de unión que comprende la muestra de ácidos nucleicos concentrada, un alcohol alifático en un rango entre aproximadamente 0-10% (v/v) y una sal caotrópica en un rango de concentración entre aproximadamente 1 M y aproximadamente 4,0 M.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para aislar ácidos nucleicos fetales de ácidos nucleicos maternos en una muestra de plasma que comprende: una punta de pipeta que comprende un filtro de fritas de vidrio autoportante, en donde el filtro de fritas de vidrio tiene un tamaño de poro de 2-220 micras y no está tratado ni recubierto con agente que mejora la unión de ácido nucleico al filtro de fritas de vidrio, una primera solución amortiguadora de unión formulada para proporcionar una primera mezcla de unión que tiene aproximadamente 17-25% v/v de un alcohol alifático y una sal caotrópica a una concentración de entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 4,0 M; y una segunda solución amortiguadora de unión formulada para proporcionar una primera mezcla de unión que tiene aproximadamente 0-10% v/v de un alcohol alifático y una sal caotrópica a una concentración de entre aproximadamente 1 M y aproximadamente 4,0 M, en donde el filtro de fritas de vidrio comprende una fritas de vidrio fusionada que comprende una primera sección que tiene un primer tamaño de poro y una segunda sección que tiene un segundo tamaño de poro, opcionalmente en donde la primera sección tiene un tamaño de poro de 100-160 micras y la segunda sección tiene un tamaño de poro de 16-40 micras, o en donde la primera sección tiene un tamaño de poro de 16-40 micras y la segunda sección tiene un tamaño de poro de 4-10 micras.

Estos y otros aspectos y ventajas serán evidentes cuando la descripción que sigue se lea conjuntamente con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

Las FIGS. 1A-1D son representaciones esquemáticas de diferentes realizaciones de un dispositivo de punta de pipeta que comprende una cámara hueca y un filtro para purificar ácidos nucleicos de acuerdo con la presente solicitud.

Las FIGS. 2A-2D son ilustraciones esquemáticas de un proceso ejemplar para purificar ácidos nucleicos fetales de acuerdo con la presente solicitud.

La FIG. 3 ilustra un diseño de placa de muestras Eppendorf epMotion 5070 (A) y una disposición de reactivos/productos consumibles en la mesa de trabajo (B). La placa de muestras puede configurarse para hasta 24 muestras (columnas 1, 5 y 9, respectivamente), aunque la epMotion solamente procesará 8 muestras simultáneamente.

La FIG. 4 ilustra resultados de PCR en tiempo real de extracción automatizada de virus de influenza mezclado en un aspirado nasofaríngeo (ANF). Volumen de ANF de entrada = 100 μ L, volumen de elución = 50 μ L. Los resultados son el promedio de 3 extracciones replicadas de 5 fondos de ANF diferentes (n = 15) por nivel de dilución y objetivo de influenza. Se llevó a cabo qPCR en el sistema LightCycler 480.

La FIG. 5 ilustra un diseño de cubierta Hamilton STAR para purificar ADN genómico de sangre entera (no está a escala). Posición cubierta 1 = puntas filtradas Hamilton de 1 ml; 2 = puntas no filtradas Hamilton de 1 ml; 3 = puntas de filtro Akonni/Hamilton de 1 ml LPT 2 mm; 4 = portadores de muestras de sangre de entrada (tubos de recolección de sangre o tubos de microcentrifuga); 5-9 = cubetas de reactivo de 290 ml para la solución amortiguadora de lisis F, etanol, solución amortiguadora de lavado J, solución amortiguadora de lavado K y solución amortiguadora de elución A2, respectivamente; 10 = placa de unión de 96 pocillos; 11 = placa de lavado de 96 pocillos J; 12 = placa de lavado de 96 pocillos K; 13 = placa de elución de 96 pocillos; 14 = calentador/agitador Hamilton HHS2 con placa de incubación de 96 pocillos Nunc; 15 = cubeta de reactivo de 50 ml que contiene proteínaasa K.

Las FIGS. 6A-6G muestran los resultados de distintas extracciones de ADN genómico (ADNg). La FIG. 6A muestra trazas UV-Visibles de un NanoDrop 1000 (ThermoFisher) de 10 repeticiones seleccionadas aleatoriamente de ADNg humano extraído de sangre entera. La FIG. 6B muestra un 1% gel de agarosa de ADNg humano purificado con punta de filtro extraído de sangre entera. M = escalera de ADN Fisher 24kb Max. Líneas 1-4 = ~100 ng de ADNg purificado de cuatro repeticiones seleccionadas aleatoriamente. La FIG. 6C muestra la reproductibilidad de rendimientos de ADNg de 8 pasadas cada uno en las que una entrada de 200 μ L de sangre entera se procesó de acuerdo con la presente invención. La FIG. 6D muestra que los rendimientos promedio de ADNg de sangre entera fueron lineales en un rango de volúmenes de entrada de sangre entera de 100 μ L, 200 μ L y 300 μ L procesados (8 pasadas cada uno) a partir de filtros TruTip® de 1 ml (lado izquierdo) y volúmenes de sangre entera de 1000 μ L y 2000 μ L procesados a partir de filtros TruTip® de 5 ml (centro y derecha). La FIG. 6E muestra los resultados de un estudio de contaminación

cruzada en el que 48 muestras de 400 μ l (24 de saliva y 24 en blanco) se sometieron a análisis por qPCR. La FIG. 6F muestra resultados de absorbancia UV de una comparación de rendimientos promedio de ADN_g de 7 muestras de saliva individuales ciegas (Muestras A-G; 400 μ l de entrada/100 μ l de elución) extraídas utilizando el método de centrifugación manual de columna de Qiagen (columna/pares de la derecha) y un método de extracción automatizado de acuerdo con la presente invención (columna/pares de la izquierda). La FIG. 6G muestra los tiempos de procesamiento para 200 μ l de sangre entera procesada a partir de un filtro TruTip® (Columna 1) en comparación con otros cinco sistemas de extracción de la competencia (Columnas 2-6).

La FIG. 7 es un diagrama de flujo que muestra una realización de un proceso para purificar ácidos nucleicos fetales de acuerdo con la presente solicitud.

La FIG. 8A es una foto de un gel de agarosa que muestra ADN genómico femenino y masculino fragmentado mediante sonicación para estimular las longitudes encontradas en muestras maternas efectivas (femenino = ADN materno, masculino = ADN fetal). La FIG. 8B es un diagrama que muestra la recuperación de ADN fetal en diferentes diluciones. Resultados de PCR en tiempo real de muestras extraídas que contienen ADN masculino fragmentado en el rango de 100 a 1 ng y ADN total incluyendo ADN femenino fragmentado de 200 ng por muestra para TruTip (rombo oscuro y cuadrado oscuro) y Qiagen (triángulo claro y X) respectivamente, n=3 extracciones cada uno con n=3 por muestra para PCR. Las barras de error indican $\pm$ una desviación estándar.

La FIG. 9 es un diagrama que muestra la recuperación de ADN fetal (Crom Y) y ADN total (Crom 1) con o sin el paso de enriquecimiento de la presente solicitud. Cuatro repeticiones de plasma materno, 5 ml cada una. CHY cuantifica ADN fetal masculino y CH1 cuantifica el ADN total presente (fetal y maternal). La qPCR se llevó a cabo en el sistema LightCycler 480 con ensayos previamente publicados dirigidos a CHY y CH1.

La FIG. 10 ilustra un diseño de cubierta Hamilton STARplus para purificar ADN de muestras de plasma de gran volumen (no está a escala). El sistema está equipado con 8 x canales de 5 ml y 8 x canales de 1 ml. Posición en cubierta 1 = puntas filtradas Hamilton de 4 ml; 2 = puntas de filtro Akonni/Hamilton de 5 ml; 3 = muestras de plasma fuente; 4 = tubos cónicos de 50 ml; 5 = cubetas de reactivo de 120 ml que contienen los reactivos CN-W1, CN-W2 y CN-W4; 6 = cubetas de reactivo de bajo volumen que contienen los reactivos proteínaasa K, CN-B2, CN-B3, EBA2, EBB y CN-W3; 7 = cubeta de reactivo de 290 ml que contiene el reactivo CN-L1; 8 = cubeta de reactivo de 290 ml que contiene el reactivo CN-B1; 9 = placas de 96 pocillos profundos para el Paso 1; 10 = placas de 96 pocillos profundos para el Paso 2; 11 = portadores de muestras para el producto final purificado; 12 = puntas sin filtrar Hamilton de 1 ml; 13 = puntas de filtro Akonni/Hamilton de 1 ml LPT 4 mm.

La FIG. 11A ilustra resultados de qPCR de ocho muestras repetidas de una muestra de plasma materno combinado procesado con un procedimiento de punta de filtro de gran volumen. El protocolo completo (incluido el tratamiento previo fuera de línea de proteínaasa K) se termina en aproximadamente 2 horas. Los valores de C_t promedio en todas las repeticiones fueron de $34,58 \pm 0,66$ y $29,76 \pm 0,50$ para el ADN fetal masculino (CHY) y total (CH1), respectivamente, lo que demuestra la excelente repetibilidad del método de extracción automatizado. La concentración de ADN fetal en la combinación total de ADN (en equivalentes de genoma) se calculó en base a la comparación del análisis del punto de ajuste con estándares, con un ADN fetal porcentual promedio resultante en todas las muestras de 2,8%. El ADN fetal porcentual real para esta muestra no se conoce porque las muestras se combinaron antes de realizar la extracción. La FIG. 11B muestra una comparación del ADN fetal porcentual recuperado de 11 muestras de plasma materno por duplicado únicas utilizando un sistema automatizado que emplea filtros Akonni TruTip® de acuerdo con los procedimientos de extracción descritos anteriormente (columna/pares de la izquierda) y el Kit de Ácido Nucleico Circulante manual de Qiagen (columna/pares de la derecha).

Descripción detallada

La presente solicitud proporciona métodos y dispositivos para purificar ácidos nucleicos de una muestra de prueba. Específicamente, la presente solicitud proporciona una simple tecnología de extracción de ácido nucleico mediante la cual una matriz de unión de ácido nucleico monolítica es insertada en una punta de pipeta o un dispositivo similar. La extracción de ácido nucleico se lleva a cabo utilizando una un formato de preparación de muestras que es compatible con la mayoría de los instrumentos de manipulación de líquidos y, por lo tanto, puede automatizarse y adaptarse a muchas aplicaciones clínicas de rendimiento medio o alto y matrices de muestras. La presente solicitud divulga un método automatizado para purificar ácidos nucleicos de una muestra líquida utilizando una plataforma robótica con una pluralidad de pipetas.

La presente solicitud proporciona, además, una metodología adaptable para la selección preferencial para fragmentos de ADN de bajo peso molecular (BPM) (tal como ADN fetal) de un fondo de ADN de peso molecular más alto (APM) (tal como ADN materno). La metodología aumenta el porcentaje de ADN de BPM presente en la muestra independientemente de la cantidad de ADN de APM presente y proporciona la capacidad de procesar un gran volumen de muestras, por ejemplo, hasta 20 ml, de forma de cumplir con el requisito de sensibilidad para ciertas aplicaciones clínicas. En algunas realizaciones, la presente solicitud se refiere a un método para separar y aislar ácidos nucleicos fetales de ácidos nucleicos maternos en una muestra de plasma utilizando uno o más filtros que permiten la unión específica de los ácidos nucleicos fetales y/o maternos al o los filtros. La presente solicitud también proporciona un kit para aislar ácidos nucleicos fetales de ácidos nucleicos maternos en una muestra de plasma.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "muestra de prueba" o "muestra" se refiere a cualquier material que puede contener ácido nucleico. Ejemplos de muestras de prueba incluyen, a modo no taxativo, muestras biológicas, muestras ambientales y muestras no naturales. Ejemplos de muestras biológicas incluyen, a modo no taxativo, muestras de tejido, muestras de fluidos biológicos, muestras celulares, muestras bacterianas y muestras de virus. Las muestras de tejido incluyen tejidos aislados de cualquier animal o planta. Las muestras de fluidos biológicos incluyen, a modo no taxativo, sangre, plasma, orina, saliva, esputo, fluido cerebroespinal, nasofaríngeo, bucal, lavados (por ejemplo bronquial) y muestras de leucoféresis. Las muestras celulares incluyen, a modo no taxativo, células cultivadas o células aisladas de cualquier fuente. Las muestras de virus incluyen, a modo no taxativo, virus cultivados o virus aislados. Las muestras ambientales incluyen, a modo no taxativo, muestras de aire, muestras de agua, muestras de suelo, muestras de rocas y cualquier otra muestra obtenida de un ambiente natural. Las muestras artificiales incluyen cualquier muestra que no existe en un entorno natural. Ejemplos de "muestras artificiales" incluyen, a modo no taxativo, materiales purificados o aislados, materiales cultivados, materiales sintetizados y cualquier otro material hecho por el hombre. En algunas realizaciones, las muestras de prueba incluyen esputo, esputo tratado con NACL, sangre entera o cultivo de sangre, plasma, fluido cerebroespinal, muestras y aspirados nasofaríngeos, lavado bronquial, células y tejidos frescos o congelados, muestras de FFPE, capa leucocitaria, tarjetas para sangre, saliva, muestra bucal, heces, cultivos bacterianos sólidos o líquidos, ANF, agua recreacional y suelo.

Tal como se utiliza en la presente, "ácidos nucleicos" se refiere a ácidos nucleicos individuales y cadenas poliméricas de ácidos nucleicos, incluidos ADN y ARN, ya sea naturales o artificiales (incluidos análogos de los mismos) o modificaciones de los mismos, especialmente aquellas modificaciones que se sabe ocurren en la naturaleza, que tienen cualquier longitud. Ejemplos de longitudes de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente solicitud incluyen, a modo no taxativo, longitudes adecuadas para productos de PCR (por ejemplo, aproximadamente 30 a 3000 pares de bases (bp), aproximadamente 30-2000 bp, aproximadamente 30-1000 bp), fragmentos de ADN en el rango de longitudes de 50-600 bp, fragmentos de ADN en el rango de longitudes de 100-350 bp y ADN genómico humano (por ejemplo, en un orden de aproximadamente decenas de kilobases (Kb) a gigabases (Gb)). De esta forma, se apreciará que la expresión "ácido nucleico" abarca ácidos nucleicos individuales, así como segmentos de nucleótidos, nucleósidos, naturales o artificiales, y combinaciones de los mismos, en fragmentos pequeños, por ejemplo, expresados en etiquetas de secuencias o fragmentos genéticos, así como cadenas más largas, tal como se ejemplifican mediante material genómico, incluidos genes individuales e incluso cromosomas enteros. Tal como se utiliza en la presente, el término "ADN de bajo peso molecular (BPM)" se refiere a fragmentos de ADN que tienen una longitud menor que aproximadamente 20 kb, 15 kb, 10kb, 5kb, 3kb, 2kb, 1 kb, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600bp, 500 bp, 4000 bp, 350 bp o 300 bp en distintas realizaciones. Tal como se utiliza en la presente, la expresión "ADN de alto peso molecular (APM)" se refiere a fragmentos de ADN que tienen una longitud mayor que aproximadamente 300 bp, 350 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1 kb, 2 kb, 3kb, 5 kb, 10 kb, 15 kb, 20 kb, 50 kb o 100 kb en distintas realizaciones. En algunas realizaciones, la expresión "ADN de alto peso molecular" se refiere a ADN en el rango de tamaños de 3000 bp o mayor, 2000 bp o mayor, 1000 bp o mayor, 800 bp o mayor, 600 bp o mayor, 500 bp o mayor, 400 bp o mayor o 350 bp o mayor, mientras que la expresión "ADN de bajo peso molecular" se refiere a ADN en el rango de tamaños de 3000 bp o menor, 2000 bp o menor, 1000 bp o menor, 800 bp o menor, 600 bp o menor, 500 bp o menor, 400 bp o menor, 350 bp o menor o 300 bp o menor. En algunas realizaciones, la expresión ADN de bajo peso molecular se refiere a ADN fetal presente en la circulación de la madre (por ejemplo, sangre), mientras que la expresión ADN de alto peso molecular se refiere a ADN materno.

Las expresiones "absorbente monolítico" o "material absorbente monolítico", tal como se usan en la presente, se refieren a un material absorbente tridimensional poroso que tiene una estructura porosa interconectada continua en una sola pieza que puede comprender una estructura monolítica rígida básicamente autoportante. Un monolito se prepara, por ejemplo, mediante fundido, sinterizado o polimerización de precursores en un molde de la forma deseada. La expresión "absorbente monolítico" o "material absorbente monolítico" debe distinguirse de una colección de partículas adsorbentes individuales compactadas en una formación de lecho o embebidas en una matriz porosa, en la que el producto final comprende partículas adsorbentes individuales. Las expresiones "absorbente monolítico" o "material absorbente monolítico" también deben distinguirse de una colección de fibras adsorbentes fibras recubiertas con un adsorbente, tales como papeles de filtro o papeles de filtro recubiertos con un adsorbente.

Filtros y puntas de pipeta

El sistema de punta de filtro divulgado en la presente proporciona una tecnología de extracción de ácido nucleico mediante la cual un filtro de matriz de unión monolítica es insertado en una punta de pipeta. El material monolítico poroso se une específicamente a ácidos nucleicos y está compuesto por una estructura básicamente monolítica autoportante rígida. En algunas realizaciones, el material monolítico poroso no incluye materiales adicionales que proporcionen afinidad por ácidos nucleicos. En algunas realizaciones preferidas, el material monolítico poroso es un material monolítico en base a vidrio, tal como una frita de vidrio. En algunas realizaciones, la frita de vidrio es una frita de vidrio sinterizado. La porosidad del material monolítico poroso, tal como una frita de vidrio o frita de vidrio sinterizado, depende de la aplicación. En general, el material monolítico poroso debería tener una porosidad que permita una tasa de flujo de la muestra deseada para una aplicación en particular y sea capaz de retener ácidos nucleicos en un rango de tamaños deseado. En algunas realizaciones, el material monolítico poroso es una frita de vidrio o frita de vidrio sinterizado que tiene una porosidad (es decir, un tamaño de poro promedio) en el rango de 2-400 micras, 2-300 micras, 2-220 micras, 2-200 micras, 2-180 micras, 2-160 micras, 2-140 micro, 2-120 micro, 2-100

micras, 2-80 micras, 2-60 micras, 2-40 micras, 2-20 micras, 2-16 micras, 2-10 micras, 2-5,5 micras, 4-400 micras, 4-300 micras, 4-220 micras, 4-200 micras, 4-180 micras, 4-160 micras, 4-140 micro, 4-120 micro, 4-100 micras, 4-80 micras, 4-60 micras, 4-40 micras, 4-20 micras, 4-16 micras, 4-10 micras, 4-5,5 micras, 10-400 micras, 10-300 micras, 10-220 micras, 10-200 micras, 10-180 micras, 10-160 micras, 10-140 micro, 10-120 micro, 10-100 micras, 10-80 micras, 10-60 micras, 10-40 micras, 10-20 micras, 10-16 micras, 16-400 micras, 16-300 micras, 16-220 micras, 16-200 micras, 16-180 micras, 16-160 micras, 16-140 micro, 16-120 micro, 16-100 micras, 16-80 micras, 16-60 micras, 16-40 micras, 40-400 micras, 40-300 micras, 40-220 micras, 40-200 micras, 40-180 micras, 40-160 micras, 40-140 micro, 40-120 micro, 40-100 micras, 40-80 micras, 40-60 micras, 100-400 micras, 100-300 micras, 100-220 micras, 100-200 micras, 100-180 micras, 100-160 micras, 100-140 micro, 100-120 micro, 160-400 micras, 160-300 micras, 160-220 micras, 160-200 micras, 160-180 micras, 200-400 micras, 200-300 micras o 200-220 micras. De acuerdo con la invención, el material monolítico poroso es una frita de vidrio o frita de vidrio sinterizado que tiene dos secciones de diferente porosidad. Cada sección tiene una porosidad en un rango descrito anteriormente (por ejemplo, una sección de 4-10 micras y una sección de 16-40 micras o una sección de 16-40 micras y una sección de 100-160 micras).

En algunas realizaciones, el filtro tiene un espesor en el rango de 1-30 mm, 1-25 mm, 1-20 mm, 1-15 mm, 1-10 mm, 1-8 mm, 1-6 mm, 1-4 mm, 2-30 mm, 2-25 mm, 2-20 mm, 2-15 mm, 2-10 mm, 2-8 mm, 2-6 mm, 2-4 mm, 4-30 mm, 4-25 mm, 4-20 mm, 4-15 mm, 4-10 mm, 4-8 mm, 4-6 mm, 6-30 mm, 6-25 mm, 6-20 mm, 6-15 mm, 6-10 mm, 6-8 mm, 8-30 mm, 8-25 mm, 8-20 mm, 8-15 mm, 8-10 mm, 10-30 mm, 10-25 mm, 10-20 mm, 10-15 mm, 15-30 mm, 15-25 mm, 15-20 mm, 20-30 mm, 20-25 mm o 25-30 mm.

El material monolítico poroso puede modificarse con uno o más materiales que tengan afinidad por ácidos nucleicos.

En algunas realizaciones, el filtro está hecho de un monolito de vidrio poroso, un vidrio poroso-cerámica o polímeros monolíticos porosos. En algunas realizaciones, el monolito de vidrio poroso se produce utilizando los métodos de sol-gel descritos en las Patentes de los EE.UU. Nos. 4.810.674 y 4.765.818. El vidrio poroso-cerámica puede producirse mediante cristalización controlada de un monolito de vidrio poroso. En realizaciones preferidas, el monolito de vidrio poroso, vidrio poroso-cerámica o polímero monolítico poroso no está recubierto ni embebido con ningún material adicional, tal como polinucleótidos o anticuerpos, para mejorar su afinidad por ácidos nucleicos.

Los polímeros monolíticos porosos constituyen una nueva categoría de materiales desarrollados durante la última década. En contraste con los polímeros compuestos por perlas muy pequeñas, un monolito es una pieza continua única de un polímero preparado utilizando un simple proceso de moldeado.

En algunas realizaciones preferidas, el filtro está hecho de una frita de vidrio finamente poroso a través de la cual una muestra líquida puede pasar. La frita de vidrio poroso no está recubierta ni embebida con ningún material adicional, tal como polinucleótidos o anticuerpos, para mejorar su afinidad por ácidos nucleicos. Sustratos adecuados para purificar ácidos nucleicos incluyen fritas de vidrio porosas hechas de vidrio sinterizado que se forman moliendo perlas en una prensa caliente para formar una única estructura monolítica. La estructura uniforme de la frita proporciona un flujo de líquido predecible hacia el interior de la frita y permite que el eluyente tenga una dinámica de fluidos similar al flujo de la muestra. El flujo de líquido predecible proporciona una alta recuperación durante el proceso de elución.

En algunas realizaciones, el filtro se coloca en una punta de pipeta. El filtro también puede insertarse en columnas, jeringas u otro receptáculo de diferentes volúmenes y formas. El método descrito en la presente puede llevarse a cabo utilizando distintos dispositivos, incluidas pipetas manuales o automáticas, bombas de jeringa, jeringas manuales u otro tipo de métodos automatizados o manuales para mover líquido a través del filtro.

En algunas realizaciones, el filtro está diseñado para separar sustancialmente los ácidos nucleicos de materia extraña en una muestra. Tal como se utiliza en la presente, "materia extraña" se refiere a todos los materiales que son diferentes de los ácidos nucleicos en la muestra. Ejemplos de dichos materiales extraños incluyen, a modo no taxativo, proteínas, almidones, lípidos, iones metálicos y estructuras celulares más grandes tales como fragmentos de membrana y otras materias celulares. La frase "separar sustancialmente", tal como se usa en la presente, se refiere a separaciones que, en algunas realizaciones, proporcionan los ácidos nucleicos con una pureza de al menos 30% con respecto a los materiales extraños, en realizaciones más específicas proporcionan los ácidos nucleicos con una pureza de al menos 50% o 60% con respecto a los materiales extraños, en otras realizaciones más específicas proporcionan los ácidos nucleicos con una pureza de al menos 70% u 80% con respecto a los materiales extraños, en otras realizaciones más específicas proporcionan los ácidos nucleicos con una pureza de al menos 90% o 95% con respecto a los materiales extraños y en otras realizaciones adicionales más específicas proporcionan los ácidos nucleicos con una pureza de al menos 97% o 99% con respecto a los materiales extraños. Tal como se utiliza en la presente, ácidos nucleicos con una pureza de al menos 30% con respecto a los materiales extraños significa una preparación de ácidos nucleicos en la que la relación en peso entre los ácidos nucleicos y los materiales extraños es de 30:70 o mayor. De manera similar, ácidos nucleicos con una pureza de al menos 99% con respecto a los materiales extraños significa una preparación de ácidos nucleicos en la que la relación en peso entre los ácidos nucleicos y los materiales extraños es de 99:1 o mayor.

En referencia ahora a la FIG. 1A, una realización de un dispositivo de punta de pipeta 100 incluye un receptáculo 10 y un filtro poroso monolítico 20 que es capaz de retirar ácidos nucleicos de un líquido que contiene dichos ácidos nucleicos. El filtro 20 puede ser una frita de vidrio o frita de vidrio sinterizado que tiene una porosidad uniforme. De

acuerdo con la invención, el filtro 20 es una frita de vidrio o frita de vidrio sinterizado que tiene dos secciones de diferente porosidad, en donde la sección que tiene el tamaño de poro más grande se dispone más cerca de la entrada de la pipeta que la sección que tiene el tamaño de poro más pequeño. En todas estas realizaciones, la frita de vidrio no está recubierta ni embebida con ningún material adicional, tal como polinucleótidos o anticuerpos, para mejorar su afinidad por ácidos nucleicos.

La punta de pipeta 100 comprende una entrada o abertura de la punta de pipeta 16 para hacer fluir materiales de ácido nucleico de una fuente de muestra a través de la misma. El receptáculo 10 está definido por una cámara hueca 12 entre una abertura distal 14 adoptada para recibir un dispositivo de pipeteado y la entrada 16. La forma y el tamaño del receptáculo 10 no se limitan particularmente. La configuración preferida de la cubierta es básicamente cilíndrica para que los vectores del flujo durante la operación sean básicamente rectos, minimizando o evitando así el lavado de dilución que podría ocurrir con configuraciones no cilíndricas. En algunas realizaciones, el receptáculo 10 tiene un volumen de aproximadamente 0,1 μ l a aproximadamente 50 ml, aproximadamente 10 μ l a aproximadamente 50 ml, aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 50 ml, aproximadamente 1 ml a aproximadamente 50 ml, aproximadamente 2 ml a aproximadamente 50 ml, aproximadamente 5 ml a aproximadamente 50 ml, aproximadamente 10 ml a aproximadamente 50 ml, aproximadamente 20 ml a aproximadamente 50 ml, aproximadamente 0,1 μ l a aproximadamente 20 ml, aproximadamente 10 μ l a aproximadamente 20 ml, aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 20 ml, aproximadamente 1 ml a aproximadamente 20 ml, aproximadamente 2 ml a aproximadamente 20 ml, aproximadamente 5 ml a aproximadamente 20 ml, aproximadamente 10 ml a aproximadamente 20 ml, aproximadamente 0,1 μ l a aproximadamente 10 ml, aproximadamente 10 μ l a aproximadamente 10 ml, aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 10 ml, aproximadamente 1 ml a aproximadamente 10 ml, aproximadamente 2 ml a aproximadamente 10 ml, aproximadamente 0,1 μ l a aproximadamente 5 ml, aproximadamente 10 μ l a aproximadamente 5 ml, aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 5 ml, aproximadamente 1 ml a aproximadamente 5 ml, aproximadamente 0,1 μ l a aproximadamente 2 ml, aproximadamente 10 μ l a aproximadamente 2 ml, aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 2 ml, aproximadamente 1 ml a aproximadamente 2 ml, aproximadamente 0,1 μ l a aproximadamente 1 ml, aproximadamente 10 μ l a aproximadamente 1 ml, aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 1 ml, aproximadamente 0,1 μ l a aproximadamente 100 μ l o aproximadamente 10 μ l a aproximadamente 100 μ l. En otras realizaciones, el receptáculo 10 tiene un volumen de aproximadamente 0,1 ml, aproximadamente 0,2 ml, aproximadamente 0,5 ml, aproximadamente 1 ml, aproximadamente 2 ml, aproximadamente 5 ml, aproximadamente 10 ml, aproximadamente 20 ml, aproximadamente 30 ml, aproximadamente 40 ml o aproximadamente 50 ml. Tal como se utiliza de aquí en adelante, el volumen del receptáculo 10 también se denomina "volumen de punta".

Los materiales adecuados para el receptáculo 10 no están particularmente limitados e incluyen plásticos (tales como polietileno, polipropileno y poliestireno), vidrio y acero inoxidable.

El filtro para muestras 20 puede ubicarse en cualquier posición dentro del receptáculo 10. En algunas realizaciones, el filtro para muestras 20 se coloca en proximidad cercana a la entrada 16 para que las muestras se filtren inmediatamente después de ingresar al receptáculo 10 a través la entrada 16. En una realización, el filtro para muestras 20 está contiguo a la entrada 16. En otra realización, el filtro para muestras 20 está separado de la entrada 16 una distancia de 0-60 mm, 0-40 mm, 0-30 mm, 0-20 mm, 0-10 mm, 5-60 mm, 5-40 mm, 5-30 mm, 5-20 mm, 5-10 mm, 10-60 mm, 10-40 mm, 10-30 mm, 10-20 mm, 20-60 mm, 20-40 mm, 20-30 mm, 30-60 mm o 40-60 mm. En otras realizaciones, el filtro para muestras 20 está separado de la entrada 16 una distancia de 60-120 mm, 60-100 mm, 60-80 mm, 80-120 mm, 80-100 mm o 100-120 mm. En otras realizaciones, el filtro para muestras 20 está separado de la entrada 16 una distancia de 60-80 mm, por ejemplo, aproximadamente 75 mm. El filtro para muestras 20 puede tener una porosidad adecuada para el aislamiento de los ácidos nucleicos de interés. En algunas realizaciones, el filtro para muestras 20 tiene un tamaño de poro promedio de 4-5,5 micras, 4-16 micras, 16-40 micras, 40-100 micras, 100-160 micras o 2-220 micras.

En algunas realizaciones, el filtro 20 comprende dos o más subfiltros. La FIG. 1B muestra una realización de una punta de pipeta 100 que tiene un filtro 20 que comprende los subfiltros 22 y 24. En algunas realizaciones, los subfiltros 22 y 24 tienen diferente porosidad y se colocan en tándem con un espacio entre los subfiltros. En otras realizaciones, los subfiltros 22 y 24 se colocan pegados entre sí sin ningún espacio entre ellos (FIG. 1B). En otras realizaciones, los subfiltros 22 y 24 están fusionados entre sí para formar una estructura monolítica 20 que tiene dos secciones (22 y 24) de diferente porosidad. Típicamente, el filtro o la sección de filtro que tiene tamaños de poro más grandes se dispone más cerca de la entrada de la punta de pipeta 16. Se cree que disponer el filtro de tamaño de poro más grande más cerca de la entrada de la punta de pipeta ayuda a proporcionar un prefiltro para evitar la obstrucción de los poros más pequeños con el material de la muestra.

En algunas realizaciones, el subfiltro 22 tiene un tamaño de poro de aproximadamente 80-200 micras, preferiblemente 100-160 micras, y el subfiltro 24 tiene un tamaño de poro de aproximadamente 8-80 micras, preferiblemente 16-40 micras. En algunas realizaciones, el subfiltro 22 tiene un tamaño de poro de aproximadamente 8-80 micras, preferiblemente 16-40 micras, y el subfiltro 24 tiene un tamaño de poro de aproximadamente 2-16 micras, 4-10 micras o 4,5,5 micras.

En una realización, el filtro 20 tiene un espesor entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 20 mm. En otra realización, el filtro 20 tiene un espesor entre aproximadamente 2 mm y aproximadamente 10 mm. En otra realización, el filtro 20 tiene un espesor entre aproximadamente 2 mm y aproximadamente 6 mm. En otra realización, el filtro 20 tiene un espesor de aproximadamente 4 mm.

- 5 En algunas realizaciones, la punta de pipeta 100 contiene, además, un prefiltro 30 ubicado entre la segunda abertura 16 y el filtro para muestras 20 (FIG. 1C). El prefiltro 30 tiene un tamaño de poro que es mayor que el tamaño de poro del filtro para muestras 20 y no se une específicamente a ácidos nucleicos. En otra realización, la punta de pipeta 100 contiene un filtro en aerosol 40 en la proximidad de la primera abertura 14 para prevenir la contaminación del dispositivo de bombeo (FIG. 1D).

10 Condiciones de preparación, unión, lavado y elución de la muestra

El paso de preparación de la muestra típicamente contiene un paso de lisis para librear los ácidos nucleicos de interés del huésped original, tal como células, bacterias o virus. La lisis de la estructura celular o viral puede lograrse químicamente (por ejemplo, NaOH o tiocianato de guanidina), mecánicamente (por ejemplo, perlas de vidrio o sonicación) o físicamente (por ejemplo, ciclos de congelación-descongelación). Para muestras de tejido puede emplearse un paso de digestión enzimática antes del paso de lisis. La muestra lisada luego se carga en un filtro monolítico de la presente solicitud para el aislamiento de ácidos nucleicos. Las FIGS. 2A-2D muestran un proceso típico de purificación de ácidos nucleicos utilizando la punta de pipeta 100 de la presente solicitud. En primer lugar, el material de la muestra se hace pasar (o fluye) a través del filtro 20 hacia el instrumento de pipeteado, filtrando el contenido para que los ácidos nucleicos en la muestra sean retenidos en el filtro 20. Preferiblemente, el material de la muestra se vuelve a hacer pasar a través del filtro 20 hacia la entrada 16 y luego se hace pasar a través del filtro 20 varias veces (por ejemplo, 2-5 veces, 2-10, veces, 2-25 veces, 2-20 veces, 5-10 veces, 5-15 veces, 5-20 veces, 10-15 veces, 10-20 veces o 15-20 veces) para mejorar la eficiencia de la unión. En algunos casos, el material de la muestra se hace pasar a través del filtro 20 al menos 2 veces, 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces o más. Típicamente, fluidos se hacen fluir a través del filtro en una primera dirección y luego se hacen fluir a través del filtro correspondiente en una dirección opuesta a la primera dirección, lo que resulta en una fracción de flujo que pasa a través del filtro al menos dos veces (FIG. 2A).

Los ácidos nucleicos pueden unirse a los filtros utilizando soluciones amortiguadoras de unión adecuadas. Dependiendo del objetivo para la unión (por ejemplo, ADN de APM, ADN de BPM o ambos), pueden alcanzarse condiciones de unión adecuadas mediante el ajuste de la concentración de uno o más agentes caotrópicos y/o sales caotrópicas de los mismos. Agentes caotrópicos ejemplares incluyen, a modo no taxativo, sales caotrópicas, tales como urea, tiourea, dodecilsulfato de sodio (SDS), isotiocianato de guanidina, clorhidrato de guanidina, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, yoduro de sodio, yoduro de potasio y perclorato de sodio; alcoholes alifáticos, tales como butanol, etanol, propanol e isopropanol; fenol y otros compuestos fenólicos; arginina y cloruro de magnesio. Sales caotrópicas ejemplares incluyen tiocianato de guanidinio, cloruro de guanidinio, yoduro de sodio, perclorato de sodio, perclorato de litio, urea y tiourea.

En algunas realizaciones se utilizan soluciones amortiguadoras de unión para promover la unión tanto de ADN de APM como de BPM a un filtro seleccionado en un primer paso, en donde un alcohol alifático, tal como isopropanol, se proporciona en un rango entre aproximadamente 17% y aproximadamente 25%, preferiblemente entre aproximadamente 20% y aproximadamente 24% (óptimo = 22,5%), y una sal caotrópica, tal como isotiocianato de guanidina y/o clorhidrato de guanidina se proporciona en un rango entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 4,0 M, preferiblemente entre aproximadamente 1,0 M y aproximadamente 2,5 M (óptimo = 1,8 M). Para promover la unión selectiva de ADN de APM a un filtro seleccionado puede proporcionarse un alcohol alifático, tal como isopropanol, en un rango entre aproximadamente 0% y aproximadamente 10%, preferiblemente entre aproximadamente 4% y aproximadamente 6% (óptimo = 4,7%) y una sal caotrópica, tal como isotiocianato de guanidina y/o clorhidrato de guanidina, se proporciona en un rango entre 1,0 M y 4,0 M, preferiblemente entre aproximadamente 3,0 M y aproximadamente 4,0 M. Para promover la unión (y concentración) de ADN de BPM recuperado a un filtro seleccionado puede proporcionarse un alcohol alifático, tal como isopropanol, en un rango entre aproximadamente 10% y aproximadamente 25%, preferiblemente entre aproximadamente 15% y aproximadamente 20% (óptimo = 17,7%) y una sal caotrópica, tal como isotiocianato de guanidina y/o clorhidrato de guanidina, se proporciona en un rango entre aproximadamente 1,0 M y 5,0 M, preferiblemente entre aproximadamente 2,0 M y aproximadamente 4 M (óptimo = 3,3 M).

En el siguiente paso (FIG. 2B), el filtro 20 se lava con una solución amortiguadora de lavado para eliminar materiales que no se unen específicamente al filtro. De forma similar al Paso 1, la solución amortiguadora de lavado se hace pasar a través del filtro 20 al menos 1 vez, 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces o más. En algunas realizaciones, el filtro 20 se lava con una sola solución amortiguadora de lavado antes del siguiente paso. En otras realizaciones, el filtro 20 se lava con dos o más soluciones amortiguadoras de lavado antes del siguiente paso. Este paso es un paso opcional que puede no ser necesario en algunas realizaciones.

El paso de lavado elimina los materiales extraños sin unir presentes en los extractos o fracciones de ácido nucleico. Ejemplos de soluciones amortiguadoras de lavado incluyen, a modo no taxativo, soluciones amortiguadoras que

contienen guanidina, acetato de sodio y etanol), soluciones amortiguadoras que contienen Tris y etanol, acetona, etanol, mezclas de acetona y etanol, y otros disolventes que se evaporan fácilmente para secar el filtro.

En el siguiente paso (FIG. 2C), el filtro 20 se seca haciendo pasar aire a través del filtro 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más veces. Este paso elimina el exceso de líquido del filtro 20 y permite la elución del ácido nucleico unido en un volumen más pequeño. Este paso también elimina los disolventes residuales del paso de unión y/o lavado porque dicho disolvente residual puede afectar negativamente las reacciones posteriores, tales como la PCR. Este paso es un paso opcional que puede no ser necesario en algunas realizaciones.

En el siguiente paso (FIG. 2D), el ácido nucleico unido al filtro 20 es eluido del filtro mediante una solución amortiguadora de elución. La solución amortiguadora de elución puede hacerse pasar a través del filtro 20 al menos 2 veces, 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces o al menos 20 veces o más.

Los ácidos nucleicos pueden eluirse de los filtros utilizando soluciones amortiguadoras adecuadas. Pueden lograrse condiciones de elución adecuadas mediante la adición de una solución amortiguadora de elución. Ejemplos de soluciones amortiguadoras de elución incluyen, a modo no taxativo, NaOH 1 mM, TrisHCl 10 mM o cualquier solución amortiguadora baja en sal o agua, preferiblemente con un pH por encima de 6,5.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente permiten 1) el aislamiento de un rango de longitudes de fragmentos de ADN de grandes volúmenes de muestra; y 2) el aislamiento selectivo de fragmentos de ADN en cierto rango de tamaños.

Al incorporar una matriz de unión monolítica en una punta de pipeta, el proceso de extracción e instrumentación requerido para purificar ácidos nucleicos de tipos de muestras difíciles se simplifica enormemente. La geometría y la porosidad de la matriz de unión se adapta para minimizar la impedancia fluidica o la obstrucción, proporcionando al mismo tiempo una gran área superficial para la unión de los ácidos nucleicos dentro de puntas de pipeta en el rango de 0,1 a 50 ml en volumen total. Por lo tanto, la matriz es microfluídicamente óptima, dado que pueden usarse bajas presiones para hacer pasar las muestras por ella. El flujo bidireccional durante la aspiración y la administración de las muestras permite un tiempo de residencia prolongado entre el extracto de la muestra y la matriz de unión para una recuperación y elución óptimas de los ácidos nucleicos y permite que un volumen relativamente grande de muestras se procese sin obstrucción dentro de una punta de filtro. El formato de punta de pipeta es universal para cualquier dispositivo que bombea líquido, desde una pipeta manual que es útil en entornos en los que las cantidades de muestras son bajas o los recursos son limitados hasta grandes sistemas de manipulación de líquidos capaces de procesar muchas muestras simultáneamente.

Separación de ácidos nucleicos de bajo peso molecular de ácidos nucleicos de alto peso molecular

En un aspecto, la presente solicitud proporciona un método para concentrar y separar ácidos nucleicos de bajo peso molecular (BPM) (por ejemplo, ácidos nucleicos fetales) y/o ácidos nucleicos de alto peso molecular (APM) (por ejemplo, ácidos nucleicos maternos) de una muestra que contiene tanto ácidos nucleicos de BPM como ácidos nucleicos de APM utilizando uno o más filtros que se unen específicamente a ácidos nucleicos de BPM y/o ácidos nucleicos de APM. El método comprende los pasos de hacer pasar la muestra a través de un primer filtro que se une tanto a los ácidos nucleicos de BPM como los ácidos nucleicos de APM, recuperar los ácidos nucleicos unidos del primer filtro, hacer pasar los ácidos nucleicos recuperados a través de un segundo filtro en condiciones que permiten la unión de los ácidos nucleicos de APM al segundo filtro para proporcionar una fracción de flujo, en donde la fracción de flujo contiene los ácidos nucleicos de BPM. En algunas realizaciones, el método comprende, además, los pasos de eluir los ácidos nucleicos de APM del segundo filtro, luego hacer pasar la fracción de flujo que contiene los ácidos nucleicos de BPM a través del segundo filtro en condiciones que permiten la unión de los ácidos nucleicos de BPM al segundo filtro y eluir los ácidos nucleicos de BPM del segundo filtro. De forma alternativa, el método también puede comprender los pasos de hacer pasar la fracción de flujo que contiene los ácidos nucleicos de BPM a través de un tercer filtro en condiciones que permiten la unión de los ácidos nucleicos de BPM al tercer filtro y eluir los ácidos nucleicos de BPM del tercer filtro. En algunas realizaciones, el primer y el segundo filtro son el mismo filtro. En otras realizaciones, los subfiltros se colocan separados entre sí. En otras realizaciones, los subfiltros se colocan adyacentes entre sí sin espacio entre ellos. En otras realizaciones, los subfiltros están fusionados entre sí para formar una única estructura monolítica con dos secciones de diferente porosidad. En algunas realizaciones, el primer y el segundo filtro son el mismo filtro con dos secciones de diferente porosidad.

En algunas realizaciones, el método descrito anteriormente (es decir, la separación de ADN en base a la exclusión por tamaño o enriquecimiento) se usa en el aislamiento de ADN sin células de muestras clínicas, cuyo volumen es comúnmente grande. Ejemplos de estas muestras clínicas incluyen, a modo no taxativo, muestras de mujeres embarazadas (para la separación de ADN materno y fetal), muestras de paciente con cáncer (para la separación de ADN normal de ADN tumoral), muestras de paciente transplantado (para la separación de ADN de huésped del de donante). En algunas otras realizaciones, el método descrito anteriormente se utiliza en el protocolo de preparación de bibliotecas antes de llevar a cabo la secuenciación de última generación o para el aislamiento de enfermedades infecciosas de muestras renales.

En algunas realizaciones, el método es utilizado para separar y aislar ácidos nucleicos fetales de ácidos nucleicos maternos en una muestra de plasma. En particular, el método utiliza filtros con tamaños de poro definidos para la captura y la concentración tanto de ácidos nucleicos de APM (por ejemplo, ácidos nucleicos maternos) como de ácidos nucleicos de BPM (por ejemplo, ácidos nucleicos fetales). Esto es seguido por la captura (y exclusión) de ácidos nucleicos de APM y la retención y concentración de los ácidos nucleicos de BPM fetales.

En realizaciones preferidas, los filtros se colocan en puntas de pipeta para que una muestra pueda cargarse en los filtros y eluirse de los filtros mediante pipeteado de la muestra a través de las puntas de pipeta. El formato de punta de pipeta puede automatizarse en una variedad de instrumentos de manipulación de líquidos para proporcionar capacidades de procesamiento de alto rendimiento.

En una realización en particular, el método incluye: a) hacer fluir una muestra de plasma que comprende ácidos nucleicos fetales y ácidos nucleicos maternos a través del volumen interior de una primera punta de pipeta que comprende una primera frita de vidrio monolítica en condiciones que permiten que tanto los ácidos nucleicos fetales como los ácidos nucleicos maternos se unan a la primera frita de vidrio monolítica, (b) hacer fluir una primera solución amortiguadora a través de la primera frita de vidrio monolítica para eluir ácidos nucleicos unidos, (c) hacer fluir ácidos nucleicos unidos a través de una segunda punta de pipeta que comprende una segunda frita de vidrio monolítica en condiciones que favorecen la unión de los ácidos nucleicos maternos a la segunda frita de vidrio monolítica y recolectar la fracción de flujo de los ácidos nucleicos unidos, (d) eluir ácidos nucleicos maternos unidos de la segunda punta de pipeta, (e) hacer fluir la fracción de flujo a través de la segunda punta nuevamente en condiciones que favorecen la unión de los ácidos nucleicos fetales a la segunda frita de vidrio monolítica y (f) eluir los ácidos nucleicos fetales a la segunda frita de vidrio monolítica.

La muestra puede ser cualquier muestra líquida que contenga ácidos nucleicos de diferentes tamaños. El método puede optimizarse para permitir la separación de ácidos nucleicos en un rango de tamaños (por ejemplo, 50-600 bp) de ácidos nucleicos en otro rango de tamaños (por ejemplo, mayores que 600 bp). En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de fluido corporal, tal como sangre, plasma, orina, saliva, líquido linfático o líquido cefalorraquídeo. En una realización en particular, la muestra es una muestra de plasma de una mujer embarazada.

La expresión "ácidos nucleicos de BPM" y "ácidos nucleicos de APM", cuando se utilizan en el contexto de extracción de ADN fetal de sangre o plasma maternos, se refieren a ácidos nucleicos en dos grupos de tamaños diferentes. Los ácidos nucleicos en el grupo de los "ácidos nucleicos de BPM" tienen tamaños que son más pequeños que los de los ácidos nucleicos del grupo de los "ácidos nucleicos de APM". En algunas realizaciones, la expresión "ácido nucleico de BPM" se refiere a ácidos nucleicos de 1000 bp o menores y la expresión "ácido nucleico de APM" se refiere a ácidos nucleicos que son mayores que 1000 bp. En otras realizaciones, la expresión "ácido nucleico de BPM" se refiere a ácidos nucleicos de 800 bp o menos y la expresión "ácido nucleico de APM" se refiere a ácidos nucleicos que son mayores que 800 bp. En otras realizaciones, la expresión "ácido nucleico de BPM" se refiere a ácidos nucleicos de 600 bp o menos y la expresión "ácido nucleico de APM" se refiere a ácidos nucleicos que son mayores que 600 bp.

En realizaciones ejemplares, el método se utiliza para el aislamiento de ADN fetal (típicamente menor que 600 bp) de ADN materno (típicamente mayor que 600 bp) en una muestra de plasma. El primer paso del método utiliza una primera punta de pipeta de 1-50 ml que contiene un primer filtro de frita de vidrio que tiene una porosidad que permite que muestras de plasma más espesas fluyan a través de la matriz sin obstrucción y el espesor permite una unión óptima de los fragmentos más pequeños. En algunas realizaciones, la primera punta de pipeta tiene un volumen de punta de aproximadamente 20 ml, aproximadamente 10 ml, aproximadamente 5 ml, aproximadamente 2 ml, aproximadamente 1 ml, aproximadamente 0,5 ml o aproximadamente 0,1 ml. El volumen de muestra de plasma adecuado es de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 ml. En algunos casos, una muestra puede distribuirse entre múltiples puntas de pipeta (por ejemplo, 2-4) para aumentar el volumen de muestra procesado. La punta puede utilizarse con un pipeteador motorizado. El método descrito en la presente puede llevarse a cabo utilizando distintos dispositivos, incluidas bombas de jeringa, jeringas manuales u otro tipo de métodos automatizados o manuales para mover líquido a través de la frita de vidrio u otro tipo de filtro. También pueden emplearse columnas, jeringas u otros receptáculos para el filtro de diferentes volúmenes y diseños, siempre y cuando las dimensiones permitan la colocación de un filtro lo suficientemente grande. En algunas realizaciones, el primer filtro de frita de vidrio tiene un tamaño de poro de 16-40 micras. En otras realizaciones, el primer filtro de frita de vidrio es un filtro fundido que tiene una primera sección con un tamaño de poro de 100-160 micras y una segunda sección con un tamaño de poro de 16-40 micras. En otras realizaciones, el primer filtro de frita de vidrio es un filtro fundido que tiene una primera sección con un tamaño de poro de 16-40 micras y una segunda sección con un tamaño de poro de 4-5,5 micras o 4-10 micras. El primer filtro de vidrio puede tener un espesor de 2-6 mm, preferiblemente 4 mm, y un diámetro de 5-10 mm, preferiblemente 7-8 mm. En una realización, la punta se adjunta a un pipeteador motorizado con adaptador. Esta configuración puede utilizarse para la extracción de ácidos nucleicos fetales de 10-20 ml de plasma utilizando los pasos de unión, lavado, secado y elución descritos anteriormente.

La condición de unión para el primer filtro de frita de vidrio se optimiza para la unión tanto de ADN fetal como del ADN materno al filtro. En algunas realizaciones, la mezcla de unión incluye plasma, reactivos para la digestión, solubilización y desnaturalización de material celular y otras proteínas presentes en plasma, incluidas enzimas tales como proteinasa K, detergentes tales como Triton, SDS y Tween, y desnaturalizantes tales como guanidina, y/o reactivos que facilitan

la unión del ADN del rango de tamaños deseado al filtro, tales como guanidina, isopropanol y acetato de sodio. En algunas realizaciones, la mezcla de unión contiene isopropanol o etanol en una concentración final de 17-25% v/v, preferiblemente aproximadamente 22,5% v/v, e isotiocianato de guanidina y/o clorhidrato de guanidina en una concentración final de aproximadamente 0,5-4 M, preferiblemente 1,8 M. Dicha mezcla de unión permite que tanto el ADN fetal como el ADN materno en la mezcla de unión se unan al primer filtro de fritada de vidrio. Después de hacer pasar la mezcla de unión a través del primer filtro de fritada de vidrio en ambas direcciones (es decir, hacer pasar el filtro en una dirección para que ingrese en la punta de pipeta y hacer pasar el filtro en otra dirección para que salga de la punta de pipeta) durante una o más rondas para la unión del ADN fetal y materno al filtro, el ADN unido es eluido del primer filtro con una solución amortiguadora. En algunas realizaciones, el primer filtro se lava una o más veces con una solución amortiguadora de lavado. Elución del ADN unido, que contiene tanto el ADN fetal como materno. En algunas realizaciones, el ADN unido es eluido en un volumen de 0,01-5 ml, 0,01-2,5 ml, 0,01-1 ml, 0,01-0,5 ml, 0,01-0,25 ml, 0,01-0,1 ml, 0,01-0,05 ml, 0,05-5 ml, 0,05-2,5 ml, 0,05-1 ml, 0,05-0,5 ml, 0,05-0,25 ml, 0,1-5 ml, 0,1-2,5 ml, 0,1-1 ml, 0,1-0,5 ml, 0,1-0,25 ml, 0,25-5 ml, 0,25-2,5 ml, 0,25-1 ml, 0,25-0,5 ml, 0,5-5 ml, 0,5-2,5 ml, 0,5-1 ml, 1-5 ml, 1-2,5 ml o 2-5 ml. En algunas realizaciones, el ADN unido es elegido en un volumen de aproximadamente 0,05 ml a aproximadamente 1 ml, o aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 0,5 ml, de manera de concentrar el ADN fetal y materno. En aplicaciones en las que no es necesario el enriquecimiento de una subpoblación de ADN, este paso es el último paso del proceso de extracción de ADN y el ADN es típicamente eluido en un volumen de 50-100 µl.

El segundo paso del método implica la remoción del ADN materno de la muestra de ADN eluida del primer filtro. En algunas realizaciones, este paso se logra con una punta de pipeta de 0,2-2 ml, preferiblemente 1 ml, que contiene un segundo filtro de fritada de vidrio. En algunas realizaciones, el segundo filtro de fritada de vidrio tiene un tamaño de poro de 16-40 micras. En otras realizaciones, el segundo filtro de fritada de vidrio tiene un tamaño de poro de 4-10 micras. En otras realizaciones, el segundo filtro de fritada de vidrio es un filtro fundido que tiene una primera sección con un tamaño de poro de 100-160 micras y una segunda sección con un tamaño de poro de 16-40 micras. En otras realizaciones, el segundo filtro de fritada de vidrio es un filtro fundido que tiene una primera sección con un tamaño de poro de 16-40 micras y una segunda sección con un tamaño de poro de 4-10 micras. El segundo filtro de vidrio puede tener un espesor de 2-6 mm, preferiblemente 4 mm, y un diámetro de aproximadamente 2-6 mm, preferiblemente aproximadamente 4 mm.

La mezcla de unión en este paso se optimiza para unir el ADN materno, pero no el ADN fetal, al segundo filtro de fritada de vidrio. En algunas realizaciones, la mezcla de unión contiene isopropanol o etanol en una concentración final de 0-10% v/v, preferiblemente aproximadamente 4,7% v/v, e isotiocianato de guanidina y/o clorhidrato de guanidina en una concentración final de aproximadamente 1,0-4,0 M, preferiblemente 3,4 M. Después de hacer pasar la mezcla de unión a través del segundo filtro de fritada de vidrio en ambas direcciones (es decir, hacer pasar el filtro en una dirección para que ingrese en la punta de pipeta y hacer pasar el filtro en otra dirección para que salga de la punta de pipeta) durante una o más rondas para la unión del ADN materno al filtro, la mezcla de unión es recolectada para el siguiente paso. La mezcla de unión recolectada, que se designa ahora la fracción de flujo del segundo filtro, contiene ADN fetal y no contiene ADN materno.

El tercer paso del método implica el aislamiento del ADN fetal de la fracción de flujo del segundo filtro. En algunas realizaciones, este paso se logra con la misma punta de pipeta utilizada en el segundo paso. En estas realizaciones, la punta de pipeta del segundo paso se lava primero con una solución amortiguadora para remover el ADN materno unido al segundo filtro en el segundo paso. El segundo filtro sin ADN materno lavado luego se usa para aislar el ADN fetal en condiciones que favorecen la unión del ADN fetal al segundo filtro. El ADN fetal unido se eluye luego del segundo filtro con una solución amortiguadora en un volumen de 0,01-0,1 ml. En otras realizaciones, una tercera punta de pipeta de 0,2-2 ml, preferiblemente 1 ml, que contiene un tercer filtro de fritada de vidrio es utilizada en el tercer paso. En algunas realizaciones, el tercer filtro de fritada de vidrio tiene un tamaño de poro de 16-40 micras. En otras realizaciones, el tercer filtro de fritada de vidrio tiene un tamaño de poro de 4-5,5 micras o 4-10 micras. En otras realizaciones, el tercer filtro de fritada de vidrio es un filtro fundido que tiene una primera sección con un tamaño de poro de 100-160 micras y una segunda sección con un tamaño de poro de 16-40 micras. En otras realizaciones, el tercer filtro de fritada de vidrio es un filtro fundido que tiene una primera sección con un tamaño de poro de 16-40 micras y una segunda sección con un tamaño de poro de 4-5,5 micras o 4-10 micras. El tercer filtro de vidrio puede tener un espesor de 2-6 mm, preferiblemente 4 mm, y un diámetro de aproximadamente 2-6 mm, preferiblemente aproximadamente 4 mm.

En algunas realizaciones, los pasos descritos anteriormente en la purificación de ADN fetal se llevan a cabo utilizando un solo filtro (es decir, una sola punta). La unión de ADN materno y/o fetal es controlada por la composición de la solución amortiguadora de unión (por ejemplo, la solución amortiguadora de unión 1 permite la unión tanto de ADN fetal como materno al filtro, la solución amortiguadora de unión 2 permite solamente la unión de ADN materno al filtro y la solución amortiguadora de unión 3 permite solamente la unión de ADN fetal al filtro). En algunas realizaciones, el único filtro es un filtro con dos secciones de diferente porosidad.

Kits

Otro aspecto de la presente invención proporciona un kit para separar y aislar ácidos nucleicos fetales de ácidos nucleicos maternos en una muestra de plasma. El kit puede incluir cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente. En una realización, el kit incluye: una o más puntas de pipeta que tienen forma de cono truncado y

dimensiones que permiten ajustarse al extremo de un instrumento de pipeteado. La o las puntas de pipeta comprenden una punta que comprende un filtro que comprende una estructura monolítica de vidrio sinterizado básicamente autoportante rígida con un tamaño de poro de entre aproximadamente 16 micras y aproximadamente 40 micras. En algunas realizaciones, el kit comprende, además, al menos una solución amortiguadora de unión formulada para proporcionar condiciones para unir ácidos nucleicos maternos a un filtro, en donde las condiciones incluyen más de 0% y menos de aproximadamente 10% de alcohol y guanidina en un rango entre aproximadamente 1,0 M y aproximadamente 4,0 M; y al menos una solución amortiguadora de unión formulada para proporcionar condiciones para unir ácidos nucleicos fetales a un filtro, en donde las condiciones incluyen alcohol en un rango entre aproximadamente 10-25% y guanidina en un rango entre aproximadamente 1,0 M y aproximadamente 5,0 M. En algunas realizaciones, el kit comprende, además, al menos una solución amortiguadora formulada adecuadamente para eluir ADN de la estructura de vidrio sinterizado y al menos una solución amortiguadora de lavado formulada adecuadamente para remover materia extraña sin unir a la estructura de vidrio sinterizado. En algunas realizaciones, la o las puntas de pipeta comprenden una punta que tiene dos o más filtros colocados en ella. En una realización, la o las puntas de pipeta comprenden una punta que tiene un filtro monolítico de vidrio con dos secciones de diferente porosidad. En otras realizaciones, la o las puntas de pipeta comprenden una punta que tiene dos filtros de diferente porosidad, en donde un extremo de un filtro está fusionado a un extremo de otro filtro.

Sistemas automatizados de puntas de filtro

Puede emplearse cualquier modo de llevar a cabo el método de acuerdo con la presente solicitud. Sin embargo, los atributos, la adaptabilidad, la simplicidad y el flujo de trabajo de la punta de filtro permiten que sea fácilmente adaptada, automatizada y efectiva para distintas matrices de muestras clínicas, volúmenes de muestras de entrada y sistemas de manipulación de líquidos. De esta forma, en una realización preferida, el modo de operación incluye algún tipo de automatización.

En algunas realizaciones, la presente solicitud proporciona un método automatizado para purificar ácidos nucleicos de una muestra líquida utilizando el filtro de la presente solicitud. El método comprende: (a) proporcionar una plataforma robótica automatizada capaz de dispensar automáticamente reactivos, retirar contenidos de muestras y mover puntas de pipeta y/o tubos de muestras; (b) cargar la plataforma robótica con una pluralidad de puntas de pipeta de la presente solicitud, comprendiendo cada punta un receptáculo que define un pasaje entre una primera abertura y una segunda abertura y un filtro que ocupa una sección del pasaje, comprendiendo el filtro un material monolítico de filtro que se une específicamente a ácidos nucleicos; (c) hacer fluir al menos una porción de una muestra líquida que comprende ácidos nucleicos por una punta de pipeta, en donde la porción de muestra líquida es introducida en el receptáculo a través de la primera abertura, de forma tal que los ácidos nucleicos en la porción pasan a través del material de filtro y se unen a él; (d) expeler la porción de muestra líquida de la punta de pipeta a través de la primera abertura, en donde la porción de muestra líquida pasa a través del filtro una segunda vez mientras sale de la punta de pipeta; (e) eluir los ácidos nucleicos del filtro haciendo fluir hacia adentro una solución amortiguadora de elución a través de la punta de pipeta mediante la primera abertura y expeliendo la solución amortiguadora de la punta de pipeta a través de la primera abertura, en donde la solución amortiguadora pasa a través del filtro mientras entra y sale de la punta de pipeta; y (f) repetir los pasos (c)-(e) en cada una de la pluralidad de pipetas.

En una realización adicional se incluye un paso de lavado, en donde el filtro se lava haciendo fluir hacia adentro una solución amortiguadora de lavado a través de la punta de pipeta mediante la primera abertura y expeliendo la solución amortiguadora de lavado de la punta de pipeta a través de la primera abertura de forma tal que la solución amortiguadora de lavado pasa a través del filtro mientras entra y sale de la punta de pipeta. Preferiblemente, el paso de lavado se repite varias veces en cada una de la pluralidad de pipetas.

En una realización adicional se incluye un paso de secado, en donde el filtro se seca haciendo pasar aire a través del filtro varias veces. En algunas realizaciones, el filtro se seca haciendo pasar aire a través del filtro 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más veces.

En algunas realizaciones, el material de filtro comprende una frita de vidrio sinterizado que tiene un tamaño de poro de entre aproximadamente 2 micras y aproximadamente 220 micras y/o un espesor entre aproximadamente 2 mm y 6 mm. En ciertas realizaciones, la punta de pipeta comprende dos o más filtros de diferente porosidad, en donde cada uno de los dos o más filtros se une específicamente a ácidos nucleicos.

En ciertas realizaciones, la muestra líquida es una muestra de plasma que comprende ácidos nucleicos maternos y ácidos nucleicos fetales y una porción de los ácidos nucleicos unidos que comprende ácidos nucleicos maternos y fetales liberados del primer filtro se hace fluir a través de una segunda punta de pipeta que comprende un segundo filtro que comprende un segundo material de filtro, en donde los ácidos nucleicos eluidos se hacen fluir hacia arriba y hacia abajo a través de una primera abertura de la segunda punta de pipeta, de forma tal que los ácidos nucleicos maternos pasan a través de la punta de pipeta y se unen al segundo material de filtro y los ácidos nucleicos fetales pasan a través del segundo material de filtro y la primera abertura de la segunda punta de pipeta de la que son recuperados.

Los sistemas, dispositivos y métodos pueden ser totalmente automatizados o semiautomatizados mediante lógica programable. En un modo de operación, el método se lleva a cabo en placas de múltiples pocillos (por ejemplo, 24

pocillos, 96 pocillos, etc.). Preferiblemente, las mezclas se mezclan mediante el uso de manipulación de líquidos automatizada, ya que esto reducirá la cantidad de trabajo necesario para preparar las mezclas que han de investigarse. También pueden llevarse a cabo protocolos de muestreo automatizados mediante robótica utilizando equipos y métodos conocidos en la técnica.

- 5 Puede utilizarse cualquier maquinaria o equipo adecuados para mover las muestras a través del sistema de purificación automatizado y sus distintos pasos de procesamiento. Por ejemplo, los sistemas empleados en la presente pueden usar una variedad sistemas robóticos conocidos en la técnica para automatizar el movimiento de muestras, reactivos y otros componentes del sistema. Los sistemas robóticos ejemplares tienen la capacidad de mover muestras en uno, dos o tres ejes y/o rotar las muestras alrededor de uno, dos o tres ejes. Los sistemas robóticos ejemplares se mueven en una trayectoria que puede ubicarse por encima, por debajo o al costado de las piezas de trabajo. Típicamente, un componente robótico incluye un componente funcional, por ejemplo, un brazo robótico capaz de agarrar y/o mover una pieza de trabajo, insertar un pipeteador, dispensar un reactivo, aspirar, etc. Un "brazo robótico", tal como se usa en la presente, significa un dispositivo, preferiblemente controlado mediante un microprocesador, que físicamente transfiere muestras, tubos o placas que contienen muestras de un lugar a otro. Cada lugar puede ser una unidad en el sistema de purificación automatizado. En general, el software para el control de los brazos robóticos es comercializado por el fabricante del brazo.

- Los sistemas robóticos pueden trasladarse sobre una guía, por ejemplo, en la parte superior, inferior o lateral del área de trabajo, y/o pueden incluir segmentos articulados que permitan al brazo alcanzar distintas ubicaciones en el área de trabajo. Los sistemas robóticos pueden ser impulsados mediante motores conocidos en la técnica que pueden ser alimentados, por ejemplo, eléctricamente, neumáticamente o hidráulicamente. Puede utilizarse cualquier sistema de control de accionamiento para controlar los sistemas robóticos, tal como programación de PLC estándar u otros métodos conocidos en la técnica. Opcionalmente, los sistemas robóticos incluyen sistemas de información de la posición que miden ópticamente o mecánicamente la posición y/o la fuerza y permiten que el robot sea guiado hasta una ubicación deseada. Opcionalmente, los sistemas robóticos también incluyen mecanismos de control de posición, tales como topes mecánicos, marcadores ópticos o guías láser, que permiten obtener repetidamente posiciones particulares.

- Los protocolos de muestreo automatizados ejemplares pueden utilizar, por ejemplo, robots de manipulación de líquidos Eppendorf epMotion 5070, epMotion 5075, Hamilton STARlet, STAR y STARplus. Estos protocolos pueden adaptarse para el aislamiento de ARN, el aislamiento de ADN genómico de sangre entera y la extracción de ADN fetal y el enriquecimiento de plasma materno como se demuestra más adelante.

- Sin embargo, debería reconocerse que cada muestra clínica es única y variará en cuanto a la viscosidad, los particulados, las mucosidades, los contaminantes superficiales, los microbios y/o los antecedentes genéticos humanos. Por lo tanto, dadas las variaciones esperadas en la composición de las muestras clínicas y los usos pretendidos de un protocolo de preparación de muestras de punta de filtro automatizada, puede ser necesario modificar ciertos pasos en un procedimiento de punta de filtro para lograr los resultados deseados. Por ejemplo, la pureza y/o recuperación de ácido nucleico de las puntas de filtro descritas en la presente pueden verse afectadas por distintos parámetros, tales como (1) mezcla y homogenización de las muestras con solución amortiguadora de lisis (y alcohol); (2) tasas de flujo; (3) cantidad de muestras; (4) cantidad y tipo de lavado y (5) secado.

- Por ejemplo, con respecto a (1), si bien las puntas de filtro descritas en la presente tienen un tamaño de poro relativamente grande, la homogenización y licuefacción de las muestras es muy importante para una lisis celular eficiente y para los pasos de unión posteriores a la matriz de la punta de filtro. Con lisados homogéneos y bien licuados, las muestras también pueden pasarse por la punta de filtro con mayores tasas de flujo, lo que reduce el tiempo total del procesamiento de las muestras. Como se demuestra con el protocolo de plasma de gran volumen a continuación, pueden procesarse efectivamente grandes volúmenes de muestras de entrada con una punta de filtro, lo que permite a los usuarios homogenizar y licuar bien muestras difíciles (en línea y fuera de línea) y solo preocuparse mínimamente por los volúmenes de las muestras de entrada.

Además, debería apreciarse que las tasas de flujo más lentas durante la unión o elución de ácidos nucleicos típicamente resultan en mayores rendimientos de ácido nucleico, aunque a expensas del tiempo de procesamiento total. Tasas de flujo más lentas también minimizarán el grado de fragmentación de ADN.

- El número óptimo de ciclos de aspiración y dispensado depende del tipo de muestra, el volumen total de la muestra y las tasas de flujo. El Paso 1 en la FIG. 2A es típicamente el punto en el que la cantidad de ciclos (y tasas de flujo) pueden requerir cierta optimización empírica, donde muestras tales como aspirado nasofaríngeo representan uno de los lisados más desafiantes para optimizar debido al rango de viscosidades de ANF de diferentes pacientes.

- Se recomienda el secado completo de la matriz de la punta de filtro para evitar que disolventes orgánicos residuales se eluyan conjuntamente con la muestra de ácido nucleico purificada e inhiban procesos o pruebas posteriores. Dado que la punta de filtro no se seca mediante centrifugación o filtración al vacío, es importante maximizar tanto la tasa de flujo como la cantidad de ciclos durante el paso de secado. A veces hay una gotita residual de solución de lavado en el extremo de la punta de filtro después de que los ciclos de secado se han completado. El robot de Hamilton tiene la capacidad de realizar un "toque de punta" en el lado del pocillo para liberar la gotita, asegurando así una elución sin

disolvente. El sistema epMotion no cuenta con esta funcionalidad pero puede programarse un enjuague previo del extremo de la punta de filtro en solución amortiguadora para lograr el mismo efecto.

Debido a la geometría, el material de la punta de pipeta y el método de unión a los brazos para canales robóticos son únicos para cada fabricante de instrumentos, es necesaria una construcción de punta de filtro diferente para cada sistema de manipulación de líquidos. Las dimensiones de la matriz de la punta de filtro (diámetro, espesor y tamaño de poro) se correlacionan con la capacidad de unión de ácidos nucleicos (y las eficiencias de elución), como es de esperar para toda técnica de extracción en fase sólida. Si bien las matrices anchas (> 4 mm) pueden insertarse en una punta de filtro de 1 ml para aumentar la capacidad de unión de ácidos nucleicos para muestras de gran volumen y/o igualar la capacidad de unión de la matriz en diferentes formatos de puntas de filtro específicos, existe una correlación entre el espesor de la punta de filtro y las tasas de flujo durante el paso de unión inicial (en presencia de lisados brutos). De esta forma, a veces es ventajoso incluir matrices de mayor diámetro en puntas de pipeta de mayor volumen para los pasos iniciales de un protocolo automatizado (por ejemplo, la Hamilton/Akonni TruTips® de 5 ml para extracciones de gran volumen). Sin embargo, dadas las configuraciones de puntas de filtro específicas establecidas por los fabricantes de robots de manipulación de líquidos, no es razonable esperar que los rendimientos de ácido nucleico de las puntas de filtro sean idénticos en todas las plataformas de manipulación de líquidos de distintos fabricantes o en todos los tamaños de punta de filtro. La evaluación clínica de los protocolos de punta de filtro automatizados y las comparaciones directas con los sistemas automatizados comercialmente disponibles se describen con detalle más adelante en la presente.

Las muestras clínicas (por definición) contendrán cantidades significativas de ADN genómico humano a menos que sean adquiridas de sitios normalmente estériles (por ejemplo, fluido cerebroespinal). A veces se desea el ADN genómico humano, mientras que en otras aplicaciones el ADN humano representa un fondo genómico no deseado. En otros casos, puede servir como portador si el ácido nucleico objetivo deseado está presente en cantidades traza. La presencia de ADN de fondo no es problemática en general, siempre y cuando la cantidad total de ácido nucleico en la muestra no exceda la capacidad de unión de la matriz.

En el caso del protocolo de extracción de plasma de gran volumen descrito a continuación (FIG. 9), el objetivo fue aislar ADN fetal (fragmentado) en presencia de un exceso de 10-20 veces de ADN materno, que es similar al objetivo de preparación de muestras de pruebas de enfermedades infecciosas, excepto que las secuencias son muy congruentes y solamente pueden distinguirse mediante pruebas moleculares altamente específicas y/o discriminación por tamaño. En algunas realizaciones, el ADN circulante total se aísla utilizando una punta de filtro de 5 ml y posteriormente se separa el ADN de alto y bajo peso molecular a través de la posterior unión y elución a una punta de filtro de 1 ml mediante alteración de las condiciones de la solución amortiguadora de unión. La separación selectiva por tamaño y el enriquecimiento de ácidos nucleicos objetivos en base a sus propiedades de unión y elución a un monolito de sílice constituye un modo de acción significativamente diferente que el alcanzado mediante membranas o columnas de centrifugado de exclusión por tamaño. La separación por tamaño y el enriquecimiento de ADN microbiano de ADN genómico humano pueden lograrse de manera similar mediante personalización de la unión de la punta de filtro y las soluciones amortiguadoras de elución.

Una vez validado un protocolo de punta de filtro automatizado, existen relativamente pocas formas de introducir errores en el proceso. Sin embargo, es posible configurar los robots de manipulación de líquidos con una punta de filtro incorrecta o mediante la colocación de los reactivos en una cubeta de reactivo incorrecta. En algunas realizaciones se proporcionan placas de reactivos prellenadas y selladas con papel de aluminio para evitar estos errores. Las placas prellenadas pueden simplificar significativamente la complejidad de un procedimiento automatizado, reducir el número de puntas de pipeta y productos consumibles y minimizar el espacio en cubierta requerido para realizar la extracción. Posteriormente, los resultados de la extracción típicamente reflejan la calidad de la muestra inicial, en donde recuperaciones insuficientes se relacionan con la degradación de las muestras (durante el transporte o el almacenamiento) más que errores en el método de extracción.

Los protocolos automatizados demostrados adicionalmente en la presente hacen hincapié en la utilidad de la matriz de la punta de filtro en sí misma para procesar distintas muestras clínicas y en cómo puede adaptarse para grandes volúmenes y robots de manipulación de líquidos específicos. La simplicidad del sistema de puntas de filtro de la presente solicitud también otorga algunas ventajas económicas para los interesados en adquirir un nuevo sistema de purificación de ácidos nucleicos porque el equipo principal requerido para automatizar el procedimiento de puntas de filtro es el brazo para canales de pipetas en sí más que las varillas magnéticas, sistemas de vacío o centrifugas integradas. Minimizar el espacio en cubierta con protocolos de puntas de filtro también permite que los usuarios avanzados integren procesos automatizados corriente arriba o corriente abajo con los sistemas de puntas de filtro de la presente invención. Por ejemplo, la solución easyBlood de Hamilton para fraccionar sangre entera puede incorporarse con un método de extracción de puntas de filtro automatizado que optimizaría significativamente los procesos de generación de biobancos. Los procesos postextracción, tales como cuantificación y normalización de ácido nucleico, configuración de PCR y secuenciación de ADN también se integran fácilmente con puntas de filtro utilizando plataformas de manipulación de líquidos más grandes.

En la presente se divulga un método automatizado para purificar ácidos nucleicos de una muestra líquida que comprende: (a) cargar la plataforma robótica con una pluralidad de puntas de pipeta, comprendiendo cada punta un receptáculo que define un pasaje entre una primera abertura y una segunda abertura y un filtro que ocupa una sección

del pasaje, en donde el filtro se une específicamente a ácidos nucleicos y en donde la plataforma robótica automatizada es capaz de dispensar automáticamente reactivos, retirar contenidos de muestras y mover puntas de pipeta y/o tubos de muestras; (b) hacer fluir al menos una porción de una muestra líquida que comprende ácidos nucleicos a través de la primera abertura de una punta de pipeta de forma tal que los ácidos nucleicos pasan a través de la punta de pipeta y se unen al filtro que allí se encuentra; (c) expeler la porción de muestra líquida de la punta de pipeta a través de la primera abertura, en donde la porción de muestra líquida pasa a través del filtro una segunda vez mientras sale de la punta de pipeta; y (d) eluir los ácidos nucleicos del filtro haciendo fluir hacia adentro una solución amortiguadora de elución a través de la primera abertura de la punta de pipeta y expeliendo la solución amortiguadora de la punta de pipeta a través de la primera abertura, en donde la solución amortiguadora pasa a través del filtro mientras entra y sale de la punta de pipeta. En algunas realizaciones, los pasos (b)-(d) se llevan a cabo en cada una de la pluralidad de pipetas.

En algunas realizaciones, el método comprende, además, el paso de lavado del filtro haciendo fluir una solución amortiguadora de lavado hacia adentro a través de la punta de pipeta mediante la primera abertura y expeliendo la solución amortiguadora de lavado de la punta de pipeta a través de la primera abertura, en donde la solución amortiguadora de lavado pasa a través del filtro mientras entra y sale de la punta de pipeta. En una realización relacionada, el paso de lavado se repite dos o más veces.

En algunas realizaciones, los pasos de fluir y expeler la muestra se repiten hasta que la totalidad de la muestra líquida pasa a través del filtro al menos una vez.

En algunas realizaciones, el filtro comprende una frita de vidrio autoportante. En realizaciones relacionadas, la frita de vidrio es una frita de vidrio sinterizado que no se ha tratado ni recubierto con un agente que mejora la unión de ácido nucleico. En otras realizaciones relacionadas, la frita de vidrio tiene un tamaño de poro de entre aproximadamente 2 micras y aproximadamente 220 micras y tiene un espesor entre aproximadamente 2 mm y aproximadamente 20 mm.

En algunas realizaciones, la muestra líquida comprende plasma que contiene ácidos nucleicos maternos y fetales. En una realización relacionada, la punta de pipeta comprende dos o más filtros de diferente porosidad, en donde cada uno de los dos o más filtros se une específicamente a ácidos nucleicos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para separar y aislar ácidos nucleicos fetales de ácidos nucleicos maternos en una muestra de plasma que comprende: (a) hacer fluir una muestra de plasma que comprende ácidos nucleicos fetales y ácidos nucleicos maternos a través de un primer filtro en condiciones que permiten la unión específica de los ácidos nucleicos fetales y maternos al primer filtro; (b) eluir los ácidos nucleicos fetales y maternos unidos del primer filtro para formar una muestra de ácidos nucleicos concentrada que comprende ácidos nucleicos fetales y ácidos nucleicos maternos; (c) hacer fluir la muestra de ácidos nucleicos concentrada a través de un segundo filtro en condiciones que permiten a los ácidos nucleicos maternos unirse al segundo filtro y a los ácidos nucleicos fetales fluir a través del segundo filtro; y (d) recolectar la fracción de flujo del segundo filtro, en donde la fracción de flujo del segundo filtro contiene ácidos nucleicos fetales.

Las condiciones que permiten la unión específica de los ácidos nucleicos fetales y maternos al primer filtro en el paso (a) comprenden formar una primera mezcla de unión que comprende la muestra de plasma, un alcohol alifático en un rango entre aproximadamente 17-25% (v/v) y una sal caotrópica en un rango de concentración entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 4,0 M.

Las condiciones para unir los ácidos nucleicos maternos al segundo filtro de frita de vidrio en el paso (c) comprenden formar una segunda mezcla de unión que comprende la muestra de ácidos nucleicos concentrada, un alcohol alifático en un rango entre aproximadamente 0-10% (v/v) y una sal caotrópica en un rango de concentración entre aproximadamente 1 M y aproximadamente 4,0 M.

En algunas realizaciones, el método comprende, además, los pasos de: (e1) eluir ácidos nucleicos maternos unidos del segundo filtro para proporcionar un segundo filtro regenerado; (f1) hacer fluir la fracción de flujo del segundo filtro a través del segundo filtro regenerado en condiciones que permiten la unión de ácidos nucleicos fetales al segundo filtro; y (h1) eluir ácidos nucleicos fetales unidos del segundo filtro en el paso (f1). En una realización relacionada, las condiciones para unir los ácidos nucleicos fetales al segundo filtro en el paso (f1) comprenden formar una tercera mezcla de unión que comprende la fracción de flujo del segundo filtro de frita de vidrio, un alcohol alifático en un rango entre aproximadamente 10-25% (v/v) y una sal caotrópica en un rango de concentración entre aproximadamente 1 M y aproximadamente 5,0 M. En algunas realizaciones, el método comprende, además, los pasos de (e2) hacer fluir la fracción de flujo del segundo filtro a través del primer filtro en condiciones que permiten la unión de ácidos nucleicos fetales al primer filtro; y (f2) eluir ácidos nucleicos fetales unidos al primer filtro en el paso (e2).

En algunas realizaciones, el primer y el segundo filtro son fritas de vidrio autoportantes. En una realización relacionada, las fritas de vidrio son fritas de vidrio sinterizado. En otra realización relacionada, el primer filtro de frita de vidrio tiene un tamaño de poro de 16-40 micras y el segundo filtro de frita de vidrio tiene un tamaño de poro de 4-10 micras.

En algunas realizaciones, el método comprende, además, los pasos de: (e3) hacer fluir la fracción de flujo del segundo filtro a través de un tercer filtro en condiciones que permiten la unión de los ácidos nucleicos fetales al tercer filtro; y (f3) eluir ácidos nucleicos fetales unidos del tercer filtro.

En algunas realizaciones, uno o ambos del primer y el segundo filtro comprenden una fritas de vidrio que comprende una primera sección que tiene un primer tamaño de poro y una segunda sección que tiene un segundo tamaño de poro, en donde el primer tamaño de poro es diferente del segundo tamaño de poro.

En algunas realizaciones, el primer filtro y el segundo filtro son el mismo filtro.

- 5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para aislar ácidos nucleicos fetales de ácidos nucleicos maternos en una muestra de plasma que comprende: una punta de pipeta que comprende un filtro de fritas de vidrio autoportante, en donde el filtro de fritas de vidrio tiene un tamaño de poro de 2-220 micras y no está tratado ni recubierto con agente que mejora la unión de ácido nucleico al filtro de fritas de vidrio, una primera solución amortiguadora de unión formulada para proporcionar una mezcla de unión que tiene aproximadamente 17-25% v/v de un alcohol alifático y una sal caotrópica a una concentración de entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 4,0 M; y una segunda solución amortiguadora de unión formulada para proporcionar una mezcla de unión que tiene aproximadamente 0-10% v/v de un alcohol alifático y una sal caotrópica a una concentración de entre aproximadamente 1 M y aproximadamente 4,0 M.

- 15 En algunas realizaciones, el kit comprende una primera punta de pipeta que comprende un primer filtro de fritas de vidrio y que tiene un volumen de punta de 0,5-50 ml; y una segunda punta de pipeta que comprende un segundo filtro de fritas de vidrio y que tiene un volumen de punta de 0,5-50 ml. En una realización relacionada, el primer filtro de fritas de vidrio tiene un tamaño de poro de 16-40 micras y el segundo filtro de fritas de vidrio tiene un tamaño de poro de 4-10 micras. El filtro de fritas de vidrio comprende una fritas de vidrio fusionada que comprende una primera sección que tiene un primer tamaño de poro y una segunda sección que tiene un segundo tamaño de poro. En una realización relacionada, la primera sección tiene un tamaño de poro de 100-160 micras y la segunda sección tiene un tamaño de poro de 16-40 micras o en donde la primera sección tiene un tamaño de poro de 16-40 micras y la segunda sección tiene un tamaño de poro de 4-10 micras.

Ejemplos

- 25 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertos aspectos de la presente invención y para ayudar a los expertos en la técnica a poner en practica la invención. No se debe considerar de ningún modo que estos ejemplos limitan el alcance de la invención de manera alguna.

Ejemplo 1: Extracción de ARN automatizada a partir de aspirado nasofaríngeo

- 30 Se usó un robot para manipulación de líquidos Eppendorf epMotion 5070 con una matriz Akonni TruTip® de poros grandes incrustada en puntas de pipeta de Eppendorf de 1,2 ml, una placa de pocillos profundos de 2 ml (USA Scientific), reactivos de extracción Akonni TruTip® y aspirado nasofaríngeo como la matriz de muestra. El robot para manipulación de líquidos epMotion 5070 solo soporta hasta 8 puntas simultáneamente, por lo que se describe un protocolo automatizado de referencia para 8 extracciones paralelas. Sin embargo, pueden procesarse hasta 24 muestras durante un único programa en una placa de muestras de 96 pocillos de pocillos profundos. Un programa epMotion separado está disponible (y es requerido) para procesar 16 o 24 muestras. El protocolo mencionado a continuación es para una secuencia de comandos automatizada de 8 muestras.

Configuración:

- 1.1 Llevar las muestras nasofaríngeas a temperatura ambiente antes de comenzar la extracción.
- 1.2. Colocar una alícuota de 100 µL de aspirado nasofaríngeo más 150 µL de agua libre de nucleasas en la columna 1 de la placa de muestras; (FIG.3A).
- 40 1.3 Colocar la placa de muestras en la posición B1 en la mesa de trabajo epMotion (Figura 2B).
- 1.4 Colocar las puntas de pipeta, puntas de filtro y cubetas de reactivo de 30 ml en sus respectivas posiciones en la mesa de trabajo epMotion (FIG. 3B).
- 1.5 Abrir el programa Eppendorf epBlue, seleccionar el archivo Ejecutar proporcionado por Akonni para 8 muestras y cargar el método haciendo clic en el botón EJECUTAR en la pestaña EJECUTAR.
- 45 1.6 En Configuración del Sensor de Nivel, seleccionar Niveles y Puntas y hacer clic en el botón EJECUTAR.
- 1.7 Ingresar el volumen de la muestra en el programa y hacer clic en EJECUTAR.
- 1.8 La secuencia de comandos de epMotion le mostrará un mensaje al usuario para que agregue reactivos de extracción y elución a los depósitos de reactivos ubicados en la posición B2 en la mesa de trabajo. Agregar los volúmenes recomendados de cada reactivo a la cubeta respectiva. Para 8 muestras, los volúmenes de reactivo mínimos se representan en la Tabla 1:
- 50

Tabla 1

Reactivo	Volumen (ml)	Posición de la cubeta
95% de etanol	3,5	2
Solución amortiguadora de lavado D	9,0	3
Solución amortiguadora de lavado E	9,0	4
Solución amortiguadora de elución A2	1,3	5
Solución amortiguadora de unión y de lisis D	11,0	6

1.9 Ingresar los volúmenes de reactivo en la Tabla presentada por el programa epMotion durante el mensaje del Paso 1.8 anterior. El volumen de la solución amortiguadora dispensado por el usuario en cada depósito de reactivos respectivo debe ser mayor o igual a los volúmenes mínimos mencionados anteriormente. Si el volumen efectivo de la solución amortiguadora es significativamente mayor que los volúmenes recomendados del Paso 1.8, ingresar el volumen aproximado dentro de cada depósito en la Tabla del programa epMotion. Ingresos de volumen incorrectos podrían resultar en volúmenes de alícuotas incorrectos administrados por el equipo epMotion a cada tubo o pocillo en la(s) placa(s) de 96 pocillos.

Programa automatizado:

1.10 Seleccionar EJECUTAR para comenzar el método automatizado. La secuencia de comandos automatizada se moverá a través de los siguientes pasos (es decir, 1.11-1.23) sin la intervención del usuario:

División en alícuotas de lisis y reactivos de muestra:

1.11 Dispensar una solución amortiguadora de lisis D de 375 μ L en la columna 1 y mezclar por 10 ciclos (aspirar + dispensar = 1 ciclo). Este paso comienza el proceso de incubación de lisis mientras los reactivos restantes se dividen en alícuotas.

1.12 Dispensar 1,6 ml de solución amortiguadora de lavado D en la columna 2.

1.13 Dispensar 1,6 ml de solución amortiguadora de lavado E en la columna 3.

1.14 Dispensar 50 μ L de solución amortiguadora de elución A en la columna 4.

1.15 Pausar por 6 minutos para completar la incubación de la muestra de 10 minutos en la solución amortiguadora de lisis D

1.16 Agregar 375 μ L de etanol a cada pocillo en la columna 1, mezclar cada muestra con etanol a través de 10 ciclos de pipeteo.

Extracción:

1.17 Cargar 8 puntas de filtro desde la posición A2 en la mesa de trabajo y comenzar el proceso de extracción detallado en las FIGS. 3A y 3B.

1.18 Aspirar y dispensar la mezcla de muestra/solución amortiguadora de lisis/etanol de la columna 1 de la Placa de muestras por siete ciclos para unir el ácido nucleico a la matriz TruTip®. Aunque el flujo de muestra a través de la matriz TruTip® puede variar (debido a las diferencias en la viscosidad de la muestra clínica), el rendimiento del ácido nucleico no se verá afectado. Las opciones para mejorar el flujo de la prueba se describen en la Discusión.

1.19 Mover las puntas de filtro a la columna 2 de la Placa de muestras y realizar el ciclo de la solución amortiguadora de lavado D 5 veces sobre la matriz para retirar la solución amortiguadora de lisis residual y la matriz de las muestras.

1.20 Mover las puntas de filtro a la columna 3 de la Placa de muestras y realizar el ciclo de la solución amortiguadora de lavado E 5 veces sobre la matriz para retirar proteínas y otros contaminantes del ácido nucleico unido.

1.21 Mover las puntas de filtro a la posición 1 del depósito de reactivos vacío (en la ubicación de la Mesa de trabajo B2) y realizar el ciclo (a una tasa de flujo rápida) 80 veces para secar la matriz. Es importante secar exhaustivamente la punta del filtro, ya que disolventes residuales en preparaciones eluidas de ácido nucleico afectarán negativamente las enzimas, tales como transcriptasa inversa y polimerasa Taq.

1.22 Mover las puntas de filtro a la columna 4 de la Placa de muestras y realizar el ciclo en la solución amortiguadora de elución A 5 veces. El ácido nucleico extraído y purificado está ahora en la solución amortiguadora de elución en los pocillos de la columna 4 de la Placa de Muestra.

1.23 Expulsar las puntas de filtro al recipiente de desechos de epMotion.

Cuando el programa termina, retirar manualmente la Placa de muestras del instrumento y transferir el ácido nucleico purificado a tubos nuevos para su almacenamiento a largo plazo o uso adicional. Los usuarios de epMotion avanzados pueden agregar instrucciones al archivo Ejecutar para transferir las muestras eluidas en tubos de almacenamiento separados o placas de PCR, si se desea. El programa para 16 muestras totales repetirá los pasos 1.11 a 1.16 usando las columnas 5-8 de la Placa de muestras. Para el programa de 24 muestras, los pasos 1.11 a 1.16 se repiten 2 veces más usando las columnas de Placa de muestras 5-8 y 9-12, respectivamente.

La Tabla 2 proporciona una lista de reactivos y equipos usados en el Ejemplo 1:

Tabla 2. Reactivos y equipos usados en el Ejemplo 1.

Reactivo/Material	Compañía	Número de catálogo
Kit de extracción de influenza TruTip (EPM TruTips)	Akonni Biosystems	300-11120
95% de etanol	Acros Organics/Fisher Scientific	AC615110040
99% de acetona	Sigma-Aldrich	270725-4L
Agua tratada con DEPC	Life Technologies	AM9906
Depósito de reactivo, 30 ml	Eppendorf	960050100
Placa de pocillos profundos 96/2000 µL	USA Scientific	30502302
Puntas de filtro epT.I.P.S. Motion, 1000 µL	Eppendorf	960050100
Equipo	Compañía	Número de catálogo
Sistema epMotion 5070	Eppendorf	
Herramienta dispensadora TM1000-8	Eppendorf	960001061
Rack de depósito	Eppendorf	960002148

Resultados representativos:

En la FIG. 4 se muestran datos de PCR en tiempo real para la extracción de ARN de influenza a partir de aspirados nasofaríngeos. Se observa una respuesta lineal en valores C_t promedio entre 10^4 y 10^6 de copias de genes ml^{-1} de influenza ($R^2 = 0,99$ y $0,98$ para influenza A y B, respectivamente), con desviaciones estándar en valores C_t promedio de menos de 1 ciclo. El tiempo de procesamiento de muestras total es 16, 28 y 40 minutos para 8, 16 y 24 muestras, respectivamente. Debido a que el aspirado nasofaríngeo típico o hisopo contendrá $> 10^4$ $\text{TCID}_{50} \text{ ml}^{-1}$ de influenza A o B, representando $> 10^7$ copias de genes ml^{-1} (asumiendo 1000 viriones por TCID_{50}), se espera por lo tanto que el protocolo de epMotion automatizado sea efectivo para la mayoría de especímenes de ANF clínicos.

Ejemplo 2: Extracción automática de ADN genómico

Se usó un robot para manipulación de líquidos Hamilton STAR para demostrar la extracción automatizada de 96 muestras simultáneamente de sangre entera. El Hamilton STAR difiere del sistema epMotion porque una unidad calentador/agitador opcional está disponible en la cubierta, lo cual es importante para la digestión enzimática de ciertas matrices clínicas, tales como sangre entera. Debido a que el sistema puede ajustarse con una cabeza de pipeta de 96 canales, existe una placa de 96 pocillos dedicada para cada uno de los pasos de punta de filtro y reactivos.

Configuración:

2.1 Encender el instrumento STAR y el ordenador.

2.2 Abrir el programa Hamilton Run Control.

2.3 Abrir el archivo Ejecutar proporcionado por Akonni para 96 muestras.

2.4 Colocar los instrumentos de laboratorio en la cubierta del STAR como se muestra en la FIG. 5.

2.5 Dispensar los reactivos en sus cubetas correspondientes (los volúmenes denotan el mínimo requerido para procesar 96 muestras) de acuerdo con la Tabla 3:

Tabla 3

Reactivo	Volumen (ml)	Posición de la cubeta
Solución amortiguadora de unión y de lisis F	75	5
95% de etanol	100	6
Solución amortiguadora de lavado J	175	7
Solución amortiguadora de lavado K	175	8
Solución amortiguadora de elución A2	12	9
Proteínasa K (20 mg ml ⁻¹)	8	15

2.6 Permitir que las muestras se equilibren hasta alcanzar la temperatura ambiente.

- 5 2.7 Colocar los tubos de muestras en los racks Portadores de muestras (posición de cubierta 4 en la FIG. 5). Colocar la Muestra 1 en la parte trasera del portador del extremo izquierdo y moverse secuencialmente hacia abajo cada portador con la Muestra 96 finalizando en la posición frontal derecha.

Programa automatizado:

2.8 Seleccionar el botón REPRODUCIR en la izquierda superior de la ventana del archivo Ejecutar. La secuencia de comandos automatizada se moverá por los siguientes pasos sin intervención del usuario: Ppp

10 Pretratamiento

2.9 Transferir 200 µL de cada tubo de muestra a la placa de incubación en la posición 14 en el módulo de calentador/agitador (FIG.5).

2.10 Dispensar 80 µL de proteínasa K en cada pocillo de muestra de la placa de incubación.

2.11 Dispensar 600 µL de solución amortiguadora de lisis F en cada pocillo de la placa de incubación.

- 15 2.12 Mezclar la solución por 10 ciclos a través de la punta del filtro y luego incubar durante 20 minutos a 70°C y 500 rpm. Mientras las muestras se incuban, el sistema para manipulación de líquidos continúa operando al dispensar reactivos en sus placas y pocillos correspondientes:

- 800 µL de etanol en cada pocillo de la placa de pocillos profundos en la posición 10.
- 1,6 ml de solución amortiguadora de lavado J en cada pocillo de la placa de pocillos profundos en la posición 11.
- 1,6 ml de solución amortiguadora de lavado K en cada pocillo de la placa de pocillos profundos en la posición 12.
- 100 µL de solución amortiguadora de elución A en cada pocillo de la placa de pocillos profundos en la posición 13.

2.13 Después de la incubación de 20 minutos, la mezcla de muestras se transfiere desde la placa de incubación a la placa de pocillos profundos en la posición 10 y se mezcla a través de 12 ciclos de pipeteado.

2.14 Expulsar las puntas de reactivo al recipiente de desechos.

25 Extracción

Esta porción del procedimiento de sangre de ADN es muy similar al protocolo de influenza de epMotion, excepto para la composición de reactivos de lavado y números de ciclo. Las puntas Hamilton TruTips® están impregnadas con carbono para permitir medir el nivel del líquido, para que el flujo de los líquidos por la TruTip no sea fácilmente visible para el usuario.

- 30 2.15 Cargar 96 TruTips® desde la posición 3 de la cubierta.

2.16 Aspirar y dispensar la mezcla de muestra/solución amortiguadora de lisis/etanol en la posición 10 para 10 ciclos para unir ácidos nucleicos a la matriz TruTips®.

2.17 Mover las puntas de filtro a la posición 11 y realizar el ciclo de la solución amortiguadora de lavado J 5 veces sobre la matriz para retirar la solución amortiguadora de lisis residual y la matriz de las muestras.

- 35 2.18 Mover las puntas de filtro a la posición 12 y realizar el ciclo de la solución amortiguadora de lavado K 5 veces sobre la matriz para retirar las proteínas y otros contaminantes del ácido nucleico unido.

2.19 Realizar el ciclo de la punta de filtro 40 veces a alta velocidad hasta que se seque al aire.

2.20 Mover las puntas de filtro a la posición 13 y realizar el ciclo en una solución amortiguadora de elución A2 5 veces. El ácido nucleico extraído y purificado está ahora en la solución amortiguadora de elución en la placa de pocillos profundos.

5 2.21 Expulsar las puntas de filtro al recipiente de desechos.

Cuando el programa termine, retirar la placa de elución del instrumento y transferir las muestras extraídas a los tubos apropiados para su almacenamiento o aplicaciones corriente abajo.

La Tabla 4 proporciona una lista de reactivos y equipos usados en el Ejemplo 2:

Tabla 4. Reactivos y equipos usados en el Ejemplo 2.

Reactivo/Material	Compañía	Número de catálogo
Kit de extracción de sangre d ADNg TruTip (Hamilton TruTips®)	Akonni Biosystems	300-20341
95% de etanol	Acros Organics/Fisher Scientific	AC615110040
Proteinasa K	Amresco	E195
Rack de puntas CO-RE 96 filtradas Hamilton de 1 ml	Hamilton	235905
Rack de puntas CO-RE 96 no filtradas Hamilton de 1 ml	Hamilton	235904
Cubeta de reactivo de 50 ml	Hamilton	187297
Placa de 2 ml de pocillos profundos	USA Scientific	1896-2800
Placa de 96 pocillos Nunc-2ml	Thermofisher	27874
Cubeta de reactivo	Fisher	14-222-412
Equipo	Compañía	Número de catálogo
Sistema Hamilton STAR	Hamilton	
Brazo para manipular líquidos de 8 canales	Hamilton	173027
Cabeza de 96 canales	Hamilton	199090
Portadores de puntas (TIP_CAR_480BC)	Hamilton	182085
Portadores de muestras (SMP_CAR_32_EPIL)	Hamilton	173400 para portadores
	Hamilton	182238 para insertos
Portadores de placas (PLTCAR_L5AC)	Hamilton	182090
Portador Multiflex	Hamilton	188039
Unidad HHS2	Hamilton	199033
Portador de rack (rackformfxcarL5_rgt5)	Hamilton	188047

10

Resultados representativos:

Dado el rango de pruebas moleculares realizadas en ADN genómico humano, el objetivo primario de la extracción de ácido nucleico de sangre entera es producir ADN genómico de alto peso molecular puro. El protocolo automatizado para 96 muestras se completa en 1 hr. La FIG. 6A muestra los perfiles de absorbancia de UV/Visibles para 45 muestras de sangre positivas procesadas simultáneamente con 45 blancos de reactivos en el protocolo de Hamilton STAR, con una relación $A_{260/280}$ promedio de 1,96 y una relación de $A_{260/230}$ promedio de 1,93. Una relación $A_{260/280}$ entre 1,7-2,0 y una relación $A_{260/230} >1,7$ en general indican un ADN muy puro, sin sales residuales, proteínas o disolventes, y aceptable para la mayoría de aplicaciones moleculares corriente abajo. El 1% de gel de agarosa en la FIG. 6B muestra que el ADNg resultante es de alto peso molecular (> 24 Kb), con mínima fragmentación. El ADN humano del conjunto entero de 45 muestras positivas se cuantificó con el Kit de cuantificación de ADN humano Quantifiler® (Life Technologies) en el sistema LightCycler® 480, resultando en un rendimiento promedio de $5,26 \pm 0,46$ ug de ADN humano por 200 uL de sangre entera.

15

20

La Tabla 5 muestra las relaciones de $A_{260/280}$ promedio de ADNg automáticamente purificado de sangre entera, capa leucocitaria, saliva, muestra bucal, pulmón de rata, hígado de rata, bazo de rata y riñón de rata.

25

Tabla 5. Calidad de ADN genómico de varios tipos de muestra.

Tipo de muestra	A260/A280 Promedio
Sangre entera	1,92

Capa leucocitaria	1,88
Saliva Oragene	1,78
Muestra bucal	1,90
Pulmón de rata	1,86
Hígado de rata	2,06
Bazo de rata	2,10
Riñón de rata	2,12

La FIG. 6C muestra los resultados de qPCR en tiempo real de 8 pasadas cada una en las cuales se procesaron 200 µl de entrada de sangre entera, combinada, con 1 ml de filtro de TruTip® y se eluyeron en un volumen de 100 µl. Los resultados muestran que el rendimiento promedio de ADN humano aislado por diferentes operadores durante 3 días separados fue altamente reproducible. La FIG. 6D muestra que los rendimientos de ADNg promedio de sangre entera fueron lineales durante un rango de volúmenes de entrada de sangre entera de 100 µL, 200 µL y 300 µL procesada (8 pasadas cada una) de filtros TruTip® de 1 ml (lado izquierdo) y volúmenes de sangre entera de 1000 µL y 2000 µL, procesada de filtros TruTip® de 5 ml (centro y derecha). La FIG. 6E muestra los resultados de un estudio de contaminación cruzada en el cual una placa que contenía 24 pocillos de saliva y 24 pocillos de PBS se sometió a un proceso de extracción de ADN automático. El ADN extraído de cada pocillo se amplificó entonces con qPCR. Tal como se muestra en la FIG. 6E, no hubo contaminación cruzada entre los pocillos. La FIG. 6F muestra los resultados de absorbancia de UV a partir de una comparación de rendimientos de ADNg promedio de 7 muestras de saliva individuales ciegas (Muestras A-G; 400 µl de entrada/100 µl de elución) extraídas usando el método de centrifugación manual de columna de Qiagen (columna/pares de la derecha) y un método de extracción automatizado de acuerdo con la presente invención (columna/pares de la izquierda). Los datos sugieren que el proceso automático de la presente solicitud proporciona una mejor recuperación del ADNg de las muestras que el proceso de Qiagen. La FIG. 6G muestra los tiempos de procesamiento para 200 µl de sangre entera procesada a partir de un filtro TruTip® (Columna 1) en comparación con otros cinco sistemas de extracción de la competencia (Columnas 2-6).

Ejemplo 3: Protocolo para purificar ácidos nucleicos fetales

Los diagnósticos prenatales no invasivos (DPNI) son un mercado importante que crece rápidamente que ofrece avances médicos de vanguardia debido a su capacidad de reemplazar los métodos diagnósticos prenatales estándar que implican muchos riesgos, incluida la deformación fetal y aborto espontáneo. En su lugar, la evaluación por anomalías genéticas en el ADN fetal presente en el plasma de la madre solo requiere una simple extracción de sangre. Aunque este método ofrece un abordaje de riesgo más bajo para los diagnósticos prenatales, también hay muchos desafíos con el tipo de muestra que requieren técnicas de procesamiento especiales. Primero, el ADN fetal está presente en concentración baja en el plasma materno temprano en el embarazo, así que es importante ser capaz de procesar grandes volúmenes de muestras y concentrarlas para alcanzar cantidades adecuadas para el análisis. Sin embargo, los kits actuales disponibles en el mercado permiten volúmenes de entrada de solo 250 µL-5 ml y aislar el ácido nucleico total. En segundo lugar, el ADN circulante fetal está presente en el plasma materno en un alto fondo de ADN circulante materno (Lo 1997). Si la muestra de sangre no es procesada de manera oportuna (<24 hrs), entonces el fondo del ADN materno aumenta con el transcurso de tiempo provocando un descenso adicional en el ADN fetal % presente (Barrett 2011). Esta relación baja dificulta cuantificar con precisión los diferentes números de copias de genes específicos para el ADN fetal. Más aun, las muestras de plasma materno, dependiendo de cuán rápido se procesan, pueden contener factores de coagulación y otras proteínas y coagulantes que provoquen la obstrucción de materiales de unión en columnas de centrifugación. Tercero, los kit actuales usan métodos de columnas de centrifugación de sílice que no son fácilmente automatizados, lo cual es una capacidad importante cuando se pasa a un ensayo diagnóstico clínico con aprobación reguladora.

Un protocolo ejemplar para separar y aislar ácidos nucleicos fetales de ácidos nucleicos maternos en una muestra de plasma de acuerdo con la presente invención se proporciona a continuación.

3.1.0 Configuración

3.1.1 Colocar una alícuota de 615 µl de Proteinasa K en cada tubo de muestra de 5 ml (dos tubos de muestra de 5 ml por muestra).

3.1.2 Agregar 1 µg de ARN portador (5µL de 0,2 µg/µl) a cada tubo de muestra.

3.1.3 Agregar 6,2ml de solución amortiguadora de lisis CN-L1 a cada tubo de muestra.

3.1.4 Agregar 5 ml de muestra de plasma a cada tubo de muestra.

3.1.5 Agitar vorticialmente los tubos de muestra durante 30 segundos a velocidad máxima.

3.1.6 Incubar a 60°C durante 30 minutos en un baño de agua.

3.1.7 Agregar 12 ml de solución amortiguadora de unión CN-B1 a cada tubo de muestra.

- 3.1.8 Agregar 10 µl de BSA (20 mg/ml) a cada tubo de muestra.
- 3.1.9 Agitar vorticialmente los tubos de muestra durante 15 segundos a velocidad máxima.
- 3.1.10 Incubar los tubos de muestra sobre hielo durante 5 minutos
- 3.2.0 Extracción:
- 5 3.2.1 Unión del ADN fetal y materno al filtro
- 3.2.1.1 Ajustar una punta de pipeta de 20 ml a un pipeteador motorizado.
- 3.2.1.2 Pipetear el líquido en el tubo de muestra A durante 18 ciclos (ciclo = aspirar + dispensar).
- 3.2.1.3 Repetir el paso 3.2.1.2 para el tubo de muestra B.
- 3.2.1.4 Desechar los tubos de muestra (que contienen la muestra de líquido) pero retener la punta de pipeta.
- 10 El ácido nucleico está ahora unido al filtro de punta de pipeta.
- 3.2.2 Lavar
- 3.2.2.1 Usando el pipeteador motorizado, lavar con pipeta la solución amortiguadora a través de la punta de pipeta durante 1 ciclo.
- 3.2.2.2 Desechar la solución amortiguadora de lavado pero retener la punta de pipeta.
- 15 3.2.2.3 Repetir el paso 3.2.2 tres veces más.
- El ácido nucleico aún está unido al filtro de punta de pipeta.
- 3.2.3 Secar
- 3.2.3.1 Usando el pipeteador motorizado, hacer pasar aire a través del filtro de la punta de pipeta durante 15 ciclos. Golpear suavemente la punta de pipeta intermitentemente si quedó una cantidad perceptible de solución amortiguadora de lavado.
- 20 Este paso es para evitar la inhibición de PCR que podría ocurrir debido a un exceso de solución amortiguadora.
- 3.2.3.2 Esperar 1 minuto para permitir que el filtro de la punta de pipeta se seque exhaustivamente.
- El ácido nucleico aún está unido al filtro de punta de pipeta.
- 3.2.4 Eluir ácidos nucleicos maternos y fetales purificados de la punta de pipeta
- 25 3.2.4.1 Extraer la solución amortiguadora de elución a través de la punta de pipeta y esperar 1 minuto para permitir que la solución amortiguadora de elución se incube en el filtro.
- 3.2.4.2 Pipetear el líquido en el Tubo 1 de elución y repetir por un total de 5 ciclos.
- 3.2.4.3 Repetir los pasos 3.2.4.1 y 3.2.4.2 con el tubo 2 de elución.
- 3.2.4.4 Centrifugar los tubos y combinar la muestra de los tubos 1 y 2 de elución.
- 30 3.2.4.5 Medir el volumen total contenido en el tubo de elución y llevar el volumen a 450 µl con la solución amortiguadora de elución A2.
- El ácido nucleico extraído está ahora en el tubo de elución.
- 3.2.4.6 Desechar la punta de pipeta.
- El ácido nucleico purificado está ahora pronto para la exclusión y concentración.
- 35 3.3.0 Exclusión de ácidos nucleicos de APM
- 3.3.1 Configuración:
- 3.3.1.1 Transferir la muestra eluida del paso 3.2.4.5 al tubo de microcentrifuga de 2 ml etiquetado con el número de muestra apropiado.
- 3.3.1.2 Agregar 495 µl de solución amortiguadora de unión CN-B2.
- 40 3.3.1.3 Agitar vorticialmente la muestra durante 10 segundos y centrifugar por pulsos.

3.3.2 Unir de manera selectiva los ácidos nucleicos de APM a la punta de pipeta

3.3.2.1 Unir una punta de pipeta de 1 ml de 4mm a una pipeta electrónica.

3.3.2.2 Pipetear el líquido del tubo de muestra por 20 ciclos (ciclo = aspirar + dispensar).

3.3.2.3 Cerrar el tubo de muestra y hacer a un lado.

5 NO desechar; el tubo de muestra contiene ADN fetal.

3.3.2.4 Retener la punta de pipeta.

El ácido nucleico de alto PM (ADN materno) está ahora unido al filtro de punta de pipeta.

3.3.3 Enjuagar la punta de pipeta

3.3.3.1 Pipetear el líquido en el tubo de enjuague durante 5 ciclos.

10 3.3.3.2 Desechar el tubo de enjuague pero retener la punta de pipeta.

El ácido nucleico se libera desde el Filtro.

3.4.0 Concentración de ácidos nucleicos de BPM

3.4.1 Configuración:

3.4.1.1 Agregar 575 µl de solución amortiguadora de unión CN-B3 al tubo de muestra.

15 3.4.1.2 Agitar vorticialmente el tubo de muestra durante 10 segundos y centrifugar por pulsos.

3.4.2 Unir los ácidos nucleicos de BPM

3.4.2.1 Pipetear el líquido en el tubo de muestra durante 20 ciclos.

3.4.2.2 Desechar el tubo de muestra pero retener la punta de pipeta.

El ácido nucleico está ahora unido al filtro.

20 3.4.3 Lavar los ácidos nucleicos de BPM

3.4.3.1 Mantener las mismas configuraciones mencionadas anteriormente en la pipeta Rainin.

3.4.3.2 Pipetear el líquido en el tubo 1 de lavado durante 1 ciclo.

3.4.3.3 Desechar el tubo 1 de lavado pero retener la punta de pipeta.

3.4.3.4 Repetir los pasos 3.4.3.2 y 3.4.3.3 con el tubo 2 de lavado.

25 El ácido nucleico está todavía unido al filtro.

3.4.4 Secar

3.4.4.1 Con la punta de pipeta en el tubo de secado vacío, hacer pasar aire a través de la punta de pipeta durante 15 ciclos. Golpear suavemente la punta de pipeta intermitentemente si quedó una cantidad perceptible de solución amortiguadora de lavado.

30 Este paso es para evitar la inhibición de PCR que podría ocurrir a partir de solución amortiguadora en exceso

3.4.4.2 Esperar 1 minuto para permitir que el filtro se seque exhaustivamente.

El ácido nucleico aún está unido al filtro de punta de pipeta.

3.4.5 Eluir

35 3.4.5.1 Extraer el líquido en el tubo de elución a través de la punta de pipeta y esperar 1 minuto para permitir que la solución amortiguadora de elución se incube en el filtro.

3.4.5.2 Pipetear el líquido en el tubo de elución por un total de 10 ciclos.

3.4.5.3 Retener la muestra eluida en el tubo de elución.

El ácido nucleico extraído está ahora en el tubo de elución.

3.4.5.4 Desechar la punta de pipeta.

El ácido nucleico purificado está listo ahora para la amplificación de PCR o almacenamiento a -20°C (-80°C para un almacenamiento a largo plazo).

El procedimiento de purificación descrito anteriormente se resume en la FIG. 7. En algunas realizaciones, se usa solo una única punta de pipeta en el procedimiento de purificación completo (es decir, los pasos 3.1.0 a 3.4.5.4) para bajar el costo del procedimiento. La unión selectiva del ADN fetal y/o materno al filtro de punta de pipeta puede alcanzarse con una diferente solución amortiguadora de unión. En algunas realizaciones, la única punta de pipeta contiene un filtro de fritas de vidrio con secciones de diferente porosidad. En algunas realizaciones, la única punta de pipeta contiene un filtro de fritas de vidrio sinterizado con dos secciones de diferente porosidad. En otras realizaciones, la única punta de pipeta contiene dos filtros de diferente porosidad y los filtros están fusionados entre sí. En otras realizaciones, la única punta de pipeta contiene dos o más filtros de diferente porosidad.

En algunas realizaciones, el método descrito anteriormente (es decir, la separación del ADN fetal en base a la exclusión por tamaño o enriquecimiento) se usa en el aislamiento de otros ADN sin células de muestra de pacientes con cáncer (para la separación de ADN normal de ADN tumoral) o muestras del paciente transplantado (para la separación de ADN de huésped del ADN de donante). La porción de exclusión/concentración de tamaño del protocolo podría usarse también en el protocolo de preparación de bibliotecas antes de llevar a cabo la secuenciación de última generación. El aislamiento de fragmentos pequeños de ADN de volúmenes grandes de muestra (no necesariamente incluyendo el enriquecimiento) es también una aplicación común para el aislamiento de enfermedades infecciosas de muestras renales.

Ejemplo 4. Caracterización del procedimiento de extracción de ADN fetal

Eficiencia de la recuperación de ADN

Se fragmentó ADN genómico masculino y femenino de longitud completa (Promega) usando un sonicador con copa de cuerno en la pared lateral de un tubo de PCR con perlas de vidrio y el tiempo de sonicación se optimizó para ADN femenino y masculino para producir rangos de fragmentos deseados para desarrollar y demostrar la capacidad de discriminar entre tamaños para el paso de exclusión del protocolo. Los resultados se muestran en la FIG. 8A. Se fragmentó ADN masculino a un rango de tamaño de <600bp (centrado alrededor de aproximadamente 150 bp) para simular ADN fetal circulante en una muestra de plasma. Se fragmentó ADN femenino a un rango de tamaño de aproximadamente 400 bp a aproximadamente 1200 bp (centrado en aproximadamente 800 bp) para simular ADN materno en una muestra de plasma. Las muestras que contenían una mezcla de 200 ng de ADN femenino fragmentado y varias cantidades de ADN masculino fragmentado (1, 3, 10, 30 y 100 ng) se prepararon y extrajeron con un protocolo de extracción de ADN descrito en el Ejemplo 3. La FIG. 8B muestra los resultados de qPCR de recuperación de ADN masculino fragmentado (Crom Y) ADN y ADN total (Crom 1). Los datos que se muestran son el promedio de tres extracciones. Cada muestra de extracción se ejecutó como un duplicado por qPCR. Los resultados ilustran que la recuperación de ADN masculino efectiva se alcanzó dentro del rango de concentración evaluado y es comparable a los rendimientos usando el Kit de ácidos nucleicos circulante Qiagen. La cantidad más baja de ADN total recuperado para TruTip en comparación con el método Qiagen demuestra el efecto del paso de enriquecimiento en el protocolo de TruTip.

En otros conjuntos de experimentos se evaluó la recuperación de ADN fetal y materno de los filtros de fritas de vidrio con diferentes dimensiones y las porosidades de matriz. Brevemente, se procesaron 10 ml de plasma femenino adulterado con 10 ng de ADN fragmentado masculino usando fritas de vidrio, filtros con diferentes dimensiones y porosidades de matriz siguiendo los procedimientos descritos en el paso 3.2.0 del Ejemplo 3 (solo el paso de extracción), se recuperó el ADN extraído en 250 µl de solución amortiguadora de elución y se analizó por qPCR para el ADN fetal (CHY) y total (CH1). Los resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6

Nombre de la muestra	Tipo de punta	CHY (ADN masculino)						CH1 (ADN total)					
		Cp1	Conc1	Cp2	Conc2	Cp promedio	Conc. promedio	Cp1	Conc1	Cp2	Conc2	Cp promedio	Conc. promedio
E1	4mm/8mm (16-40µm porosidad)	26,93	3,51E-01	26,82	3,77E-01	26,92	3,55E-01	24,99	2,59E+00	24,93	2,68E+00	25,00	2,57E+00
E2	4mm/8mm (16-40µm porosidad)	26,98	3,40E-01	26,94	3,50E-01			25,05	2,49E+00	25,04	2,50E+00		
E3	4mm/8mm (16-40µm porosidad)	27,57	2,34E-01	27,63	2,25E-01	27,19	3,08E-01	25,77	1,60E+00	25,85	1,53E+00	25,34	2,18E+00
E4	4mm/8mm (16-40µm porosidad)	26,79	3,84E-01	26,78	3,87E-01			24,87	2,77E+00	24,86	2,80E+00		

E5	4mm/7mm (filtro dual)*	26,9 4	3,51E- 01	26,9 5	3,48E- 01			25,07	2,47E+0 0	25,0 6	2,47E+0 0		
E6	4mm/7mm (filtro dual)*	26,8	3,82E- 01	26,9 5	3,48E- 01	26,9 1	3,57E- 01	25,02	2,54E+0 0	25,0 6	2,48E+0 0	25,05	2,49E+0 0
E7	4mm/7mm (40-60um porosidad)	28,5 3	1,21E- 01	28,3 5	1,39E- 01			26,86	8,29E- 01	26,8	8,58E- 01		
E8	4mm/7mm (40-60um porosidad)	29,2 2	7,22E- 02	29,0 5	8,22E- 02	28,7 9	1,04E- 01	27,9	7,23E- 01	27,1 1	7,14E- 01	26,97	7,81E-01

Efecto del paso de exclusión (paso 3.3 del Ejemplo 3) y paso de concentración (paso 3.4 del Ejemplo 3) con respecto solamente al paso de concentración (paso 3.3 del Ejemplo 3)

Una mezcla del ADN masculino y femenino fragmentado (de entrada) se extrajo usando el protocolo básico del Ejemplo 3 con o sin el paso 3.3. Tal como se muestra en la FIG. 9, en ausencia del paso de exclusión 3.3, el paso de concentración 3.4 es capaz de recuperar 80% del ADN masculino con leve enriquecimiento en comparación con el de entrada (~2,4%). Cuando se incluye el paso de exclusión 3.3 con el paso de concentración, los resultados muestran que hay una recuperación levemente más baja para el ADN masculino (CHY), pero una recuperación de ADN femenino significativamente más baja, resultando en un aumento general en el ADN fetal % de ~8% en este caso (Tabla 7).

Tabla 7

Nombre de muestra	Cp promedio	CHY (ADN masculino)				CH1 (ADN total)					
		Desv. est. (CP)	Conc. prom. (GES/uL)	Conc. prom. (ng/uL)	% recuperación	Cp prom.	Desv. est. (Cp)	Conc. prom. (GES/uL)	Conc. prom. (ng/uL)	% recuperación	% fetal
Entrada	26,21		5,76E+01	3,80E-01		24,07		5,38E+02	3,55E+00		10,7%
Exclusión y conc. TruTip (n=4)	26,75	0,17	3,99E+01	2,63E-01	69,24	25,38		2,16E+02	1,43E+00	40,15	18,5%
Entrada	26,53		4,61E+01	3,04E-01		24,52		3,93E+02	2,59E+00		11,7%
Solo conc. TruTip (n=4)	26,78	0,20	3,90E+01	2,57E-01	84,62	25,04	0,23	2,77E+02	1,83E+00	70,54	14,1%

GES = equivalentes de genoma

Ejemplo 5: Protocolo automatizado para la extracción de ácidos nucleicos fetales de muestras de plasma de gran volumen

Se usó el instrumento Hamilton STARplus para desarrollar y demostrar un protocolo automatizado para extraer ADN fetal circulante libre de 5 ml de plasma materno. El sistema STARplus puede soportar dos brazos de canales de pipeta automatizados, uno con 8 x 5 ml canales y uno con 8 x 1 ml canales. Estos brazos pueden operar en paralelo para procesamiento escalonado en lotes de 8 muestras cada uno. Puede usarse una punta de filtro de 5 ml para la extracción de gran volumen inicial, y puede usarse un filtro de 1ml para la separación por tamaño y concentración adicional del ácido nucleico extraído.

Configuración:

5.1 Encender el instrumento STARplus y el ordenador.

5.2 Abrir el programa Hamilton Run Control.

5.3 Abrir el archivo Ejecutar proporcionado por Akonni para 8 muestras de plasma de gran volumen.

5.4 Colocar los instrumentos de laboratorio en la cubierta del STARplus como se muestra en la FIG. 10.

5.5 Dispensar los reactivos en sus depósitos correspondientes de acuerdo con la Tabla 8:

Tabla 8:

Reactivo	Volumen (ml)	Posición de la cubeta
CN-W1	17	5A
CN-W2	17	5B

CN-W2	21	5C
Proteinasa K (20 mg ml ⁻¹)	5	6A
EBB	17	6B
EBA2	5	6C
CN-W3	5	6D
CN-B2	5	6E
CN-B3	5	6F
CN-L1	175	7
CN-B1	52	8

5.6 Permitir que la muestra se equilibre hasta alcanzar la temperatura ambiente.

5.7 Colocar los tubos de muestras en los racks Portadores de muestras (posición de cubierta 3 en la FIG. 10A). Colocar la Muestra 1 en la parte trasera y moverse secuencialmente hacia la parte delantera de la cubierta.

5 Programa automatizado:

Debido al gran volumen de muestra de entrada, los pasos de pretratamiento deben realizarse fuera del instrumento Hamilton STARplus en un baño de agua. Los pasos que requieren la intervención del usuario dentro del protocolo automatizado se indican con un asterisco (*) al comienzo de la oración y en negrita.

10 Pretratamiento: La muestra está incubada con proteinasa K y solución amortiguadora de lisis para homogeneizar la muestra y las células lisadas para liberar el ADN.

5.8 Seleccionar el botón REPRODUCIR en la izquierda superior de la ventana del archivo Ejecutar.

5.9 La secuencia de comandos automatizada agrega 5 ml de plasma, 615 µl de proteinasa K y 6,3 de solución amortiguadora de lisis CN-L1 a cada tubo cónico de 50 ml y luego se hará una PAUSA.

15 5.10 *Retirar los tubos cónicos de 50 ml de la cubierta de muestra, agitar vorticialmente durante 30 segundos a alta velocidad e incubar fuera de línea durante 30 min a 60°C en un baño de agua o bloque de calor. Después de que se retiren los tubos cónicos de la cubierta Hamilton, REANUDAR la secuencia de comandos automatizada para continuar dispensando reactivos en sus placas y pocillos respectivos (FIGS. 10B y 10C):

- 2 ml de CN-W1 pocillo por medio en la posición 9 columna 1
- 2 ml de CN-W2 pocillo por medio en la posición 9 columna 2
- 20 • 2 ml de CN-W4 pocillo por medio en la posición 9 columna 3
- 250 µl de EA2 pocillo por medio en la posición 9 columnas 4 y 5.
- 1 ml de EBB a cada pocillo en la posición 10 columna 2.
- 500 µl de CN-W3 a cada pocillo en la posición 10 columna 3.
- 500 µl de CN-W4 a cada pocillo en la posición 10 columna 4.
- 25 • 50 µl de EBA2 a cada pocillo en la posición 10 columna 5.

Debido a que los canales de 5 ml son demasiado anchos para usar pocillos adyacentes para cada muestra, el programa automatizado dispensa por lo tanto reactivos en cada pocillo por medio de la placa de pocillos profundos en la posición de cubierta 9.

Después de dispensar los reactivos, el programa hará una PAUSA.

30 5.11 *Después de los 30 min, incubación a 60°C, colocar los tubos cónicos de 50 ml sobre hielo durante 5 min.

5.12 *Regresar los tubos cónicos de 50 ml a sus posiciones originales dentro del rack portador de muestras en la posición 4 de la cubierta y REANUDAR la secuencia de comandos automatizada.

5.13 Agregar 12 ml de solución amortiguadora de unión CN-B1 a cada tubo de muestra y mezclar 10 veces.

35 Extracción de gran volumen: Pueden usarse puntas de filtro de 5 ml para extraer un ADN total de la muestra de plasma lisada.

5.14 Recoger puntas de filtro de 5 ml de la posición 2 para la extracción de ácido nucleico de gran volumen.

ES 2 673 315 T3

- 5.15 Realizar el ciclo de la mezcla de muestra 15 veces en el tubo cónico de 50 ml, comenzando en el fondo del tubo y moviéndolo 3 mm más arriba después de cada ciclo de pipeteado. Este paso une el ácido nucleico total a la matriz de unión.
- 5.16 Mover las puntas de filtro a las placas de pocillos profundos en la posición 6 columna 1 y realizar 1 ciclo en la solución amortiguadora de lavado CN-W1.
- 5.17 Mover las puntas de filtro a la posición 9 columna 2 y realizar el ciclo 1 vez en la solución amortiguadora de lavado CN-W2.
- 5.18 Mover las puntas de filtro a la posición 9 columna 3 y realizar el ciclo 2 veces en la solución amortiguadora de lavado CN-W4.
- 5.19 Mover las puntas de filtro a la posición 9 columna 4 y realizar el ciclo 40 veces a alta velocidad para secar la matriz de unión.
- 5.20 Mover las puntas de filtro a la posición 9 columna 5 y realizar el ciclo 10 veces para eluir los ácidos nucleicos unidos de las puntas de filtro de 5 ml. Esta es la elución de gran volumen No.1.
- 5.21 Mover las puntas de filtro a la columna 6 y repetir el paso con la segunda alícuota de solución amortiguadora de elución. Esta es la elución de gran volumen No.2.
- 5.22 Transferir la elución No.2 a la posición 9 columna 5 para combinarla con la elución No.1 y desechar las puntas de filtro.
- Exclusión y concentración: El ADN de alto peso molecular se retira de la muestra extraída y se aísla y concentra el ADN restante.
- 5.23 Agregar un eluyente combinado del paso 5.22 a la posición 10 columna 1 y mezclar exhaustivamente 10 veces.
- 5.24 Recoger puntas de filtro de 1 ml de la posición 13 y realizar el ciclo 20 veces para unir el ADN de alto peso molecular a la matriz.
- 5.25 Mover las puntas de filtro a la posición 10 columna 2 y realizar el ciclo 5 veces para enjuagar la punta. Las puntas de filtro se retienen y colocan de vuelta en el rack de puntas en la posición 13.
- 5.26 Con las puntas de reactivos de la posición 12, agregar 575 µl de solución amortiguadora de unión CN-B3 a la muestra en la posición 10 columna 1 y mezclar 10 veces.
- 5.27 Recoger las puntas de filtro del paso 5.25, regresar a la posición 10 columna 1 y realizar el ciclo 20 veces para unir el ADN restante de la muestra a la punta de filtro de 1 ml.
- 5.28 Mover las puntas de filtro a la posición 10 columna 4 y realizar el ciclo 1 vez en la solución amortiguadora de lavado CN-W3 para retirar cualquier inhibidor restante.
- 5.29 Mover las puntas de filtro a la posición 10 columna 5 y realizar el ciclo 1 vez en la solución amortiguadora de lavado CN-W4 para enjuagar la guanidina residual de CN-W3.
- 5.30 Elevar las puntas de filtro sobre la posición 10 columna 5 y hacer circular aire a través de las puntas 35 veces para secar la matriz.
- 5.31 Mover las puntas de filtro a la posición 10 columna 6 y realizar el ciclo 10 veces en EBA2 para eluir el ácido nucleico purificado, seleccionado por tamaño y concentrado.
- 5.32 Desechar las puntas de filtro.
- 5.33 Transferir la muestra eluida de la columna 6 a tubos de 1,5 ml en la posición 11. Las muestras extraídas están listas para el almacenamiento o procesamiento corriente abajo.
- La Tabla 9 proporciona una lista de reactivos y equipos usados en el Ejemplo 5.

Tabla 9

Reactivo/Material	Compañía	Número de catálogo
Kit de extracción de ADN circulante TruTip R+D (Hamilton TruTrips®)	Akonni Biosystems	
100% de etanol	Sigma-Aldrich	459828-1L
Isopropanol	Acros Organics/Fisher Scientific	AC327270010
Puntas de 4 ml filtradas	Hamilton	184022

Puntas de 1 ml no filtradas	Hamilton	235939
Placas de 96 pocillos profundos	USA Scientific	1896-2800
Tubos cónicos de 50 ml	Corning/Fisher Scientific	05-526B
Cubetas de reactivos de 50 ml	Hamilton	
Cubetas de reactivos de 120 ml	Hamilton	182703
Cubetas de reactivos de 96 pos de gran volumen	Fisher Scientific	14-222-412
Equipo	Compañía	Número de catálogo
Sistema Hamilton STARplus	Hamilton	
Portadores de puntas	Hamilton	182085
Portadores de tubos de 50 ml	Hamilton	182245
Portadores de muestras de 24 posiciones	Hamilton	
Portadores de muestras de 32 posiciones	Hamilton	173410
Portador Multiflex (7 guías de ancho)	Hamilton	Posición 1: CPAC o HHS con un adaptador de placa de fondo redondo
	Hamilton	Posición 2: Módulo MFX_Rgt (PN 188047) con adaptador de guía (7 a 6)
	Hamilton	Posición 3: Módulo MFX_DWP (PN 188042) con adaptador de guía (7 a 6)
	Hamilton	Posición 4: Módulo MFX_DWP (PN 188042) con adaptador de vía (7 a 6)

Resultados representativos:

Los resultados en tiempo real de ocho muestras replicadas de una muestra de plasma materna combinada procesada con el procedimiento de punta de filtro de gran volumen se muestran en la FIG. 11A. El protocolo completo (incluido el pretratamiento con proteinasa K fuera de línea) se termina en aproximadamente 2 horas. Los valores C_t promedio para todas las repeticiones fueron de $34,58 \pm 0,66$ y $29,76 \pm 0,50$ para el ADN fetal masculino (CHY) y total (CH1), respectivamente, lo que demuestra la excelente repetibilidad del método de extracción automatizado. La concentración del ADN fetal dentro de la combinación total de ADN (en equivalentes de genoma), se calculó en base a la comparación del análisis del punto de ajuste con estándares, con el ADN fetal porcentual promedio resultante en todas las muestras de 2,8%. El ADN fetal porcentual efectivo para esta muestra no se conoce porque las muestras se combinaron antes de realizar la extracción.

La FIG. 11B muestra una comparación del ADN fetal porcentual recuperado de 11 muestras únicas de plasma materno por duplicado utilizando un sistema automatizado que emplea filtros Akonni TruTip® de acuerdo con los procedimientos de extracción descritos anteriormente (columna/pares de la izquierda) y el Kit de Ácido Nucleico Circulante manual de Qiagen (columna/pares de la derecha).

Sin ceñirse a ninguna teoría o acción en particular, la presente invención satisface las necesidades descritas anteriormente mediante la implementación de una estructura de matriz autoportante rígida que es relativamente gruesa para una capacidad de unión alta, contiene porosidades relativamente grandes para impedancia de flujo bajo, tasas de flujo más rápidas y tolerancia más alta a partículas en muestras clínicas y ambientales, y consiste en material no suelto (por ejemplo, gel de sílice, tierra de diatomeas, perlas de vidrio).

El formato de matriz de unión y punta proporciona numerosas ventajas no realizadas en las tecnologías actuales incluidas: i) área superficial alta para mayor eficiencia y concentración de la extracción, ii) porosidad grande para volúmenes de muestras grandes y muestras sucias, iii) concepto simple obviando la necesidad de una centrifugadora o colector de vacío; y iv) compatibilidad de productos extraídos con cualquier sistema de detección de amplificación corriente abajo. El sistema descrito en la presente evita el uso de materiales endebles y delicados (por ejemplo, filtros de fibra, filtros de membrana, microestructuras de silicio) para proporcionar una operación fuerte y una fabricación simplificada que está bien caracterizada y es fácil de ampliar para un procesamiento de rendimiento más alto en un sistema de manipulación de líquidos robótico.

REIVINDICACIONES

1. Un método para separar y aislar ácidos nucleicos fetales de ácidos nucleicos maternos en una muestra de plasma que comprende:
 - 5 (a) hacer fluir una muestra de plasma que comprende ácidos nucleicos fetales y ácidos nucleicos maternos a través de un primer filtro en condiciones que permiten la unión específica de los ácidos nucleicos fetales y maternos al primer filtro;
 - (b) eluir los ácidos nucleicos fetales y maternos unidos del primer filtro para formar una muestra de ácidos nucleicos concentrada que comprende ácidos nucleicos fetales y ácidos nucleicos maternos;
 - 10 (c) hacer fluir la muestra de ácidos nucleicos concentrada a través de un segundo filtro en condiciones que permiten a los ácidos nucleicos maternos unirse al segundo filtro y a los ácidos nucleicos fetales fluir a través del segundo filtro; y
 - (d) recolectar la fracción de flujo del segundo filtro, en donde la fracción de flujo del segundo filtro contiene ácidos nucleicos fetales,
 - 15 en donde las condiciones que permiten la unión específica de los ácidos nucleicos fetales y maternos al primer filtro en el paso (a) comprenden formar una primera mezcla de unión que comprende la muestra de plasma, un alcohol alifático en un rango entre aproximadamente 17-25% (v/v) y una sal caotrópica en un rango de concentración entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 4,0 M, y en donde las condiciones para unir los ácidos nucleicos maternos al segundo filtro de fritas de vidrio en el paso (c) comprenden formar una segunda mezcla de unión que comprende la muestra de ácidos nucleicos concentrada, un alcohol alifático en un rango entre aproximadamente 0-10% (v/v) y una sal caotrópica en un rango de concentración entre aproximadamente 1 M y aproximadamente 4,0 M.
 - 20 2. El método de la reivindicación 1 que comprende, además, los pasos de:
 - (e1) eluir ácidos nucleicos maternos unidos del segundo filtro para proporcionar un segundo filtro regenerado;
 - (f1) hacer fluir la fracción de flujo del segundo filtro a través del segundo filtro regenerado en condiciones que permiten la unión de ácidos nucleicos fetales al segundo filtro; y (h1) eluir ácidos nucleicos fetales unidos del segundo filtro en el paso (f1),
 - 25 opcionalmente en donde las condiciones para unir los ácidos nucleicos fetales al segundo filtro en el paso (f1) comprenden formar una tercera mezcla de unión que comprende la fracción de flujo del segundo filtro, un alcohol alifático en un rango entre aproximadamente 10- 25% (v/v) y una sal caotrópica en un rango de concentración entre aproximadamente 1 M y aproximadamente 5,0 M.
 - 30 3. El método de la reivindicación 1 que comprende, además, los pasos de:
 - (e2) hacer fluir la fracción de flujo del segundo filtro a través del primer filtro en condiciones que permiten la unión de ácidos nucleicos fetales al primer filtro; y
 - (f2) eluir ácidos nucleicos fetales unidos del primer filtro en el paso (e2),
 - o que comprende, además, los pasos de:
 - 35 (e3) hacer fluir la fracción de flujo del segundo filtro a través de un tercer filtro en condiciones que permiten la unión de los ácidos nucleicos fetales al tercer filtro; y
 - (D) eluir ácidos nucleicos fetales unidos del tercer filtro.
 4. El método de la reivindicación 1, en donde el primer y el segundo filtro son fritas de vidrio autoportantes, opcionalmente en donde las fritas de vidrio son fritas de vidrio sinterizado, u
 - 40 opcionalmente en donde el primer filtro de fritas de vidrio tiene un tamaño de poro de 16-40 micras y el segundo filtro de fritas de vidrio tiene un tamaño de poro de 4-10 micras.
 5. El método de la reivindicación 1, en donde uno o ambos del primer y el segundo filtro comprenden una fritas de vidrio que comprende una primera sección que tiene un primer tamaño de poro y una segunda sección que tiene un segundo tamaño de poro, en donde el primer tamaño de poro es diferente del segundo tamaño de poro, o
 - 45 en donde el primer filtro y el segundo filtro son el mismo filtro.
 6. Un kit para aislar ácidos nucleicos fetales de ácidos nucleicos maternos en una muestra de plasma que comprende:

una punta de pipeta que comprende un filtro de fritas de vidrio autoportante, en donde el filtro de fritas de vidrio tiene un tamaño de poro de 2-220 micras y no está tratado ni recubierto con agente que mejora la unión de ácido nucleico al filtro de fritas de vidrio,

- 5 una primera solución amortiguadora de unión formulada para proporcionar una mezcla de unión que tiene aproximadamente 17-25% v/v de un alcohol alifático y una sal caotrópica a una concentración de entre aproximadamente 0,5 M y aproximadamente 4,0 M; y

una segunda solución amortiguadora de unión formulada para proporcionar una mezcla de unión que tiene aproximadamente 0-10% v/v de un alcohol alifático y una sal caotrópica a una concentración de entre aproximadamente 1 M y aproximadamente 4,0 M,

- 10 en donde el filtro de fritas de vidrio comprende una fritas de vidrio fusionada que comprende una primera sección que tiene un primer tamaño de poro y una segunda sección que tiene un segundo tamaño de poro, opcionalmente en donde la primera sección tiene un tamaño de poro de 100-160 micras y la segunda sección tiene un tamaño de poro de 16-40 micras, o en donde la primera sección tiene un tamaño de poro de 16-40 micras y la segunda sección tiene un tamaño de poro de 4-10 micras.

- 15 7. El kit de la reivindicación 6, en donde la punta de pipeta tiene un volumen de punta de 0,5-50 ml.

8. El kit de la reivindicación 7 que comprende, además, una punta de pipeta adicional que comprende un filtro de fritas de vidrio autoportante, en donde la punta de pipeta adicional tiene un volumen de punta de 0,5-50 ml, o

en donde el filtro de fritas de vidrio tiene un tamaño de poro de 16-40 micras y el filtro de fritas de vidrio en la punta de pipeta adicional tiene un tamaño de poro de 4-10 micras.

20

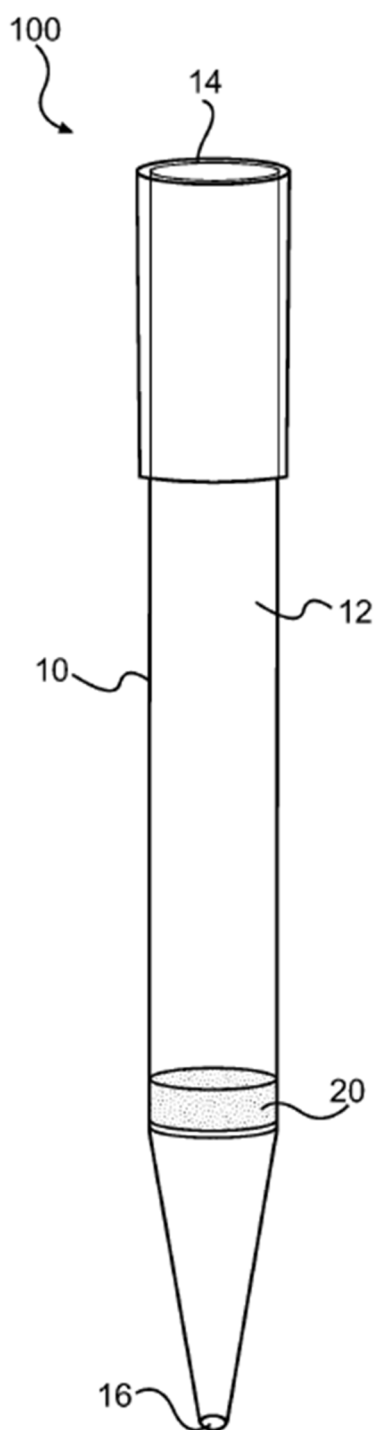


FIG. 1A

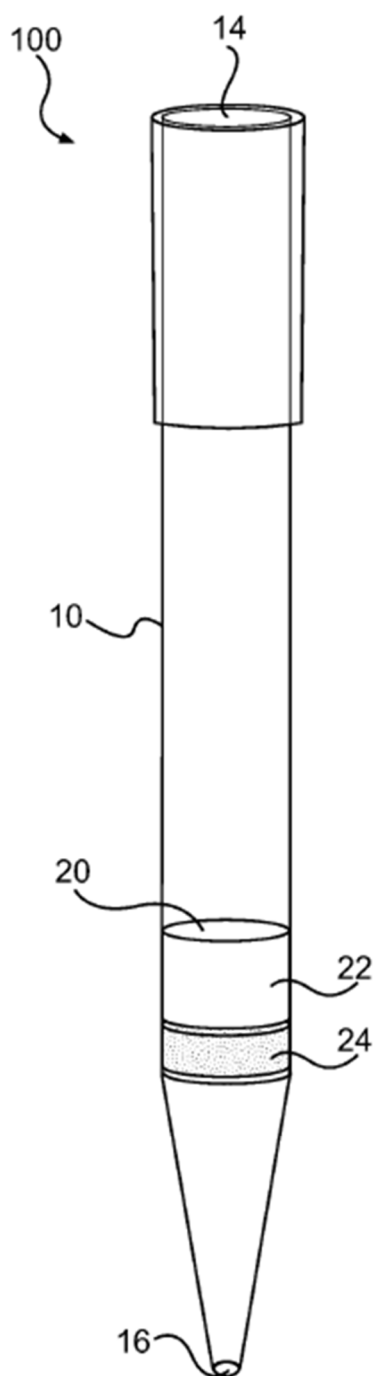


FIG. 1B

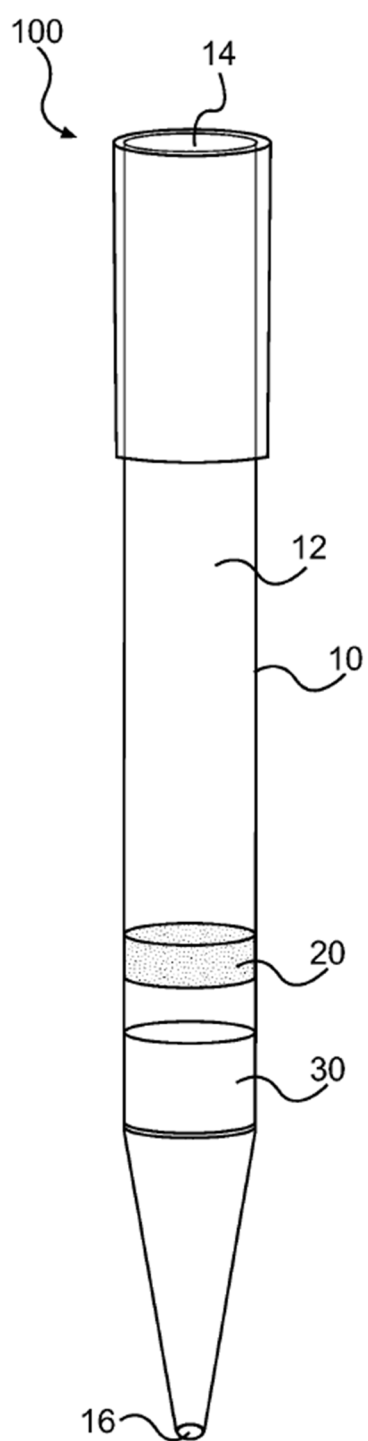


FIG. 1C

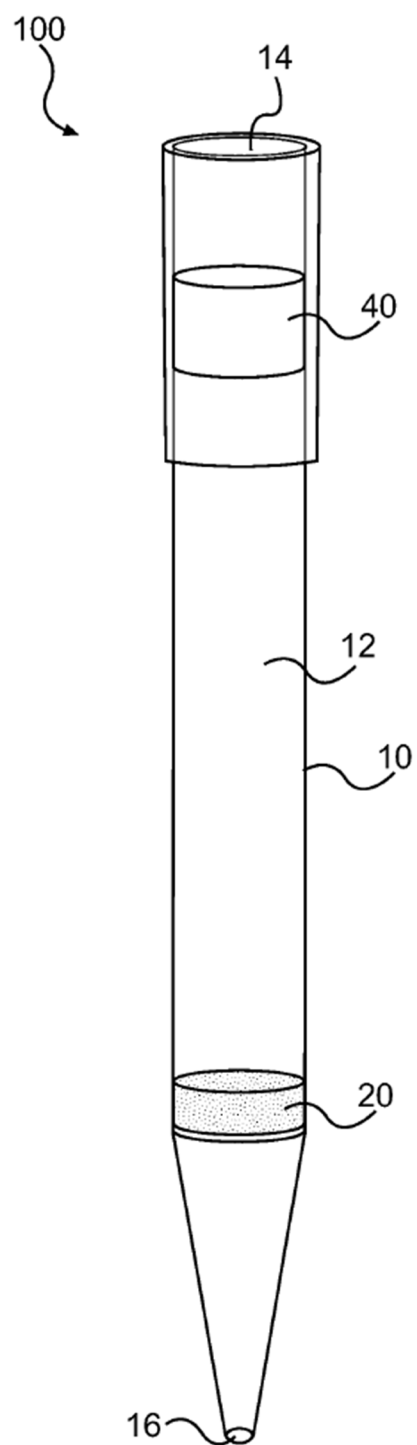


FIG. 1D

PASO 1 UNIR EL ÁCIDO A LA MATRIZ

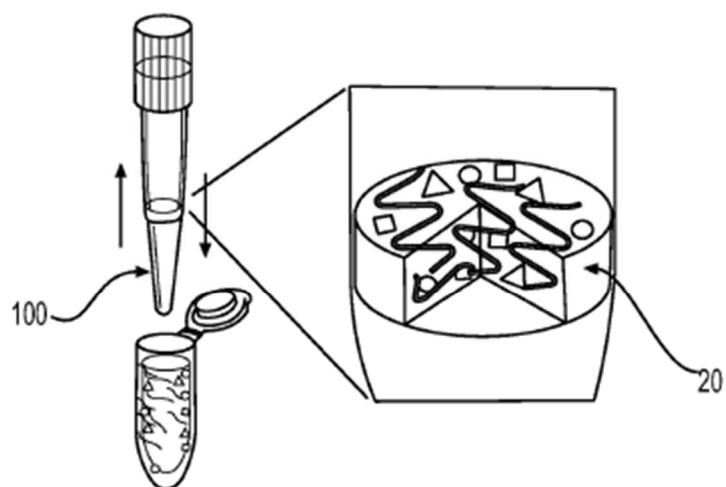


FIG. 2A

PASO 2 LAVAR LAS IMPUREZAS

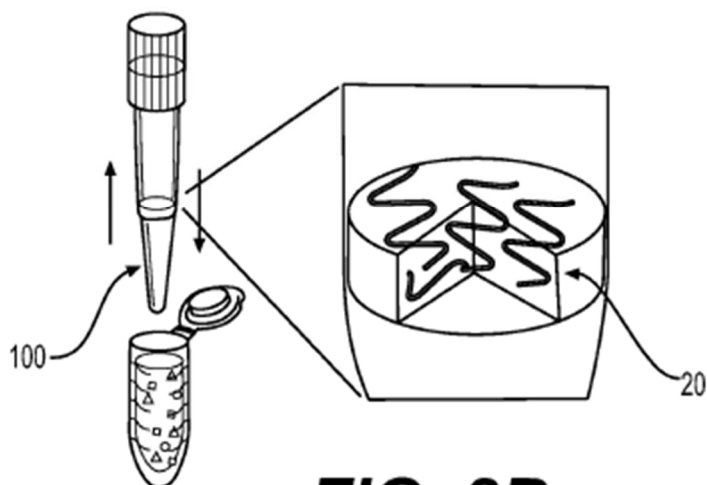


FIG. 2B

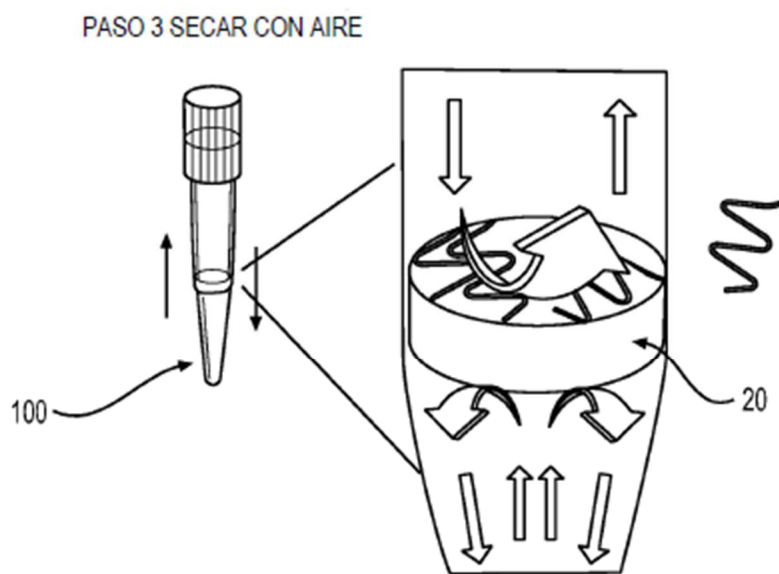


FIG. 2C

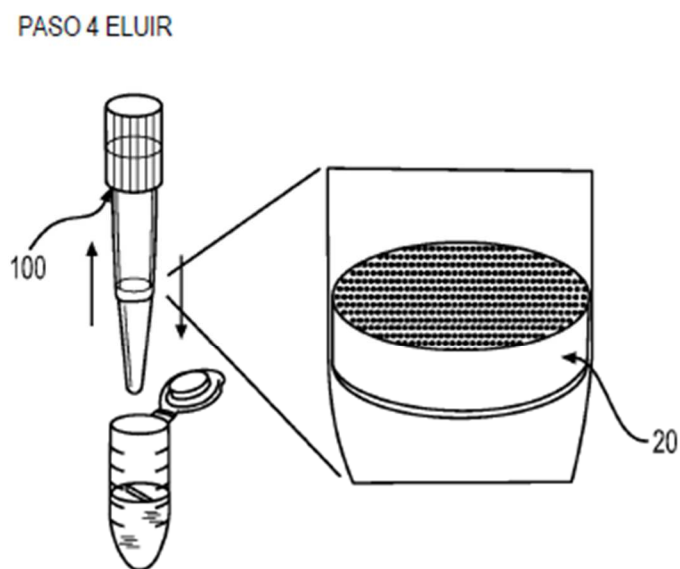
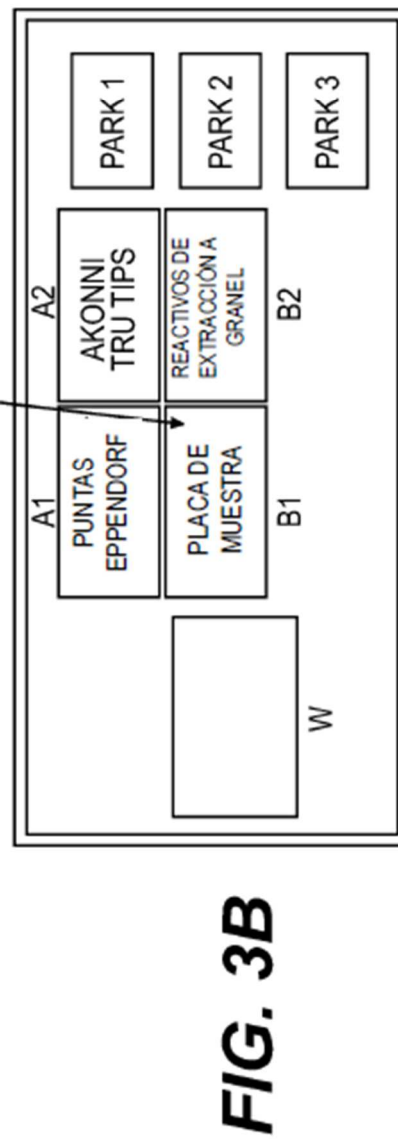
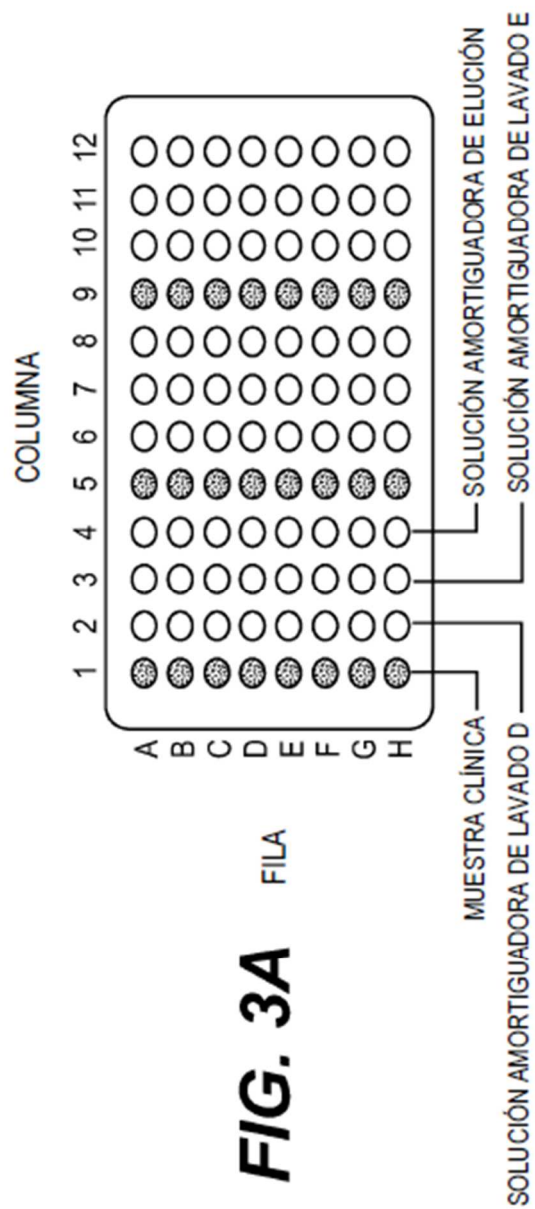


FIG. 2D



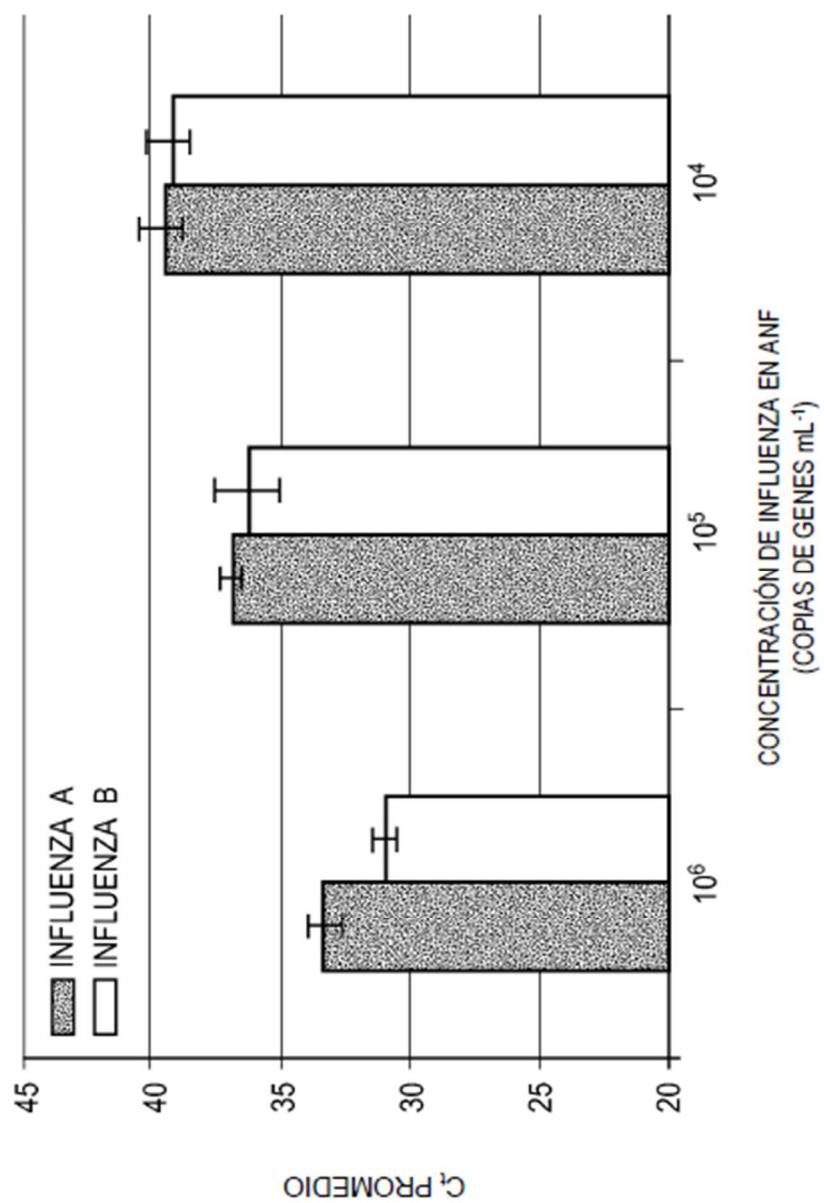


FIG. 4

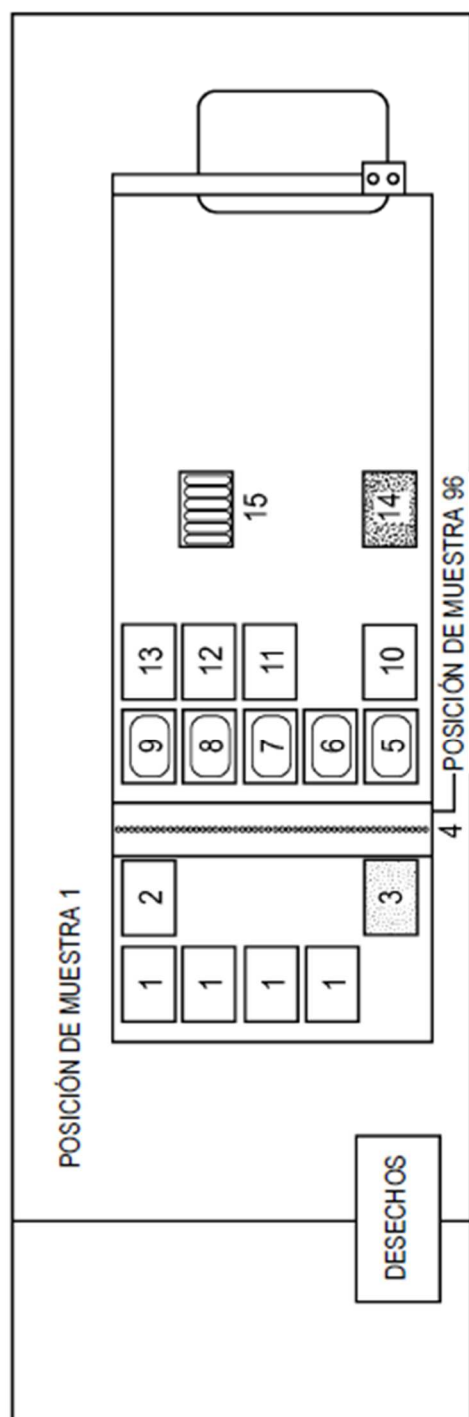


FIG. 5

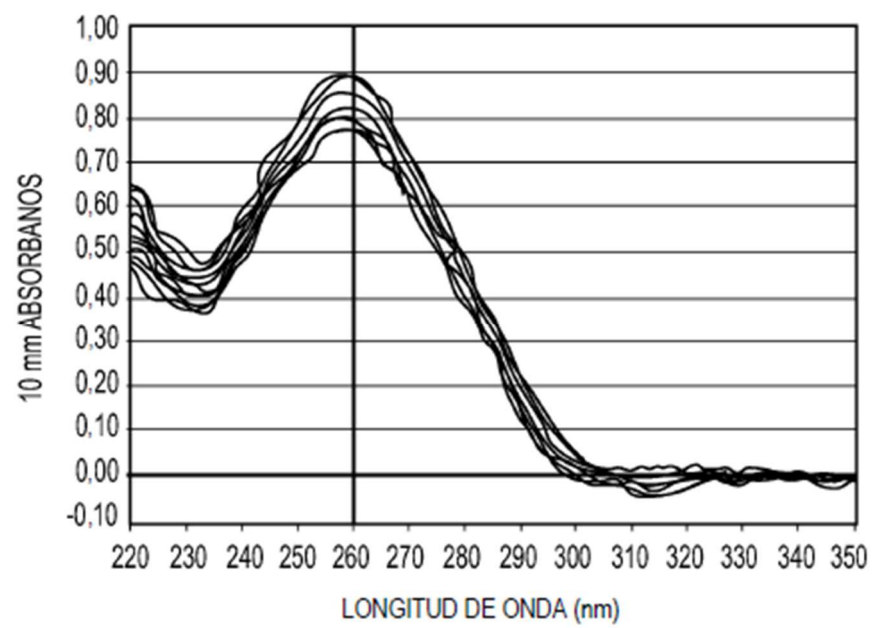


FIG. 6A

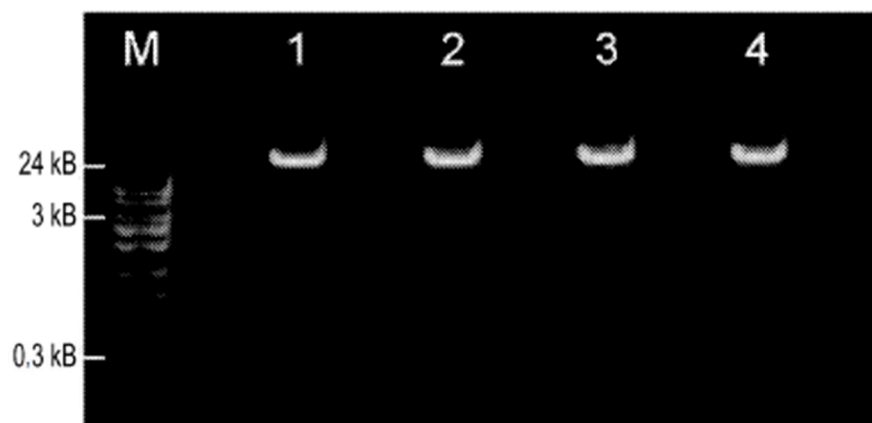


FIG. 6B

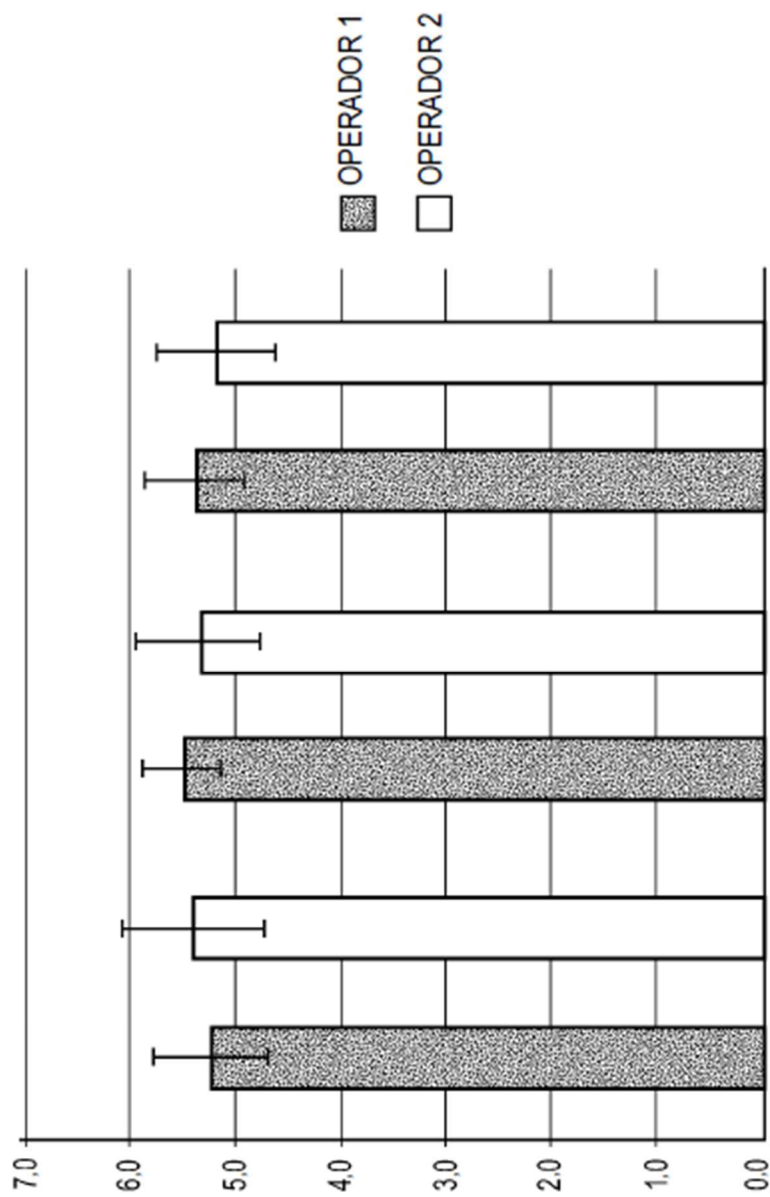


FIG. 6C

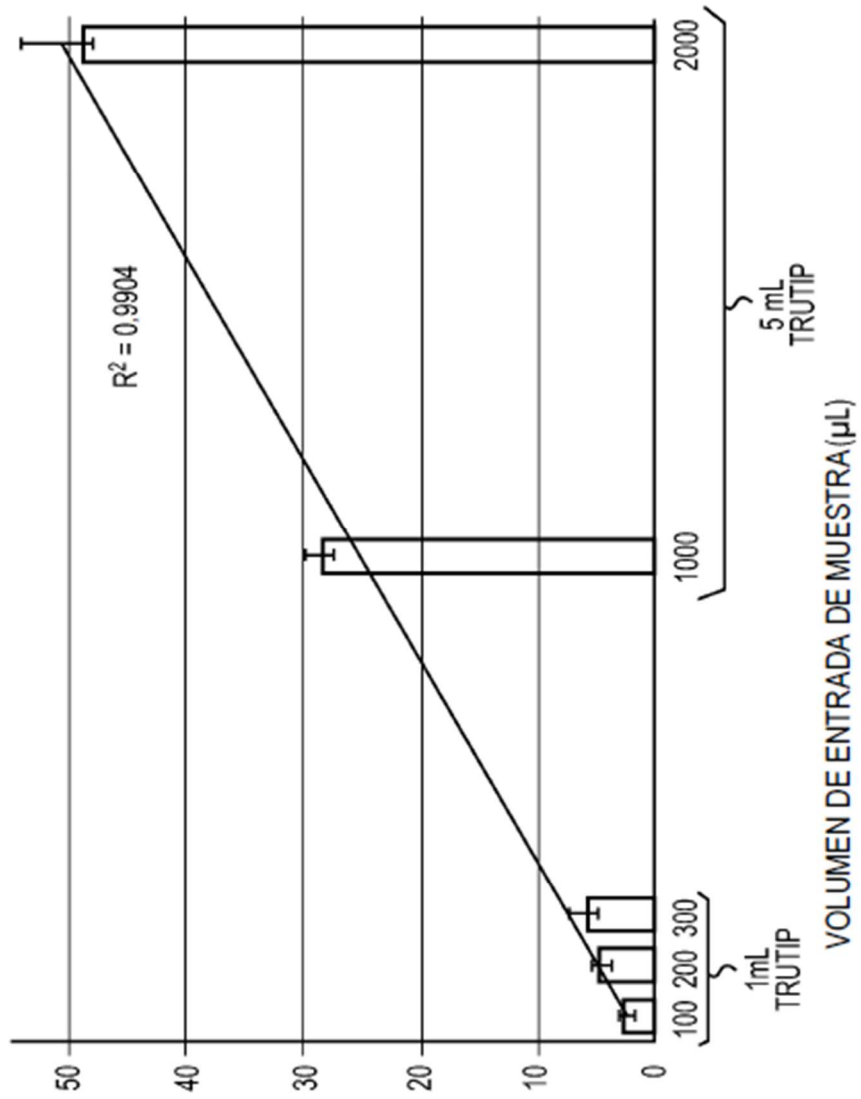


FIG. 6D

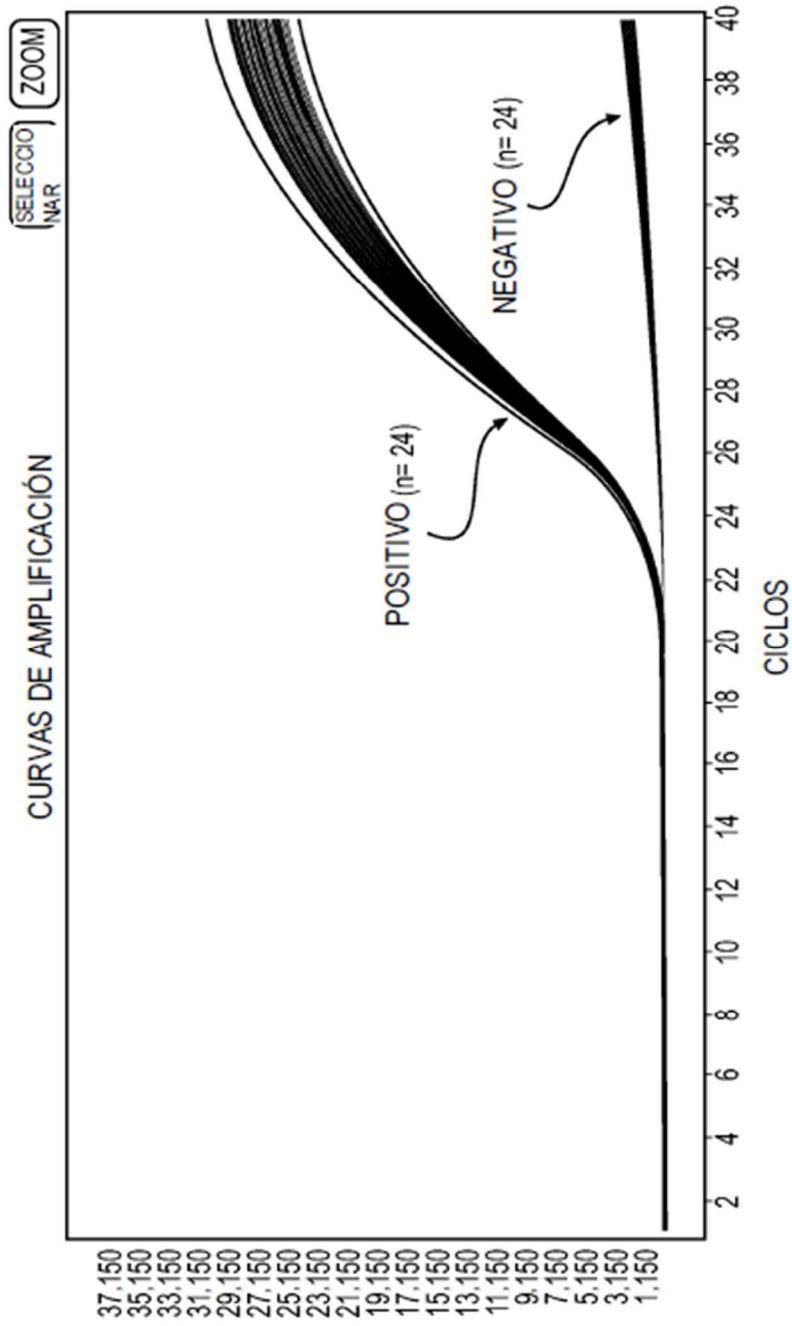


FIG. 6E

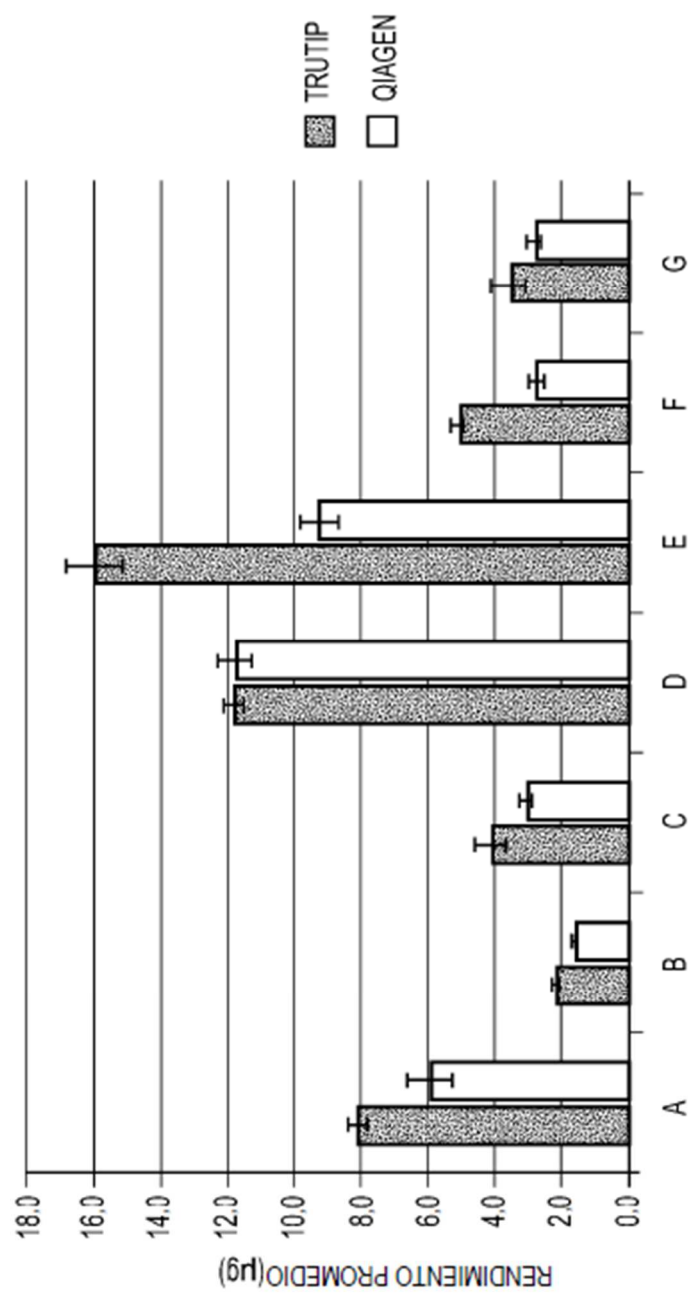


FIG. 6F

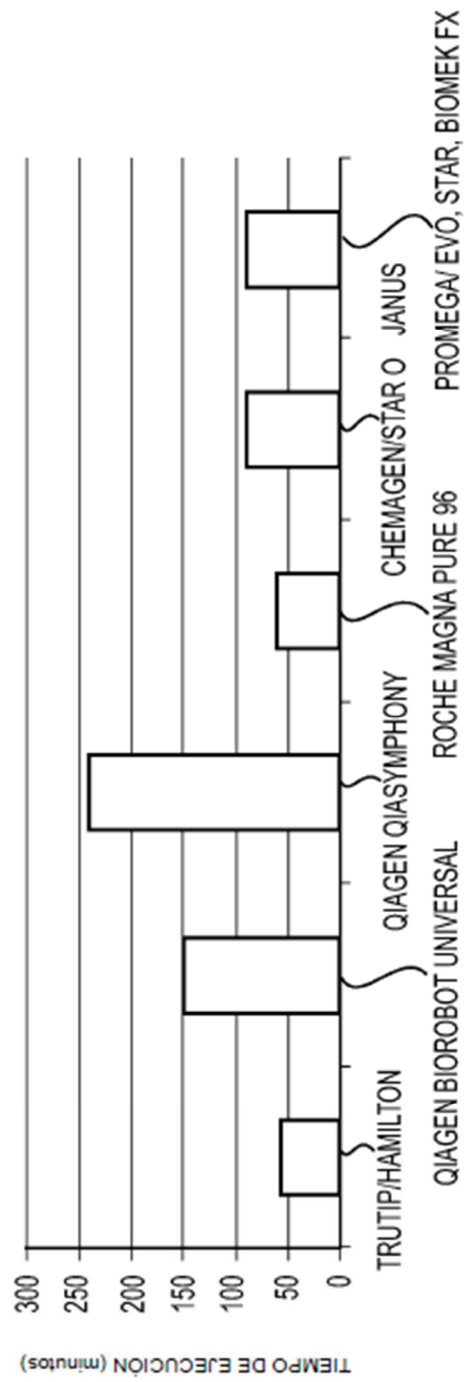


FIG. 6G

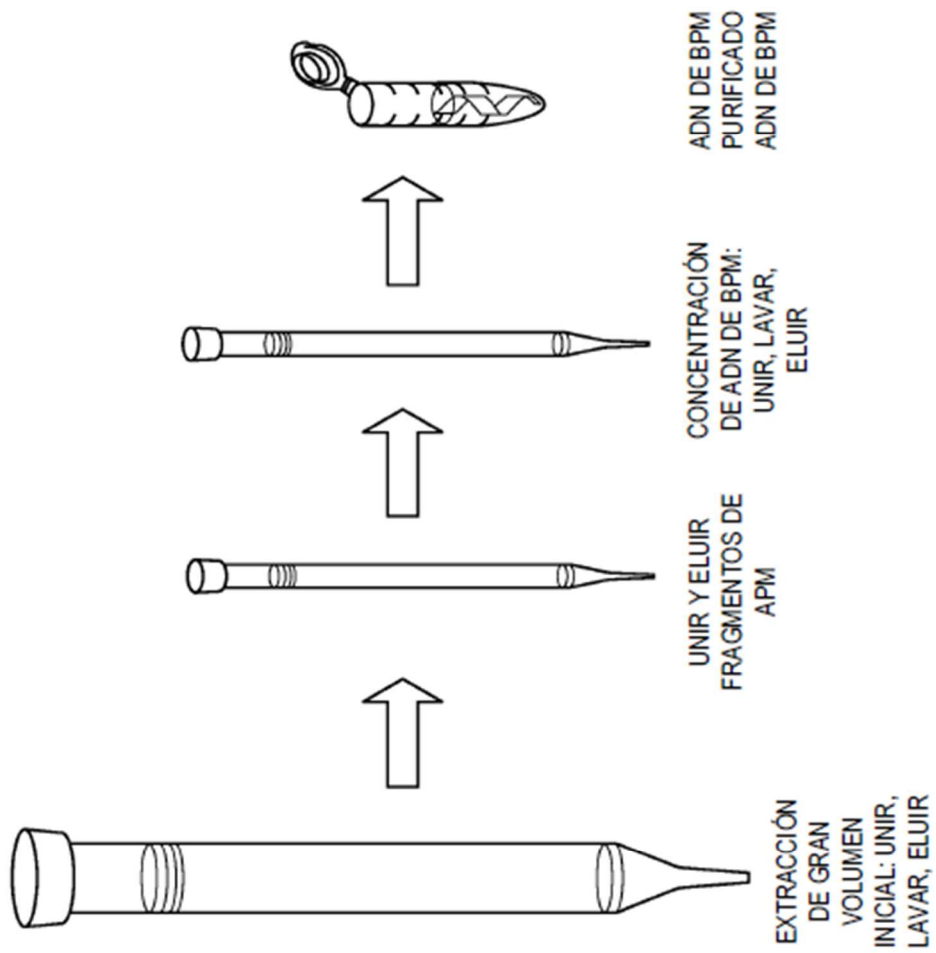


FIG. 7

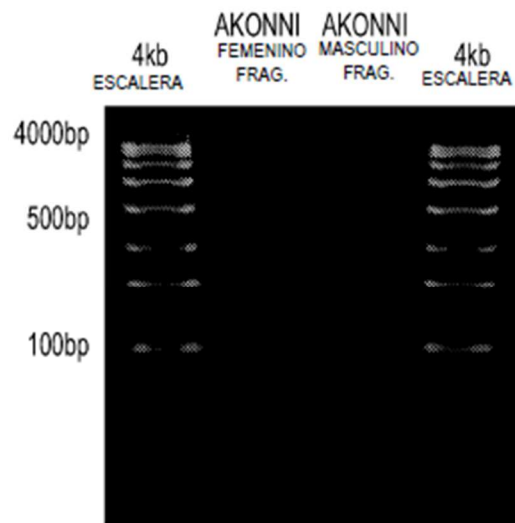
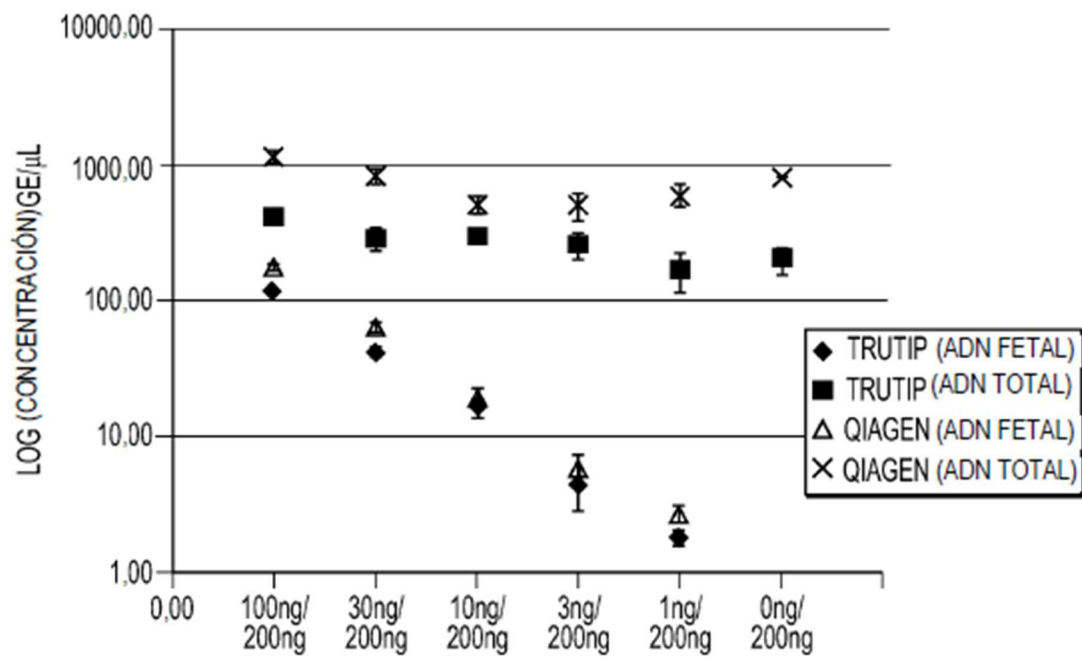


FIG. 8A



ADN FEMENINO FRAGMENTADO/MASCULINO FRAGMENTADO DE ENTRADA (ng)

FIG. 8B

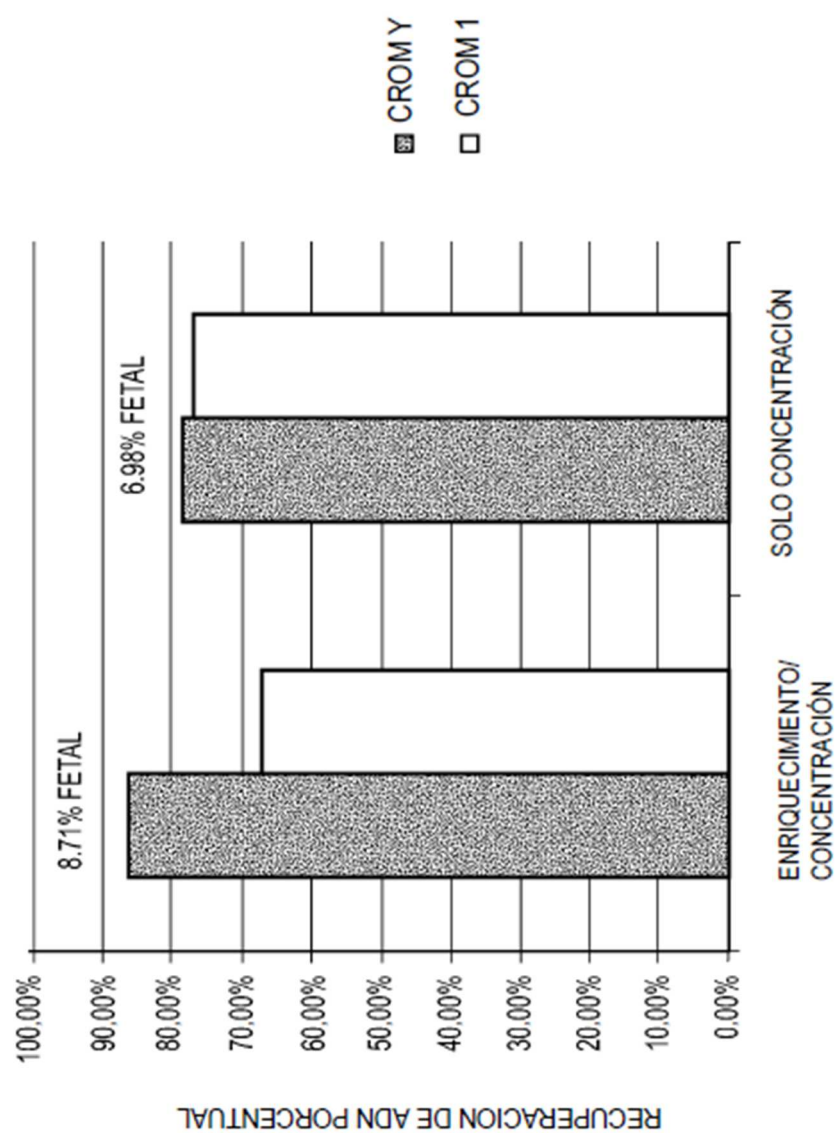


FIG. 9

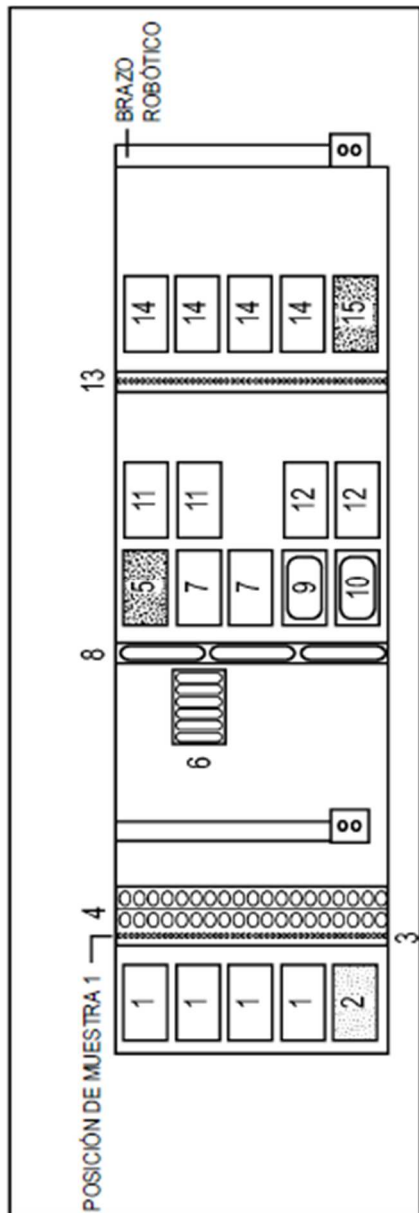
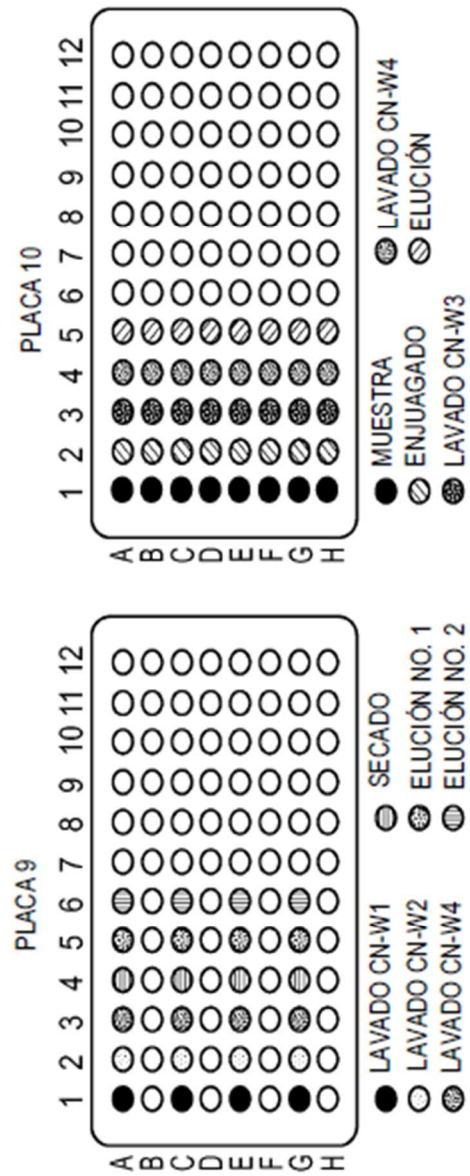
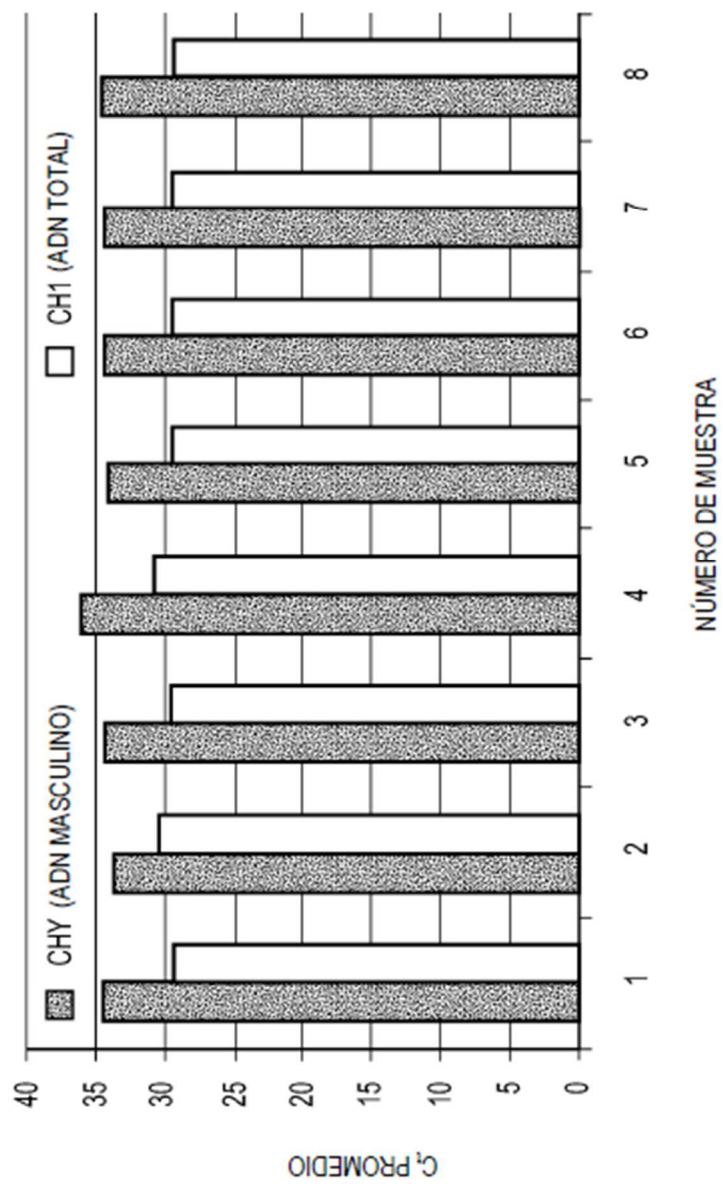


FIG. 10A



**FIG. 11A**

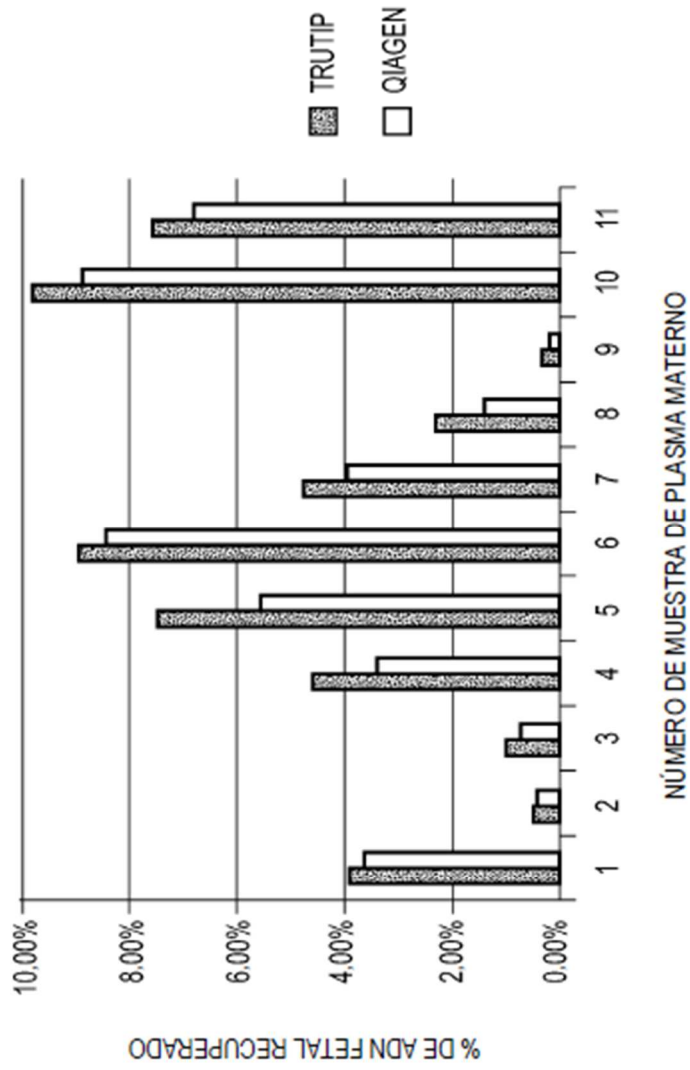


FIG. 11B