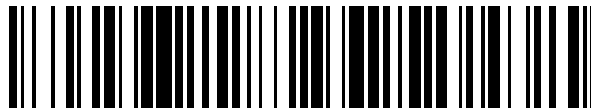


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 514**

51 Int. Cl.:

G01N 1/34 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2010 PCT/US2010/023045**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.08.2010 WO10091080**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2010 E 10732498 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2394152**

54 Título: **Purificación de ácido nucleico**

30 Prioridad:

03.02.2009 US 206690 P
06.02.2009 US 207017 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2019

73 Titular/es:

ANDE CORPORATION (100.0%)
266 Second Avenue
Waltham, MA 02451, US

72 Inventor/es:

SELDEN, RICHARD, F. y
TAN, EUGENE

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 735 514 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

Purificación de ácido nucleico

5 Declaración de interés gubernamental

La presente solicitud ha sido apoyada por el número de concesión 2007-DN-BS-K184 concedido por el Instituto Nacional de Justicia, oficina de programas de justicia, del Departamento de Justicia de los Estados Unidos de América y un contrato de MIT Lincoln Laboratory titulado "Field-Deployable Accelerated Nuclear DNA Equipment" concedido el 30 de septiembre de 2009.

Antecedentes de la invención

A. La necesidad no satisfecha - Muestra clínicas y forenses sin procesar

15 Desde el primer aislamiento de ácidos nucleicos por Miescher y Altmann en la segunda mitad del siglo diecinueve (Miescher, Friedrich (1871) "Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen," en F. Miescher. Die Histochemischen und physiologischen Arbeiten Vol.2:3-23) hasta las técnicas de biología molecular más sofisticadas disponibles hoy en día, el proceso de la extracción de ADN se ha simplificado sustancialmente. No obstante, existe una necesidad apremiante en la detección clínica de amenazas biológicas y la comunidad forense de métodos integrados sensibles, robustos y fiables de purificación de ADN que sean rápidos, rentables y que no necesiten ni mucho trabajo ni espacio. En particular, existe una necesidad no satisfecha de métodos y dispositivos que puedan purificar rápidamente ácidos nucleicos a partir de muestras del campo forense o clínico sin ninguna manipulación o procesamiento manual.

25 Idealmente, se necesitan métodos novedosos de purificación de ácidos nucleicos para abordar los numerosos y variados mercados emergentes y existentes para proporcionar información genómica, en particular, el suministro de información genómica en el campo y para aplicaciones en puntos de atención o cerca de puntos de atención. Por ejemplo, en el campo de la identificación humana, existe una necesidad no satisfecha en la comunidad forense de poder generar una huella de ADN rápidamente, bien en el laboratorio o bien en el campo (por ejemplo, en fronteras, puertos de entrada, en el campo de batalla y puntos de control militares).

30 De igual modo, para proteger la población civil y militar, resulta crucial mejorar la identificación de amenazas biológicas ambientales. Una identificación más rápida, más sensible, más específica y más detallada permitirá respuestas estratégicas y tácticas mejoradas por parte de las autoridades civiles y militares, así como actividades de remedio más eficaces. La rápida aplicación de tecnologías de análisis de ácidos nucleicos que incluyen amplificación, hibridación y secuenciación de ácidos nucleicos pueden proporcionar información crucial en este sentido.

40 Además, la capacidad de diagnosticar rápidamente infecciones clínicas (ya sean causadas por amenazas biológicas o por patógenos convencionales) tendría un profundo impacto en la sociedad. Por ejemplo, la extracción de una muestra de sangre de un paciente séptico y la determinación tanto de la identidad del patógeno o patógenos, como de sus perfiles de resistencia a antibiótico basándose en el análisis de ácidos nucleicos en una hora o menos, permitiría el inicio inmediato de una terapia antimicrobiana (la situación análoga del diagnóstico vírico y perfiles de resistencia a fármaco también resulta crucialmente importante). La capacidad de generar rápidamente información analítica de ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas también tendría un impacto sustancial sobre el diagnóstico y tratamiento de una amplia gama de enfermedades que varían desde cánceres a trastornos del sistema inmunitario; esencialmente cada categoría de enfermedades se vería afectada. También se podría aplicar el mismo enfoque a la farmacogenómica, el uso de información genética para predecir la adecuación de una intervención farmacológica dada.

50 El documento US 2004/086870 divulga un sistema microfluídico que comprende una parte de manipulación de fluido conectada con una parte de ensayo; la parte de manipulación de fluido no es autónoma, pero parece comprender una parte de manipulación de fluido conectada con una parte de ensayo; la parte de manipulación de fluido puede realizar el preprocesamiento de muestras, tal como aislamiento de ADN, y el sistema puede estar configurado en forma de un cartucho.

60 El documento WO 2007/106579 divulga diversos cartuchos microfluídicos parcialmente integrados para la extracción, amplificación y detección de ácido nucleico; los dispositivos no son autónomos aunque parecen tener una única entrada, son higiénicos y desechables.

B. Enfoques de la técnica anterior con respecto a purificación de ADN

65 En enfoque básico con respecto a la extracción y purificación de ADN nuclear a partir de células de mamífero se desarrolló hace más tres décadas (N. Blin, D.W. Stafford (1976). A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 3(9): 2303-8) y tiene dos etapas principales: la lisis de los tipos de

células de interés y la purificación de ADN a partir de otros componentes celulares en solución (particularmente proteínas) y los residuos tisulares y celulares. La lisis de células (cuando proceda) y la solubilización de ADN se puede lograr mediante técnicas mecánicas (revisado en J. Brent (1998). Breaking Up Isn't Hard To Do: A cacophony of sonicators, cell bombs and grinders" *The Scientist* 12(22):23) y técnicas no mecánicas. Enfoques mecánicos sencillos incluyen el uso de mezcladoras y homogeneización forzando las células a través de aberturas restrictivas. La sonicación se basa en la exposición de células a ondas de sonido de alta frecuencia y los enfoques de perlas se basan en la exposición de células a un mezclado violento en presencia de diversas perlas.

La alteración química de células es una alternativa a la alteración mecánica. Los detergentes son agentes líticos químicos importantes que actúan alterando las bicapas lipídicas. Las propiedades adicionales de los detergentes pueden permitir que se mantenga la estructura proteica (por ejemplo, detergentes zwitteriónicos o no iónicos) o se altere (detergentes iónicos). El dodecilsulfato sódico (SDS), un detergente iónico, se usa comúnmente en protocolos forenses de extracción de ADN debido, en parte, a su capacidad de solubilización de macromoléculas y desnaturalización de proteínas dentro de la célula (J.L. Haines *et al* (2005) *Current Protocols in Human Genetics* Vol. 2, (2005 John Wiley and Sons, Inc. Pub.). La proteinasa K se usa a menudo en tándem con protocolos de lisis a base de detergente (por ejemplo, SDS, Tween-20, Triton X-100). Otra forma de lisis por detergentes se basa en papel de FTA (L.A. Burgoyne (1997) *Convenient DNA Collection and Processing: Disposable Toothbrushes and FTA Paper as a Nonthreatening Buccal-Cell Collection Kit Compatible with Automatable DNA Processing*, 8^o International Symposium on Human Identification, Sept. 17-20, 1997 Orlando, FL; G.M. Fomovskaia *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 6.958.392). Este es un filtro de celulosa impregnado con una base débil, un detergente aniónico, un agente quelante y conservantes.

En el caso de una muestra clínica o ambiental, una primera etapa hacia el análisis de ácidos nucleicos es el aislamiento o purificación de alguno o todos los ácidos nucleicos presentes en la muestra. El material biológico en la muestra puede someterse a lisis y los ácidos nucleicos dentro del lisado puede purificarse antes de un análisis adicional. Como alternativa, los ácidos nucleicos contenidos dentro del lisado pueden analizarse directamente (por ejemplo, kit de PCR directa de sangre de Phusion (Finnzymes, Espoo, FN) y Daniel *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 7.547.510).

Como reconocerán los expertos en la materia, la purificación de ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas, ambientales o forenses requiere la automatización de las etapas preprocesamiento adecuadas al campo particular de la muestra bajo investigación. La diversidad de tipos de muestras, volúmenes de muestras, tecnologías de muestreo, dispositivos de recogida de muestras, requisitos de procesamiento de muestras y las complejidades inherentes en la resolución de muestras de campo ha creado una necesidad no satisfecha de métodos y dispositivos robustos para purificar ácidos nucleicos de tales diversas muestras.

C. Enfoques microfluídicos para la purificación a partir de muestras clínicas y ambientales

El campo de los microfluidos ofrece una solución potencial a la necesidad no satisfecha y dispositivos capaces de aislar ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas, ambientales y forenses sin procesar. La microfluídica se basa en la manipulación de pequeños volúmenes de fluidos de microlitros o menos y apareció como un híbrido de la biología molecular y la microelectrónica a principios de 1990 (véase, Manz *et al.* *Sens. Actuators B1:244-248* (1990)). Un elemento principal en la microfluídica es integrar múltiples componentes para desarrollar un sistema con funcionalidad de introducción de muestras y producción de resultados (revisado en Erickson *et al.* *Anal. Chimica Acta* 507: 11-26 (2004)).

Se han realizado algunos progresos en este enfoque con respecto a la detección ambiental de amenazas biológicas. El sistema automatizado de detección de patógenos (Hindon *et al.* *Anal. Chem.* 77:284-289 (2005)) recoge muestras de aire y realiza la extracción de ADN microfluídico y una PCR en tiempo real capaz de detectar *B. anthracis* e *Y. pestis* (los límites de detección fueron entre 10^3 - 10^7 organismos por ml de muestra concentrada). El sistema Cepheid (Sunnyvale, CA) GeneXpert también recoge muestras de aire y realiza una lisis de esporas de *B. anthracis* integrada (mediante microsonicación), extracción de ADN y PCR en tiempo real (los límites de detección fueron 68 ufc (equivalentes a 148 esporas) por ml de muestra concentrada para esporas de Ames y 10^2 - 10^3 ufc por ml de muestra concentrada para esporas de Sterne). A pesar de estos avances, no existe ningún sistema o dispositivo disponible capaz de purificar ácidos nucleicos sin procesar a partir de muestras clínicas o ambientales (o a partir de muestras ambientales recogidas manualmente) sin la intervención humana. De hecho, todas las tecnologías disponibles se basan en el procesamiento manual de alguna o todas las etapas.

D. Purificación de ADN a partir de muestras forenses

Uno de los métodos de purificación de ADN más tempranos para muestras forenses fue el uso de extracción de fenol/cloroformo (D.M. Wallace (1987) *Large and small scale phenol extractions. Methods Enzymol.* 152:33-41; Maniatis, T. *et al.*, "Purification of Nucleic Acids" in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3^a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York). En este método, la mayor parte de la proteína se mueve a la fase orgánica o la interfaz orgánico-acuosa y el ADN solubilizado permanece en la fase acuosa. La fase que contiene ADN puede someterse a precipitación de ADN y el ADN aislarse siguiendo una serie de etapas de

centrifugación y lavado. En la práctica forense, el ADN se recupera a menudo a partir de la fase acuosa con dispositivos de diálisis centrífugos, tales como columnas de Microcon (Millipore Corporation, Billerica, MA). La ventaja del enfoque de extracción orgánica es que proporciona preparaciones de ADN de alta calidad (con cantidades relativamente bajas de proteína y degradación relativamente baja) y sigue siendo uno de los métodos más fiables disponibles hoy en día. Los principales inconvenientes es que el procedimiento conlleva mucho tiempo y trabajo, requiere equipamiento engorroso y es relativamente complicado de adaptar a configuraciones de alto rendimiento.

En consecuencia, la comunidad forense se ha movido a una serie de tecnologías de purificación que son más sencillas de usar, muchas de las cuales sirven como la base de kits disponible en el mercados. Existe un número enorme de enfoques con respecto a la purificación de ácido nucleico, varios de los cuales se resumen del siguiente modo:

Matrices de sílice/agentes caotrópicos. El uso de perlas de sílice para el aislamiento de ADN ha sido una técnica convencional durante más de un cuarto de siglo, basándose los protocolos iniciales en la unión de ADN a sílice en presencia de agentes caotrópicos tales como yoduro sódico (B. Vogelstein *et al.*, (1979) "Preparative and analytical purification of DNA from agarose," *Proc Nat Acad Sci USA* 76(2):615-9). Muchos años antes, se encontró que las sales de guanidinio son potentes desestabilizadores de macromoléculas (von Hippel P.H. *et al.*, (1964) "Neutral Salts: The Generality of Their Effects on the Stability of Macromolecular Conformations." *Science* 145:577-580). Determinadas sales de guanidinio también tienen la ventaja de desactivar nucleasas (Chirgwin J.M. *et al.*, (1979) "Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease," *Biochemistry* 18(24):5294-9). Estas observaciones fueron sintetizadas por Boom (Boom, R. *et al.*, (1990) "Rapid and Simple method for purification of nucleic acids," *J Clin Microbiol.* 28(3):495-503), quien, en efecto, usó dos propiedades relacionadas de las sales de guanidinio. La primera, la capacidad de las sales de someter a lisis las células y, la segunda, la capacidad de las sales de potenciar la unión de ADN a partículas de sílice, han llevado a un número de enfoques de lisis/purificación ampliamente utilizados en laboratorios forenses hoy en día (por ejemplo, DNAIQ Systems, Promega, Madison, WI). Una alternativa a las perlas de sílice es el uso de membranas de sílice (Qlamp, Qiagen Hilden, DE). Además, las perlas de sílice por sí mismas pueden modificarse para potenciar adicionalmente la unión de ADN.

Matrices de sílice/agente no caotrópicos. Las matrices de sílice también se pueden utilizar en ausencia de caótropos. Un enfoque es modificar las perlas de sílice de modo que tengan una carga positiva neta a un pH dado y sean capaces de unir ADN (Baker, M.J., Patente de Estados Unidos n.º 6.914.137). La modificación contiene un grupo ionizable, de modo que la unión de ADN se invierte a un pH superior (cuando el grupo ionizable está negativamente cargado o es neutro), a veces a temperatura elevada. Puesto que unas fluctuaciones amplias en el pH pueden dañar el ADN, un rasgo crucial de este enfoque es escoger una modificación que permita la unión reversible de ADN dentro de un intervalo de pH relativamente estrecho. Un enfoque ampliamente usado de este tipo se basa en la perla de ChargeSwitch (Life Technologies, Inc. Carlsbad, CA).

Perlas magnéticas. Aunque las propiedades de unión de ADN se han determinado principalmente mediante la estructura superficial de una perla dada, el uso de perlas magnéticas se ha vuelto crecientemente importante en protocolos de purificación de ADN. Estas partículas, en general, son paramagnéticas; no son magnéticas por sí mismas pero forman dipolos cuando se exponen a un campo magnético. La utilidad de estas perlas se refiere a su facilidad de manipulación y adaptación a sistemas automatizados. Por ejemplo, las perlas pueden retirarse fácilmente de una suspensión en presencia de un imán, permitiendo que se laven y transporten eficazmente. Dos perlas comúnmente usadas son las perlas de ChargeSwitch y DNAIQ descritas anteriormente.

Intercambio iónico. El intercambio iónico permite que las moléculas de ADN se unan reversiblemente a una perla inmóvil. La perla consiste, en general, en un polímero orgánico o inorgánico poroso con sitios cargados que permiten que un ión se sustituya por otro a una resistencia iónica dada. En la práctica, una solución que contiene ADN y otras macromoléculas se expone a la resina de intercambio iónico. El ADN negativamente cargado (debido a su estructura principal de fosfato) se une de forma relativamente fuerte a la resina a una concentración de sal o pH dados. Proteína, carbohidrato y otras impurezas se unen de forma relativamente débil (si lo hacen) y se laven de las perlas (por ejemplo, en un formato de columna o mediante centrifugación). El ADN purificado puede, a continuación, eluirse en un tampón de alta resistencia iónica. Una resina de intercambio aniónico disponible en el mercado que se usa hoy en día se basa en perlas de sílice modificadas con DEAE (Genomic-tip, Qiagen).

Chelex. Chelex-100 (Bio-Rad, Hercules, CA) es una resina modificada que une eficazmente cationes de metal multivalentes. Puesto que tales cationes se requieren para enzimas que degradan ADN y por sí mismos inhiben enzimas de PCR, este método es representativo de aquellos que esencialmente evitan una etapa de purificación de ADN (Walsh P.S. *et al.*, Chelex 100 como un medio para la extracción simple de ADN para la tipificación basada en PCR a partir de material forense. *Biotechniques* 10(4):506-13).

Cuando se usan bastoncillos de algodón para recoger material, puede haber problemas al retirar material biológico de la matriz de algodón; ya que el bastoncillo de algodón se seca después de su recogida, el material biológico se puede adherir al bastoncillo. Por ejemplo, debido a la composición sacárica de la membrana de espermatozoides, los espermatozoides se pegan a soportes sólidos, especialmente al algodón (Lazzarino, M. F. *et al.*, (2008) DNA Recovery

- from Semen Swabs with the DNA IQ System. *Forensic Science Communications* 10(1)). Para liberar la cantidad máxima de material de los bastoncillos, se han sometido a ensayo una variedad de tampones y se han comparado con el tampón de extracción diferencial estándar. El uso de detergentes tales como dodecilsulfato sódico (SDS) al 1-2 % ha demostrado aumentar la recuperación de espermatozoides (Norris, J. V. *et al.*, (2007) "Expedited, chemically enhanced sperm cell recovery from cotton swabs for rape kit analysis." *J Forensic Sci* 52(4): 800-5). También, la adición de pequeñas cantidades de celulasa ha demostrado liberar más células epiteliales y espermatozoides desde la matriz del bastoncillo de algodón que solo la elución de tampón (Voorhees, J. C. *et al.*, (2006). "Enhanced elution of sperm from cotton swabs via enzymatic digestion for rape kit analysis." *J Forensic Sci* 51(3): 574-9).
- 10 Puede haber muchos problemas en la obtención de perfiles de repetición en tándem corto (STR) forense a partir de materiales biológicos que incluyen ADN de baja cantidad o calidad. Muestras de bajo número de copias (que contienen menos de 50-100 picogramos de ADN) así como muestras de baja calidad, degradadas, requieren procedimientos de recogida, extracción y amplificación altamente eficaces. Estas muestras se observan en una diversidad de pruebas forenses que incluyen pruebas de tacto y muestras envejecidas. Los kits de amplificación
- 15 tales como el Life Technologies Minifiler™ tienen tamaños de amplicón más pequeños que han demostrado aumentar la capacidad de obtener perfiles de STR a partir de estas muestras complicadas.

Los inhibidores de PCR son otro problema y deben eliminarse antes de que se puedan llevar a cabo aplicaciones corriente abajo. Los inhibidores comunes son tintes índigo de mezcilla de algodón, hemos de sangre, ácido húmico que se encuentra en plantas y tierra y colágeno que se encuentra en diversos tejidos. La mayoría de estos inhibidores se eliminan eficazmente usando métodos de extracción de ADN a base de sílice o purificación adicional con columnas de exclusión de carga o tamaño. La presencia de inhibidores puede detectarse realizando PCR con controles positivos internos. Si están presentes, algunos inhibidores pueden neutralizarse mediante diversos tratamientos que incluyen lavados de hidróxido sódico o purificación adicional con columnas de Millipore Microcon YM®.

La necesidad de reconciliar los requisitos del "mundo real" de la recogida de muestras con los requisitos microfluídicos de un biochip de procesamiento de ADN microfluídico integrado se pueden denominar como "interfaz macro-a-micro" o "interfaz mundo-a-chip" (Fredrickson, C. and Fan, Z. (2004) "Macro-to-micro interfaces for microfluidic devices," *Lab Chip* 4(6): 526-33). Gran parte de la investigación reportada sobre cómo abordar esta interfaz se centra en resolver el desajuste entre los requisitos volumétricos macrofluídicos y microfluídicos, pero se ha reportado poca o ninguna investigación sobre la conciliación de los requisitos específicos de muestreo forense y los formatos con dispositivos microfluídicos.

El desequilibrio volumétrico (no forense) se ha abordado comercialmente por Agilent (Santa Clara, CA) en el Bioanalizador 2100 mediante el uso de un capilar para aspirar muestras desde una placa de microtitulación a un chip para ensayos enzimáticos (Lin 2003). De igual modo, Gyros (Uppsala, SE) ha desarrollado un dispensador capilar para un sistema LabCD en el que las muestras se aspiran de una placa de pocillos en una boquilla de dispensación y, a continuación, se dirigen hacia arriba hacia un dispositivo de rotación (Jesson 2003). Estos dispositivos, sin embargo, no abordan la incompatibilidad del formato de muestras forenses recogidas, en particular, en los dispositivos de recogida comunes con bastoncillo.

E. Purificación de ADN parcialmente automatizada

Se ha desarrollado una variedad de instrumentos de laboratorio para la purificación parcialmente automatizada de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el instrumento Maxwell 16 (Promega) está diseñado para purificar ácidos nucleicos a partir de muestras forenses. Para purificar ADN de un hisopo bucal, el operario realiza una cantidad de etapas que incluyen cortar la porción de recogida de algodón por la mitad, colocarlo en un tubo de centrifugación de 1,5 ml, preparar y añadir reactivos de lisis, incubar la muestra en un bloque calefactor, agitar con formación de vórtice el tubo, transferir los reactivos y la muestra de hisopo a una cesta giratoria y centrifugar la cesta. A continuación, se coloca un pistón en el cartucho de Maxwell, se pipetea la muestra en el cartucho y el cartucho se coloca en el instrumento para la purificación del ácido nucleico.

El instrumento iPrep (Life Technologies) se usa también para el procesamiento de muestras forenses y clínicas para purificar ácidos nucleicos. Por ejemplo, la punta de un hisopo bucal se coloca en un tubo de centrifugación de 1,5 ml y se somete a una serie de etapas manuales similares a las que se requieren para el Maxwell 16. Después de la preparación manual de la muestra, el lisado se transfiere a un tubo de elución de 1 ml para su procesamiento dentro del instrumento. Los sistemas de Qiagen EZ1, BioRobot M48 y Qiacube (Qiagen) automatizan parcialmente la purificación de ácido nucleico. Se recogen los hisopos bucales, se dejan secar durante dos horas y se procesan manualmente esencialmente como en los instrumentos descritos anteriormente. Los sistemas de Innuprep (analytikJena, Itzehoe, DE), LabTurbo (Taigen, Taipei, TW), Xiril 150 (Xiril AG, Hombrechtikon, CH) y Quickgene (FujiFilm Corp., Tokyo, JP) son instrumentos parcialmente automatizados que requieren una manipulación e intervención sustancial por parte del usuario. La publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 20080003564 (Chen *et al.*) describe un tubo de procesamiento de muestras macrofluídicas que acepta un hisopo y transporta reactivos mecánicamente usando características macrofluídicas y un entubado flexible. La publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 20070092901 (Ligler, F. *et al.*) ha descrito un sistema

que acepta muestras biológicas líquidas para la purificación semiautomatizada de ácido nucleico.

Varios grupos, incluyendo los de Landers (Wolfe, K.A. et al., (2002) Toward a microchip-based solid phase extraction method for isolation of nucleic acids. *Electrophoresis* 23 (5):727-33; Wen, J. et al., (2006) DNA extraction using a tetramethyl orthosilicate-grafted photopolymerized monolithic solid phase. *Anal Chem.* 78(5):1673-81; Easley, C.J. et al., (2006) A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(51):19272-7; Hagan K.A. et al. (2008) Microchip-based solid-phase purification of RNA from biological samples, *Anal Chem* 80:8453-60), Locascio (Becker, H. et al., (2002) Polymer microfluidic devices *Talanta* 56(2):267-287; Martynova, L. et al., (1997) Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods. *Anal Chem.* 69(23):4783-9.), Mathies (Lagally, E.T. et al., (2001) Fully integrated PCR-capillary electrophoresis microsystem for DNA analysis. *Lab Chip* 1(2):102-7; Yeung, S.H., et al., (2006) Rapid and high-throughput forensic short tandem repeat typing using a 96-lane microfabricated capillary array electrophoresis microdevice. *J Forensics Sci.* 51(4):740-7), y otros (Liu R.H. et al., (2004) "Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction, amplification, and DNA microarray detection *Anal Chem* 76(7):1824-31) han funcionado en microfluidica para la purificación y análisis de ADN (revisado en Liu, P. and Mathies, R.A., (2009), "Integrated microfluidic systems for high-performance genetic analysis." *Trends in Biotechnology* 27(10):572-81). Easley ha demostrado el aislamiento de ADN a partir de 750 nanolitros de sangre entera y 1 microlitro de aspirado nasal usando un protocolo de purificación de lisis de guanidinio/perlas de sílice (Easley, C.J. et al., *Proc Natl Acad Sci*, mencionado anteriormente). La muestra de sangre entera contenía aproximadamente 2,5 millones de bacterias (*Bacillus anthracis*) por ml 1.500-2.000 ufc en la muestra de 750 nl), una concentración demasiado alta para ser relevante para el diagnóstico clínico. La solicitud de patente de los Estados Unidos, US2008/0014576 A1 describe módulos de purificación de ácido nucleico que aceptan muestras para su purificación en soluciones, perlas, coloides o soluciones multifásicas y se pueden integrar en dispositivos de preparación de corriente abajo tales como termocicladores e instrumentos de separación.

Sumario de la invención

La invención de la presente divulgación comprende aparatos, métodos e instrumentos para aislar ácido nucleico, lisados de células y suspensiones de células a partir de muestras sin procesar. En una divulgación, el aparato comprende un aparato autónomo para aislar ácido nucleico de una muestra sin procesar, aparato que se usará con un instrumento, comprendiendo dicho aparato, al menos una entrada y:

(i) un componente macrofluidico, que comprende una cámara para recibir dicha muestra sin procesar a partir de un dispositivo de recogida y al menos un depósito de almacenamiento de reactivo de purificación líquido cargado; y

(ii) un componente microfluidico en comunicación con dicho componente macrofluidico a través de al menos un elemento microfluidico, comprendiendo adicionalmente dicho componente microfluidico; al menos una matriz de purificación de ácido nucleico

(iii) un mecanismo de transmisión en dicho instrumento para transmitir dicho reactivo de purificación líquido, a través de dicho elemento microfluidico y dicha matriz de purificación de ácido nucleico, en donde las únicas entradas a dicho aparato son mediante dicha cámara y dicho mecanismo de transmisión.

En otra invención, el aparato comprende un aparato autónomo para aislar ácido nucleico de una muestra sin procesar, aparato que se usará con un instrumento, consistiendo dicho aparato en un componente macrofluidico, un componente microfluidico, al menos una línea de transmisión neumática y dos entradas, una primera entrada para recibir la al menos una muestra sin procesar desde un dispositivo de recogida y una segunda entrada para establecer una interfaz en el mecanismo de transmisión en dicho instrumento

(i) comprendiendo dicho componente macrofluidico:
al menos una cámara para recibir dicha al menos una muestra sin procesar a partir de un dispositivo de recogida;
al menos dos depósitos de almacenamiento de reactivos de lisis precargados formados dentro del componente macrofluidico;
un almacenamiento de reactivos lavados precargado formado dentro del componente macrofluidico; y
un almacenamiento de reactivos de elución precargado formado dentro del componente macrofluidico; y

(ii) un componente microfluidico en comunicación con dicho componente macrofluidico a través de al menos un elemento microfluidico, comprendiendo adicionalmente dicho componente microfluidico; al menos una matriz de purificación de ácido nucleico;

(iii) al menos una línea de transmisión neumática para la conexión a un mecanismo de transmisión en dicho instrumento para transmitir dicho primer y segundo reactivos de lisis, dicho reactivo de lavado y dicho reactivo de elución y secuencialmente a través de dicho elemento microfluidico y dicha matriz de purificación de ácido nucleico, en donde las únicas entradas a dicho aparato son mediante dicha cámara y dicha al menos una línea de transmisión y, adicionalmente, en donde todos los reactivos usados para aislar ácido nucleico de la al menos una muestra sin procesar están contenidos dentro del aparato en cámaras precargadas.

En invenciones relacionadas, el aparato reivindicado puede tener dispositivos de recogida y/o las cámaras están etiquetadas, comprendiendo dicha etiqueta un código de barras o RFID. En otras invenciones relacionadas, los mecanismos de transmisión pueden ser neumáticos, mecánicos, magnéticos o fluidos. En aún otras invenciones relacionadas la muestra sin procesar comprende: (i) un hisopo nasal, un hisopo nasofaríngeo, un hisopo bucal, un hisopo de fluido oral, un hisopo de heces, un hisopo de amígdala, un hisopo vaginal, un hisopo de cuello uterino, un hisopo sanguíneo, un hisopo de herida o tubo que contiene sangre, esputo, material purulento o aspirados; (ii) un hisopo forense, recorte, cinta adhesiva de recogida, o tarjeta; o (iii) un filtro de aire ambiental, filtro de agua o hispo.

En otras invenciones relacionadas, la matriz de purificación del aparato reivindicado comprende membranas de sílice, perlas de sílice, perlas magnéticas de sílice, resinas de intercambio iónico o perlas de intercambio iónico. En aún otras invenciones relacionadas el componente microfluídico del aparato reivindicado comprende canales, depósitos, válvulas activas, válvulas pasivas, válvulas neumáticamente activadas, cámaras de reacción, cámaras de mezclado, elementos de ventilación, orificios de acceso, bombas, elementos de medición, elementos de mezclado, elementos de calentamiento, elementos magnéticos, cámaras de reacción, elementos de filtración, elementos de purificación, líneas de transmisión y líneas de accionamiento.

Otro aspecto de la presente divulgación es un método para purificar ácidos nucleicos a partir de una muestra sin procesar que comprende,
 proporcionar una muestra que comprende ácidos nucleicos a la cámara de un aparato reivindicado;
 transmitir al menos una porción de un primer reactivo de lisis desde dicha primera cámara de reactivos de lisis a la cámara para proporcionar una primera mezcla;
 transmitir al menos una porción de un segundo reactivo de lisis desde dicha segunda cámara de reactivos de lisis a la cámara para proporcionar una segunda mezcla;
 transmitir al menos una porción de dicha segunda mezcla a través de la membrana de purificación para proporcionar un filtrado o retenido, en donde el retenido comprende al menos una porción de los ácidos nucleicos;
 transmitir al menos una porción del reactivo de lavado a través de la membrana de purificación para proporcionar un retenido lavado y un residuo;
 transmitir opcionalmente el retenido lavado; y
 recoger al menos una porción de los ácidos nucleicos desde el retenido lavado transmitiendo al menos una porción de un reactivo de elución desde la cámara de reactivos de elución a través de la matriz de purificación.

Aún otra invención de la presente divulgación es un método para purificar ácidos nucleicos a partir de una muestra sin procesar que comprende,
 proporcionar la al menos una muestra sin procesar que comprende ácidos nucleicos a la cámara de un aparato reivindicado;
 transmitir al menos una porción de un primer reactivo de lisis desde dicha primera cámara de reactivos de lisis a la cámara para proporcionar una primera mezcla;
 burbujear un gas a través de la primera mezcla para proporcionar una primera mezcla agitada que transmite al menos una porción de un segundo reactivo de lisis desde dicha segunda cámara de reactivos de lisis a la cámara para proporcionar una segunda mezcla; y
 transmitir al menos una porción de la primera mezcla agitada a través de la matriz de purificación para proporcionar un filtrado o retenido, en donde el retenido comprende al menos una porción de los ácidos nucleicos;
 transmitir al menos una porción del reactivo de lavado a través de la matriz de purificación para proporcionar un retenido lavado y un residuo;
 transmitir opcionalmente el retenido lavado;
 transmitir al menos una porción de un reactivo de elución desde la cámara de reactivos a través de la matriz de purificación para proporcionar una solución de ácido nucleico eluida; y burbujear un gas a través de la solución de ácido nucleico eluida para proporcionar una solución de ácidos nucleicos eluida homogeneizada.

Aún otro aspecto de la presente divulgación es un método para purificar ácidos nucleicos de patógenos en sangre entera que comprende,
 proporcionar una muestra que comprende sangre entera anticoagulada y patógenos en un tubo de recogida de sangre a la cámara de recogida de muestras de un aparato reivindicado;
 transmitir al menos una porción de la sangre a través de un filtro de retención de leucocitos para proporcionar un filtrado reducido en leucocitos;
 transmitir al menos una porción de un reactivo de lavado de leucocitos a través del filtro de retención de leucocitos para proporcionar un filtrado reducido en leucocitos;
 transmitir al menos una porción de un filtrado reducido en leucocitos a través de una membrana de captura de patógenos
 transmitir al menos una porción de la solución de resuspensión de patógenos por toda la membrana de captura para proporcionar una suspensión de patógenos concentrada
 transmitir al menos una porción de la suspensión de patógenos concentrada a una primera cámara de reactivos de lisis que contiene dicho primer reactivo de lisis para proporcionar una primera mezcla;
 transmitir al menos una porción de un segundo reactivo de lisis desde dicha segunda cámara de reactivos de lisis a la primera cámara de reactivos de lisis para proporcionar una segunda mezcla;

transmitir al menos una porción de dicha segunda mezcla a través de la membrana de purificación para proporcionar un filtrado o retenido, en donde el retenido comprende al menos una porción de los ácidos nucleico;
 transmitir al menos una porción del reactivo de lavado a través de la membrana de purificación para proporcionar un retenido lavado y un residuo; transmitir opcionalmente el retenido lavado; y
 5 recoger al menos una porción de los ácidos nucleicos desde el retenido lavado transmitiendo al menos una porción de un reactivo de elución desde la cámara de reactivos de elución a través de la matriz de purificación.
 Otro aspecto de la presente divulgación es un método para purificar ácidos nucleicos de patógenos en sangre entera que comprende,
 proporcionar una muestra que comprende sangre entera anticoagulada y patógenos en un tubo de recogida de
 10 sangre a la cámara de recogida de muestras de un aparato reivindicado;
 transmitir al menos una porción de la sangre a través de un filtro de retención de leucocitos para proporcionar un filtrado reducido en leucocitos;
 transmitir al menos una porción de un reactivo de lavado de leucocitos a través del filtro de retención de leucocitos para proporcionar un filtrado reducido en leucocitos;
 15 transmitir al menos una porción de la solución de resuspensión de leucocitos por todo el filtro de retención para proporcionar una suspensión de leucocitos concentrada;
 transmitir al menos una porción de la suspensión de leucocitos concentrada a una primera cámara de reactivos de lisis que contiene dicho primer reactivo de lisis para proporcionar una primera mezcla;
 transmitir al menos una porción de un segundo reactivo de lisis desde dicha segunda cámara de reactivos de lisis a
 20 la primera cámara de reactivos de lisis para proporcionar una segunda mezcla;
 transmitir al menos una porción de dicha segunda mezcla a través de la membrana de purificación para proporcionar un filtrado o retenido, en donde el retenido comprende al menos una porción de los ácidos nucleico;
 transmitir al menos una porción del reactivo de lavado a través de la membrana de purificación para proporcionar un retenido lavado;
 25 transmitir opcionalmente el retenido lavado; y
 recoger al menos una porción de los ácidos nucleicos desde el retenido lavado transmitiendo al menos una porción de un reactivo de elución desde la cámara de reactivos de elución a través de la matriz de purificación.

En una divulgación relacionada el método comprende adicionalmente, transmitir una solución de lisis de leucocitos
 30 en la suspensión de leucocitos concentrada para proporcionar una suspensión deferencialmente sometida a lisis;
 transmitir al menos una porción de la suspensión diferencialmente sometida a lisis a través de un filtro de retención de patógenos; transmitir al menos una porción del reactivo de lavado de filtro de retención a través del filtro de retención de patógenos para proporcionar un retenido de patógenos lavado; y resuspender, someter a lisis y purificar ácidos nucleicos del retenido de patógenos.
 35

Otro aspecto de la presente divulgación es un aparato autónomo para generar lisado celular a partir de una muestra sin procesar, aparato que se usará con un instrumento, comprendiendo dicho aparato al menos una entrada y:

- 40 (i) un componente macrofluido, que comprende: una cámara para recibir dicha muestra sin procesar a partir de un dispositivo de recogida y al menos un depósito de almacenamiento de reactivos cargado; y
- (ii) un componente microfluido en comunicación con dicho componente macrofluido a través de al menos un elemento microfluido; y
- (iii) un mecanismo de transmisión en dicho instrumento para transmitir dicho reactivo, a través de dicho elemento microfluido, en donde las únicas entradas a dicho aparato son mediante dicha cámara y dicho mecanismo de
 45 transmisión.

Aún otra divulgación es un aparato autónomo para someter a lisis células a partir de una muestra sin procesar, aparato que se usará con un instrumento, comprendiendo dicho aparato al menos una entrada y:

- 50 (i) un componente macrofluido, que comprende una cámara para recibir dicha muestra sin procesar a partir de un dispositivo de recogida y al menos un depósito de almacenamiento de lisis precargado; y
- (ii) un componente microfluido en comunicación con dicho componente macrofluido a través de al menos un elemento microfluido; y
- (iii) un mecanismo de transmisión en dicho instrumento para transmitir reactivo en dicho depósito de
 55 almacenamiento, a través de dicho elemento microfluido,

en donde las únicas entradas a dicho aparato son mediante dicha cámara y dicho mecanismo de transmisión.

En un método divulgado relacionado para someter a lisis células a partir de una muestra que comprende el uso del
 60 aparato, que comprende al menos una entrada y: proporcionar una muestra que comprende células a una cámara;
 introducir dicho reactivo de lisis en la cámara para proporcionar una mezcla; burbujear un gas a través de la mezcla para proporcionar una mezcla agitada; en donde la mezcla agitada comprende células sometidas a lisis.

Aún otra divulgación es un aparato autónomo para generar una suspensión de células a partir de una muestra sin
 65 procesar, aparato que se usará con un instrumento, comprendiendo dicho aparato al menos una entrada y:

(i) un componente macrofluídico, que comprende: una cámara para recibir dicha muestra sin procesar a partir de un dispositivo de recogida y al menos un depósito de almacenamiento de reactivos cargado que almacena un reactivo sustancialmente isotónico; y

5 (ii) un componente microfluídico en comunicación con dicho componente macrofluídico a través de al menos un elemento microfluídico; y

(iii) un mecanismo de transmisión en dicho instrumento para transmitir dicho reactivo, a través de dicho elemento microfluídico, en donde las únicas entradas a dicho aparato son mediante dicha cámara y dicho mecanismo de transmisión.

10 En otra divulgación, los instrumentos que comprenden el aparato inventivo reivindicado también realizan al menos uno de termociclado, electroforesis capilar, electroforesis microfluídica, calibración de fragmentos de ácido nucleico, repetición en tándem corto (STR), Y-STR y mini-STR, polimorfismo de nucleótido único, PCR, PCR altamente multiplexada, PCR en tiempo real, PCR de transcripción inversa, secuenciación, hibridación, micromatriz, VNTR, inmunoensayos, espectroscopía en masa y análisis de RFLP.

15 En aún otra invención, el aparato de la invención puede colocarse en o establecer una interfaz con otro instrumento que realiza al menos uno de termociclado, electroforesis capilar, electroforesis microfluídica, calibración de fragmentos de ácido nucleico, repetición en tándem corto (STR), Y-STR y mini-STR, polimorfismo de nucleótido único, PCR, PCR altamente multiplexada, PCR en tiempo real, PCR de transcripción inversa, secuenciación, hibridación, micromatriz, VNTR, inmunoensayos, espectroscopía en masa y análisis de RFLP.

20 También es una divulgación que el aparato e instrumentos reivindicados se refuerzan para soportar el transporte y grados extremos de al menos uno de temperatura, humedad y partículas aéreas.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La **FIG. 1** ilustra un aparato adecuado para la detección de amenazas biológicas a partir de una muestra de sangre.

30 La **FIG. 2** es un electroferograma que muestra la recuperación casi cuantitativa de *B. subtilis* mediante el uso de un cartucho de purificación.

La **FIG. 3** es una vista lateral de un cartucho de purificación para muestras de sangre. El tubo de recogida de sangre se etiqueta con el 1, la cubierta se etiqueta con el 2; el componente macrofluídico se etiqueta con el 3; el componente microfluídico se etiqueta con el 4; el puerto de interfaz neumático se etiqueta con el 5.

35 La **FIG. 4** es una vista lateral del componente macrofluídico de un cartucho de purificación para muestras de sangre. El componente macrofluídico se etiqueta con el 3; el primer depósito de lavado se etiqueta con el 6; la cámara de homogeneización de eluato se etiqueta con el 7; la cámara de residuos se etiqueta con el 8; el depósito de eluatos se etiqueta con el 9; el depósito de solución de resuspensión se etiqueta con el 10; la cámara de lisis se etiqueta con el 11; el depósito de etanol se etiqueta con el 12; el depósito de lisis se etiqueta con el 13; la cámara de retención se etiqueta con el 14; el segundo depósito de lavado se etiqueta con el 15 y la cavidad de tubo de recogida de sangre se etiqueta con el 16.

45 La **FIG. 5** es una vista superior de la capa neumática de un cartucho de purificación para muestras de sangre. Los canales neumáticos se etiquetan con el 17; orificios pasantes con respecto a depósitos de reactivos y cámaras del componente macrofluídico se etiquetan con el 18 y los puertos de interfaz neumático se etiquetan con el 19.

50 La **FIG. 6** es una vista superior de la capa microfluídica de un cartucho de purificación para muestras de sangre. Los canales de fluidos se etiquetan con el 20; la membrana de control de ataque químico se etiqueta con el 21; el filtro de Leukosorb se etiqueta con el 22 y el filtro de purificación se etiqueta con el 23.

La **FIG. 7** es una vista lateral de un cartucho forense. La caperuza del hisopo se etiqueta con el 24; la cubierta se etiqueta con el 25; el componente macrofluídico se etiqueta con el 26; el componente microfluídico se etiqueta con el 27 y los puertos de interfaz neumáticos se etiquetan con el 28.

55 La **FIG. 8** es una vista lateral del componente macrofluídico de un cartucho forense. El componente macrofluídico se etiqueta con el 26; el depósito de lavado se etiqueta con el 29; la cámara de homogeneización de eluato se etiqueta con el 30; el depósito de eluatos se etiqueta con el 31; la cámara del hisopo se etiqueta con el 32; el depósito de etanol se etiqueta con el 33; el depósito de lisis se etiqueta con el 34 y la cámara de retención se etiqueta con el 35.

60 La **FIG. 9** es una vista superior de la capa neumática de un cartucho forense. Los canales neumáticos se etiquetan con el 36; los orificios pasantes con respecto a depósitos de reactivos se etiquetan con el 37 y los puertos de interfaz neumáticos se etiquetan con el 38.

65 La **FIG. 10** es una vista superior del componente microfluídico de un cartucho forense. Los canales de fluidos se etiquetan con el 39; el filtro de partículas se etiqueta con el 40 y el filtro de purificación se etiqueta con el 41.

La FIG. 11 es un perfil STR obtenido a partir de ADN purificado a partir de un hisopo bucal.

La FIG. 12 es un perfil de STR obtenido a partir de ADN purificado a partir de una muestra de una mancha de sangre seca.

La FIG. 13 es un perfil de STR obtenido a partir de ADN purificado a partir de saliva aislada de saliva.

La FIG. 14 es un perfil STR obtenido a partir de ADN purificado a partir de una muestra de tacto.

La FIG. 15 es una vista lateral de un cartucho de hisopo de cuello uterino. La caperuza del hisopo se etiqueta con el 42; la cubierta se etiqueta con el 43; el componente macrofluido se etiqueta con el 44; el componente microfluido se etiqueta con el 45 y un puerto de interfaz neumático se etiqueta con el 46.

La FIG. 16 es una vista lateral de la porción macrofluidica de un cartucho de hisopo de cuello uterino. El depósito de lavado se etiqueta con el 47; la cámara de homogeneización de eluato se etiqueta con el 48; el depósito de eluatos se etiqueta con el 49; la cámara de hisopo se etiqueta con el 50; el depósito de etanol se etiqueta con el 51; el depósito de lisis se etiqueta con el 52; la cámara de retención se etiqueta con el 53.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una serie de aparatos, instrumentación y métodos que pueden usarse para proporcionar una purificación rápida y eficaz de ácidos nucleicos a partir de una variedad de tipos de muestras biológicas. Tal como se ilustra en los ejemplos en el presente documento, se puede purificar ácido nucleico basándose en dispositivos que comprenden características tanto macrofluidicas como microfluidicas e instrumentación adjunta. En general, el componente macrofluido del aparato de la presente invención comprende cámaras (incluyendo muestra, depósito de almacenamiento de reactivos, cámaras de reacción, de retención, de homogeneización y de residuos) con volumen agregado de 1-1.000 ml o superior y volúmenes individuales de 1 ml y superiores. Son particularmente preferentes volúmenes de agregados en el intervalo de 1-250 ml. El componente macrofluido también puede comprender opcionalmente cámaras con volúmenes de 20-1.000 μ l. El componente microfluido comprende elementos microfluidicos con volúmenes de microlitros y nanolitros. Es preferente que los elementos microfluidicos tengan volúmenes individuales en el intervalo de 0,1-1000 μ l y particularmente preferente que los elementos individuales tengan volúmenes de 0,1 a 100 μ l.

Las enseñanzas de la invención se pueden aplicar a la purificación de ácido nucleico de modo que el producto de ácido nucleico se puede retirar y analizar por separado o el ácido nucleico se puede transferir directamente a módulos analíticos en un instrumento integrado. Los tipos de análisis y enfoques a tal integración incluyen los descritos en Tan *et al.*, Integrated Nucleic Acid Analysis, PCT/US08/04462.

El aparato e instrumentación de la invención permite que los ácidos nucleicos se purifiquen a partir de muestras biológicas sin procesar. Muestras biológicas sin procesar son aquellas que un individuo recoge e inserta, a continuación en la cámara de recepción de muestras del aparato sin etapas de procesamiento intermediarias (aunque el dispositivo de recogida de muestras pueda etiquetarse y/o almacenarse antes de su procesamiento). El operario solo necesita recoger o, de otro modo, obtener la muestra, insertar la muestra en el aparato, insertar el aparato en el instrumento (no necesariamente si el aparato se ha colocado previamente en el instrumento) y presionar un botón de inicio. No se requiere ningún procesamiento, manipulación o modificación de la muestra antes de su inserción en el aparato, el operario no tiene que cortar un bastoncillo de algodón, abrir un tubo de sangre, recoger tejidos o fluido biológico, transferir una muestra a otro soporte o exponer la muestra al reactivo o una condición (por ejemplo, calor, frío, vibración). En consecuencia, el operario no necesita tener una amplia formación en ciencias biológicas ni técnicas de laboratorio.

El aparato de la invención es autónomo por que las únicas entradas al aparato son a través de la cámara de recepción de muestras y el mecanismo de transmisión. Puesto que todos los reactivos requeridos están presentes dentro del aparato en depósitos de almacenamiento de reactivos precargados, no se requiere que el operario añada reactivos de procesamiento al aparato. El hecho de que el aparato contenga todos los reactivos en su interior es un factor importante en la facilidad de la operación. De igual modo, puesto que el instrumento no contiene reactivos de procesamiento de purificación, el operario no necesita añadir reactivos al instrumento. La naturaleza autónoma del aparato minimiza los procedimientos de operación, procedimientos de mantenimiento y requisitos del operario. Tomado en conjunto, el aparato autónomo y el uso de muestras sin procesar simplifica notablemente el proceso de purificación de ácido nucleico. Otra ventaja del aparato autónomo de la invención es que este formato reduce la posibilidad de contaminación de la muestra así como la exposición del operario a la muestra, reactivos y residuos del proceso.

Además, el aparato e instrumentación de la invención están diseñados para hacerse funcionar fuera de entornos de laboratorio convencionales. Dependiendo de la aplicación, se pueden reforzar para soportar el transporte y grados extremos de temperatura, humedad y partículas aéreas. El uso de la invención por operarios no técnicos en oficinas,

en exteriores, en el campo de batalla, en aeropuertos, en fronteras y puertos, y en el punto de punto de atención permitirá una aplicación más amplia de la tecnología genética en la sociedad. El uso de muestras sin procesar en un aparato autónomo soporta adicionalmente la amplia aplicación de los métodos de la invención.

5 En la práctica, las muestras biológicas se recogen usando una infinidad de dispositivos de recogida, todos los cuales se pueden usar con el aparato de la invención. Los dispositivos de recogida estarán, en general, disponibles en el mercado pero también pueden estar específicamente diseñados y fabricados para una aplicación dada. Para muestras clínicas, hay disponible una variedad de tipos de hisopos comerciales incluidos hisopos nasales, nasofaríngeos, bucales, de fluido oral, de heces, de amígdala, vaginales, de cuello uterino y de herida. Las
10 dimensiones y materiales de los dispositivos de recogida de muestras varía y los dispositivos pueden contener asas especializadas, caperuzas, puntajes para facilitar y dirigir la rotura y matrices de recogida. Las muestras de sangre se recogen en una amplia variedad de tubos disponibles en el mercado de volúmenes variantes, algunos de los cuales contienen aditivos (incluidos anticoagulantes tales como heparina, citrato y EDTA), un aspirador para facilitar la entrada de la muestra, un retén para facilitar la inserción de la aguja y coberturas para proteger al operario de su
15 exposición a la muestra. También se recogen tejidos y fluidos corporales (por ejemplo, esputo, material purulento, aspirados) en tubos, en general, distintos de los tubos de sangre. Estos dispositivos de recogida de muestras clínicos se envían, en general, a laboratorios de hospital o clínicos comerciales sofisticados para su ensayo (aunque determinados ensayos tales como la evaluación de hisopos de garganta/amígdala para ensayos de estreptococos rápidos se pueden realizar en el punto de atención). Las muestras ambientales pueden estar presentes como filtros o cartuchos de filtro (por ejemplo, de respiraderos de aire, aerosoles o dispositivos de filtración de agua), hisopos, polvos o fluidos.

La recogida de muestras biológicas de escenas de crímenes es un proceso que reúne una cantidad de células de una variedad de superficies, conserva las células recogidas para minimizar la degradación molecular y permite la
25 liberación del material recogido para el procesamiento corriente abajo. Se puede asociar sangre, semen, células epiteliales, orina, saliva, heces, varios tejidos y hueso con la escena del crimen y requieren una recogida cuidadosa y eficaz (Lee, H. C. *et al.*, (1998) "Forensic applications of DNA typing: part 2: collection and preservation of DNA evidence." *Am J Forensic Med Pathol* 19(1): 10-8.

30 Una técnica de recogida común para pruebas forenses se realiza usando un hisopo. Se toma un único hisopo de un área o se puede usar una técnica de hisopo doble húmedo-seco. La técnica de hisopo doble puede ser la más frecuente y se puede usar una cantidad de distintos fluidos incluidos agua, tampón salino o tampones de lisis para humedecer el primer hisopo (Leemans, P. 2006. "Evaluation and methodology for the isolation and analysis of LCN-DNA before and after dactyloscopic enhancement of fingerprints." *Int Congress Ser* 1288: 583-5). Esta técnica
35 permite que las muestras secas se rehidraten, con la mayoría de material recogido en el primer hisopo y el segundo hisopo seco que recoge el resto de la muestra. Además del algodón, la matriz de recogida del hisopo puede estar comprendida de diversos materiales tales como matrices de fibra natural (algodón) o sintéticas (celulosa modificada, espuma, nailon, poliéster y rayón). Hay hisopos disponibles en el mercado de Bode (Lorton VA), Puritan (Guilford, ME), Fitzco (Spring Park, MN), Boca (Coral Springs, FL), Copan (Murrieta, CA) y Starplex (Etobicoke, ON, Canada).
40 El hisopado también puede realizarse usando materiales tipo gasa, cepillos desechables i kits de muestreo biológico disponibles en el mercado (Lauk, C. and Schaaf, J. 2007. "A new approach for the extraction of DNA from postage stamps" *Forensic Science Communications* 9(1)).

Otra técnica de recogida forense implica tomar recortes del área de interés tal como fluido biológico de ropa; sin embargo, esto destroza la integridad de la prueba. Las cintas adhesivas de recogida también se usan sobre una
45 variedad de superficies para recoger pruebas traza que puede contener ADN humano. También se usan tarjetas, tales como tarjetas de FTA (Whatman plc, Kent, UK) para recoger muestras.

Las pruebas biológicas de un individuo que está presente en persona se recogen a menudo usando hisopos bucales. Un hisopo bucal ampliamente usado comercial es el SecurSwab (The Bode Technology Group, Lorton, VA). Las muestras bucales se recogen instruyendo al sujeto u operario para colocar el hisopo en la boca en la superficie
50 de la mejilla interna y mover el hisopo arriba y abajo una o más veces.

Después de que se hayan recogido las muestras sin procesar de la invención, si no se procesan inmediatamente se dejan a veces secar para evitar el crecimiento fúngico o bacteriano. Las muestras probatorias no se sellan, en general, inmediatamente en plástico, lo que puede dar como resultado el crecimiento microbiano y provocar la degradación del ADN. Normalmente, los hisopos o recortes se colocan en recipientes transpirables fabricados con papel o cartón. El almacenamiento de la prueba recogida en entornos fríos y secos también minimiza el deterioro de la muestra (Lee, H. C. and Ladd, C. (2001) "Preservation and Collection of Biological Evidence" *Croat Med J* 42(3):
55 225-8). Para ser verdaderamente útil para la comunidad forense, el aparato, instrumentación y métodos de purificación de ácido nucleico debe ser capaz de obtener ácidos nucleicos altamente purificados a partir de dispositivos de recogidos disponibles en el mercado y ser compatibles con los protocolos de análisis y recogida forense aceptados.

65 Independientemente del tipo de muestra, la cámara de recepción de muestras del aparato y la cubierta (si está presente) están diseñadas para aceptar y encajar perfectamente con el dispositivo de recogida de muestras. En el

caso de muestras tales como ropa o cinta adhesiva (por ejemplo, los dispositivos de recogida de muestras no tienen asa o caperuza), después de su colocación en la cámara, la caperuza de encaje preciso se coloca en la cubierta para cerrar la cámara. Dependiendo de la aplicación, el dispositivo de recogida de muestras puede bloquearse (reversible o irreversiblemente) en el aparato. Además, el dispositivo y aparato puede formar un sellado (hermético al aire y al agua); en este caso, se puede colocar una salida de ventilación o membrana de ventilación para permitir el flujo de fluido en la cámara. Salvo que se especifique otra cosa, las cámaras del aparato que reciben fluido de otro lugar del aparato deben contener salidas de ventilación o membranas de ventilación para permitir que el aire escape durante la carga de la cámara.

El aparato de la invención comprende un componente macrofluídico y un componente microfluídico en comunicación entre sí. El componente macrofluídico comprende una cámara de muestras para recibir una muestra biológica desde un dispositivo de recogida de muestras y otras cámaras que pueden incluir depósitos para reactivos de purificación, cámaras de retención, cámaras de homogeneización, cámaras de medición, cámaras de reacción, cámaras de mezclado y cámaras de residuos. El componente microfluídico comprende una cámara que comprende un medio de purificación de ácido nucleico y al menos una característica microfluídica y una línea de transmisión neumática. Las cámaras macrofluídicas están en comunicación con características microfluídicas y las cámaras macrofluídicas están en comunicación entre sí a través del componente microfluídico. Los fluidos pasan desde una cámara macrofluídica a través del componente microfluídico de nuevo a otra cámara macrofluídica. Los volúmenes de las cámaras se determinan mediante el uso de los ácidos nucleicos purificados. Por ejemplo, el volumen del depósito de elución se escoge para permitir que la concentración del ácido nucleico purificado sea óptima para reacciones posteriores.

Después de los procesos de purificación en el aparato de la presente invención, la solución de ácido nucleico proporcionada puede transferirse para etapas analíticas adicionales. La solución de ácido nucleico puede transferirse automáticamente a otros módulos analíticos dentro del mismo instrumento o el aparato mismo puede transferirse a un instrumento compatible. Como alternativa, la cámara que recoge la muestra de ácido nucleico purificada puede contener un tubo de almacenamiento de ácido nucleico retirable. Las muestras procesadas de acuerdo con la presente invención pueden ser un precursor a una amplia variedad de métodos analíticos, incluidos aunque sin limitación calibración de fragmentos de ácido nucleico, repetición en tándem corto (STR), Y-STR y mini-STR, polimorfismo de nucleótido único, PCR, PCR altamente multiplexada, PCR en tiempo real, PCR de transcripción inversa, secuenciación, hibridación, micromatriz, VNTR y análisis de RFLP. De igual modo, los aparatos, métodos e instrumentos de la invención también pueden aplicarse a inmunoensayos y ensayos de espectroscopía en masa y de proteínas en general, y otros métodos analíticos bien conocidos por los expertos en la materia.

El aparato de la invención también puede tener una cubierta opcional a canales de trayectoria entre el mecanismo de transmisión del instrumento y cada una de las cámaras individuales. Además, las cubiertas también proporcionan funciones de ventilación de gases dentro de las cámaras con respecto al ambiente y de bloqueo del dispositivo de recogida de muestras después de su inserción. La cubierta comprende al menos una capa, preferentemente fabricada de plástico. Se pueden añadir capas adicionales según aumenta el número de canales neumáticos o la complejidad de la trayectoria y otros rasgos. Los rasgos de las capas pueden ser macrofluídicos o microfluídicos y los rasgos se pueden fabricar mediante mecanizado de CNC, patrones de estampación de calor, troquelado o recorte láser de láminas de plástico o moldeado por inyección de resina termoplástica. Además, la incorporación de membranas de ventilación en la capa se puede lograr mediante soldadura y unión. Cuando se requieren dos o más capas, las capas individuales se unen juntas para formar una única parte. Métodos de unión para la fabricación de la cubierta incluyen unión térmica, unión con disolvente, unión ultrasónica, unión con adhesivo y láser.

El componente microfluídico del aparato puede contener una variedad de finos rasgos de elementos microfluídicos, incluidos canales (que pueden ser independientes, conectados o conectados por red), depósitos, válvulas, cámaras de reacción, cámaras de almacenamiento de reactivos líquidos y liofilizados, cámaras de mezclado, elementos de mezclado, elementos de ventilación, orificios de acceso, bombas, elementos de medición, elementos de calentamiento, elementos magnéticos, cámaras de reacción, elementos de filtración, elementos de purificación, líneas de transmisión, líneas de accionamiento, regiones de excitación óptima y detección, ventanas ópticas. El componente microfluídico del aparato puede usar válvulas para el control de flujo para detener o permitir el flujo de fluidos dentro de los canales. Las válvulas pueden ser pasivas o, lo más preferentemente, activas, y los enfoques de válvulas para dispositivos microfluídicos se conocen bien en la técnica (revisado en Zhang, C., *et al.* (2007) "Micropumps, microvalves, and micromixers within PCR microfluidic chips: Advances and trends." *Biotechnol Adv* 25(5): 483- 514). Las estructuras de válvulas activas incluyen microválvulas mecánicas (aleación termoneumática y con memoria de forma), no mecánicas (hidrogel, sol-gel, parafina, y hielo) y externas (incorporado modular, neumático y no neumático). Las estructuras de microválvulas neumáticas y mecánicas también pueden aplicar membranas, elastoméricas o no elastoméricas. Las válvulas pasivas incluyen válvulas de gel polimerizado en línea, tapón pasivo y válvulas hidrófobas.

Los fluidos requeridos para los métodos de la invención son reactivos de purificación de ácido nucleico y gases (por ejemplo, aire, nitrógeno u oxígeno). Los reactivos y medios de purificación pueden basarse en cualquiera de los métodos bien caracterizados de la bibliografía, incluidos matrices de sílice/agentes caotrópicos (Boom, R. *et al.*, (1990), citado anteriormente), matrices de sílice/agente no quelantes, intercambio iónico y muchos otros bien

conocidos en la técnica. Muchos de tales métodos se resumen en *Current Protocols in Molecular Biology* (editado por Ausubel *et al.*, John Wiley and Sons, 2010). De igual modo, se pueden usar muchos tipos de medios de purificación en el aparato. Se escogen las membranas de unión de ácidos nucleicos de sílice, por ejemplo, que varían en tamaño, tamaño de poro, caudal, volumen de retención, compatibilidad de reactivos y capacidad de unión; las membranas adecuadas basándose en una aplicación dada. Los medios de separación de células también se seleccionan basándose en las propiedades físicas y químicas del material celular a separar. Finalmente, en algunos casos, se pueden usar filtros de retirada de partículas, preferentemente para retirar partículas que pueden inhibir, ralentizar o, de otro modo, interferir con un proceso de separación o purificación corriente abajo. En muchas realizaciones forenses, son preferentes los filtros de retirada de partículas.

El mecanismo de transmisión para permitir el transporte de fluido por todo el aparato puede ser neumático, mecánico, magnético, fluido o cualquier otro medio que permita el control preciso del movimiento del fluido. La transmisión neumática permite un flujo controlado o una presión controlada o un desplazamiento volumétrico controlado de aire (u otros gases) al aparato mediante una o más líneas de transmisión y son particularmente preferentes. Las líneas de transmisión neumáticas se pueden utilizar para mover líquidos, crear burbujas, romper hojas, actuar características mecánicas y realizar cualquier otro movimiento requerido para un método de purificación de ácido nucleico dado. La transmisión del instrumento debe establecer una interfaz con las líneas de transmisión del aparato. Para una transmisión neumática, la interfaz puede ubicarse en una o más regiones macrofluidicas o microfluidicas del aparato. La transmisión está contenida dentro del instrumento, que también puede contener un suministro de energía, un alojamiento para aceptar el aparato, características que permiten el refuerzo y la protección de la exposición ambiental, una computadora a bordo, un controlador del procesado, un monitor y otras características basadas en el análisis de ácido nucleico a realizar. El sistema de transmisión neumática puede contener los siguientes componentes: bombas, válvulas electromecánicas, reguladores de presión, depósitos de presión, entubado, colectores neumáticos y sensores de flujo y presión. El sistema de transmisión neumática permite la generación y el suministro de un flujo definido, presión o volumen a cada una de las líneas neumáticas del aparato. Un controlador del procesado puede ejecutar un script programado después de la inserción de la muestra sin procesar en el aparato. Se puede utilizar más de una clase de mecanismo de transmisión con el aparato. Sin embargo, el uso de un único mecanismo de transmisión, preferentemente neumático, reduce la complejidad de tanto el instrumento como el aparato.

Una vez en la cámara de muestras, la muestra biológica se puede someter a lisis mediante una cantidad de métodos. Se provoca el burbujeo caótico por el flujo de fluido, preferentemente aire, en una cámara del componente macrofluidico. El flujo puede ser turbulento, lo que puede contribuir a las fuerzas de cizalla que contribuirían en la lisis de células que sería adecuado para el mezclado o la homogeneización de reactivos. Otros enfoques para potenciar la lisis incluyen el accionamiento mecánico mediante vibración, accionamiento ultrasónico y calor.

En una realización de la invención, el ácido nucleico a purificar es ADN. Otras realizaciones se basan en la purificación de ARN y ácidos nucleicos totales. Se requiere que los reactivos purifiquen ADN, ARN y ácidos nucleicos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Gjerde, D.T. *et al.*, *RNA Purification & Analysis: Sample Preparation, Extraction, Chromatography* (2009 Wiley-VCH Pub.); Ausubel, F.M. *et al.* (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (2008 John Wiley Pub.). En otra realización de la invención, el aparato contiene elementos microfluidicos y macrofluidicos que permiten la separación de células. Estos elementos pueden permitir una variedad de separaciones de células que incluyen glóbulos blancos (WBC) a separar de glóbulos rojos, bacterias o virus a separar de células hospedadoras, espermatozoides a separar de células epiteliales vaginales y virus y bacterias intracelulares a separar de sus huéspedes mamíferos.

El aparato de la invención puede fabricarse de varios modos. Basándose en el tiempo y costes destinados para la fabricación y el número de aparatos a fabricar, hay disponible una variedad de métodos. El aparato puede fabricarse sin vidrio o, más preferentemente, sin polímeros termoplásticos tales como polietileno, polipropileno, policarbonato, poliestireno, polímero de olefina cíclica o copolímeros de olefina cíclica. El aparato puede fabricarse en una o más piezas, macrofluidicas y microfluidicas. Si el aparato está fabricado de piezas de plástico, los componentes pueden unirse juntos usando sujeción, unión térmica, unión ultrasónica, unión con disolvente, unión con láser o unión adhesiva (métodos de unión se revisan en Tsao y DeVoe, *Microfluid Nanofluid* (2009) 6:1-16). Un método rápido y directo de fabricación es mediante mecanizado mediante control numérico por ordenador. Otros métodos incluyen moldeado por soplado, extrusión y grabado en relieve.

Un método preferente de fabricación es mediante moldeado por inyección. La porción macrofluidica del aparato de la invención comprende un conjunto de cámaras de estructura tubular que pueden estar moldeadas por inyección para formar una única parte. Las superficies superiores de cada cámara se acoplan preferentemente de forma neumática a una cubierta para proporcionar una transmisión neumática a cada una de las cámaras individuales. Las superficies inferiores de cada cámara se acoplan preferentemente neumática y fluidamente al componente microfluidico. Las estructuras tubulares que se han moldeado por inyección como una pieza única incluyen placas de microcentrifugación con 96, 384 y 1.536 pocillos. Turner (Patente de los EE.UU. n.º 6.340.589) describe placas de microcentrifugación con 96 pocillos en una configuración 12x8 de 8,4 mm de diámetro de 16 mm de profundidad. Mientras que estas placas tienen una alta densidad de estructuras tubulares en una alta densidad de empaquetado, la profundidad de estos tubos no es mayor de 16 mm. Las tiras tubo-tubo de PCR con 8 o 12 tubos se han fabricado en línea mediante

modelo por inyección, teniendo cada tubo 8,65 mm de diámetro y 30 mm de profundidad con una capacidad para contener 0,2 ml. Estas son todas versiones acopladas del recipiente de reacción de plástico descrito por Gerken (Patente de los EE.UU. 4.713.219). Estos tubos de tiras tienen una baja densidad de empaquetado y están orientados en línea. Finalmente, el modelo por inyección de dos tubos acoplados largos lo describe Spehar (Patente de los EE.UU. 4.753.536).

Las estructuras tubulares de la porción macrofluídica tienen paredes finas. Cuando está moldeada por inyección, la porción macrofluídica es esencialmente una serie de tubos con paredes finas soportados juntos al contrario de un bloque sólido con tubos perforados. Los tubos tienen espesores de pared de 0,1-5,0 mm, preferentemente de 0,3 a 3,0 mm, más preferentemente de 0,5 a 1,5 mm, aún más preferentemente de 0,7 a 1,3 mm y, lo más preferentemente de 0,9 a 1,2 mm.

Las estructuras tubulares moldeadas por inyección de la porción macrofluídica tienen preferentemente una longitud tubular por encima de 16 mm, 18 mm, 20 mm, 25 mm, 30 mm, 40 mm, 50 mm, 60 mm, 70 mm, 80 mm, 90 mm o 100 mm. Las estructuras tubulares están orientadas en una configuración bidimensional. Las partes superiores de las estructuras tubulares deben ser planas para conseguir un acoplamiento neumático fuerte a la cubierta opcional y las partes inferiores de las estructuras tubulares deben ser planas para conseguir un acoplamiento neumático y fluido fuerte a la porción microfluídica. Se debe mantener el espaciado de las estructuras tubulares para coincidir con precisión con la huella de la porción microfluídica. Las estructuras tubulares pueden estrecharse desde la parte superior a la inferior para facilitar el establecimiento de interfaz preciso con el componente microfluídico. De igual modo, la forma de la estructura tubular puede adaptarse para un fin particular, tal como una porción inferior estrechada para facilitar el burbujeo caótico y mezclado, o una porción central o superior estrechada para mantener la posición de un dispositivo de recogida de muestras.

Las estructuras tubulares del componente macrofluídico están densamente empaquetadas, con un tubo presente por aproximadamente 200 mm² de área superficial en la parte superior del componente, más preferentemente aproximadamente 150 mm². Para otras aplicaciones, hay un tubo presente, preferentemente, por aproximadamente 100 mm² de área superficial en la parte superior del componente y lo más preferentemente, hay un tubo presente por aproximadamente 50 mm² de área superficial en la parte superior del componente. De igual modo, el área superficial ocupada por las estructuras tubulares en comparación con el área total en la parte superior del componente macrofluídico es superior al 30 %, más preferentemente superior al 40 %. Para otras aplicaciones, mayor del 50 %, para otras aplicaciones aún más preferentemente superior al 60 % y lo más preferentemente superior al 90 %.

El volumen total del aparato se basa en parte en el número y volumen de cámara y el número de muestras a procesar simultáneamente. El volumen será al menos de 2 ml y puede ser de 45 ml, 65 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml, 1500 ml o más y, preferentemente, en el intervalo de 45-1500 ml e incluso más preferente en el intervalo de 65-1500 ml.

El aparato de la invención puede aceptar y procesar una o más muestras. Para algunas realizaciones el aparato puede configurarse para aceptar 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48, 96, 192 o 384 muestras. Según aumenta el número de unidades, el enfoque de fabricación puede cambiar. Por ejemplo, una única unidad de muestra fabricada mediante moldeado por inyección se puede usar como la base para un aparato de 5 muestras. Se pueden conjuntos de aparatos de 5 muestras unir, generando aparatos de 10 muestras, de 15 muestras. Como alternativa, se puede fabricar un aparato de 15 muestra como una única unidad grande. El aparato, instrumentos y métodos de la invención pueden permitir la rápida purificación de ácidos nucleicos. Desde el tiempo en el que se inicia el proceso después de la inserción de la muestra sin procesar hasta el tiempo en que se generan los ácidos nucleicos a partir de la muestra es preferentemente a 30 minutos, más preferentemente inferior a 20 minutos, incluso más preferentemente inferior a 10 minutos y lo más preferentemente inferior a 5 minutos.

Ejemplos

Ejemplo I. Bacterias extracelulares presentes en sangre

En la sangre puede haber patógenos tales como estafilococos, estreptococos y *Yersinia enterocolitica*. En algunos casos, resulta ventajoso aislar patógenos extracelulares de los elementos celulares de sangre humana (o de otros hospedadores animales). Por ejemplo, para hacer el mejor uso de las ventajas de un dispositivo microfluídico, un volumen ideal de ADN purificado, que es el producto final del módulo de extracción/purificación de ADN, es de 25 μ l o inferior. Este volumen puede transferirse y manipularse rápidamente sobre un chip microfluídico. Sin embargo, limitando este volumen, también se pone un límite análogo en la cantidad máxima de ADN que puede haber dentro de ese volumen. En 3 ml de sangre entera, se asume un total de 15 millones de glóbulos blancos y 150 bacterias (50 por ml). El ADN total en esta muestra es de aproximadamente 90 μ g con esencialmente todo esto debido a ADN de leucocitos. Si este ADN se purificara y recuperara con un 100 % de eficacia en una solución de 25 μ l, la concentración de ADN sería de 3,6 mg/ml, casi, sin duda, inhibitorio para la PCR (F.B. Cogswell, C.E. Bantar, T.G. Hughes, Y. Gu, and M.T. Philipp (1996) "Host DNA can interfere with detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy specimens by PCR" J Clin Microbiology 34:980-982) y sería demasiado viscoso para la manipulación microfluídica.

Por el contrario, la pequeña cantidad de ADN bacteriano—solo 250 genomas de aproximadamente 5 Mpb/genoma— presente en 25 µl sería aproximadamente de 1 pg. Si solo se utilizase una décima parte del ADN total para la reacción microfluidica, el límite de detección disminuiría por definición diez veces. Según aumenta el volumen de sangre, el número de leucocitos por volumen de unidad de sangre aumenta, el volumen de solución microfluidica disminuye y el número de organismos por muestra disminuye, este problema se vuelve incluso más grave. La conclusión a partir de este análisis es que, en determinadas aplicaciones (particularmente aquellas en las que la carga bacteriana es baja de forma temprana en una infección), la mayor parte del ADN de leucocitos debe retirarse antes de alcanzar el volumen microfluidico final. Esto permitiría que la mayor parte o todo el ADN de patógenos se analice seguido de purificación. De igual modo, el ADN ambiental de fondo, tal como el que se acumula en los filtros de respiradores de aire, puede interferir con la sensibilidad y especificidad de la identificación de patógenos.

La retirada de leucocitos en 3 ml de sangre entera humana reciente se consiguió apilando 13 capas de medio de unión con tamaño de poro nominal de 8 µm (Leukosorb B media, Pall Corporation, Port Washington, Nueva York) y se filtró usando una presión al vacío inicial de 1,72 kPa (0,172,4 kPa (25 psi)) y, a continuación, se aumentó a 172,4 kPa (25 psi) para la recogida final del filtrado. Los tamaños de poro útiles de medio de unión pueden variar de menos de 1 micrómetro a más de 100 micrómetros, dependiendo del tipo de células, viriones, bacterias, hongos y partículas a separar. El volumen recuperado fue aproximadamente de 1,5 ml con filtración completada en un 1 minuto. El recuento de WBC de filtrados indicó que el filtro retuvo más del 99 % de los leucocitos.

A muestras de sangre entera humana reciente de 3 ml se les añadieron 100 µl de *B. subtilis* (ATCC® 7003™), cada una conteniendo 100 µl de concentraciones variables de *B. subtilis* por muestra. En este experimento, se usó *B. subtilis* como un modelo de organismos patógenos y agentes de amenaza biológica (por ejemplo, *B. anthracis*). Estas muestras de bacterias en sangre se pasaron a través del medio apilado usando el aparato de la **Figura 1**. La aplicación de muestras fue seguida por un lavado con 3 ml de TSB (medio de caldo de soya triptico), permitiendo la recuperación de bacterias que no habían pasado inicialmente a través de la matriz de unión. El flujo a través recogido de aproximadamente 4,5 ml se pasó a través de una única capa de 0,2 µm de una membrana de control de ataque químico de policarbonato (SPI-Pore™ Track-Etch Membrane, Structure Probe, Inc., West Chester, PA) para concentrar las bacterias a través de la captura sobre la membrana. Este método de concentración redujo los volúmenes de los reactivos, los tamaños de las cámaras de depósito de cartucho de purificación y el tiempo de procesamiento. Los organismos capturados se recogieron desde la superficie de la membrana resuspendiéndolos en 100 µl de PBS (solución salina tamponada con fosfato).

En esta realización, la lisis de las células bacterianas se basó en el método de extracción de sal caotrópica para ADN y ARN. En particular, la solución preferida de tampón de lisis contenía clorhidrato de guanidinio 4 M, Tris-HCl 80 mM (pH 7,5), 20 mM EDTA y Triton X-100 al 5 % (otros tampones de lisis útiles se describen en Ausubel *et al.*, citado anteriormente). A 100 µl de organismos resuspendidos, se transfirieron 450 µl de tampón de lisis con 1 mg/ml de concentración final de proteinasa K y se mezcló meticulosamente en el cartucho de purificación mediante el método de burbujeo caótico definido en el script neumático. A esto, se añadieron 550 µl de etanol absoluto (graduación 100 %) y de nuevo se mezcló mediante burbujeo. El lisado se pasó microfluidicamente a través de una membrana a base de sílice para la unión de ADN en la porción microfluidica del aparato de purificación. Después de haber filtrado el lisado completo, la membrana se lavó 1 vez con 2 ml de solución de lavado, preparada mezclando 1 unidad de volumen de solución de NaCl 200 mM, 0,5 unidades de volumen de etanol de graduación 100 % y 0,5 unidades de volumen de >99 % de isopropanol. Después de la etapa de lavado, a continuación, la membrana se dejó secar durante 1 minuto mediante exposición a aire desde el sistema neumático. Finalmente, el ADN se eluyó en 20 µl de tampón de TE, pH 8,0. Las presiones para la filtración del lisado, el lavado y secado de la membrana y de elución fueron aproximadamente de 34,47 kPa (5 psi). La amplificación por PCR rápida (Giese, H. *et al.*, (2009), "Fast multiplexed polymerase chain reaction for conventional and microfluidic short tandem repeat analysis" *J Forensic Sci* 54(6): 1287-97) usando cebadores de *glnA* (*glutamina sintetasa*) en un biochip microfluidico y separados y detectados microfluidicamente, da como resultado la característica de fragmentos de 343 pb esperada del gen de *glnA* de *B. subtilis* con intensidad de señal proporcional a las copias de entrada en las muestras de sangre. Se realizó PCR usando biochips y un termociclador rápido como se describe en "Methods for Rapid Multiplexed Amplification of Target Nucleotides," PCT/US08/04487, que se incorpora por lo tanto por referencia. La separación y detección se realizaron en el Genebench tal como se describe en "Plastic Microfluidic Separation and Detection Platforms" PCT/US08/04405 y en "Integrated Nucleic Acid Analysis," PCT/US08/04462. La **Figura 2** muestra un electroferograma que muestra aproximadamente 2 equivalentes genómicos de *B. subtilis*; esto representa la amplificación de solo ~6 % del material total recuperado de una muestra de sangre de 33 ufc/ml y usando un 40 % del producto de PCR para el análisis electroforético. La recuperación bacteriana es casi cuantitativa.

Un método alternativo para la cuantificación fue usar una cámara de Petroff-Hausser. El flujo a través recogido se aplicó sobre placas de agar TSB para determinar el efecto de la filtración a través de medio apilado sobre la recuperación de bacterias. Las bacterias recuperadas se normalizaron usando la eficacia de aplicación en placas basándose en las colonias recuperadas en muestras de control no filtradas. A concentraciones clínicas relevantes de bacterias en sangre, se recuperó aproximadamente el 100 % de las bacterias

Bacterias esperadas en 3 ml de sangre	n.º de colonias recuperadas aplicando muestras filtradas	% de recuperación	% de recuperación normalizada
~1000	860 ± 239	85 ± 18	104 ± 10
~100	88 ± 16	88 ± 11	97 ± 17
~10	9 ± 2	96 ± 19	103 ± 26

La **Figura 3** muestra un cartucho de purificación integrado para muestras de sangre. Las **Figuras 4, 5 y 6** muestran el componente macrofluídico, la capa neumática del componente microfluídico, la capa microfluídica del componente microfluídico, respectivamente, del cartucho de purificación integrado. La porción macrofluídica [3] del aparato está compuesta de 11 cámaras, [6] a [16], que contienen soluciones de reactivos precargadas o sirven como cámaras de retención/reacción durante el proceso de purificación de ADN. Se usa una cámara para aceptar el tubo de recogida de sangre; se precargan seis cámaras con 3 ml de tampón de lavado, 100 µl de solución de resuspensión, 450 µl de solución de lisis, 550 µl de etanol absoluto, 2 ml de tampón de lavado y 20 µl de tampón de elución TE (pH 8).

El aparato acepta un tubo de vacutainer de 3 cc estándar (para experimentos de separación, se debe recoger sangre en tubos que contienen anticoagulantes adecuados. El tubo de recogida de sangre [1] se inserta en el cartucho con el extremo de detención de goma hacia abajo. El proceso de purificación se inicia cuando el usuario presiona un botón de inicio. El aparato junto con el instrumento ejecutan un script automático y generan ADN purificado. Dentro del instrumento, el tubo de recogida de sangre se empuja en dos pasadores huecos ubicados en la base de la cavidad del tubo de recogida de sangre [16]. Los pasadores huecos perforan a través del retén de goma para acoplar fluidica y neumáticamente el tubo de recogida de sangre al aparato. El tubo de recogida de sangre [16] se presuriza neumáticamente a 34,47 kPa (5 psi) para transmitir la sangre desde el tubo de recogida de sangre [16] a través del filtro de leukosorb [22] y la membrana de control de ataque químico [21] a la cámara de residuos [8]. El filtrado que pasa a través del filtro de leukosorb contiene el material biológico (por ejemplo, patógenos bacterianos, víricos o fúngicos) para el análisis, un filtrado reducido en leucocitos. A continuación, este filtrado se transmite a través de la membrana de control de ataque químico y la membrana retiene los patógenos de interés (el tamaño de poro de la membrana de captura de patógenos se selecciona basándose en las dimensiones de los patógenos a analizar). La solución de lavado desde el depósito de lavado 2 [15] se conduce neumáticamente a través del filtro de leukosorb [22] y de la membrana de control de ataque químico [21] a la cámara de residuos [8]. La solución de resuspensión desde el depósito de solución de resuspensión [4-10] se aplica a la superficie de la membrana de control de ataque químico [6-21]. Esta solución resuspenderá los patógenos retenidos en la membrana de control de ataque químico, generando una suspensión de patógenos concentrada (que puede incluir también leucocitos residuales). Esta suspensión se transmite neumáticamente a la cámara de lisis/residuos [11]. El reactivo de lisis se transmite neumáticamente a la cámara de lisis [11]. Para efectuar el burbujeo caótico del lisado dentro de la cámara de lisis/residuos [11] se transmite aire neumáticamente a la cámara de lisis/residuos [11]. Este burbujeo crea un flujo del lisado para que medie la lisis de células. Se transmite etanol desde el depósito de etanol [12] a la cámara de lisis/residuos [11]. La aplicación continuada de transmisión neumática a través del depósito de etanol [12] después de que se haya dispensado todo el etanol fuerza que el aire a través del lisado y la solución de etanol efectúa el mezclado mediante burbujeo caótico. Toda la mezcla de lisado y etanol se transmite neumáticamente a la cámara de retención [11]. Desde la cámara de retención [11] la mezcla de lisado y etanol se transmite neumáticamente a través de la membrana de purificación [23] y a la cámara de lisis/residuos [11]. La solución de lavado desde el depósito de lavado 1 [6] se transmite neumáticamente a través de la membrana de purificación [23] y a la cámara de lisis/residuos [11]. Este lavado retira material no unido y solución de lisis residual. La aplicación continuada de transmisión neumática a través de la cámara de lavado [6] después de que toda la solución de lavado se haya dispensado, forzará el aire a través del filtro de purificación y secará el filtro. La solución de elución se transmite neumáticamente desde el depósito de eluatos [9] a través de la membrana de purificación [6-23] a la cámara de homogeneización de eluatos [7]. La aplicación continuada de transmisión neumática a través del depósito de eluatos [9] después de que se haya dispensado toda la elución, forzará el aire a través de la cámara de homogeneización de eluatos [7] para que efectúe el mezclado mediante burbujeo caótico. La solución de ADN purificado homogeneizado en la cámara de homogeneización de eluatos [7] está preparada para su posterior análisis.

Ejemplo II. Bacterias intracelulares presentes en sangre.

Determinadas bacterias, tales como *Francisella tularensis* y *Chlamydia trachomatis*, pasan una parte significativa de sus ciclos de vida dentro de células de mamífero. Algunas son organismos intracelulares obligados y otras son, opcionalmente, intracelulares. Un resumen exhaustivo de patógenos humanos conocidos se proporciona en Gorbach, S.L. (*et al. Eds.*) *Infectious Disease* (3ª Ed), (2004 Lippincott Williams & Wilkins Pub). El proceso de purificación de ADN para tales bacterias intracelulares en sangre es similar al de bacterias extracelulares con una excepción principal. Después de la aplicación de sangre entera y a través del filtro de separación de células, los leucocitos atrapados por el filtro contienen el ADN de interés. El filtro se lava, se resuspende en 100 µl y se somete a purificación a base de guanidinio, tal como se describe en el Ejemplo I con reducción correspondiente de su volumen de reactivos.

Si se desea, el aparato puede diseñarse para que inicialmente someta a lisis los leucocitos (osmóticamente, por ejemplo), aprovechando la relativa facilidad de la lisis de las células de mamífero en comparación con la de las

bacterias. En este escenario, las bacterias intracelulares intactas se liberan y el extracto celular se pasa a través de un filtro de captura bacteriano y se lava. A continuación, se purifica ADN bacteriano tal como se describe en el **Ejemplo I**. De forma similar, se puede someter a lisis sangre entera en ausencia de separación de células, permitiendo que el ADN bacteriano o vírico extracelular o intracelular se purifique.

5 **Ejemplo III. Purificación de ADN a partir de muestra(s) biológica(s) recogida(s) mediante un hisopo de recogida forense validado**

10 Las muestras forenses se pueden dividir generalmente en dos tipos; muestras de trabajo de casos son aquellas que se recogen en la escena de un crimen o relacionadas con una investigación y muestras de referencia que se recogen directamente de un individuo. Se dispone de varios métodos de recogida basándose en el tipo específico de muestra a analizar y están diseñados para obtener y proteger pruebas biológicas de la escena del crimen. El hisopado es un método de recogida de muestras forenses bien establecido, y los hisopos disponibles en el comercio tienen matrices de recogida que consisten en diversos materiales, tales como algodón, celulosa modificada, espuma, 15 nailon, poliéster y rayón.

La **Figura 7** muestra un cartucho de purificación para muestras de hisopos forenses. Las Figuras **8-10** muestran el componente macrofluídico, la capa neumática del componente microfluídico y la capa microfluídica del componente microfluídico del cartucho de purificación. La porción microfluídica [27] del cartucho de purificación contiene válvulas para controlar el flujo de las soluciones hacia y desde la porción macrofluídica [26], un filtro de partículas [40] y un filtro de purificación [41].

Para purificar ADN a partir de una muestra de hisopo forense, se insertó un hisopo BodeSecur manualmente en la cámara de recogida de muestras del cartucho de purificación y se bloqueó en su sitio para el procesamiento de 25 muestras. La cámara que acepta el hisopo se diseñó para permitir que la caperuza del hisopo se ajuste a la perfección. El cartucho se diseñó para permitir que el operario inserte el hisopo en la cámara e inicie la purificación de ADN sin una manipulación adicional por parte del usuario.

La porción macrofluídica del cartucho de purificación estaba compuesta de 7 cámaras que contenían soluciones de reactivos precargadas o servían como cámaras de retención/reacción durante el proceso de purificación de ADN. Se usó una cámara para contener el hisopo de algodón con la muestra de ADN; se precargaron cuatro cámaras con 30 550 µl de solución de lisis, 550 µl de etanol absoluto, 2 ml de tampón de lavado y 100 µl de tampón de elución TE (pH 8). La porción microfluídica del cartucho de purificación contenía válvulas para controlar el flujo de las soluciones hacia y desde la porción macrofluídica, un filtro de partículas y un filtro de purificación.

El hisopo de recogida de muestras (Bode SecurSwab) [24] comprende una caperuza, un cabezal del hisopo de algodón y un bastoncillo que conecta los dos; la longitud total de este dispositivo de recogida de muestras es de aproximadamente 9,1 cm. El cabezal del hisopo tiene una dimensión nominal de 5 mm a 5,1 mm de diámetro y tiene aproximadamente 12 mm de longitud. Cuando se inserta el SecurSwab en el aparato, el cabezal del hisopo entra en una sección tubular de la cámara de muestras y se posiciona de entre 0 mm a 1,5 mm de la parte inferior de la 40 cámara de muestras. La sección tubular es de 5,85 mm de diámetro de 24 mm de longitud. Un puerto de entrada de aire que tiene 1 mm de diámetro está ubicado en la parte inferior de la sección tubular. El diámetro del puerto de entrada (de entre 0,1 mm y 2,5 mm y preferentemente de entre 0,7 mm y 1,3 mm) y las dimensiones de la sección tubular de la cámara de muestras, pueden modificarse para optimizar un flujo de fluido y burbujeo caótico.

El proceso de purificación se inició presionando simplemente un botón que inicia el script automático que controla la transmisión neumática. La transmisión neumática aplica las presiones y los vacíos requeridos durante los tiempos requeridos para permitir que se realicen todas las etapas del proceso automáticamente, sin la intervención por parte del usuario. La solución de lisis se transmitió neumáticamente desde el depósito de reactivos de lisis [34] en la 50 cámara de hisopos [32] y se puso en contacto con el hisopo. La aplicación continuada de transmisión neumática a través del depósito de lisis [34] después de que se haya dispensado todo el reactivo de lisis, forzó el aire a través de la cámara de hisopos efectuando "burbujeo caótico". Esto se llevó a cabo, mediante la aplicación de una presión de 39,3 kPa (5,7 psi) durante 60 segundos. Este burbujeo creó un flujo turbulento alrededor del cabezal del hisopo, la mediación de lisis de células y la retirada del material celular del cabezal del hisopo. Se transmitió etanol desde el depósito de etanol [33] a la cámara de hisopos [32]. La aplicación continuada de transmisión neumática a través del depósito de etanol [32] después de que se hubiera dispensado todo el etanol, forzó que el aire a través del lisado y la solución de etanol efectuara el mezclado mediante burbujeo caótico durante 30 segundos. Toda la mezcla de lisado y etanol se transmitió neumáticamente a través de un filtro de partículas [40] en la cámara de retención [35]. Desde la cámara de retención [35] la mezcla de lisado y etanol se transmitió neumáticamente a través de la 60 membrana de purificación [41] y a la cámara de hisopos [32]. La cámara de hisopo sirvió ahora como una cámara de residuos para reactivos de proceso gastados. La solución de lavado desde el depósito de lavado [29] se transmitió neumáticamente a través de la membrana de purificación [41] y a la cámara de hisopos [32]. El lavado de la membrana de purificación con tampón de lavado se realizó para retirar material no unido (incluida proteína) y solución de lisis residual. La aplicación continuada de transmisión neumática a través del depósito de lavado [29] después de que toda la solución de lavado se hubiera dispensado, forzó el aire a través del filtro de purificación [41] 65 y secó el filtro durante 105 segundos. La solución de elución se transmitió neumáticamente desde el depósito de

eluatos [31] a través de la membrana de purificación [41] a la cámara de homogeneización de eluatos [30]. La aplicación continuada de transmisión neumática a través del depósito de eluatos [31] después de que se hubiera dispensado toda la elución, forzó el aire a través de la cámara de homogeneización de eluatos [30] para que efectuase el mezclado mediante burbujeo caótico. La solución de ADN purificado homogeneizado en la cámara de homogeneización de eluatos [30] estaba preparada para su posterior análisis.

Para evaluar el ADN generado por el cartucho de purificación, se realizaron reacciones de PCR multiplexadas tal como se describe en Geise et al. 2009 (citado anteriormente) usando cebadores de AmpFISTR® **Identifiler**® (Life Technologies) en un volumen de 7 µl en aproximadamente 17 minutos. Se separaron y detectaron productos amplificados usando Genebench de NetBio. A 2,7 µl de cada producto amplificado se añadieron 10,2 µl de formamida Hi-Di y 0,1 µl de Genescan estándar de línea interna de 500 LIZ (ambos Life Technologies). Después de la desnaturalización a 95 °C durante 3 min y un enfriamiento instantáneo sobre hielo, se cargaron las muestras en los pocillos del biochip de separación y se movieron electroforéticamente en los canales de separación aplicando un campo eléctrico de 350 V/cm durante 90 segundos. Esto se siguió por la aplicación de un campo eléctrico de 150 V/cm junto con el canal de separación para separar fragmentos de ADN. Todas las separaciones se llevaron a cabo a 50 °C. Se analizaron los datos sin procesar con el Software de Identificación Humana HID STR GeneMarker®, Versión 1.51 (SoftGenetics LLC, State College, PA).

Se generaron perfiles alélicos completos a partir de diversas muestras de hisopos (hisopos bucales, sangre entera seca y húmeda en hisopos, saliva y contacto celular). Las muestras de células bucales (**Figura 11**) se obtienen raspando ligeramente los hisopos en la mejilla interna de un sujeto humano. Se prepara muestra de sangre seca hisopando manchas de sangre secas (**Figura 12**). Se recogen muestras de saliva (**Figura 13**) hisopando saliva presente en una plaqueta cerámica. Las muestras de contacto (Figura 14) se preparan hisopando una plaqueta de cerámica que se manipuló por un único donante. El cabezal del hisopo se prehumedeció con agua DI estéril.

25 **Ejemplo IV. ADN bacteriano a partir de hisopo vaginal**

Se inserta un hisopo vaginal en la cámara de muestras de cartucho de purificación mediante un puerto de sujeción para mantener el hisopo en su lugar. La purificación es esencialmente la misma que la descrita para hisopos forenses en el **Ejemplo III**; la principal diferencia es que la cámara de muestras está modificada para aceptar y asegurar el hisopo vaginal. La geometría de la cámara de hisopos puede modificarse para acomodar esencialmente cualquier tipo de hisopo, independientemente de las dimensiones del asa del hisopo o región de recogida del hisopo. La cámara de muestras está diseñada de modo que el hisopo puede insertarse directamente en el cartucho de purificación para su procesamiento. La caperuza del hisopo puede modificarse para bloquear irreversiblemente para minimizar la posibilidad de la contaminación muestra a muestra y el montaje del hisopo puede modificarse para permitir la identificación de muestras (por ejemplo, mediante código de barras o chip RFID).

La **Figura 15** muestra un cartucho de purificación para muestras de hisopo vaginales o de cuello uterino y la **Figura 16** muestra la porción macrofluídica de ese cartucho. Las capas microfluídicas son esencialmente las mismas que las de las **Figuras 9 y 10**.

La porción macrofluídica del cartucho de purificación está compuesta de 7 cámaras que contienen soluciones de reactivos precargadas o sirven como cámaras de retención/reacción durante el proceso de purificación de ADN. Se usa una cámara para contener el hisopo de algodón con la muestra de ADN; se precargan cuatro cámaras con 550 µl de solución de lisis, 550 µl de etanol absoluto, 2 ml de tampón de lavado y 100 µl de tampón de elución TE (pH 8).

El proceso de purificación se inicia presionando simplemente un botón que inicia el script automático que controla la transmisión neumática. La transmisión neumática aplica las presiones y los vacíos requeridos durante los tiempos requeridos para permitir que se realicen todas las etapas del proceso automáticamente, sin la intervención por parte del usuario. La solución de lisis se transmite neumáticamente desde el depósito de reactivos de lisis [52] en la cámara de hisopos [50] y se pone en contacto con el hisopo. La aplicación continuada de la transmisión neumática a través del depósito de lisis [52] después de que se haya dispensado todo el reactivo de lisis, forzará el aire a través de la cámara de hisopos efectuando "burbujeo caótico" a 34,47 kPa (5 psi) durante 60 segundos. Este burbujeo crea un flujo turbulento alrededor del cabezal del hisopo, la mediación de lisis de células y la retirada del material celular del cabezal del hisopo. Se transmite etanol desde el depósito de etanol [51] a la cámara de hisopos [50]. La aplicación continuada de transmisión neumática a través del depósito de etanol [51] después de que se haya dispensado todo el etanol, forzará que el aire a través del lisado y la solución de etanol efectúe el mezclado mediante burbujeo caótico durante 30 segundos. Toda la mezcla de lisado y etanol se transmite neumáticamente a través de un filtro de partículas [40] en la cámara de retención [35]. Desde la cámara de retención [35] la mezcla de lisado y etanol se transmite neumáticamente a través de la membrana de purificación y a la cámara de hisopos [50]. La cámara de hisopo sirve ahora como una cámara de residuos para reactivos de proceso gastados. La solución de lavado desde el depósito de lavado [47] se transmite neumáticamente a través de la membrana de purificación y a la cámara de hisopos [50]. El lavado de la membrana de purificación con tampón de lavado se realiza para retirar material no unido (incluida proteína) y solución de lisis residual. La aplicación continuada de transmisión neumática a través del depósito de lavado [47] después de que toda la solución de lavado se haya dispensado, forzará el aire a través del filtro de purificación y secará el filtro durante 105 segundos. La solución de elución se transmite

5 neumáticamente desde el depósito de eluatos [49] a través de la membrana de purificación a la cámara de homogeneización de eluatos [48]. La aplicación continuada de transmisión neumática a través del depósito de eluatos [49] después de que se haya dispensado toda la elución, forzará el aire a través de la cámara de homogeneización de eluatos [48] para que efectúa el mezclado mediante burbujeo caótico. La solución de ADN purificado homogeneizado en la cámara de homogeneización de eluatos [48] está preparada para su posterior análisis.

10 La concentración de ácido nucleico total se cuantifica por absorbancia a 260 nm. La rápida amplificación por PCR en biochip utilizando conjuntos de cebadores marcados con fluorescencia específicos de enfermedades transmitidas sexualmente (incluidas *Chlamydia trachomatis*, virus de inmunodeficiencia humana, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*) y la como separación electroforética y detección en el Genebench, generan bandas características del patógeno que provoca la infección bien sintomática o asintomática.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato autónomo para aislar ácido nucleico a partir de al menos una muestra sin procesar, aparato para usarse con un instrumento, consistiendo dicho aparato en un componente macrofluídico, un componente microfluídico, al menos una línea de transmisión neumática y dos entradas, una primera entrada para recibir la al menos una muestra sin procesar desde un dispositivo de recogida y una segunda entrada para establecer una interfaz en el mecanismo de transmisión en dicho instrumento:
- (i) comprendiendo dicho componente macrofluídico:
- al menos una cámara para recibir dicha al menos una muestra sin procesar desde un dispositivo de recogida;
 - al menos dos depósitos de almacenamiento de reactivos de lisis precargados formados dentro del componente macrofluídico;
 - un depósito de almacenamiento de reactivos lavados precargado dentro del componente macrofluídico; y
 - un depósito de almacenamiento de reactivos de elución precargado dentro del componente macrofluídico;
- (ii) un componente microfluídico en comunicación con dicho componente macrofluídico a través de al menos un elemento microfluídico, comprendiendo adicionalmente dicho componente microfluídico al menos una matriz de purificación de ácido nucleico;
- y
- (iii) al menos una línea de transmisión neumática para la conexión a un mecanismo de transmisión en dicho instrumento para transmitir dicho primer y segundo reactivos de lisis, dicho reactivo de lavado y dicho reactivo de elución secuencialmente a través de dicho elemento microfluídico y dicha matriz de purificación de ácido nucleico,
- en el que las únicas entradas a dicho aparato son mediante dicha cámara y dicha al menos una línea de transmisión y, adicionalmente, en donde todos los reactivos usados para aislar ácido nucleico de la al menos una muestra sin procesar están contenidos dentro del aparato en cámaras precargadas.
2. El aparato de la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo y/o cámara de recogida se etiqueta, comprendiendo dicha etiqueta un código de barras o RFID.
3. El aparato de la reivindicación 1, en el que la muestra sin procesar comprende: i) un hisopo nasal, un hisopo nasofaríngeo, un hisopo bucal, un hisopo de fluido oral, un hisopo de heces, un hisopo de amígdala, un hisopo vaginal, un hisopo de cuello uterino, un hisopo sanguíneo, un hisopo de herida o tubo que contiene sangre, esputo, material purulento o aspirados; (ii) un hisopo forense, recorte, cinta adhesiva de recogida, o tarjeta; o (iii) un filtro de aire ambiental, filtro de agua o hisopo.
4. El aparato de la reivindicación 1, en el que la matriz de purificación de ácido nucleico comprende membranas de sílice, perlas de sílice, perlas magnéticas de sílice, resinas de intercambio iónico o perlas de intercambio iónico.
5. El aparato de la reivindicación 1, en el que dicho componente microfluídico comprende canales, depósitos, válvulas activas, válvulas pasivas, válvulas neumáticamente activadas, cámaras de reacción, cámaras de mezclado, elementos de ventilación, orificios de acceso, bombas, elementos de medición, elementos de mezclado, elementos de calentamiento, elementos magnéticos, cámaras de reacción, elementos de filtración, elementos de purificación, líneas de transmisión o líneas de accionamiento.
6. El aparato de la reivindicación 1, en el que un primer depósito de almacenamiento de reactivos de lisis de los al menos dos depósitos de almacenamiento de reactivos de lisis se precarga con guanidinio y un segundo depósito de almacenamiento de reactivos de lisis de los al menos dos depósitos de almacenamiento de reactivos de lisis se precarga con alcohol etílico y dicho depósito de almacenamiento de reactivos de lavado precargado se precarga con un reactivo de lavado a base de etanol.
7. El aparato de la reivindicación 1, en el que un volumen de fluido de agregado de la cámara, los al menos dos depósitos de almacenamiento de reactivos de lisis precargados, el depósito de almacenamiento de reactivos de lavado precargado, el depósito de almacenamiento de reactivos de elución precargado, las cámaras de reacción, de retención, de homogeneización y de residuos es de entre 1 y 1.000 ml.
8. El aparato de la reivindicación 1 adaptado para recibir una muestra de un dispositivo de recogida o porción del mismo, comprendiendo dicho dispositivo de recogida de muestras al menos un ácido nucleico sin procesar, en el que los al menos dos depósitos de almacenamiento de reactivos de lisis están cada uno cargado con un reactivo de lisis; el depósito de almacenamiento de reactivos de lavado está cargado con un reactivo de lavado; el depósito de

almacenamiento de reactivos de elución está cargado con un reactivo de elución; y en el que dicho mecanismo de transmisión transmite dicho primer y segundo reactivos de lisis, dicho reactivo de lavado y dicho reactivo de elución secuencialmente a través de dicho elemento microfluídico y dicha matriz de purificación de ácido nucleico para recuperar ácido nucleico aislado.

- 5
9. Un método de purificación de ácidos nucleicos a partir de al menos una muestra sin procesar que comprende, proporcionar el aparato de la reivindicación 1; proporcionar la al menos una muestra sin procesar que comprende ácidos nucleicos a la al menos una cámara de muestras de dicho aparato;
- 10 transmitir al menos una porción de un primer reactivo de lisis desde una primera de dichas al menos dos cámaras de almacenamiento de reactivos de lisis a dicha al menos una cámara de muestra para proporcionar una primera mezcla;
- 15 burbujear un gas a través de la primera mezcla para proporcionar una primera mezcla agitada; transmitir al menos una porción de un segundo reactivo de lisis desde una segunda de dichas al menos dos cámaras de almacenamiento de reactivos de lisis a dicha al menos una cámara de muestras para proporcionar una segunda mezcla;
- 20 y transmitir al menos una porción de la primera mezcla agitada a través de dicha al menos una matriz de purificación de ácido nucleico para proporcionar un filtrado y un retenido, en el que el retenido comprende al menos una porción de los ácidos nucleicos;
- 25 transmitir al menos una porción de dicho reactivo de lavado desde dicha cámara de almacenamiento de reactivos de lavados a través de dicha al menos una matriz de purificación para proporcionar un retenido lavado y un residuo;
- transmitir opcionalmente el retenido lavado;
- 30 transmitir al menos una porción de dicho reactivo de elución desde dicha cámara de almacenamiento de reactivos de elución a través de dicha al menos una matriz de purificación para proporcionar una solución de ácido nucleico eluida;
- y burbujear un gas a través de la solución de ácido nucleico eluida para proporcionar una solución de ácido nucleico eluida homogeneizada.

35

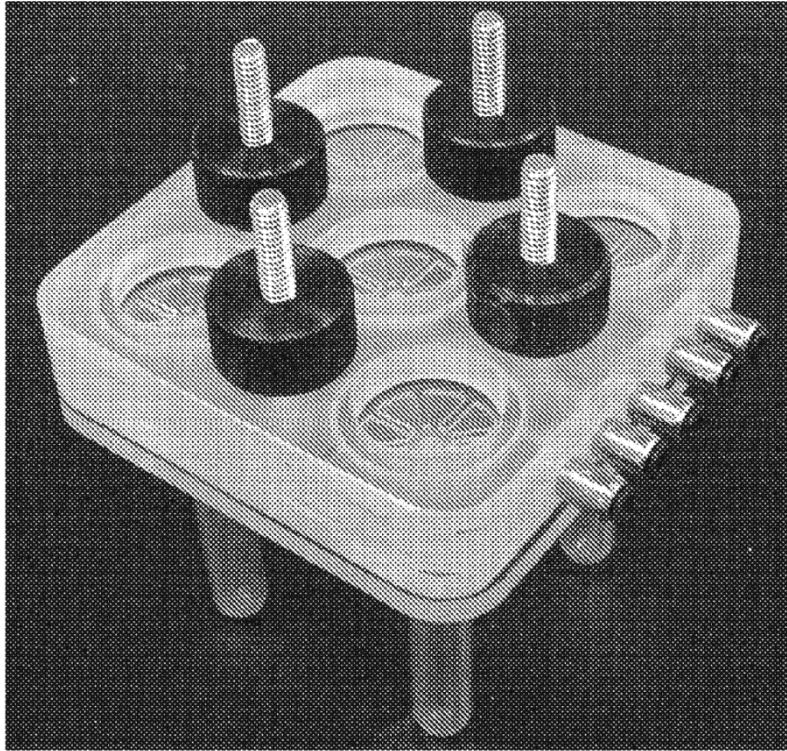


FIGURA 1

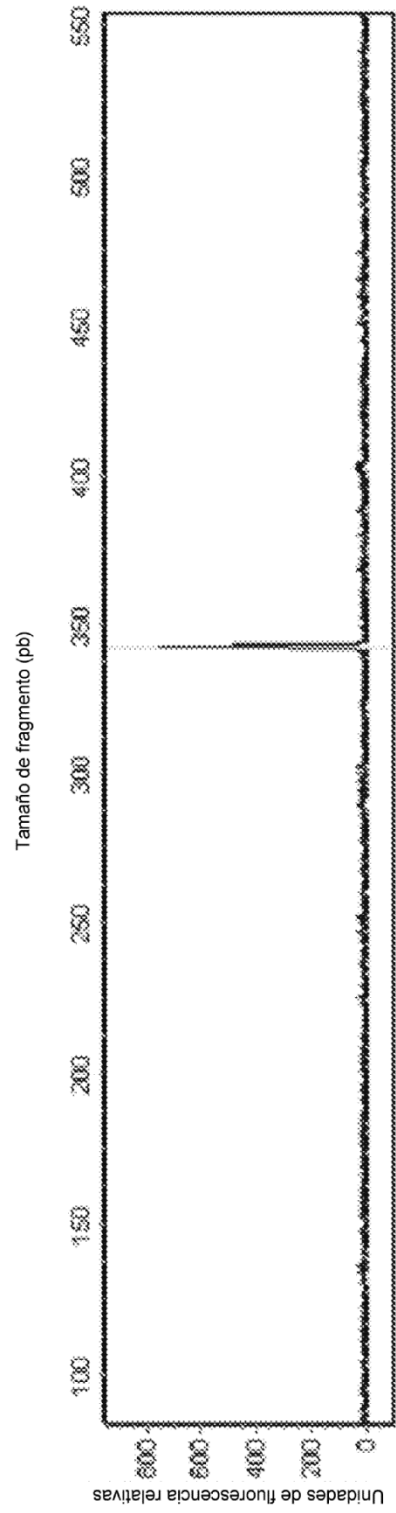


FIGURA 2

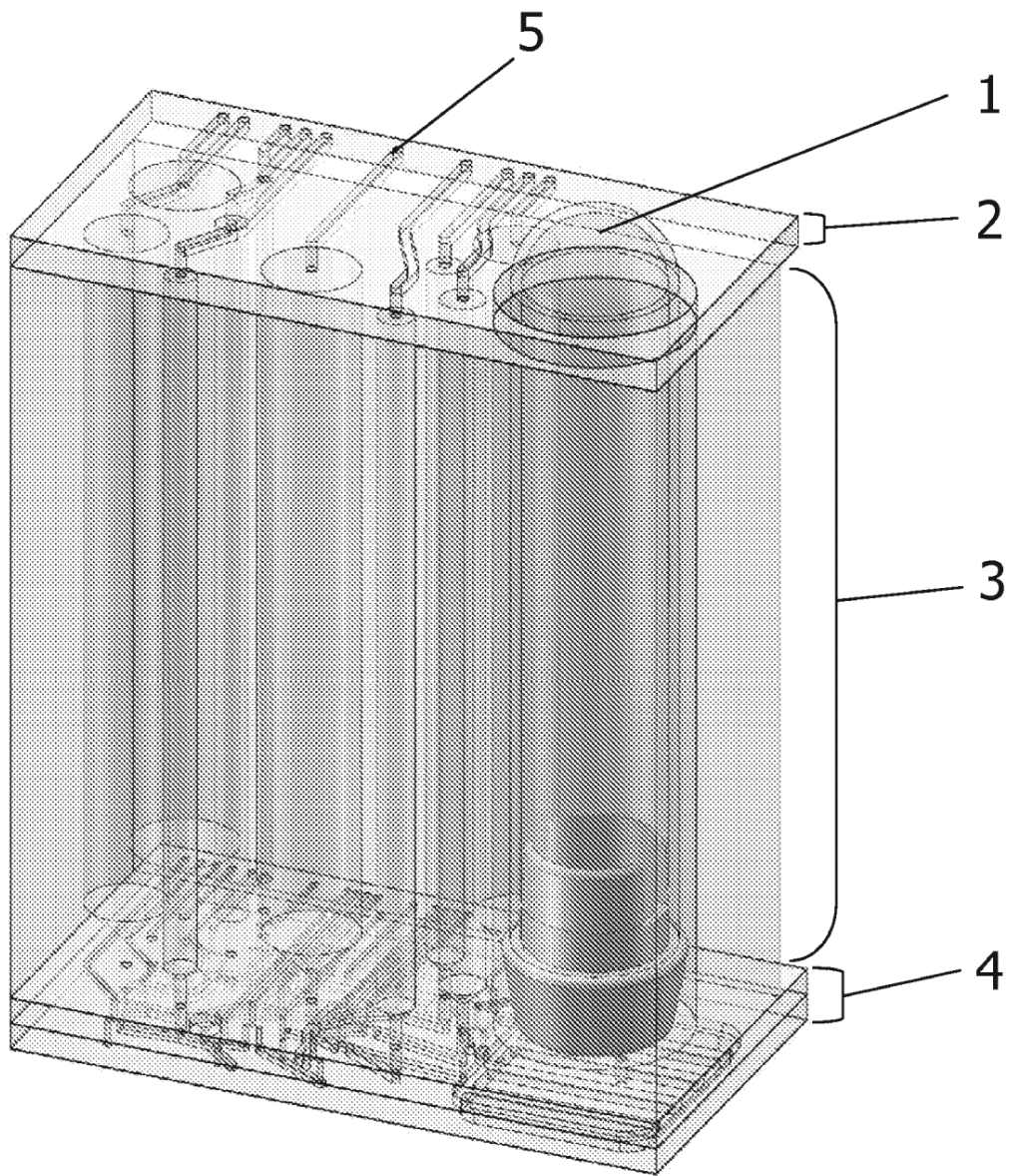


FIGURA 3

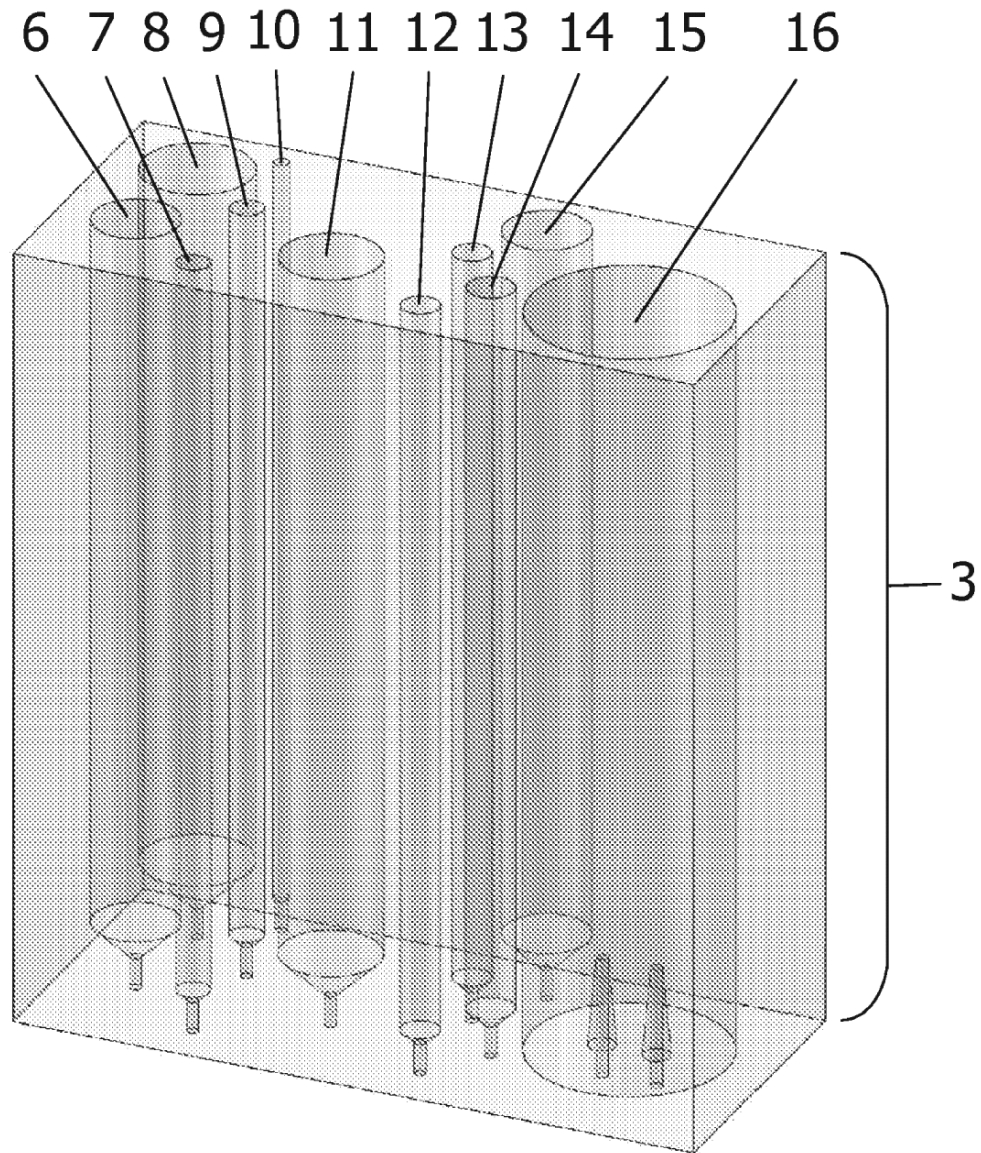


FIGURA 4

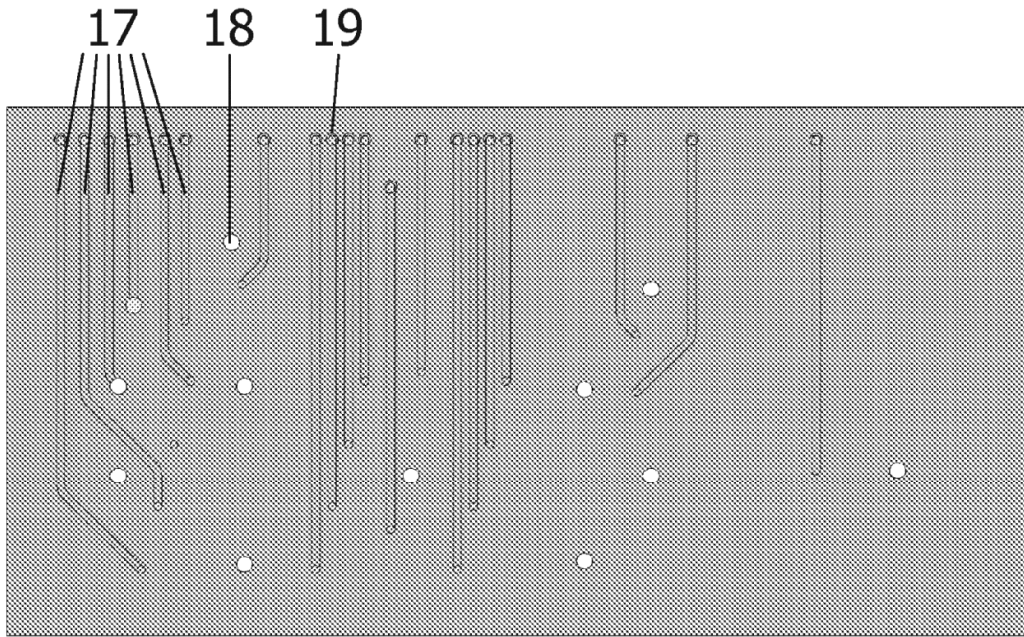


FIGURA 5

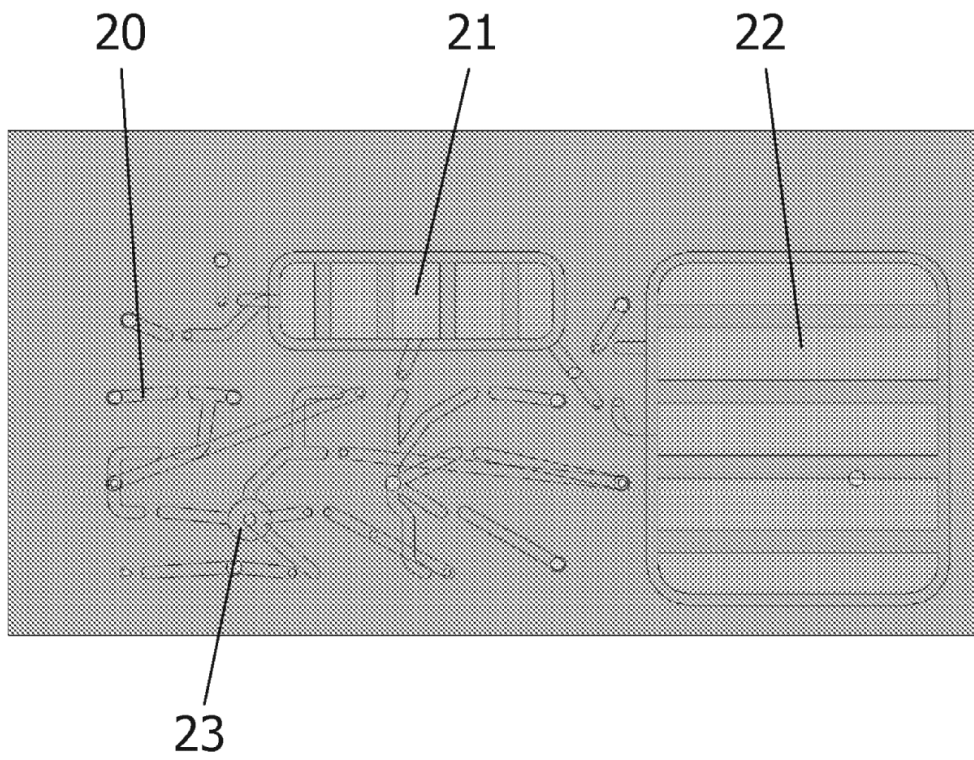


FIGURA 6

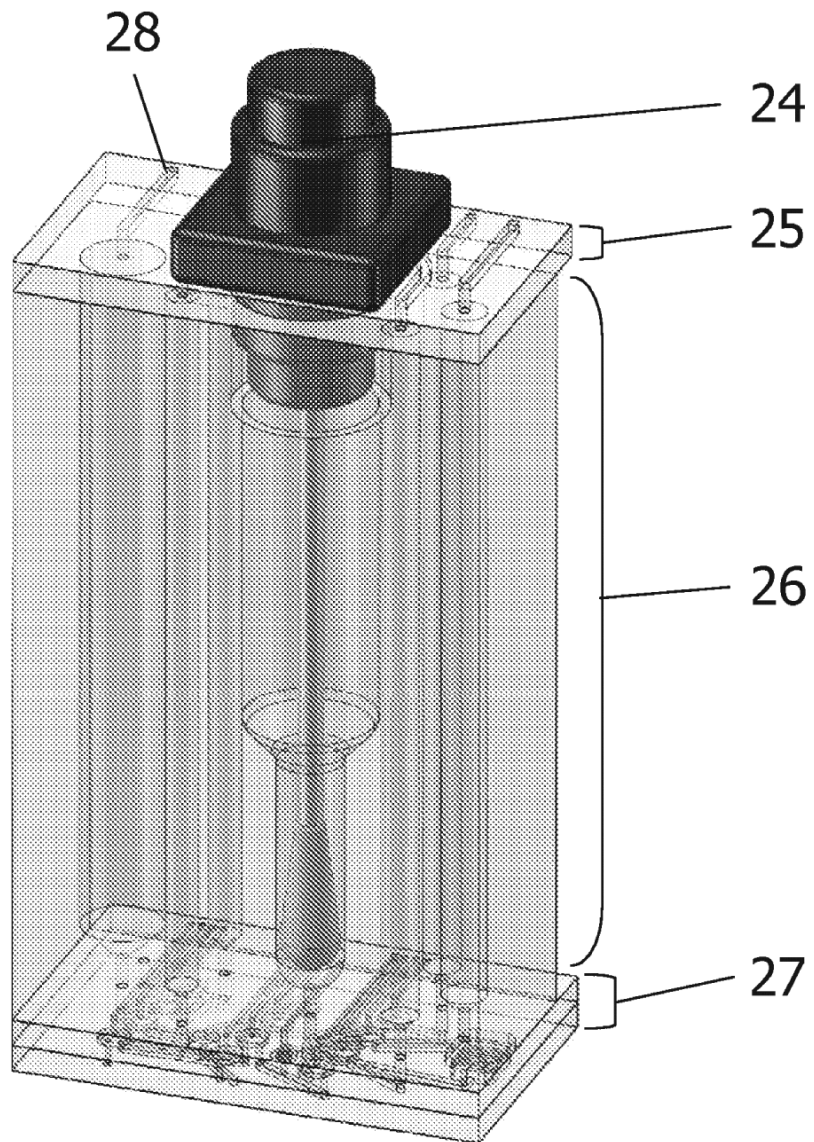


FIGURA 7

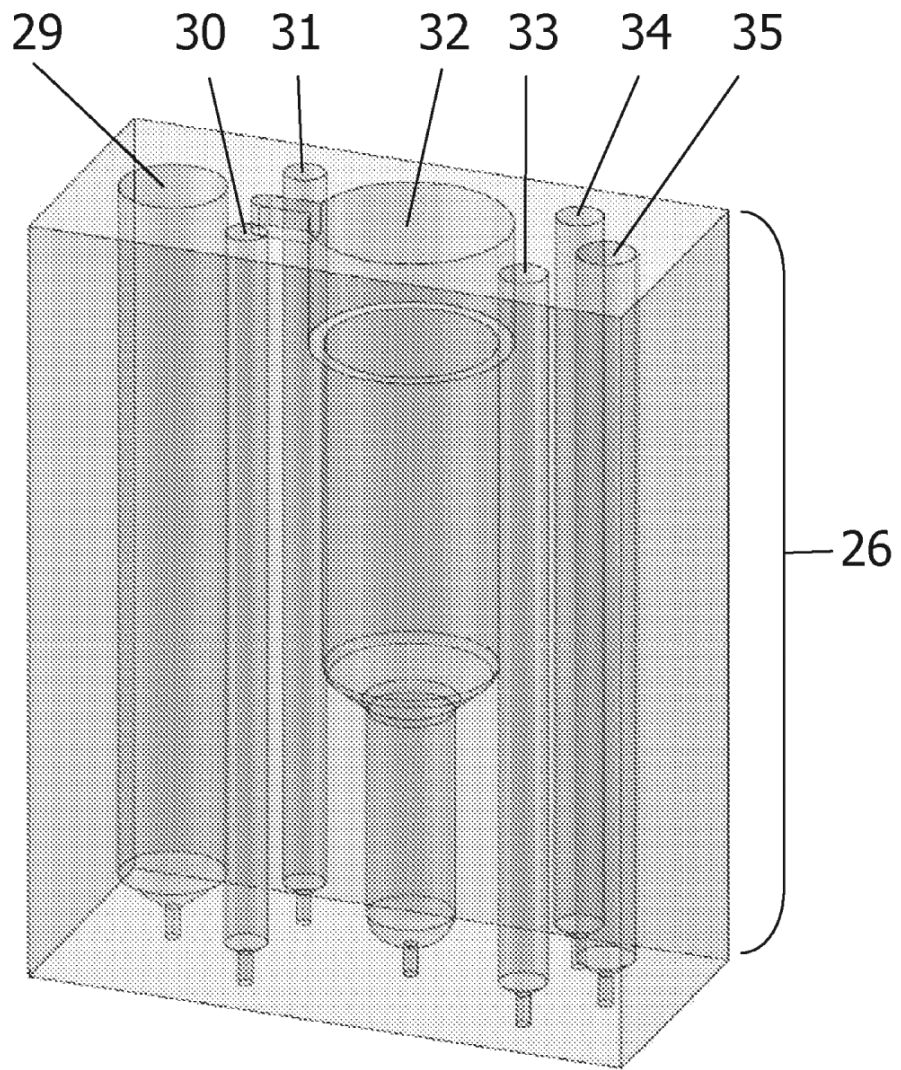


FIGURA 8

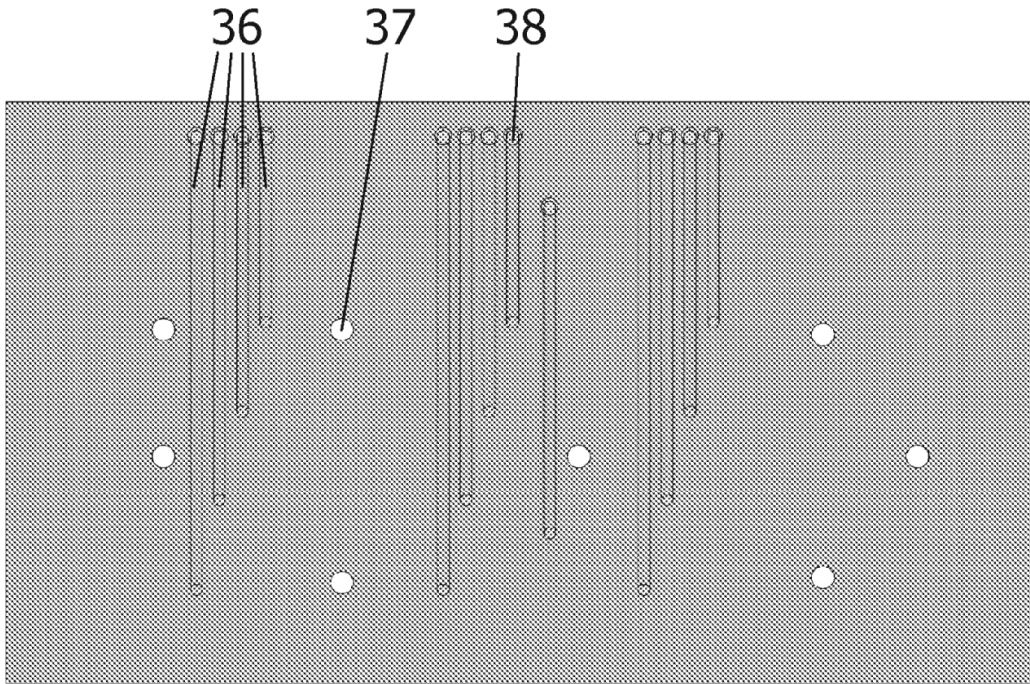


FIGURA 9

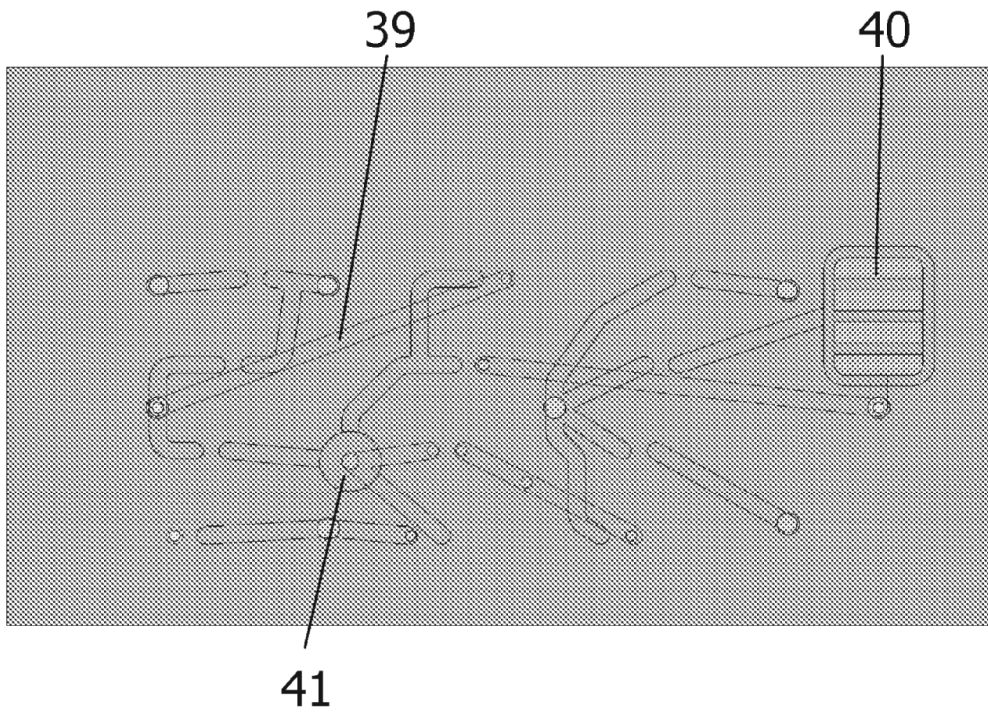


FIGURA 10

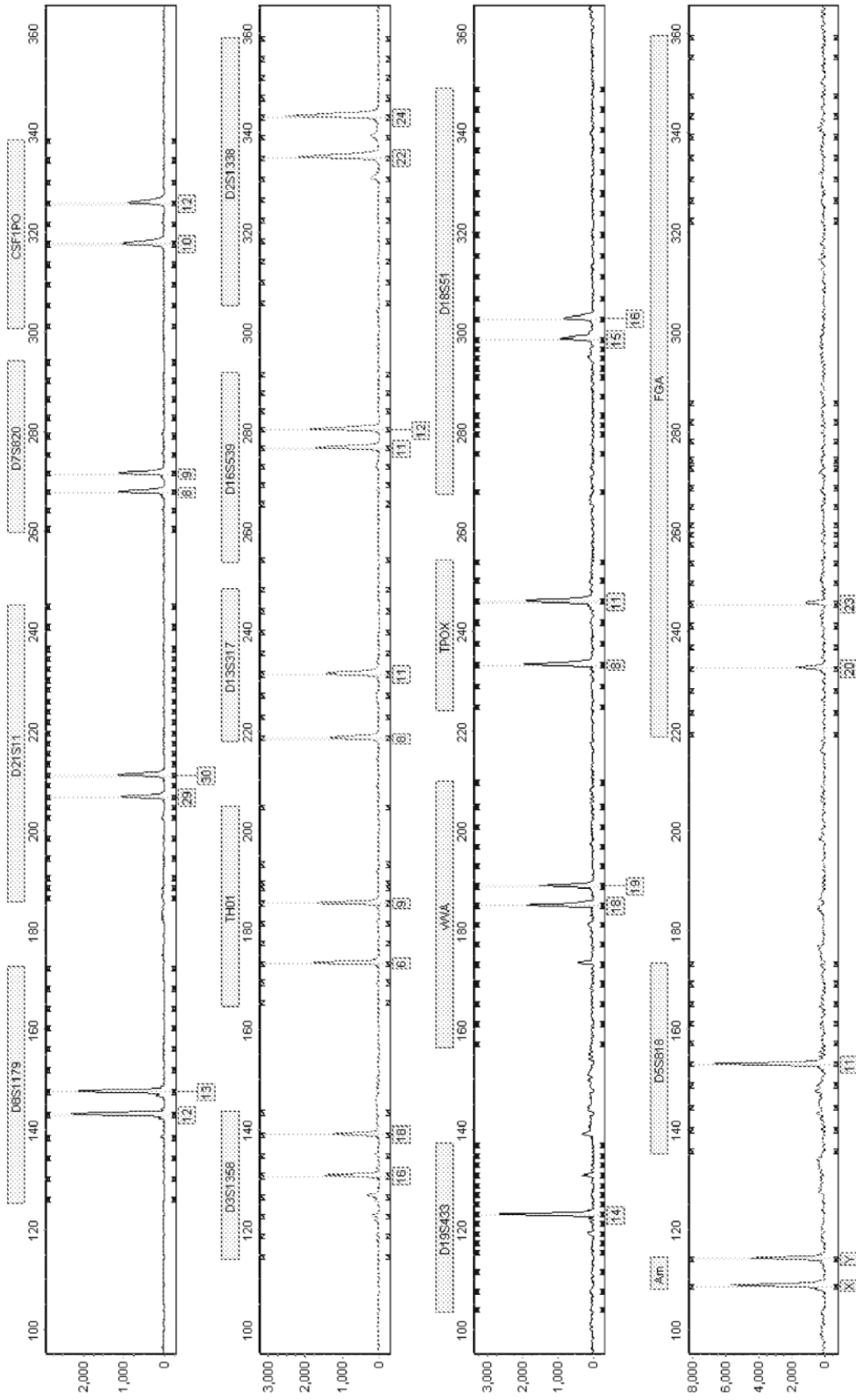


FIGURA 12

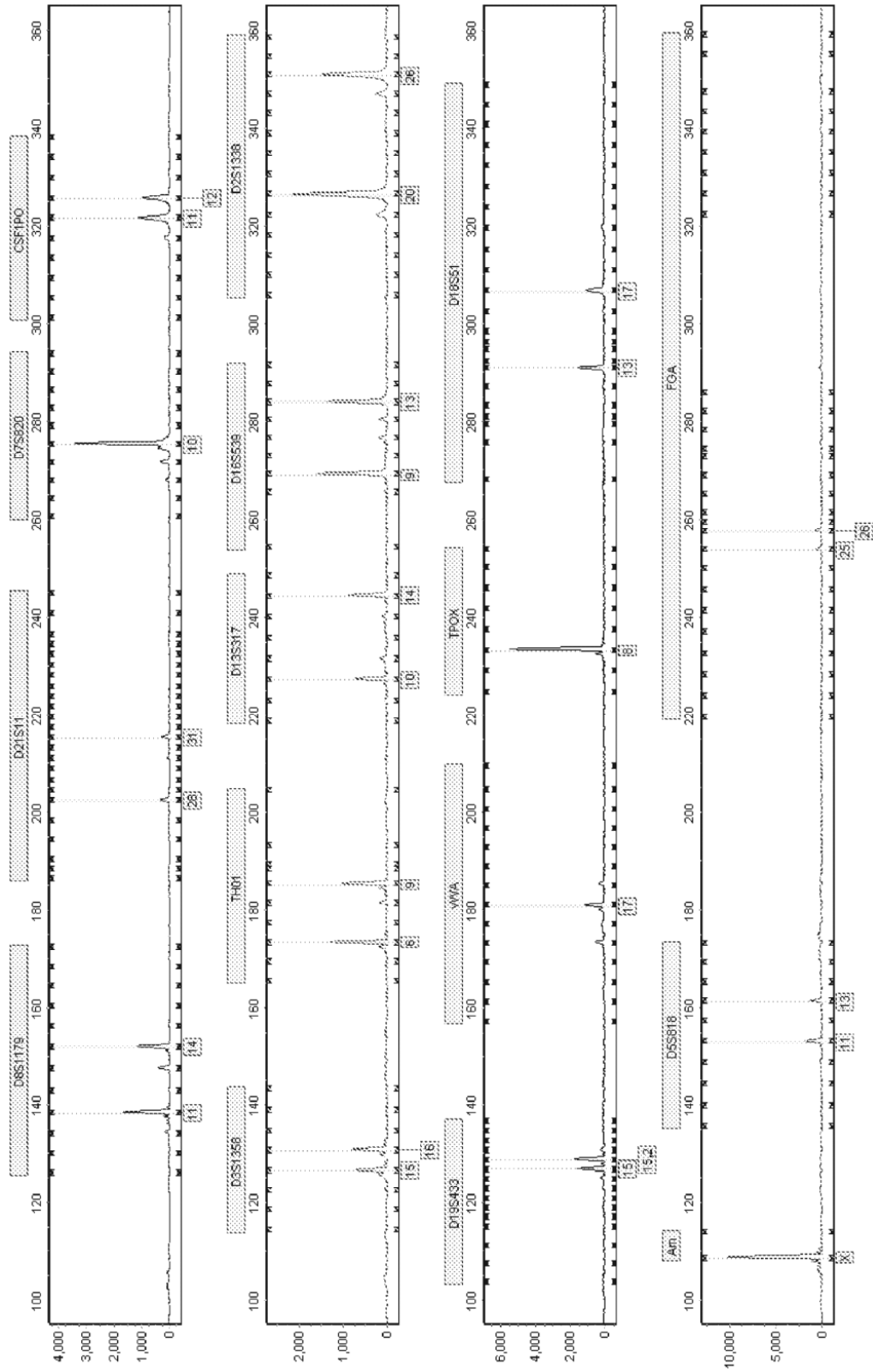


FIGURA 13

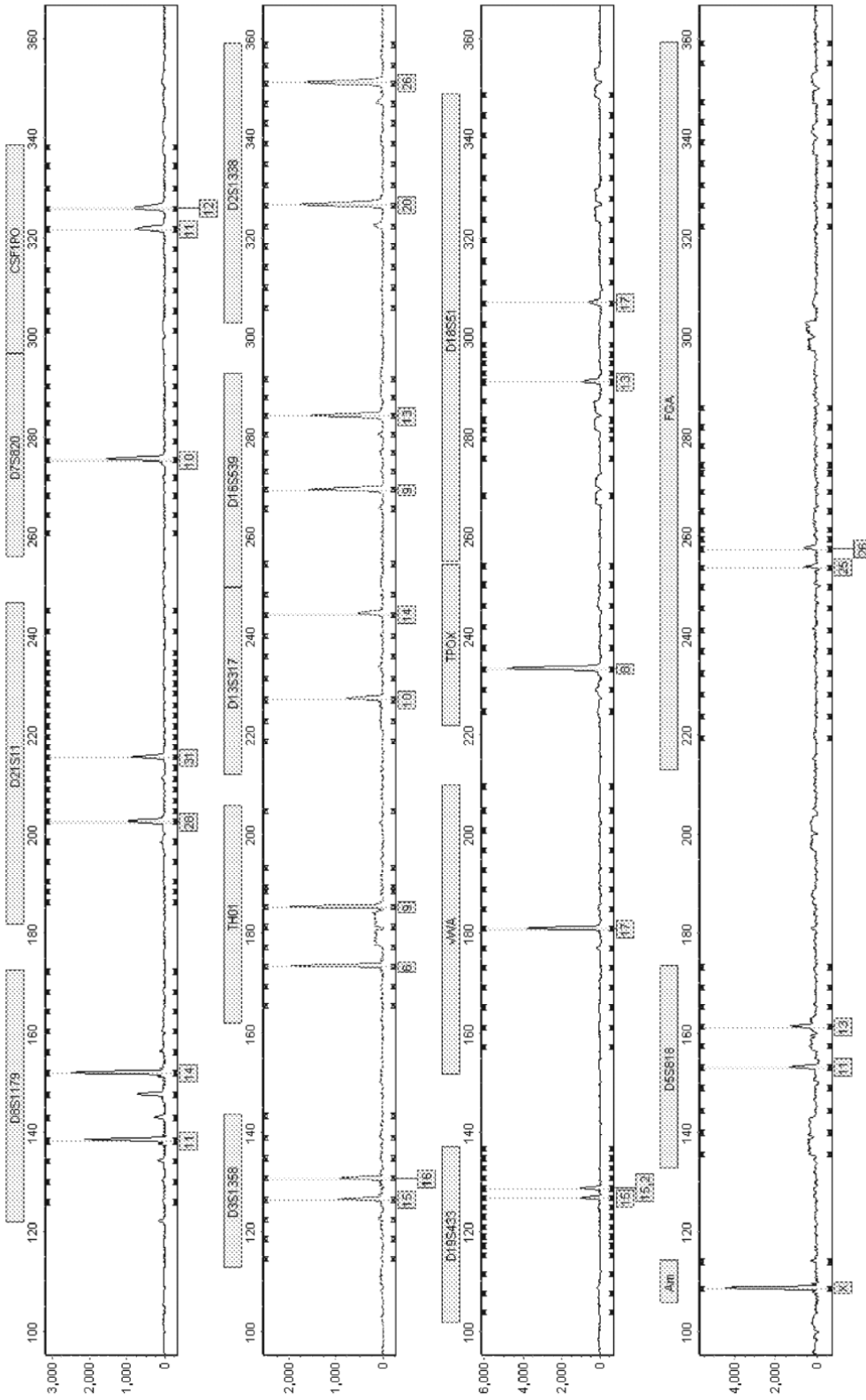


FIGURA 14

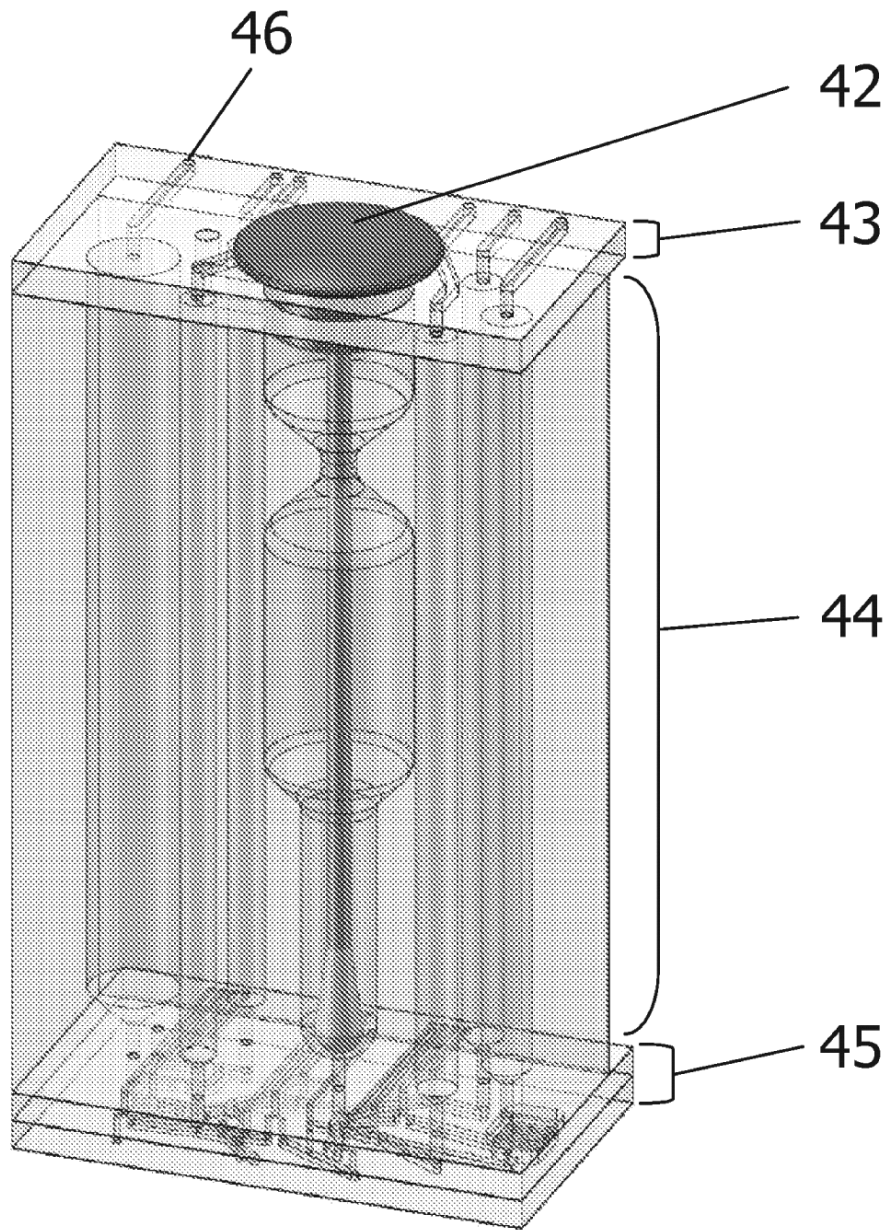


FIGURA 15

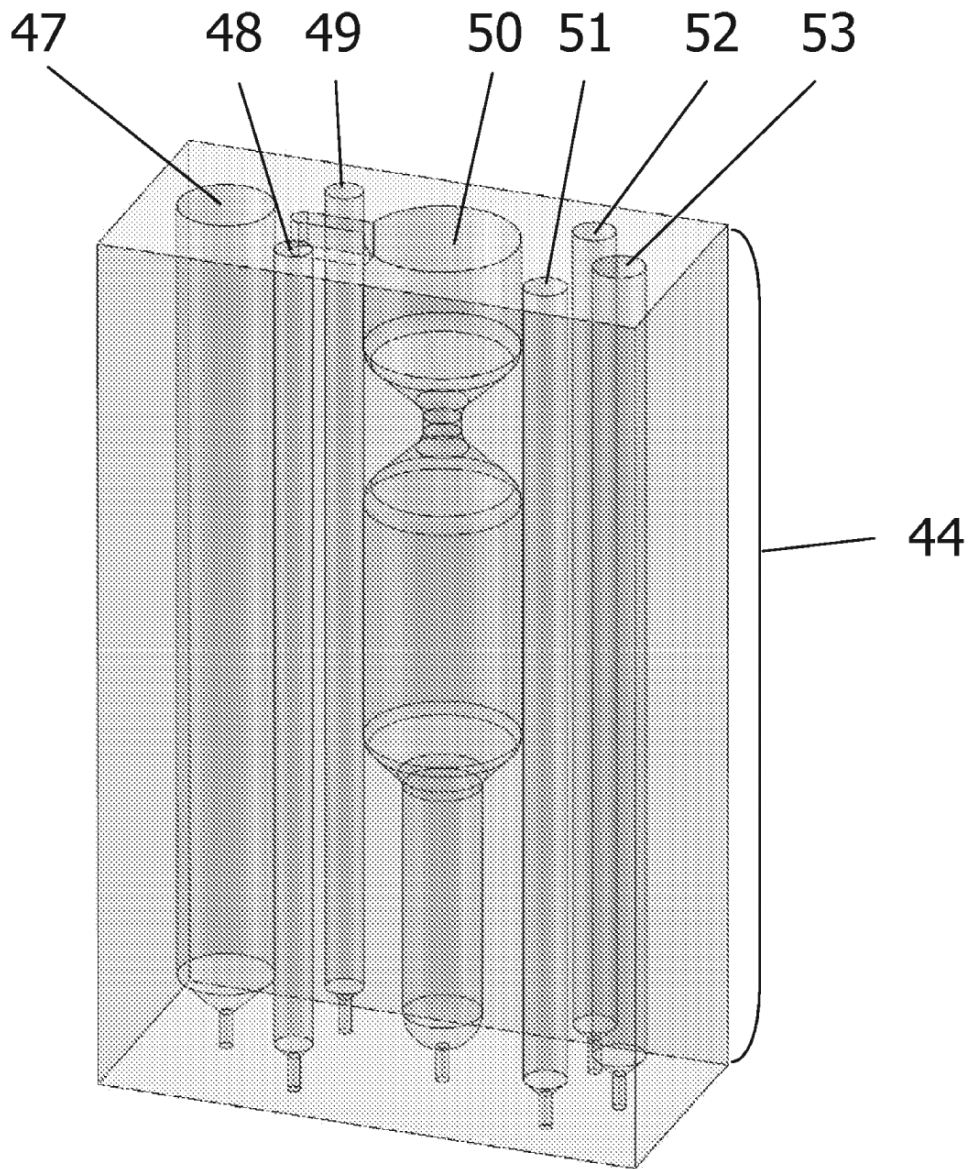


FIGURA 16