(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 709 123**

(51) Int. CI.:

B01F 13/08 (2006.01)
B01F 9/10 (2006.01)
C12M 1/33 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
B02C 17/20 (2006.01)
C12N 1/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2010 E 16166269 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3067112**

(54) Título: **Método y dispositivo para lisis magnética**

(30) Prioridad:

21.09.2009 US 272396 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.04.2019

(73) Titular/es:

AKONNI BIOSYSTEMS (50.0%)
400 Sagner Avenue, Suite 300
Frederick, MD 21701, US y
BIO-RAD LABORATORIES, INC. (50.0%)

(72) Inventor/es:

BELGRADER, PHILLIP y
HINDSON, BENJAMIN

(74) Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

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 dispositivo para lisis magnética

SOLICITUDES RELEVANTES

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de patente de Estados Unidos No. 61/272,396, presentada el 21 de septiembre de 2009.

CAMPO TÉCNICO

El campo técnico es la biotecnología y, más específicamente, los métodos y el aparato para el lisado de células.

ANTECEDENTES

La lisis celular es la destrucción o la ruptura de una membrana o pared celular que libera la célula y expone su contenido. Hay muchas técnicas disponibles para la rotura de células que incluye la perturbación física, química (por ejemplo, métodos a base de detergente, sales caotrópicas) y bioquímica (por ejemplo, enzimas como lisozima). La lisis mecánica, como el tratamiento con vortex y *bead-beating*, es una forma de lisis física. La sonicación es otra forma de lisis física, que utiliza ondas sonoras de frecuencia alta pulsadas para agitar y lisar células, bacterias, esporas y tejido finamente cortado. Sin embargo, estos enfoques no son compatibles inmediatamente con un sistema de análisis de lisis celular/ ácido nucleico de bajo costo. Los métodos a base de detergente suelen ser más fáciles de utilizar con protocolos más eficientes que los métodos físicos. Igualmente, la presencia de detergente puede interferir con reacciones corriente abajo en un sistema integrado y puede proporcionar diferentes eficiencias de lisis para bacterias y esporas más resistentes y requiere etapas de incubación largas y/o tratamiento térmico. Por lo tanto, existe una necesidad de métodos para lisis celular que sean económicos, eficientes y compatibles con un sistema de lisis celular/análisis integrado.

SUMARIO

Se divulga un método para el lisado de células, partículas de virus y esporas. El método comprende agitar células con un elemento agitador magnético en un contenedor en presencia de una pluralidad de perlas de lisis celular, donde el elemento de agitación rota a una velocidad suficiente y con una duración para lisar células. En algunas realizaciones, las perlas de lisis celular se seleccionan del grupo que consiste de perlas poliméricas, perlas de vidrio, perlas de cerámica y perlas metálicas. En algunas realizaciones, las perlas de lisis celular tienen diámetros dentro del espectro de 10 a 1000 µm. En algunas realizaciones, se agrega entre 1 mg y 10 g de perlas de lisis celular en la cámara de lisis. En algunas realizaciones, se agrega entre 1ul y 10ml de un líquido acuoso en la cámara de lisis. En algunas realizaciones, solo se agrega una muestra o espécimen directamente en la cámara de lisis En algunas realizaciones, se agrega directamente una muestra en la cámara de lisis junto con un líquido acuoso (por ejemplo, un espécimen sólido que se homogeniza y lisa en forma acuosa). En algunas realizaciones, el elemento de agitación magnético tiene forma rectangular, forma trapezoide, una forma de diapasón doble, una forma de varilla y una forma de barra. En algunas realizaciones, las células son células eucariotas, células procariotas, endoesporas o una combinación de estos, y se suspenden en un medio líquido a una concentración que oscila entre 1 y $1x10^{10}$ células/ml. En algunas realizaciones, las células son partículas de virus y se suspenden en un medio líquido a una concentración que oscila entre 1 y $1x10^{13}$ partículas/ml.

También se divulga un método para lisar células y partículas de virus. El método comprende suspender células o partículas de virus en un medio líquido para formar una suspensión y agitar la suspensión con un elemento de agitación magnético a alta velocidad, entre 1000 y 5000 rpm, preferentemente más cerca de 5000 rpm, en presencia de una pluralidad de perlas de lisis celular durante un plazo entre 1 y 600 segundos, preferentemente entre aproximadamente 90 y 120 segundos.

También se divulga un dispositivo para lisar células y partículas de virus. El dispositivo incluye una cámara que tiene uno o más elementos de agitación magnética y una pluralidad de perlas de lisis celular allí dispuestas. La cámara tiene dimensiones que permiten la rotación de uno o más elementos de agitación magnética dentro de la cámara. En algunas realizaciones, el dispositivo incluye un agitador magnético que produce un campo magnético de rotación, donde los elementos de agitación magnética rotan dentro de la cámara cuando se colocan en el espectro operativo del campo de rotación magnética. En algunas realizaciones, el dispositivo también incluye un soporte de cámara configurado para sostener la cámara en el campo magnético de rotación producido por el agitador magnético.

También se divulga un método para purificar ácido nucleico de una célula. El método comprende aplicar un campo magnético en un recipiente que contiene una célula, un elemento de agitación y una pluralidad de perlas, donde el campo magnético hace que el elemento de agitación choque con la pluralidad de perlas y produzca un lisado celular; y aislar el ácido nucleico del lisado celular.

También se divulga un método para amplificar un polinucleótido de una célula. El método comprende aplicar un campo magnético en un recipiente que contiene una célula, un elemento de agitación, y una pluralidad de perlas, donde el

campo magnético hace que el elemento de agitación choque con la pluralidad de perlas y produzca un lisado celular, y amplíe un polinucleótido del lisado celular.

También se divulga un método para detectar un polinucleótido de una célula. El método comprende aplicar un campo magnético en un recipiente que contiene una célula, un elemento de agitación y una pluralidad de perlas, donde el campo magnético hace que el elemento de agitación choque con la pluralidad de perlas y produzca un lisado celular, y detectar un polinucleótido del lisado celular. En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende aislar ácidos nucleicos del lisado celular, ampliar el polinucleótido de los ácidos nucleicos aislados y detectar el polinucleótido ampliado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La descripción detallada se referirá a los siguientes dibujos, donde:

La Figura 1 es un organigrama que muestra una realización de un método para lisar células.

La Figura 2 es un organigrama que muestra otra realización de un método para lisar células.

La Figura 3 es un gráfico que muestra las posiciones relativas de un imán y una cámara de lisis.

La Figura 4 es un gráfico que muestra una ampliación por PCR en tiempo real de una región genómica específica a partir de células de *E. coli* no lisadas, células de *E. coli* lisadas mediante un agitador de perlas durante 2 minutos (agitación durante 2m), y células de *E. coli* lisadas mediante perlas/agitador durante 30 segundos (mezcla 30 segundos) o 2 minutos (mezcla 2 min.).

La Figura 5 es un gráfico que muestra una ampliación por PCR en tiempo real de una región genómica específica a partir de células *E. coli* no lisadas (no lisado), células de *E. coli* lisadas mediante un agitador de perlas durante 2 minutos (agitación 2m), y células de *E. coli* lisadas mediante perlas/agitador durante 1 minuto (mezcla 1m.) o 2 minutos (mezcla 2m.).

La Figura 6 es un gráfico que muestra una ampliación por PCR en tiempo real de una región genómica específica a partir de esporas *Bacillus thuringiensis* no lisadas, esporas *Bacillus thuringiensis* lisadas mediante un agitador de perlas durante 2 minutos (agitación durante 2m), y esporas *Bacillus thuringiensis* lisadas mediante perlas/agitador durante 2 minutos (mezcla 2 min.).

La Figura 7 es un gráfico que muestra una ampliación por PCR en tiempo real de una región genómica específica a partir de esporas *Bacillus thuringiensis* no lisadas (no lisado), esporas *Bacillus thuringiensis* lisadas mediante un agitador de perlas durante 2 minutos (agitación 2m), y esporas *Bacillus thuringiensis* lisadas mediante perlas/agitador durante 1,5 minutos (mezcla 1,5m.) o 2 minutos (mezcla 2m.).

La Figura 8 es un gráfico que muestra una ampliación por PCR en tiempo real de una región genómica específica a partir de esporas *Bacillus thuringiensis* no lisadas, esporas *Bacillus thuringiensis* lisadas mediante un agitador de perlas durante 2 minutos (agitación durante 2m), y esporas *Bacillus thuringiensis* lisadas mediante perlas/agitador durante 1,5 minutos (mezcla 1,5 min.).

La Figura 9 es un gráfico que muestra el efecto del tiempo de lisis y la velocidad del mezclador de perlas en la respuesta de PCR en tiempo real para células Staphylococcus aureus. La lisis eficiente de células S. aureus se logró en 2 minutos cuando el mezclador de perlas funcionó a alta velocidad. Las velocidades más lentas necesitaron de tiempos de lisis más extensos. Las esporas sin lisiar tienen niveles bajos de ADN extracelular que son detectables sin lisis (0 min.). Una cantidad pequeña de ADN libre se une a las perlas de vidrio. La velocidad del mezclador de perlas de 100 corresponde a 5000 rpm.

La Figura 10 es un gráfico que muestra el efecto del tiempo de lisis y la velocidad del mezclador de perlas en la respuesta de PCR en tiempo real para esporas Bacillus thuringiensis. La lisis eficiente de esporas Bacillus thuringiensis se logró en 2 minutos cuando el mezclador de perlas funcionó a alta velocidad. Las velocidades más lentas necesitaron de tiempos de lisis más extensos. Las esporas sin lisiar tienen niveles bajos de ADN extracelular que son detectables sin lisis (0 min.). Una cantidad pequeña de ADN libre se une a las perlas de vidrio. La velocidad del mezclador de perlas de 100 corresponde a 5000 rpm.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Al describir realizaciones preferidas de la presente invención, se emplea terminología específica a los efectos de la claridad. Sin embargo, no se pretende limitar la invención a la terminología específica seleccionada.

Se divulgan realizaciones de un método para lisar células. Respecto de la figura 1, en algunas realizaciones, el método 100 incluye agregar una muestra celular en una cámara (etapa 110), agregar una pluralidad de perlas de lisis celular en el contenedor (etapa 120), agregar un elemento de agitación magnética en el contenedor (etapa 130), y agitar la muestra celular con el elemento de agitación magnética a una velocidad de rotación (entre 1000 y 5000 rpm) suficiente para lisar las células (etapa 140). Respecto de la Figura 2, en otras realizaciones, el método 200 incluye formar una

mezcla que incluye células, un medio líquido, perlas de lisis celular, y un elemento de agitación magnética (etapa 210) y un movimiento de conducción del elemento de agitación magnética en la mezcla mediante el uso de un campo magnético para lisar las células (etapa 220).

Como se utiliza en la presente, el término «células» hace referencia a células eucariotas, procariotas, virus, endoesporas o cualquier combinación de estos. Las células pueden incluir bacterias, esporas bacterianas, hongos, partículas de virus, organismos eucariotas unicelulares (por ejemplo, protozoos, levadura, etc.), células aisladas o acumuladas de organismos multicelulares (por ejemplo, células primarias, células cultivadas, tejidos, organismos enteros, etc.), o una combinación de estos, entre otros.

El término «muestra celular» hace referencia a muestras que contienen células. Como se utiliza en la presente, las muestras celulares incluyen especímenes de origen humano, vegetal, animal, alimenticio, agrícola o ambiental como hisopado nasal, muestras de sangre, heces, plasma, tejido, hojas, agua y suelo. Preferentemente, las muestras celulares contienen células suspendidas en un medio líquido a una concentración que no interfiere con el movimiento del elemento de agitación magnético.

El término «lisar» respecto de las células significa la afectación de la integridad de al menos una fracción de las células para liberar componentes intracelulares, como ácidos nucleicos y proteínas, de células rotas.

El término «homogeneizar» respecto de la mezcla (diferentes elementos, por ejemplo, heces, tejido, esputo, saliva) en una mezcla uniforme.

Las células eucariotas, las células procariotas, y/o virus se pueden suspender en cualquier concentración adecuada. En algunas realizaciones, las células eucariotas y/o las células procariotas se suspenden en una concentración que oscila entre 1 y $1x10^{10}$ células/ml, 1 y $1x10^{5}$ células/ml, o $1x10^{3}$ y $1x10^{4}$ células/ml, entre otros. En algunas realizaciones, las partículas de virus se suspenden en una concentración que oscila entre 1 y $1x10^{13}$ partículas/ml, 1 y $1x10^{10}$ partículas/ml, o $1x10^{5}$ y $1x10^{7}$ partículas/ml.

El medio líquido puede ser isotónico, hipotónico o hipertónico. En algunas realizaciones, el medio líquido es acuoso. En algunas realizaciones, el medio líquido contiene un tampón y/o al menos una sal o una combinación de sales. En algunas realizaciones, el pH del medio líquido oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 8, entre aproximadamente 6 y 8, o entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,5. Se puede utilizar una variedad de tampones de pH para alcanzar el pH deseado. Los tampones adecuados incluyen, a modo no taxativo, Tris, MES, Bis-Tris, ADA, ACES, PIPES, MOPSO, Bis-Tris propano, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, MOBS, TAPSO, HEPPSO, POPSO, TEA, HEPPS, Tricina, Gli-Gli, Bicina, y un tampón fosfato (por ejemplo, fosfato de sodio o un fosfato de sodio y potasio, entre otros). El medio líquido puede comprender entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 100 mM de tampón, entre 25 mM y aproximadamente 75 mM de tampón, o entre aproximadamente 40 mM y aproximadamente 60 mM de tampón entre otros. El tipo y la cantidad de tampón utilizado en el medio líquido pueden variar de aplicación en aplicación. En algunas realizaciones, el medio líquido tiene un pH de aproximadamente 7,4, el cual se puede alcanzar utilizando aproximadamente 50 mM de tampón Tris. En algunas realizaciones, el medio líquido es agua.

La cámara puede ser un contenedor de cualquier material, tamaño y forma adecuados. En algunas realizaciones, la cámara es un contenedor plástico. La cámara puede, por ejemplo, tener la forma de un tubo de microcentrífuga (por ejemplo, un tubo Eppendorf), un tubo centrífugo, un vial o placa de micropocillos. La cámara solo puede definir un compartimento/una cámara para mantener células, perlas, y un elemento de agitación, o una pluralidad de compartimentos/cámaras (por ejemplo, un conjunto de pocillos) para mantener mezclas (células, perlas, y elementos de agitación) en aislamiento entre sí. La cámara puede ser un contenedor sellado o sellable, como un contenedor con una tapa, un tapón, o una cubierta. La superficie interior puede ser químicamente inerte para conservar la integridad del analito de interés.

Las perlas de lisis celular pueden ser cualquier estructura del tipo partícula y/o perla que tiene una dureza mayor que la dureza de las células. Las perlas de lisis celular pueden ser de plástico, vidrio, cerámica, metal y/o de cualquier otro material adecuado. En algunas realizaciones, las perlas de lisis celular pueden ser de materiales no magnéticos. En algunas realizaciones, las perlas de lisis celular pueden ser rotativamente simétricas alrededor de al menos un eje (por ejemplo, partículas esféricas, redondeadas, ovales, elípticas, en forma de huevo, y de gotas). En otras realizaciones, las perlas de lisis celular tienen formas de poliedro. En algunas realizaciones, las perlas de lisis celular son partículas con forma irregular. En algunas realizaciones, las perlas de lisis celular son partículas con protuberancias. En algunas realizaciones, la cantidad de perlas agregadas a cada contenedor de lisis oscila entre 1 y 10.000 mg, 1 y 1000 mg y 1 y 10 mg, entre otros.

En algunas realizaciones, las perlas de lisis celular tienen diámetros que oscilan entre 10 a 1000 µm, 20 y 400 µm, o 50 y 200 µm, entre otros.

El elemento de agitación magnética puede tener cualquier forma y podría ser suficientemente pequeño para ser colocado en el contenedor y para moverse o girar o mezclar en el contenedor. El elemento de agitación magnético puede ser un elemento de agitación en forma de barra, de cilindro, de cruz, de V, triangular, rectangular, de varilla o

disco, entre otros. En algunas realizaciones, el elemento de agitación magnético tiene una forma rectangular. En algunas realizaciones, el agitador magnético tiene una forma de diapasón doble. En algunas realizaciones, el agitador magnético tiene una forma de V. En algunas realizaciones, el agitador magnético tiene una forma trapezoide. En algunas realizaciones, la dimensión más larga del elemento de agitación es ligeramente menor que el diámetro del contenedor (por ejemplo, aproximadamente entre un 75 y un 95% del diámetro del contenedor). En algunas realizaciones, el elemento de agitación magnético está revestido con un material químicamente inerte como, por ejemplo, un polímero, vidrio, o cerámica (por ejemplo, porcelana). En algunas realizaciones, el polímero es un polímero biocompatible como PTFE y parileno.

La suspensión celular, las perlas de lisis celular y el elemento de agitación magnética se pueden colocar en la cámara en cualquier orden. En algunas realizaciones, la suspensión celular se agrega en la cámara antes que las perlas de lisis celular y el elemento de agitación magnética. En otras realizaciones, las perlas de lisis celular y/o el elemento de agitación magnética se colocan en la cámara antes que las células (por ejemplo, antes que una suspensión celular).

La cámara, y particularmente las células, perlas y el elemento de agitación magnética, se ubican en un espectro operativo de un campo magnético variable. Por ejemplo, la cámara se puede ubicar con un espectro operativo de un campo magnético rotatorio (por ejemplo, mediante la colocación del contenedor en el agitador magnético o adyacente a él). El campo magnético variable dirige el movimiento del elemento de agitación, como el movimiento rotatorio, la reciprocidad, o una combinación de ellos, entre otros, el cual a su vez dirige el movimiento de las perlas, las células y el medio líquido. En algunas realizaciones, la suspensión celular se agita con el elemento de agitación magnética a una velocidad de rotación y durante tiempos suficientes para lisar las células dentro del contenedor. La velocidad de rotación adecuada y la duración dependen de la aplicación y un entendido en la técnica puede determinarlas en forma empírica. En general, la velocidad de rotación suficiente para lisar las células es determinada por factores como el tipo de células, la concentración de la suspensión celular, el volumen de la suspensión celular, el tamaño y la forma del elemento de agitación magnética, la cantidad/número, el tamaño, la forma y la dureza de las perlas de lisis celular y el tamaño y la forma de la cámara.

El elemento de agitación magnética rota a una velocidad entre 1000 y 6000 rpm, preferentemente, aproximadamente 5000 rpm, durante un período entre 1 y 600 segundos, preferentemente entre aproximadamente 90 y 120 segundos. En algunas realizaciones, se coloca una cámara (por ejemplo, en la forma de tubo de ensayo o tubo de microcentrífuga) en un estante en un agitador magnético (por ejemplo, un agitador magnético rotatorio VP 710C1, 5000 RPM, una cubierta de agitación utilizable de 14cm de largo, con carcasa del motor y soporte de placa, microplacas con 2 pocillos profundos o 6 microplacas estándar -115 Volts AC - 60 Hz, V&P Scientific) y se agita a la velocidad más alta (>1000 rpm). En otras realizaciones, la cámara es un pocillo en una microplaca, como una placa ELISA. En otras realizaciones, la cámara es una cámara en forma de cilindro con una entrada y una salida de células. El campo magnético variable es generado mediante la rotación de un imán, preferentemente un imán permanente, en la proximidad del elemento de agitación magnético. El imán puede rotar por encima, por debajo o por el costado de la cámara de lisis alrededor de un eje que pasa a través del centro del imán. Las cámaras se colocan en una posición que es vertical a la superficie sobre la que se encuentran una o más cámaras y el imán rota alrededor de un eje que es paralelo a la superficie sobre la cual se encuentran una o más cámaras. En otras realizaciones, el imán también tiene una forma elongada y rota alrededor de un eje que se extiende a lo largo de la dimensión del imán.

La Figura 3 muestra las posiciones relativas de un imán en forma de cilindro 301 y una cámara de lisis 303. El imán 301 rota alrededor de un eje A y hace que el elemento de agitación magnético 305 en la cámara 303 rote en la misma dirección a lo largo de un eje B. El elemento de agitación magnética rotatorio 305 choca con las perlas 307 y las células de lisis 309 en el proceso. El imán 301 se puede colocar a lo largo de la cámara 303, por encima, debajo o en diagonal a ella. En esta realización, la cámara 303 tiene una entrada 311 y una salida 313 para facilitar la carga y la descarga de la cámara.

En algunas realizaciones, la velocidad de rotación del elemento agitador aumenta para incrementar la eficiencia de la lisis y reduce el tiempo necesario para lograr la lisis. En algunas otras realizaciones, la velocidad de rotación es regulada para que solo algunos tipos de células sean lisadas. Por ejemplo, en una suspensión celular que contiene múltiples tipos de células, el elemento agitador puede rotar a una primera velocidad para lisar un primer conjunto de células y posteriormente, rotar a una segunda velocidad para lisar un segundo conjunto de células. En otras realizaciones, el contenedor se acopla a un módulo de regulación de temperatura que controla la temperatura de la suspensión celular antes, durante y/o después del proceso de lisado. En algunas realizaciones, la temperatura de la suspensión celular se mantiene a 8-2°C.

En algunas realizaciones, se puede facilitar el lisado de tipos particulares de células mediante la incorporación de aditivos en la suspensión celular antes y/o durante de la etapa de agitación. Los ejemplos de aditivos incluyen enzimas, detergentes, tensioactivos y otros químicos como bases y ácidos. Se ha descubierto que las condiciones alcalinas (por ejemplo, 10 mM de NaOH) pueden mejorar la eficiencia de la lisis durante la agitación para algunos tipos de células. La suspensión celular también o alternativamente se puede calentar durante agitación para mejorar la eficiencia de la lisis. Sin embargo, los aditivos pueden dañar las etapas de procesamiento corriente abajo que incluyen la ampliación y la detección del ácido nucleico. Se desea eliminar la necesidad de aditivos para lograr una lisis eficiente dado que el procesamiento de especímenes se puede simplificar en gran medida.

La combinación de agitador/perlas brinda muchas ventajas respecto de los métodos de lisado convencionales. El método de agitador/perlas es mucho más rápido que los enfoques químico y enzimático y brinda mejor lisis celular o de virus respecto de muchos otros tipos de métodos de lisis física. El método de agitador/perlas también es susceptible de automatización mediante el uso de robótica y/o microfluidos. La fuente magnética se puede reutilizar y no requiere una alineación precisa con el recipiente; puede dirigir una pluralidad de cámaras. El elemento de agitación magnética es económico lo permite que sea desechable después de un solo uso.

También se divulga un dispositivo para lisar células. El dispositivo incluye una cámara que tiene un elemento de agitación magnética y una pluralidad de perlas de lisis celular allí dispuestas. Un usuario puede simplemente agregar una suspensión celular en la cámara, colocar la cámara en un agitador magnético, y agitar la suspensión celular con el elemento de agitación magnética a una velocidad suficiente para lisar las células.

También se divulga un sistema para lisar células. El sistema incluye una cámara que tiene un elemento de agitación magnética y una pluralidad de perlas de lisis celular allí dispuestas, y un agitador magnético que produce un campo magnético de rotación, donde el elemento de agitación magnética rota dentro de la cámara cuando se coloca en un espectro operativo del campo magnético de rotación.

El sistema también contiene un estante configurado para sostener la cámara. El estante se puede configurar para sostener múltiples cámaras y se puede colocar en una superficie de soporte de un agitador magnético para el proceso simultáneo de múltiples cámaras. El estante también se puede utilizar como soporte de la cámara a los efectos del almacenamiento. Por ejemplo, se pueden colocar múltiples cámaras en el soporte y almacenar en un refrigerador o congelador para otro análisis. La cámara puede estar interconectada con un instrumento externo (por ejemplo, un robot de manejo de líquidos, un dispositivo de microfluidos, un instrumento analítico).

También se divulga un método para purificar ácido nucleico de una célula. El método comprende aplicar un campo magnético en un recipiente que contiene una célula, un elemento de agitación y una pluralidad de perlas, donde el campo magnético hace que el elemento de agitación choque con la pluralidad de perlas y produzca un lisado celular; y aislar el ácido nucleico del lisado celular.

También se divulga un método para amplificar un polinucleótido de una célula. El método comprende aplicar un campo magnético en un recipiente que contiene una célula, un elemento de agitación, y una pluralidad de perlas, donde el campo magnético hace que el elemento de agitación choque con la pluralidad de perlas y produzca un lisado celular, y amplíe un polinucleótido del lisado celular.

También se divulga un método para detectar un polinucleótido de una célula. El método comprende aplicar un campo magnético en un recipiente que contiene una célula, un elemento de agitación y una pluralidad de perlas, donde el campo magnético hace que el elemento de agitación choque con la pluralidad de perlas y produzca un lisado celular, y detectar un polinucleótido del lisado celular. La etapa de detección comprende aislar ácidos nucleicos del lisado celular, ampliar el polinucleótido de los ácidos nucleicos aislados y detectar el polinucleótido ampliado.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Lisis de células de E.coli

Se suspendieron células de E. coli en un tampón de Tris-EDTA a una concentración de 10^4 células/ml. Se agregó un milímetro de la suspensión celular en una cámara (2 ml de vial plástico, Wheaton) que contiene 800 mg de perlas de vidrio (106 µm o más finas, Sigma G8893) y un disco de agitación magnética (Disco de súper agitación VP-7195, V&P Scientific).

El vial plástico se colocó posteriormente en un agitador magnético (Agitador magnético rotatorio VP 710C1, 5000 RPM, V&P Scientific) y se agitó a 5000 rpm durante 30 segundos, 1 minuto o 2 minutos. Las muestras de control positivas se procesaron utilizando un agitador de perlas (mini agitador de perlas-1, Biospec), de conformidad con las instrucciones del fabricante durante 2 minutos a 4800 rpm. Las suspensiones celulares sin procesar se utilizaron como controles. Las células lisadas y los controles se sometieron a una ampliación por PCR en tiempo real de un gen específico utilizando Roche LightCycler 480. Las condiciones de ampliación fueron las siguientes: 95°C durante 250 seg.; posteriormente 45 ciclos a 95°C durante 10 seg., 60°C durante 20 seg., y 72°C durante 10 seg.; y 40°C durante 10 seg. en el ciclo final.

Como se muestra en las Figuras 4 y 5, el método de perlas/agitador (mezcla durante 30 segundos, mezcla durante 1 minuto y mezcla durante 2 minutos) genera una mejor lisis que el método de agitación de perlas (agitación durante 2 minutos).

Ejemplo 2: Lisis de esporas *Bacillus thuringiensis*

Las esporas *Bacillus thuringiensis* se suspendieron en agua a una concentración de 10^4 células/ml. Se agregaron 500 µl de la suspensión celular en una cámara plástica de 2 ml (Wheaton) que contiene 800 mg de perlas de vidrio (106 µm o más finas, Sigma) y un disco de agitación magnética (Disco de súper agitación VP-7195, V&P Scientific).

El vial plástico se colocó posteriormente en un agitador magnético (Agitador magnético rotatorio VP 710C1, 5000 RPM,

V&P Scientific) y se agitó a 5000 rpm durante 1,5 minuto o 2 minutos. Las muestras de control positivas se procesaron utilizando un agitador de perlas (mini agitador de perlas-1, Biospec), de conformidad con las instrucciones del fabricante durante 2 minutos. Las suspensiones celulares sin procesar se utilizaron como controles. Las células lisadas y los controles se sometieron a una ampliación por PCR en tiempo real de un gen *B. Thuringiensis* específico utilizando Roche LightCycler 480 en condiciones descritas en el Ejemplo 1.

Como se muestra en las Figuras 3 a 6, el método de perlas/agitador (mezcla durante 1,5 min. y mezcla durante 2 minutos) genera una mejor lisis que el método de agitación de perlas (agitación durante 2 minutos).

Ejemplo 3: Efecto del tiempo de lisis y velocidad del mezclador de perlas en la respuesta de PCR en tiempo real para células *Staphylococcus aureus*

Las células ***Staphylococcus aureus*** se suspendieron y lisaron a varias velocidades del mezclador durante distintos períodos de tiempo utilizando el mismo equipo y mismos procedimientos descritos en el Ejemplo 2.

La Figura 9 es un gráfico que muestra el efecto del tiempo de lisis y la velocidad del mezclador de perlas en la respuesta de PCR en tiempo real para células Staphylococcus aureus. La lisis eficiente de células S. aureus se logró en 2 minutos cuando el mezclador de perlas funcionó a alta velocidad. Las velocidades más lentas necesitaron de tiempos de lisis más extensos. Las esporas sin lisiar tienen niveles bajos de ADN extracelular que son detectables sin lisis (0 min.). Una cantidad pequeña de ADN libre se une a las perlas de vidrio. La velocidad del mezclador de perlas de 100 corresponde a 5000 rpm.

Ejemplo 4: Efecto del tiempo de lisis y velocidad del mezclador de perlas en la respuesta de PCR en tiempo real para esporas *Bacillus thuringiensis*

Las esporas *Bacillus thuringiensis* se suspendieron y lisaron a varias velocidades del mezclador durante distintos períodos de tiempo utilizando el mismo equipo y mismos procedimientos descritos en el Ejemplo 2.

La Figura 10 es un gráfico que muestra el efecto del tiempo de lisis y la velocidad del mezclador de perlas en la respuesta de PCR en tiempo real para esporas Bacillus thuringiensis. La lisis eficiente de esporas Bacillus thuringiensis se logró en 2 minutos cuando el mezclador de perlas funcionó a alta velocidad. Las velocidades más lentas necesitaron de tiempos de lisis más extensos. Las esporas sin lisiar tienen niveles bajos de ADN extracelular que son detectables sin lisis (0 min.). Una cantidad pequeña de ADN libre se une a las perlas de vidrio. La velocidad del mezclador de perlas de 100 corresponde a 5000 rpm.

La presente invención ha sido descrita en términos de realizaciones específicas que incorporan detalles para facilitar el entendimiento de los principios de construcción y funcionamiento de la invención. Dicha referencia a realizaciones específicas y sus detalles no pretende limitar el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para lisar una o más células, que comprende:

colocar una pluralidad de cámaras en una superficie, donde cada cámara comprende una o más células de interés, uno o más elementos de agitación magnética, y una pluralidad de perlas; y

rotar un imán entre 1000 y 6000 rpm durante 90 a 120 segundos alrededor de un eje para producir un campo magnético de rotación, donde el eje es paralelo a la superficie sobre la cual residen las cámaras, la rotación del imán hace que uno o más agitadores magnéticos en las cámaras roten, lo que a su vez dirige el movimiento de las perlas, una o más células y el medio líquido y lisa las células dentro de las cámaras.

2. El método de la reivindicación 1, donde el eje pasa a través del centro del imán.

3. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, donde:

a. las perlas comprenden un material seleccionado del grupo que consiste de plástico, vidrio, cerámica y metales;

b. las perlas comprenden perlas de vidrio, de plástico, de cerámica, de metal o una mezcla de estas;

c. las perlas son perlas de sílice;

d. las perlas tienen diámetros dentro del espectro de 10 a 1000 µm;

e. el agitador magnético comprende un metal o una aleación;

f. el agitador magnético comprende acero inoxidable;

g. el agitador magnético comprende un centro de aleación revestido con un polímero; y/o

h. un agitador magnético tiene una forma seleccionada del grupo que consiste de forma circular, forma cuadrada, forma rectangular, forma de varilla curva, forma rectangular transversal, forma de disco, forma de varilla, forma anular, forma de media luna, forma trapezoide y forma de diapasón doble.

4. El método de la reivindicación 3 (g), donde el núcleo de la aleación comprende neodimio, hierro y boro o samario-cobalto y/o donde el polímero es un polímero biocompatible, opcionalmente PTFE o parileno.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde:

a. el imán es un imán permanente;

b. el imán rotatorio hace que uno o más agitadores magnéticos en la cámara roten a una velocidad entre 1000 y 6000 rpm durante entre 1 y 600 segundos; y

c. la cámara tiene una forma seleccionada del grupo que consiste de tubos de microcentrífuga, tubos centrífugos, tubos de ensayo, viales y pocillos en una microplaca.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la cámara contiene dos o más tipos de células y donde la etapa de rotación comprende la rotación del imán a una primera velocidad que causa la lisis de un primer tipo de células.

7. El método de la reivindicación 6, donde la etapa de rotación comprende rotar el imán a una segunda velocidad que causa la lisis de un segundo tipo de células

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde:

a. una o más células son células eucariotas o procariotas y donde la suspensión líquida contiene las células a una concentración que oscila entre 1 y $1x10^{10}$ células/ml; o

b. las células son partículas de virus y donde la suspensión líquida contiene partículas de virus a una concentración que oscila entre 1 y 1×10^{13} partículas/ml.

9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8:

a. para purificar ácido nucleico de una célula, que comprende realizar el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para obtener un lisado celular y aislar el ácido nucleico del lisado celular;

b. para ampliar un polinucleótido de una célula, que comprende realizar el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para obtener un lisado celular y ampliar el polinucleótido del lisado celular; o

c. para detectar un polinucleótido de una célula, que comprende realizar el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para obtener un lisado celular y detectar el ácido nucleico del polinucleótido del lisado celular.

10. El método de la reivindicación 9, donde la etapa de detección comprende: aislar ácidos nucleicos del lisado celular, ampliar el polinucleótido de los ácidos nucleicos aislados y detectar polinucleótidos ampliados.

11. Un dispositivo para lisar células, que comprende:

una pluralidad de cámaras que comprenden uno o más elementos de agitación magnética y una pluralidad de perlas no magnéticas allí dispuestas, donde las cámaras están dimensionadas para permitir la rotación del elemento de agitación magnética dentro de las cámaras, donde las cámaras yacen sobre una superficie;

un imán que rota alrededor de un eje paralelo a la superficie donde residen las cámaras en entre 1000 y 6000 rpm durante 90 a 120 segundos para producir un campo magnético rotatorio,

donde la rotación del imán hace que uno o más elementos de agitación magnética en las cámaras roten para lisar células.

12. El dispositivo de la reivindicación 11, donde:

las perlas comprenden perlas de vidrio, de plástico, de cerámica, o una mezcla de estas,

y/o

el imán es capaz de rotar alrededor de un eje que pasa el centro del imán.

13. El dispositivo de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, que comprende: un módulo de control de temperatura que controla la temperatura de la cámara.

14. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, construido y dispuesto para operar el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

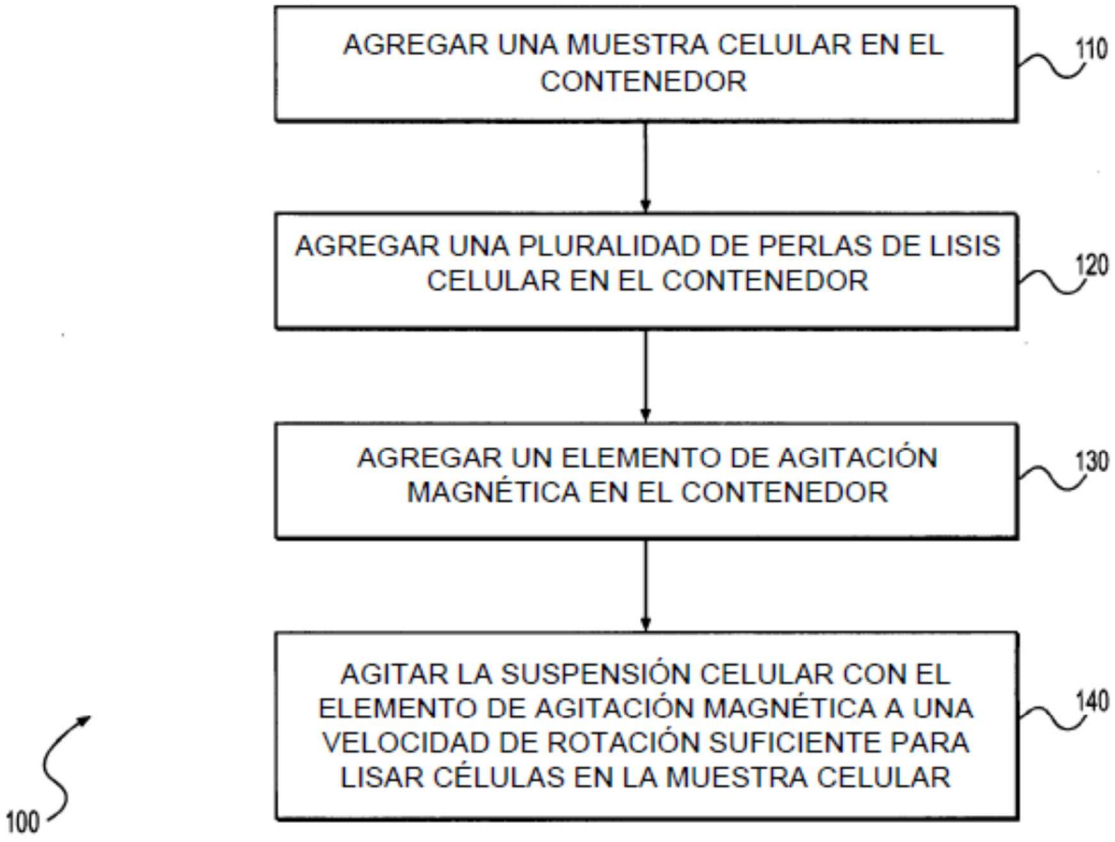
AGREGAR UNA MUESTRA CELULAR EN EL CONTENEDOR
110
AGREGAR UNA PLURALIDAD DE PERLAS DE LISIS CELULAR EN EL CONTENEDOR
120
AGREGAR UN ELEMENTO DE AGITACIÓN MAGNÉTICA EN EL CONTENEDOR
130
AGITAR LA SUSPENSIÓN CELULAR CON EL ELEMENTO DE AGITACIÓN MAGNÉTICA A UNA VELOCIDAD DE ROTACIÓN SUFICIENTE PARA LISAR CÉLULAS EN LA MUESTRA CELULAR
140
100

FIG. 1

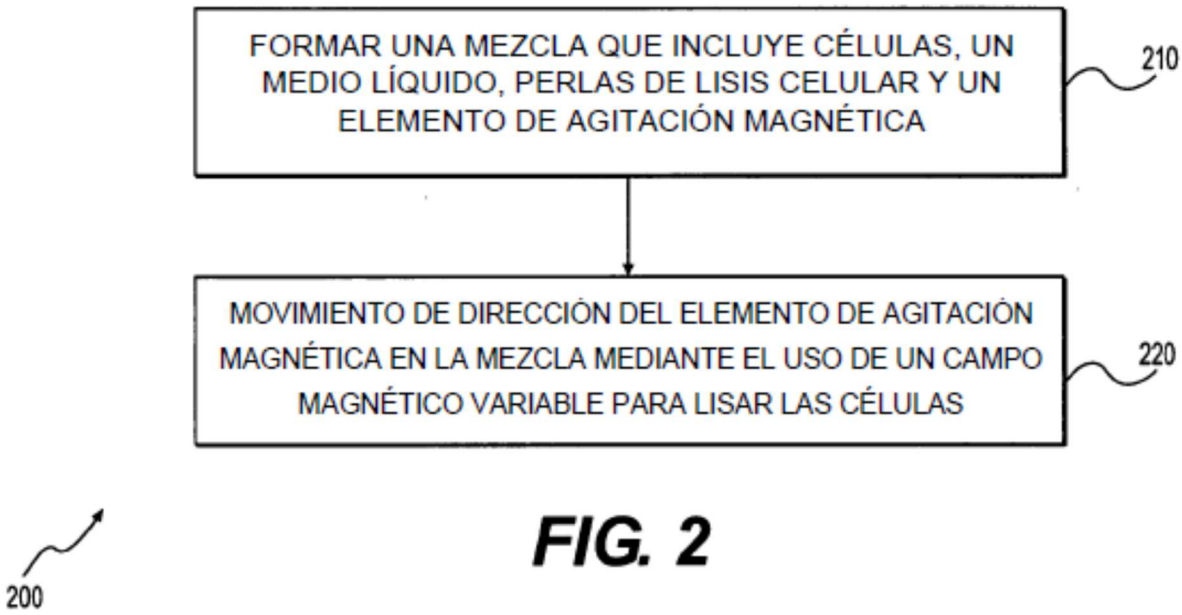
FORMAR UNA MEZCLA QUE INCLUYE CÉLULAS, UN MEDIO LÍQUIDO, PERLAS DE LISIS CELULAR Y UN ELEMENTO DE AGITACIÓN MAGNÉTICA
210
MOVIMIENTO DE DIRECCIÓN DEL ELEMENTO DE AGITACIÓN MAGNÉTICA EN LA MEZCLA MEDIANTE EL USO DE UN CAMPO MAGNÉTICO VARIABLE PARA LISAR LAS CÉLULAS
220
200

FIG. 2

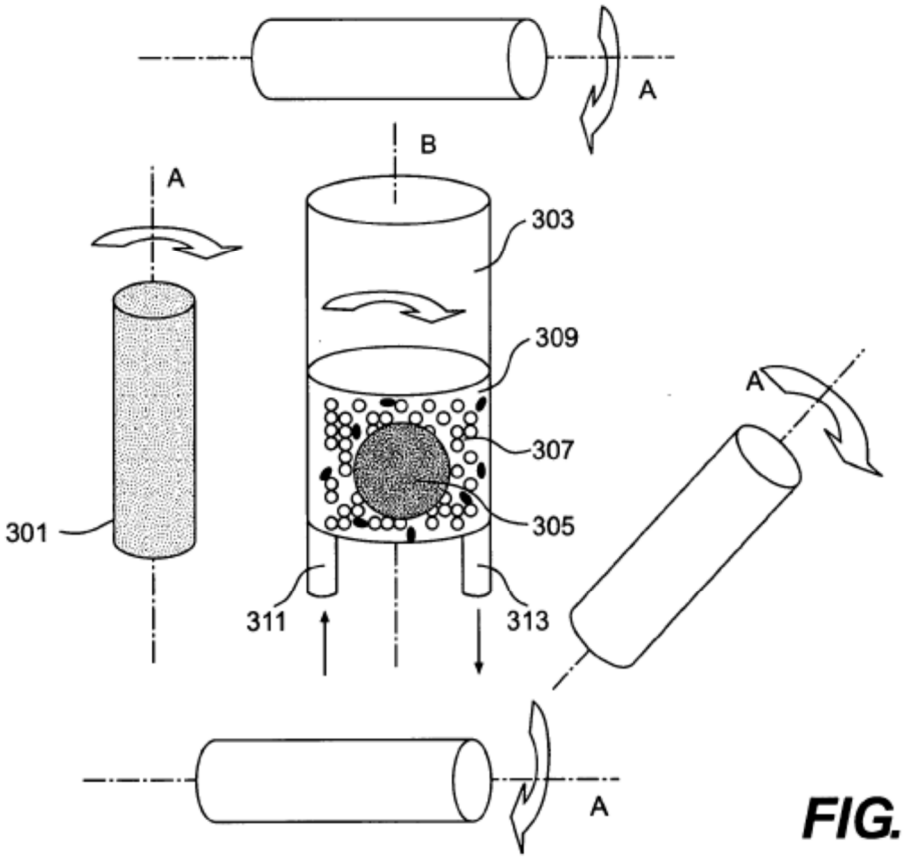

FIG. 3

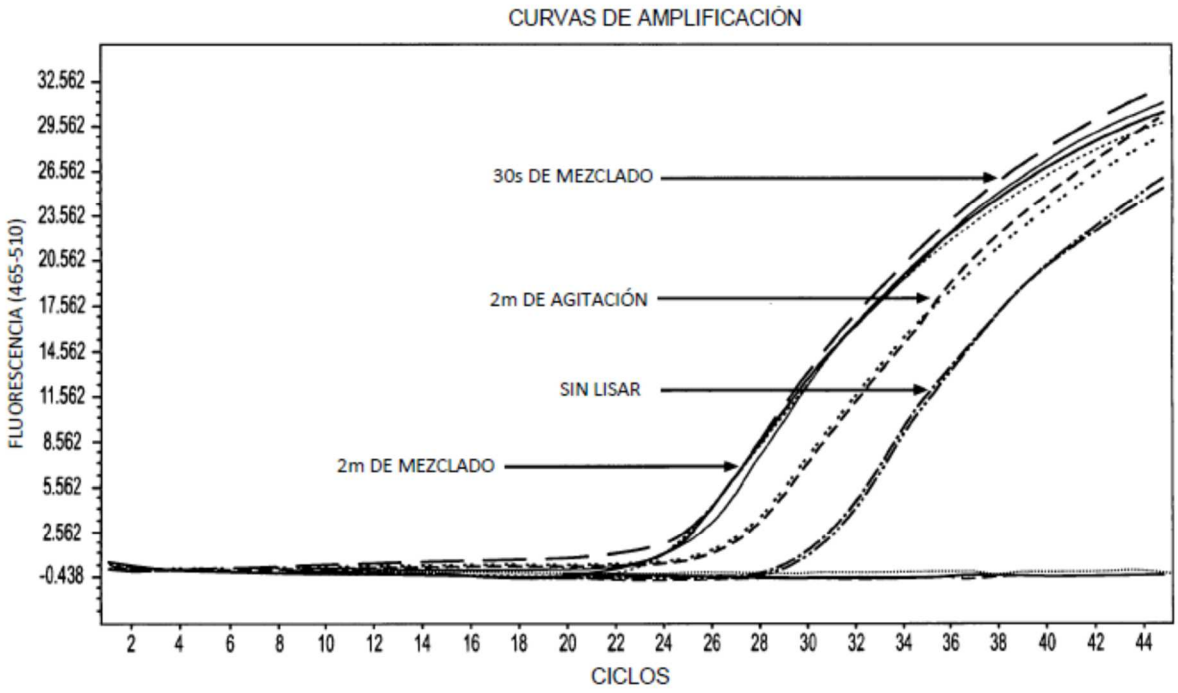
CURVAS DE AMPLIFICACIÓN
FLUORESCENCIA (465-510)
32.562
29.562
26.562
23.562
20.562
17.562
14.562
11.562
8.562
5.562
2.562
-0.438
30s DE MEZCLADO
2m DE AGITACIÓN
SIN LISAR
2m DE MEZCLADO
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
42
44
CICLOS

FIG. 4

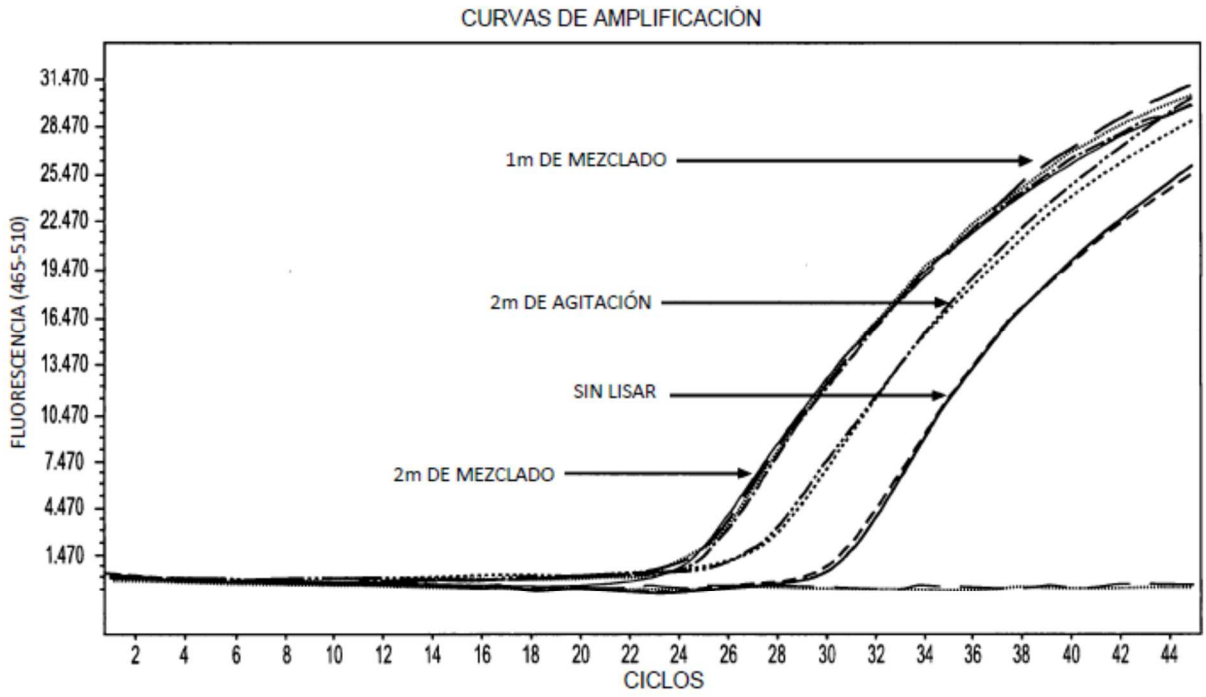
CURVAS DE AMPLIFICACIÓN
FLUORESCENCIA (465-510)
31.470
28.470
25.470
22.470
19.470
16.470
13.470
10.470
7.470
4.470
1.470
1m DE MEZCLADO
2m DE AGITACIÓN
SIN LISAR
2m DE MEZCLADO
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44
CICLOS

FIG. 5

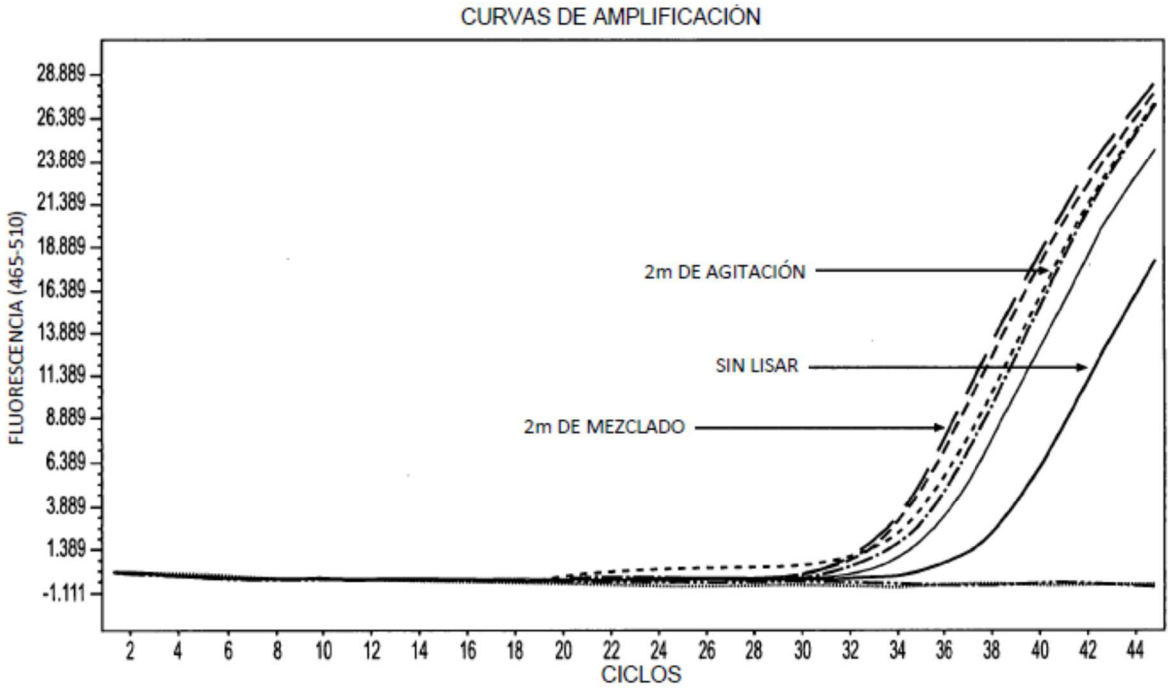
CURVAS DE AMPLIFICACIÓN
FLUORESCENCIA (465-510)
28.889
26.389
23.889
21.389
18.889
16.389
13.889
11.389
8.889
6.389
3.889
1.389
-1.111
2m DE AGITACIÓN
SIN LISAR
2m DE MEZCLADO
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44
CICLOS

FIG. 6

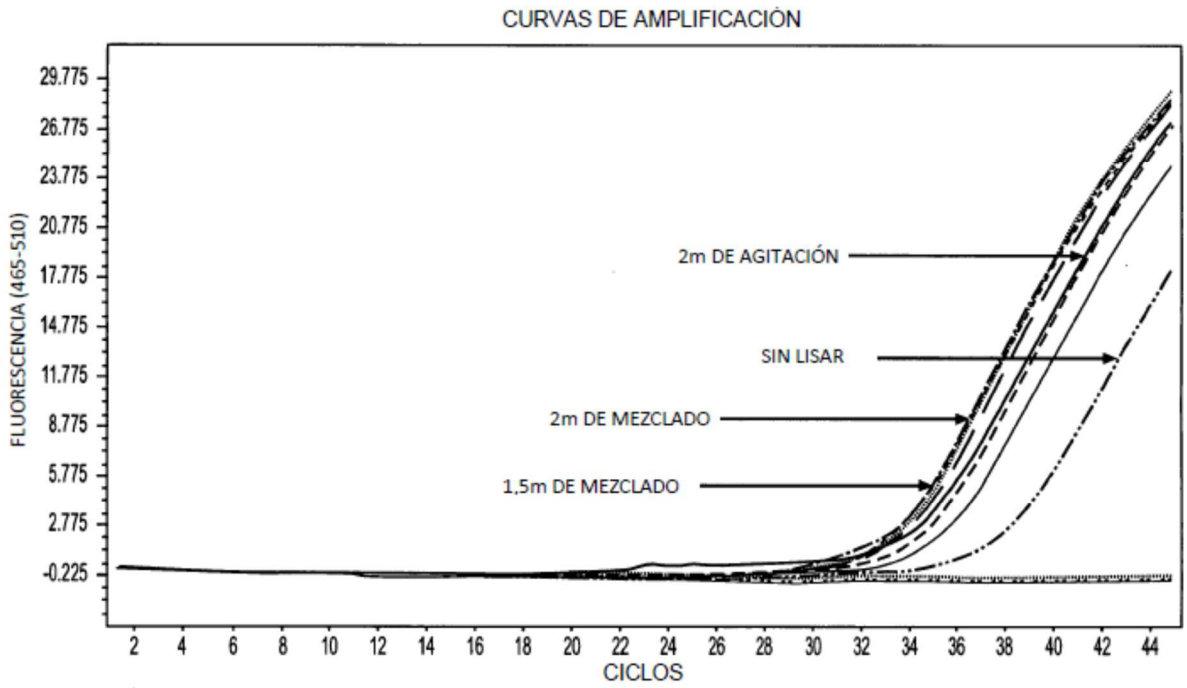
CURVAS DE AMPLIFICACIÓN
FLUORESCENCIA (465-510)
29.775
26.775
23.775
20.775
17.775
14.775
11.775
8.775
5.775
2.775
-0.225
2m DE AGITACIÓN
SIN LISAR
2m DE MEZCLADO
1,5m DE MEZCLADO
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44
CICLOS

FIG. 7

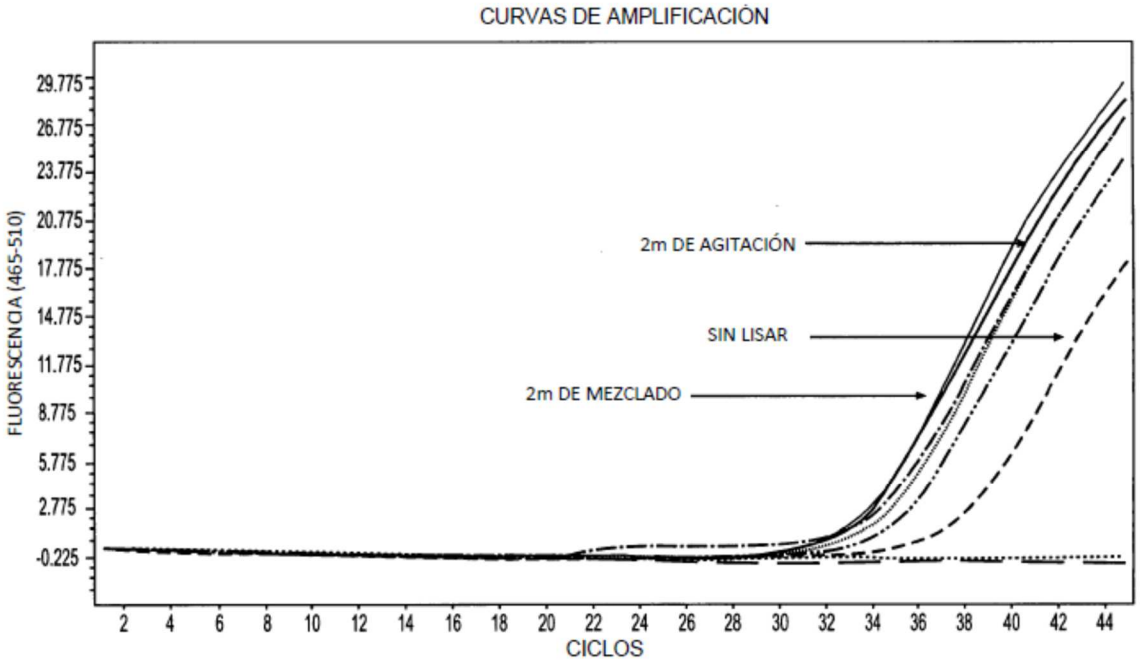
CURVAS DE AMPLIFICACIÓN
FLUORESCENCIA (465-510)
29.775
26.775
23.775
20.775
17.775
14.775
11.775
8.775
5.775
2.775
-0.225
2m DE AGITACIÓN
SIN LISAR
2m DE MEZCLADO
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44
CICLOS

FIG. 8

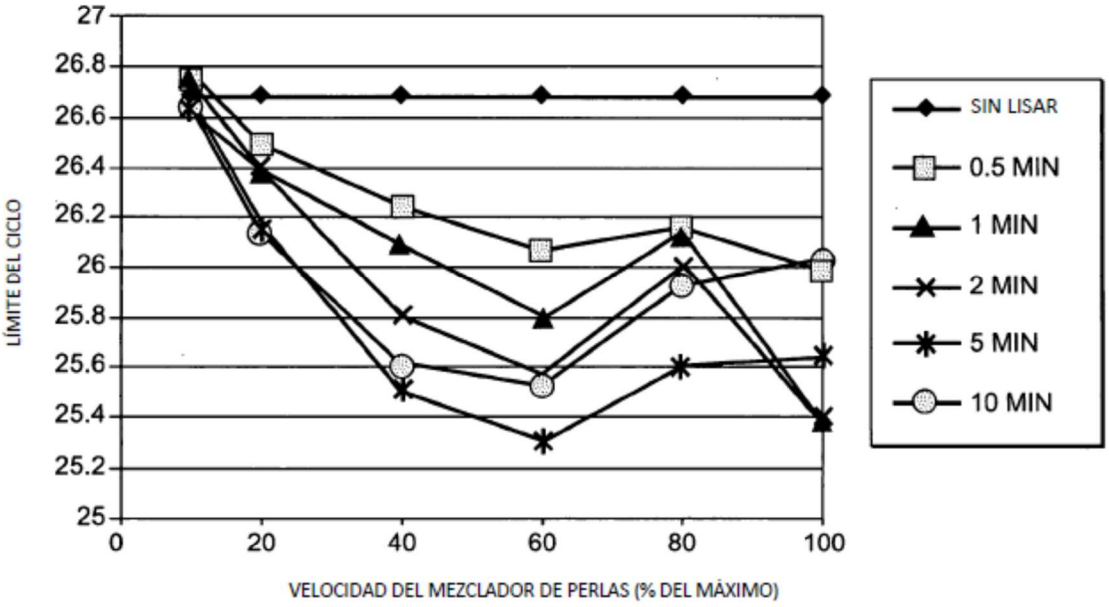
27
26.8
26.6
26.4
26.2
26
25.8
25.6
25.4
25.2
25
0
20
40
60
80
100
LÍMITE DEL CICLO
VELOCIDAD DEL MEZCLADOR DE PERLAS (% DEL MÁXIMO)
SIN LISAR
0.5 MIN
1 MIN
2 MIN
5 MIN
10 MIN

FIG. 9

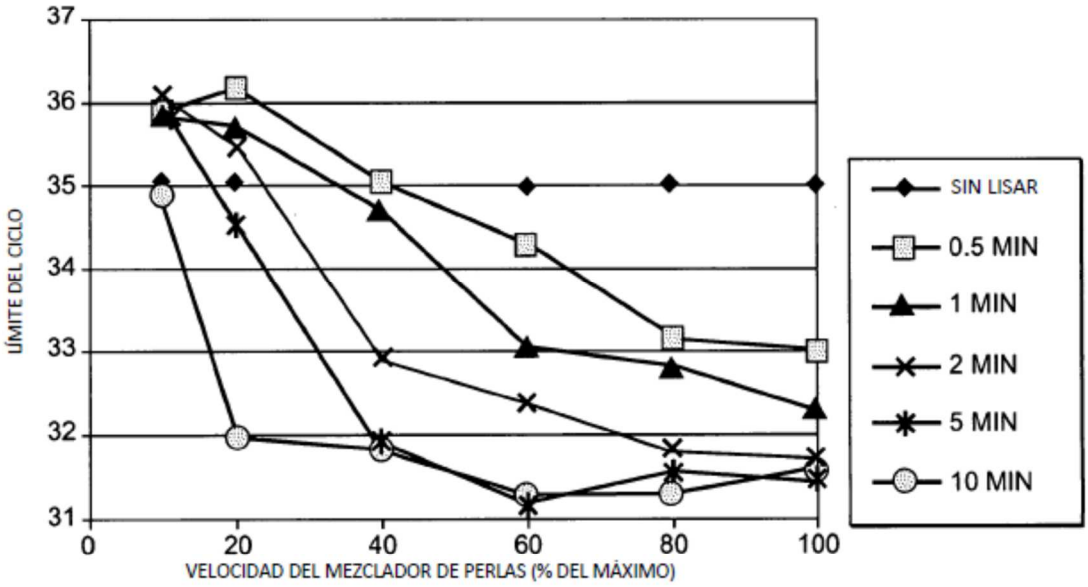
37
36
35
34
33
32
31
0
20
40
60
80
100
LÍMITE DEL CICLO
VELOCIDAD DEL MEZCLADOR DE PERLAS (% DEL MÁXIMO)
SIN LISAR
0.5 MIN
1 MIN
2 MIN
5 MIN
10 MIN

FIG. 10