

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 749**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2013 PCT/US2013/066162**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14066376**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2013 E 13849949 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2912174**

54 Título: **Método y materiales para el aislamiento de materiales de ácido nucleico**

30 Prioridad:

25.10.2012 US 201261718634 P

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

12.02.2020

73 Titular/es:

**NEUMODX MOLECULAR, INC. (100.0%)
1250 Eisenhower Place
Ann Arbor, MI 48108, US**

72 Inventor/es:

**BRAHMASANDRA, SUNDARESH;
MASTRONARDI, MICHELLE;
CRAIG, ELIZABETH y
CAREY, MAUREEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 741 749 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método y materiales para el aislamiento de materiales de ácido nucleico

Campo técnico

5 Esta descripción se refiere generalmente al campo de la biotecnología, y más específicamente a un método mejorado y materiales para el aislamiento de materiales de ácido nucleico.

Antecedentes

10 El diagnóstico molecular es una disciplina de laboratorio clínico que se ha desarrollado rápidamente durante los últimos 25 años. Se originó a partir de procedimientos de investigación de bioquímica básica y biología molecular, pero actualmente se ha convertido en una disciplina independiente enfocada en el análisis rutinario de ácidos nucleicos (AN), que incluyen ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) para uso diagnóstico en el cuidado de la salud. El análisis diagnóstico molecular de muestras biológicas puede incluir la detección de uno o más materiales de ácido nucleico presente en la muestra. El análisis particular realizado puede ser cualitativo y/o cuantitativo. Los métodos de análisis implican el aislamiento y purificación de material de ácido nucleico, y una etapa importante en la sensibilidad y rápida detección de un ácido nucleico es el aislamiento y purificación de dicho material de ácido nucleico a partir de la muestra biológica en bruto. A menudo, una muestra de material de ácido nucleico se obtiene en cantidad, calidad y/o pureza insuficiente, impidiendo una fuerte implementación de una técnica analítica. Además, los métodos de aislamiento son específicos para ciertas matrices clínicas que contienen el ácido nucleico y no son aplicables a través de múltiples matrices. Debido a estas y otras deficiencias de los métodos y materiales actuales usados en el aislamiento de materiales de ácido nucleico, hay por consiguiente una necesidad de un método y materiales mejorados para el aislamiento de materiales de ácido nucleico.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A-1C representan realizaciones del flujo de proceso de un método para el aislamiento de materiales de ácido nucleico;

La Figura 2 representa un diagrama de flujo de un método para el aislamiento de materiales de ácido nucleico;

25 La Figura 3 es una representación esquemática de una realización de un método para unir micropartículas con un resto de afinidad útil para el aislamiento de materiales de ácido nucleico;

La Figura 4 muestra el rendimiento de reactivos de aislamiento de ácido nucleico de ejemplo para la extracción de la diana de ARN de Enterovirus desde la muestra de fluido cerebroespinal usando un ensayo de RT-PCR en tiempo real;

30 La Figura 5 muestra el rendimiento de reactivos de aislamiento de ácido nucleico de ejemplo para la extracción de la diana de ARN de Enterovirus desde el medio de transporte M4 usando un ensayo de RT-PCR en tiempo real;

La Figura 6 muestra el rendimiento de los reactivos de aislamiento de ácido nucleico de ejemplo para la extracción de la diana de ARN de Enterovirus desde UTM (Medios de transporte universales) usando un ensayo de RT-PCR en tiempo real;

35 La Figura 7 muestra el rendimiento cuantitativo de los reactivos de aislamiento de ácido nucleico de ejemplo para la extracción de la diana de ARN de Enterovirus a partir de un frotis nasal transferido al medio de transporte UTM usando un ensayo de RT-PCR en tiempo real;

La Figura 8 demuestra el uso de reactivos de aislamiento de ácido nucleico y una realización de un proceso para aislar y purificar ADN de *Streptococo* del grupo B usando partículas de afinidad DAB, en una variedad de muestras biológicas (matrices clínicas) para la posterior implementación del ensayo de PCR en tiempo real;

40 La Figura 9 demuestra el uso de reactivos de aislamiento de ácido nucleico y una realización de un proceso para aislar y purificar ADN de *Streptococo* del grupo B usando partículas de afinidad PAA, en muestras de orina humana, para la posterior implementación del ensayo de PCR en tiempo real;

45 La Figura 10 demuestra el uso de reactivos de aislamiento de ácido nucleico y una realización de un proceso para aislar y purificar ADN de *Streptococo* del grupo B usando partículas de afinidad PAA, en muestras de plasma humano, para la posterior implementación del ensayo de PCR en tiempo real;

La Figura 11 demuestra el uso de reactivos de aislamiento de ácido nucleico y una realización de un proceso para aislar y purificar el ADN de *Streptococo* del Grupo B usando partículas de afinidad PAA, en muestras de frotis simulado, para la posterior implementación del ensayo de PCR en tiempo real;

50 La Figura 12 demuestra el uso de reactivos de aislamiento de ácido nucleico y una realización de un proceso para aislar y purificar ADN de *Streptococo* del grupo B usando partículas de afinidad PAA, en una muestra de medios de transporte de frotis simulada, para la posterior implementación del ensayo de PCR en tiempo real;

La Figura 13 demuestra el uso de reactivos de aislamiento de ácido nucleico y una realización de un proceso para aislar y purificar ADN de *Estreptococo* del grupo B usando partículas de afinidad PAA, en muestras de sangre completa (donante), para la posterior implementación del ensayo de PCR en tiempo real;

5 La Figura 14 demuestra el uso de reactivos de aislamiento de ácido nucleico y una realización de un proceso para aislar y purificar ADN de *Estreptococo* del grupo B usando partículas de afinidad PAA, en muestras de orina humana (donante), para la posterior implementación del ensayo de PCR en tiempo real cuantitativo;

La Figura 15 demuestra el uso de reactivos de aislamiento de ácido nucleico y una realización de un proceso para aislar y purificar ADN de *Estreptococo* del grupo B usando partículas de afinidad PAA, en muestras de plasma humano (donante), para la posterior implementación del ensayo de PCR en tiempo real cuantitativo;

10 La Figura 16 demuestra la influencia del tiempo de unión en el rendimiento de una realización de una técnica de aislamiento de ácido nucleico;

La Figura 17 demuestra la influencia de la temperatura de unión en el rendimiento, en muestras de plasma humano, de una realización de una técnica de aislamiento de ácido nucleico;

15 La Figura 18 demuestra la influencia del tiempo de unión en el rendimiento, en muestras de orina humana, de una realización de una técnica de aislamiento de ácido nucleico;

La Figura 19 demuestra el uso de DOS disoluciones de elución diferentes de ejemplo – NaOH y KOH – en el rendimiento, en muestras de orina humana, de una realización de una técnica de aislamiento de ácido nucleico; y

20 La Figura 20 demuestra el uso de reactivos de aislamiento de ácido nucleico y una realización de un proceso para aislar y purificar de forma simultánea ARN de Enterovirus y ADN de *Estreptococo* del Grupo B usando partículas de afinidad de PAA, desde la misma matriz de muestra, Medio de transporte M4.

Descripción de las realizaciones preferidas

La siguiente descripción de realizaciones preferidas de la invención no pretende limitar la invención a estas realizaciones preferidas, sino más bien permitir que cualquier experto en la técnica haga y use esta invención.

1. Método para el aislamiento de ácido nucleico

25 Como se muestra en la Figura 1A y 2, un método 100 para el aislamiento de ácido nucleico comprende recibir una disolución de resto de unión en una cámara de proceso S110; mezclar la disolución de resto de unión con una muestra biológica, en la cámara de proceso, para producir una disolución de resto-muestra S120; incubar la disolución de resto-muestra durante una ventana temporal S130, produciendo así una disolución lisada que comprende un volumen de ácido nucleico unido al resto y un volumen de desecho; separar el volumen de ácido nucleico unido al resto del volumen de desecho S140; lavar el volumen de ácido nucleico unido al resto S150; y liberar una muestra de ácido nucleico desde el volumen de ácido nucleico unido al resto S160. El método sirve para liberar, extraer, agregar y/o aislar ácidos nucleicos (p.ej. ácidos desoxirribonucleicos, ácidos ribonucleicos) desde una muestra biológica en bruto (p.ej., directamente desde un producto de estudio o producto biológico), en donde la muestra biológica en bruto contiene los ácidos nucleicos en forma unida (p.ej., unida en forma celular). El método 100 puede servir además como un precursor a otros métodos de procesado para ácidos nucleicos, incluyendo amplificación (p.ej., por reacción de cadena polimerasa) y/o caracterización (p.ej., por detección de fluorescencia) de ácidos nucleicos desde una muestra biológica. El método 100 permite preferiblemente la unión preferente de una muestra de ácido nucleico deseado, en comparación con la unión de inhibidores (p.ej., fragmentos de membrana, ácidos húmicos, compuestos de mucosa, hemoglobina, proteínas) o sustancias no preferidas, o el lavado preferente de inhibidores/sustancias no preferidas en comparación con la muestra de ácido nucleico deseado. El método 100 también permite preferiblemente la liberación o elución de la muestra de ácido nucleico deseado a partir de la micropartícula u otra superficie para el procesado y/o caracterización adicional.

El método 100 puede realizarse en cualquier recipiente o cámara de proceso que se configura para contener una concentración adecuada de micropartículas recubiertas con resto de afinidad, facilitar las condiciones de tampón adecuadas para permitir la unión (p.ej., condiciones tampón que proporcionan un pH adecuadamente bajo), contener cantidades adecuadas de enzimas proteolíticas u otras enzimas para la lisis efectiva o eliminación de sustancias inhibitoras, y proporcionar condiciones térmicas adecuadas que permiten de forma colectiva la unión de ácidos nucleicos a las micropartículas recubiertas con resto de afinidad. La cámara de proceso o cualquier otro dispositivo puede configurarse además para permitir otro conjunto de condiciones (p.ej., pH adecuadamente alto, concentración de sal adecuadamente baja, y/o temperatura adecuadamente alta) que facilitan la liberación de ácidos nucleicos unidos. Las condiciones adecuadas para la unión y la liberación pueden variar entre diferentes tipos de muestras biológicas, y condiciones adecuadas de ejemplo para tipos de muestras biológicas ejemplares se describen en más detalle en la Sección 3 posterior.

55 En un ejemplo específico, como se muestra en la Figura 1A, el método 100 puede implementarse usando un tubo de microcentrifuga de 1,7 mL; sin embargo, el método 100 puede implementarse de forma alternativa usando cualquier

tubo, recipiente, contenedor, cámara o dispositivo adecuado. En otros ejemplos, el método 100 puede implementarse usando el sistema descrito en la Publicación de Patente de EE.UU. núm. 2013/210.127, titulado "System and Method for Processing and Detecting Nucleic Acids", y/o el cartucho descrito en la Publicación de Patente de EE.UU. núm. 2013/210.125, titulado "Microfluidic Cartridge for Processing and Detecting Nucleic Acids".

5 La etapa S110 relata la recepción de una disolución de resto de unión en una cámara de proceso, y sirve para proporcionar un medio que facilita la unión de ácidos nucleicos a un resto de unión. Preferiblemente, la disolución de resto de unión comprende una concentración adecuada de un resto de afinidad configurado para unirse de forma selectiva a ácidos nucleicos diana, tal como un resto de afinidad descrito en la Sección 2 posterior; sin embargo, la disolución de resto de unión puede comprender adicionalmente o de forma alternativa componentes adicionales, tal como un tampón de recogida (p.ej., tampón a pH bajo, tampón de alto contenido en sal), enzimas proteolíticas (p.ej.,
10 proteinasa K, otras proteasas), reactivos de lisis adicionales y/o cualquier otro reactivo de proceso adecuado que facilita la unión de ácidos nucleicos a los restos de afinidad. Además, las cantidades/concentraciones de enzimas proteolíticas (p.ej., proteinasa K, otras proteasas) en la disolución de resto de unión puede optimizarse para proporcionar un nivel adecuado de acción proteolítica mientras se reduce el remanente de las enzimas proteolíticas en etapas de proceso adicionales (p.ej., cuando se usan disoluciones de elución con menores concentraciones de sal). Reducir el remanente de enzimas proteolíticas proporciona la amplificación significativamente mejor y la posterior señal de fluorescencia (p.ej., detección de ácido nucleico) en las variaciones de la etapa S170. En ejemplos específicos, la cantidad de proteinasa K en una disolución de resto de unión puede oscilar de 20-40 microlitros de 20 mg/mL de proteinasa K. En una variación, los restos de afinidad se recubren en las superficies de micropartículas por
20 enlace covalente, y se configuran para facilitar el procesado adicional y aislamiento de ácidos nucleicos unidos a los restos de afinidad. Además, en esta variación, la cantidad del resto de afinidad recubierto en las micropartículas se configura preferiblemente para proporcionar una alta capacidad de unión con una cantidad reducida de micropartículas (p.ej., configuradas para proporcionar una capacidad de unión de 25-100 microgramos de ácidos nucleicos por 1 mg de micropartículas). Dicha configuración permite la liberación de ácidos nucleicos en un pequeño volumen, para concentrar de forma eficiente un ácido nucleico diana desde una muestra biológica.

En un ejemplo específico de esta variación de la etapa S110, las micropartículas son perlas magnéticas (p.ej., magnéticas, paramagnéticas, superparamagnéticas) con cualquier hidrofiliidad adecuada (p.ej., hidrófobas, hidrófilas), en donde las perlas magnéticas están recubiertas con el resto de afinidad y se reciben de forma simultánea en la cámara de proceso junto con una disolución de tampón de bajo pH, enzimas proteolíticas y reactivos líticos. En este ejemplo específico, la separación magnética puede usarse para facilitar el procesado adicional y aislamiento de ácidos nucleicos unidos a los restos de afinidad acoplados a perlas magnéticas. En otro ejemplo específico de esta variación, las micropartículas son perlas de un tamaño adecuado recubiertas con el resto de afinidad, y se reciben de forma simultánea en la cámara de proceso junto con una disolución tampón adecuada, enzimas proteolíticas y reactivos líticos. En este ejemplo específico, la separación basada en el tamaño puede usarse para facilitar el procesado adicional y el aislamiento de ácidos nucleicos unidos a los restos de afinidad acoplados a las perlas de tamaño adecuado. La disolución de resto de unión de la etapa S110 puede comprender de forma adicional o alternativa cualquier resto de afinidad adecuado o combinación de resto de afinidad distribuido por cualquier mecanismo o sustrato adecuado.

La etapa S120 relata la mezcla de la disolución de resto de unión con una muestra biológica, en la cámara de proceso, para producir una disolución de resto-muestra, que sirve para iniciar la lisis de la muestra biológica y permitir que los ácidos nucleicos diana se unan a los restos de afinidad de la disolución de resto de unión. Preferiblemente, la unión de los ácidos nucleicos diana a los restos de afinidad se facilita por el pH apropiado de la disolución de unión, como se muestra en la Figura 1C; sin embargo, la unión puede facilitarse por cualquier otro mecanismo adecuado. En una variación que implica un pH apropiado en la disolución de unión, la mezcla y la unión pueden darse a un bajo pH, que produce un resto de afinidad cargado de forma positiva que está atraído a moléculas de ácido nucleico cargado de forma negativa. Ejemplos específicos de restos de afinidad que funcionan por medio de un desplazamiento de pH se describen en la Sección 2 posterior.

En la etapa S120, la cámara de proceso puede ser cualquier recipiente adecuado, como se muestra en la Figura 1A, o una placa de captura adecuada, tal como se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. núm. 2013/210.127, titulado "System and Method for Processing and Detecting Nucleic Acids", como se muestra en la Figura 1B. Preferiblemente, la muestra biológica se distribuye en la cámara de proceso que contiene la disolución de resto de unión, y la disolución de resto-muestra resultante se aspira y se dispensa de forma repetida para mezclar completamente la disolución de resto-muestra. De forma alternativa, la muestra biológica y la disolución de resto de unión puede mezclarse en cualquier orden adecuado, y puede aspirarse y dispensarse cualquier número adecuado de veces para mezclar la disolución de resto-muestra. Además, en otras variaciones, la disolución de resto-muestra puede transferirse a cualquier otro recipiente de fluido adecuado para la mezcla. En un ejemplo específico, entre 5 uL-2 mL de muestra biológica se distribuye a la cámara de proceso que contiene la disolución de resto de unión y la disolución de resto-muestra resultante se mezcla después completamente aspirando y dispensando la disolución de resto-muestra diez veces para asegurar la distribución uniforme en la disolución de resto-muestra.

60 En la etapa S120, la muestra biológica puede comprender cualquier muestra adecuada que contenga polinucleótidos, incluyendo ácidos desoxirribonucleicos (ADN) y/o ácidos ribonucleicos (ARN), y pueden co-distribuirse en cualquier

matriz o medio adecuado. En variaciones de la etapa S120, la muestra biológica puede comprender muestras biológicas de cualquier especie, y en ejemplos específicos en donde la muestra biológica es de una especie animal, la muestra biológica puede comprender cualquiera de fluido cerebroespinal (CSF), una muestra de membrana mucosa (p.ej., frotis nasal, frotis bucal, frotis de tejido vaginal), sangre (p.ej., sangre completa, sangre seca), tejido de órgano (p.ej., aspirado de biopsia), plasma, orina, heces, piel, pelo o cualquier otra muestra biológica portada en la matriz o medios (p.ej., medios de transporte universales). En estas variaciones y ejemplos, el (los) ácido(s) nucleico(s) diana de interés pueden estar contenidos en partículas (p.ej., células), fragmentos de tejido, bacterias, hongos o esporas de la muestra biológica.

La etapa S130 relata la incubación de la disolución de resto-muestra durante una ventana temporal, y sirve para producir una disolución de resto-muestra lisada que comprende un volumen de ácido nucleico unido al resto (p.ej., un volumen de ácidos nucleicos unidos de forma reversible al conjunto de micropartículas recubiertas con resto de afinidad) y un volumen de desecho. En la etapa S130, la disolución de resto-muestra puede incubarse usando cualquier aparato de calentamiento adecuado, como se muestra en la Figura 1A, o un calentador de placa de captura adecuado, tal como el descrito en la Publicación de patente de EE.UU. núm. 2013/210.127, titulado "System and Method for Processing and Detecting Nucleic Acids", como se muestra en la Figura 1B. En la etapa S130, el ácido nucleico se libera de dentro de la célula u otra estructura en que está contenido, y se une a las micropartículas acopladas con el resto de afinidad, mientras que otros componentes no unidos forman un volumen de desecho para la eliminación posterior, como se muestra en la Figura 1C. Preferiblemente, la cámara de proceso que contiene la disolución de resto-muestra (p.ej., reactivos de lisis, limpieza, unión y la muestra biológica) se incuba durante un periodo definido de tiempo a una temperatura preferiblemente en el intervalo de 25-95°C, en donde los parámetros de tiempo y temperatura son dependientes de la muestra biológica. Los parámetros del ejemplo para diferentes muestras biológicas se describen brevemente a continuación, y adicionalmente en la Sección 3 posterior. De forma alternativa, la disolución de resto-muestra puede transferirse a otro recipiente para la incubación en variaciones de la etapa S130. Además, en variaciones de las etapas S110, S120 y S130, cualquiera o todas de las etapas de lisis, proteolíticas y de unión pueden darse de forma simultánea en la cámara de proceso o cualquier otro recipiente adecuado, y no se necesita que sean etapas discretas.

En los ejemplos de la etapa S130, la incubación de la disolución de resto-muestra puede realizarse durante un periodo de 2-20 minutos dependiendo de la muestra biológica y la(s) fuente(s) del (de los) ácido(s) nucleico(s) diana. Adicionalmente, en los ejemplos, la temperatura de incubación está basada en la muestra a procesar y la(s) fuente(s) del (de los) ácido(s) nucleico(s) diana. En un primer ejemplo de la etapa S130, las partículas enterovirales se incuban y lisan a temperatura ambiente en presencia de detergente. En una variación del primer ejemplo, las partículas enterovirales tratadas con proteinasa K pueden incubarse y lisarse en un intervalo de temperatura modificado de 37-60°C para la actividad óptima de la enzima proteinasa. En un segundo ejemplo de la etapa S130, un frotis nasal que contiene bacterias de *Staphylococcus aureus* se incuba a aproximadamente 95°C para asegurar la lisis completa de las bacterias gram-positivas. En variaciones del segundo ejemplo, el tratamiento de la muestra bacteriana con enzimas líticas específicas (p.ej., acromopeptidasa o lisostafina) pueden dar por resultado temperatura de lisis modificada. En todos los ejemplos específicos y variaciones, la incubación produce una disolución de resto-muestra lisada que comprende un volumen de ácidos nucleicos unidos al resto de afinidad y un volumen de desecho para la eliminación.

La etapa S130 puede comprender además la etapa S131, que relata el pre-tratamiento y/o realización de calentamiento adicional de la disolución de resto-muestra. La etapa S131 sirve para facilitar o mejorar adicionalmente la lisis de la disolución de resto-muestra. En una solicitud, ciertos organismos difíciles de lisar (p.ej., micobacterias) pueden necesitar etapas de pre-tratamiento o calentamiento adicionales, como se proporciona por la etapa S131, para asegurar la lisis completa y la posterior liberación del ácido nucleico del organismo/muestra biológica. Preferiblemente, la unión del ácido nucleico diana no está impactado ni de forma adversa ni de forma positiva por la presencia de los reactivos de lisis y proteolíticos adicionales proporcionados en la etapa S131; sin embargo, en variaciones alternativas, la unión puede estar influida por los reactivos adicionales proporcionados en la etapa S131, y los efectos de los reactivos pueden atenuarse o no atenuarse dependiendo de la aplicación y/o uso deseado del (de los) ácido(s) nucleico(s) diana.

La etapa S140 relata la separación del volumen de ácido nucleico unido al resto del volumen de desecho, y sirve para compactar o concentrar micropartículas acopladas al (a los) ácido(s) nucleico(s) diana, por medio de los restos de afinidad, para facilitar la eliminación del volumen de desecho del volumen de ácido nucleico unido al resto. Preferiblemente, el volumen de ácido nucleico unido al resto se separa usando un método de separación magnética; sin embargo el volumen de ácido nucleico unido al resto puede separarse de forma alternativa usando métodos basados en el tamaño, masa y/o densidad de la micropartícula (p.ej., centrifugado, sedimentación, filtrado) y/o métodos de enfoque (p.ej., enfoque del campo eléctrico, enfoque basado en láser). La separación en la etapa S140 puede, sin embargo, realizarse usando cualquier otro método adecuado. En una primera variación, en donde las micropartículas acopladas con restos de afinidad tienen propiedades magnéticas, puede aplicarse un campo magnético para retener las micropartículas unidas al ácido nucleico del volumen de ácido nucleico unido al resto, mientras que el volumen de desecho (p.ej., restos celulares y otro material no unido) se elimina sustancialmente por aspiración. En una segunda variación, en donde las micropartículas acopladas con restos de afinidad tienen una dimensión característica para la separación basada en el tamaño, la disolución de resto-muestra lisada puede filtrarse para eliminar sustancialmente el volumen de desecho. En la segunda variación, el filtro se configura preferiblemente para pasar las micropartículas

unidas a los ácidos nucleicos diana mientras retienen los desechos; sin embargo, el filtro puede configurarse de forma alternativa para retener las micropartículas mientras pasa el desecho.

Preferiblemente, en la etapa S140, se tiene el cuidado apropiado para asegurar que las micropartículas compactas del volumen de ácido nucleico unido al resto no se alteren y no se dé una pérdida significativa de las micropartículas con ácidos nucleicos unidos durante la eliminación del volumen de desecho. Además, en algunas variaciones, algún líquido puede aún retenerse mediante las micropartículas compactadas del volumen de ácido nucleico unido al resto para minimizar la pérdida de micropartículas. Sin embargo, algunas aplicaciones de la etapa S140 pueden implicar de forma alternativa una reducción en el líquido retenido a expensas de alguna cantidad de pérdida de micropartículas. En un ejemplo específico, el líquido retenido puede llevar al volumen de ácido nucleico unido al resto a aproximadamente 5-10 microlitros.

En la etapa S140, la disolución de resto-muestra lisada puede procesarse en la cámara de proceso para separar el volumen de ácido nucleico unido al resto del volumen de desecho; sin embargo, la disolución de resto-muestra lisada puede transferirse de forma alternativa a otro recipiente adecuado para la separación del volumen de ácido nucleico unido al resto desde el volumen de desecho. En una primera variación, un sistema de pipeteado (automático o manual) puede usarse para eliminar el volumen de desecho (p.ej. líquido sobrenadante) y pueden ser necesarias múltiples aspiraciones mediante el sistema de pipeteo para asegurar una eliminación del sobrenadante tan completa como sea posible. En un ejemplo de la primera variación, puede usarse una punta de pipeta de 1000 microlitros para realizar la eliminación en bruto del volumen de desecho en una primera aspiración seguido por el uso de una punta de pipeta más fina (p.ej., punta de 100-200 microlitros) en aspiraciones adicionales, para eliminar el resto del volumen de desecho. En el ejemplo, la eliminación del volumen de desecho se da cerca del fondo de la cámara de proceso para proporcionar la eliminación completa del líquido con el mínimo burbujeo. En una segunda variación, la disolución de resto-muestra lisada puede transferirse a un recipiente que permita que el volumen de ácido nucleico unido al resto a capturar y el volumen de desecho a eliminar de una manera a través del flujo, o bien contra los poros de un filtro o en presencia de un campo magnético. En la segunda variación, las micropartículas con ácidos nucleicos unidos se retienen en una zona de filtro o una zona de campo magnético del recipiente, y la parte líquida se hace fluir a una "cámara de desechos". En un ejemplo específico de la segunda variación, un sistema (tal como el descrito en la Publicación de patente de EE.UU. núm. 2013/210.127, titulado "System and Method for Processing and Detecting Nucleic Acids") puede usarse para transferir la disolución de resto-muestra lisada en una ruta fluidica de un cartucho (tal como el descrito en la Publicación de patente de EE.UU. núm. 20132/210.125, titulada "Microfluidic Cartridge for Processing and Detecting Nucleic Acids"). En el ejemplo específico, la disolución de resto-muestra lisada puede retenerse mediante un campo magnético en una parte de la ruta fluidica tras la oclusión de la ruta fluidica a un conjunto adecuado de posiciones de oclusión, para separar el volumen de ácido nucleico unido al resto desde el volumen de desecho. El volumen de desecho puede eliminarse entonces presionando el volumen de desecho a una cámara de desechos del cartucho.

La etapa S150 relata el lavado del volumen de ácido nucleico unido al resto, y sirve para permitir la eliminación de restos unidos de forma no específica y para facilitar un cambio de tampón posterior en la etapa S160 desplazando cualquier líquido retenido durante la etapa S140. En otras etapas del método 100, puede darse la unión no específica por medio de atracción electrostática (p.ej., mediante otra especie cargada de forma negativa), adsorción superficial, o cualquier otro medio; por consiguiente, la etapa S150 puede eliminar sustancialmente una gran mayoría de estas especies unidas de forma no específica, especialmente las unidas a los restos de afinidad por medio de otros medios distintos de la atracción electrostática. Preferiblemente, el lavado del volumen de ácido nucleico unido al resto comprende distribuir una disolución de lavado al volumen de ácido nucleico unido al resto y eliminar la disolución de lavado y cualquier elemento portado en la disolución de lavado; sin embargo, el lavado del volumen de ácido nucleico unido al resto puede comprender de forma alternativa la distribución de una disolución de lavado a través de un recipiente que contiene el volumen de ácido nucleico unido al resto, para lavar el volumen de ácido nucleico unido al resto en una manera de flujo directo. Además, las micropartículas del volumen de ácido nucleico unido al resto pueden agitarse para volver a una suspensión desde un estado compacto (p.ej., durante la captura magnética) o la disolución de lavado puede simplemente hacerse fluir sobre las micropartículas para eliminar adicionalmente los restos no específicos y facilitar el intercambio de tampones. La disolución de lavado tiene preferiblemente un pH menor de 9 y comprende agua purificada (p.ej., agua ultrapura, agua desionizada) y un tampón adecuado (p.ej., tampón Tris pH 8,0), pero puede comprender de forma alternativa cualquier otro componente o combinación de componentes adecuada para lavar el volumen de ácido nucleico unido al resto, ya que es dependiente del tipo de muestra biológica. Además, la disolución de lavado se configura preferiblemente de manera que el (los) ácido(s) nucleico(s) diana unido(s) está(n) virtualmente inalterado(s) durante la etapa S150. Adicionalmente, las variaciones de la etapa S150 pueden comprender múltiples repeticiones de lavado con la misma o diferente disolución de lavado para la eliminación más rigurosa del material de ácido no nucleico (p.ej., inhibidores, elementos no deseados) además de facilitar un intercambio de tampón más riguroso.

En un primer ejemplo de la etapa S150, la disolución de lavado se distribuye a través de un recipiente que contiene el volumen de ácido nucleico unido al resto en un modelo de flujo continuo. En el primer ejemplo, el volumen de la disolución de lavado total y el caudal definen la eficacia del procedimiento de lavado más que el número de repeticiones de lavado. El caudal se implementa en base a asegurar que las micropartículas capturadas no se pierden sino que la velocidad de flujo proporciona la agitación adecuada para asegurar la eliminación del material/inhibidor de ácido

nucleico que no es diana unido. En el primer ejemplo, el volumen de disolución de lavado total se mide como un múltiplo del volumen del recipiente que contiene las micropartículas capturadas o el volumen retenido de las micropartículas compactadas del volumen de ácido nucleico unido al resto. En el primer ejemplo, los caudales están en el intervalo de 1-10 microlitros/segundo, y el volumen de disolución de lavado total es 50-500 microlitros.

5 En una variación del primer ejemplo de la etapa S150, un sistema tal como el descrito en la Publicación de patente de EE.UU. núm. 2013/210.127 titulada "System and Method for Processing and Detecting Nucleic Acids") puede usarse para distribuir la disolución de lavado en una ruta fluidica de un cartucho (tal como la descrita en la Publicación de patente de EE.UU. núm. 2013/210.125, titulada "Microfluidic Cartridge for Processing and Detecting Nucleic Acids"). En la variación del primer ejemplo, las micropartículas del volumen de ácido nucleico unido al resto pueden retenerse mediante un campo magnético en una parte de la ruta fluidica tras la oclusión de la ruta fluidica en un conjunto adecuado de posiciones de oclusión, y la disolución de lavado puede distribuirse a través de la parte de la ruta fluidica y en una cámara de desechos del cartucho para lavar las micropartículas con el (los) ácido(s) nucleico(s) diana unido(s).

15 La etapa S160 relata la liberación de una muestra de ácido nucleico desde el volumen de ácido nucleico unido al resto, y sirve para separar las micropartículas desde el ácido nucleico unido del volumen de ácido nucleico unido al resto usando un reactivo (es decir, una disolución de elución) que atenúa la afinidad de las micropartículas recubiertas por el (los) ácido(s) nucleico(s) diana y crea un medio para la liberación del (de los) ácido(s) nucleico(s) diana desde las micropartículas. Preferiblemente, la etapa S160 permite la elución/liberación de lo más que se pueda de los ácidos nucleicos diana unidos en la cantidad de tiempo más rápida; sin embargo, la etapa S160 puede permitir de forma alternativa o adicional la elución/liberación de lo más que se pueda de los ácidos nucleicos diana unidos usando el menor volumen de disolución de elución o cualquier otro parámetro limitante adecuado. Por ejemplo, el (los) ácido(s) nucleico(s) diana a partir de los 0,5 mL de una muestra biológica inicial (no diluida por el tampón de recogida) puede procesarse usando el método 100 y eluirse en ~10 uL de disolución de elución. En otros ejemplos, los volúmenes de disolución de elución pueden ser tan bajos como 5 microlitros dando por resultado una concentración significativa (50X-100X) del ácido nucleico diana procedente de la muestra biológica inicial.

25 En una variación de la etapa S160, los restos de afinidad, ejemplos de los cuales se describen en la Sección 2 posterior, funcionan en base al pH del medio. Específicamente, a bajo pH, los restos de afinidad están cargados de forma positiva, lo que da por resultado la atracción a ácidos nucleicos cargados de forma negativa; sin embargo, a alto pH, los restos de afinidad están cargados de forma negativa, lo que da por resultado la repulsión de ácidos nucleicos cargados de forma negativa. En un ejemplo específico de esta variación, la liberación de la muestra de ácido nucleico comprende proporcionar una disolución de elución que está en el intervalo de pH 12 – pH 13 para efectuar la elución/liberación eficiente del (de los) ácido(s) nucleico(s) diana unidos de la micropartícula en base a un desplazamiento a un pH más básico. En el ejemplo específico, la disolución de elución comprende 20 mM de NaOH; sin embargo, en otras variaciones la disolución de elución puede comprender cualquier otra concentración adecuada de NaOH o KOH, dependiendo de la aplicación (p.ej., tipo de muestra). De nuevo, la eliminación sustancial de la disolución de lavado durante las variaciones del método 100 que comprende la etapa S150 puede facilitar o mejorar el desplazamiento de pH para la liberación de ácido nucleico, ya que la disolución de lavado puede neutralizar potencialmente la disolución de elución de una manera indeseable y atenuar el pH elevado necesario para liberar el (los) ácido(s) nucleico(s) diana.

30 En algunas variaciones, la etapa S160 puede comprender además la etapa S161, que relata el calentamiento del volumen de ácido nucleico unido al resto. La etapa S161 sirve para proporcionar las condiciones ambientales adicionales que faciliten la liberación de la muestra de ácido nucleico desde las micropartículas, y puede además servir para atenuar los efectos de las enzimas proteolíticas que se usan en las etapas S110, S120 y/o S130 o que pueden liberarse de la muestra biológica que contiene el ácido nucleico. Preferiblemente, una temperatura elevada en combinación con un pH elevado resultante de la disolución de elución proporciona las condiciones mejoradas para facilitar la liberación de la muestra de ácido nucleico. Además, una temperatura elevada (p.ej., elevando una muestra eluida a temperatura ambiente a 85°C) puede servir para minimizar la actividad de enzima proteasa en el ácido nucleico eluido y mejorar así la robustez de la detección de la muestra de ácido nucleico diana durante el procesado en variaciones de la etapa S170; sin embargo, el método 100 puede omitir de forma alternativa la etapa S161 en aplicaciones en donde el calentamiento del volumen de ácido nucleico unido al resto es indeseable y/o innecesario. Además, las variaciones de la etapa S161 pueden comprender el calentamiento a mayores temperaturas durante periodos más cortos de tiempo, o calentamiento a menores temperaturas durante periodos más largos de tiempo. En un ejemplo de la etapa S161, el calentamiento comprende elevar la temperatura del volumen de ácido nucleico unido al resto a 80-85°C, durante 3 minutos, y en otro ejemplo, el calentamiento comprende elevar la temperatura del volumen de ácido nucleico unido al resto a 50-70°C, durante 3-10 minutos. En otros ejemplos, la elevación de la temperatura puede mantenerse a un punto fijo deseado durante tan poco como 1 minuto o tanto como 30 minutos. Además, las condiciones de elución pueden optimizarse para asegurar que el ácido nucleico unido se eluye solo en presencia de la disolución a alto pH a la temperatura elevada durante una cantidad de tiempo especificada.

60 En un ejemplo específico de las etapas S160 y S161, un sistema (tal como el descrito en la Publicación de patente de EE.UU. núm. 2013/210.127, titulada "System and Method for Processing and Detecting Nucleic Acids") puede usarse para distribuir la disolución de elución en una ruta fluidica de un cartucho (tal como el descrito en la Publicación de

patente de EE.UU. núm. 2013/210.125, titulada "Microfluidic Cartridge for Processing and Detecting Nucleic Acids"). En la variación del ejemplo específico, las micropartículas del volumen de ácido nucleico unido al resto pueden retenerse por un campo magnético en una parte de la ruta fluidica tras la oclusión de la ruta fluidica en un conjunto adecuado de posiciones de oclusión, y la disolución de elución puede distribuirse a través de la parte de la ruta fluidica que permite la liberación de la muestra de ácido nucleico desde la micropartícula. Adicionalmente, un elemento de calentamiento del sistema puede moverse cerca de la parte de la ruta fluidica con la disolución de elución y las micropartículas para mejorar más la liberación de la muestra de ácido nucleico.

Aunque el método 100 comprende preferiblemente las etapas S150 y S160, otras variaciones del método 100 pueden omitir las etapas S150 y S160. En una variación, la etapa S150 puede omitirse de manera que la liberación en la etapa S160 se da sin lavar el volumen de ácido nucleico unido al resto. En otra variación, la etapa S160 puede omitirse de manera que el (los) ácido(s) nucleico(s) unido(s) a las micropartículas en el volumen de resto-muestra puede(n) incorporarse en un ensayo corriente abajo sin eluir o liberar el (los) ácido(s) nucleico(s) unido(s) a la micropartícula. Otras variaciones del método 100 pueden omitir etapas o etapas de reorganización según la solicitud específica.

Además, las variaciones del método 100 pueden además comprender la etapa S165, que relata añadir al menos una de la muestra biológica y la muestra de ácido nucleico con un control de proceso. El control de proceso (p.ej., SPC1) comprende preferiblemente un conjunto de cebadores y sondas basados en el (los) tipo(s) de ácidos nucleicos (p.ej., ARN, ADN) en muestras que se procesan, y en un ejemplo específico, comprende un conjunto de cebadores y sondas basados en una hebra de ADN sintética incorporada en un plásmido o un bacteriófago de ARN MS2. En otros ejemplos, el control de proceso puede configurarse para servir como un control de proceso para ARN, ADN, o ARN y ADN en muestras biológicas que se procesan. El control de proceso puede también servir como un monitor para extracciones dobles (p.ej., PCR doble en un ensayo de MS2 + Enterovirus). Además, el control de proceso puede optimizarse para la implementación con múltiples matrices.

En la etapa S165, el control de proceso puede añadirse antes de la lisis de la muestra biológica en variaciones de la etapa S120, y/o puede añadirse después de la elución de la muestra de ácido nucleico en variaciones de la etapa S160. En las variaciones del método 100 que comprenden la etapa S165, sin embargo, el método 100 comprende preferiblemente lavar el volumen de ácido nucleico unido al resto, como en las variaciones de la etapa S150. En ejemplos específicos, sin embargo, la etapa S165 puede comprender cualquier combinación de: no lavar el volumen de ácido nucleico unido al resto, lavar de forma pasiva el volumen de ácido nucleico unido al resto, no eliminar una disolución de lavado del volumen de ácido nucleico unido al resto, lavar el volumen de ácido nucleico unido al resto con una disolución Tris (p.ej., disolución de Tris 1 mM), eluir la muestra de ácido nucleico a temperatura ambiente, eluir la muestra de ácido nucleico a 99°C, eluir la muestra de ácido nucleico a 55°C, y no suspender de nuevo las micropartículas unidas al resto en un tampón de liberación, cualquier combinación de los cuales puede afectar a la amplificación de los ácidos nucleicos o al control de proceso.

Como se muestra en las Figuras 1A, 1B y 2, el método 100 puede comprender además la etapa S170, que relata procesar la muestra de ácido nucleico. Procesar puede comprender amplificar el (los) ácido(s) nucleico(s) de la muestra de ácido nucleico (p.ej., por reacción de cadena polimerasa), o cualquier otro método adecuado para procesar ácidos nucleicos. En cualquiera de los métodos para procesar ácidos nucleicos, la etapa S170 puede comprender además tamponar la muestra de ácido nucleico, por ejemplo, para neutralizar el pH de la disolución de elución en la etapa S160, o combinar la muestra de ácido nucleico con inhibidores de nucleasa (p.ej., TCEP, b-mercaptoetanol, DTT, EDTA, SDS, LDS) para facilitar el almacenamiento a largo plazo de la muestra de ácido nucleico. En una variación, la muestra de ácido nucleico eluido desde las micropartículas puede aspirarse (p.ej., mediante una punta de pipeta o por un sistema de manejo de fluidos) en otra cámara de proceso y combinarse con reactivos de proceso para el procesado adicional y la caracterización. En un ejemplo específico de esta variación, un sistema (tal como el descrito en la Publicación de patente de EE.UU. núm. 2013/210.127, titulado "System and Method for Processing and Detecting Nucleic Acids") puede usarse para aspirar la muestra de ácido nucleico desde una ruta fluidica de un cartucho (tal como el descrito en la Publicación de patente de EE.UU. núm. 2013/210.125, titulada "Microfluidic Cartridge for Processing and Detecting Nucleic Acids"), mientras que las micropartículas se inmovilizan mediante un imán. El sistema puede combinar entonces la muestra de ácido nucleico con reactivos de proceso (p.ej., reactivos de PCR) en un recipiente separado (p.ej., placa de ensayo), y después transferir la muestra de ácido nucleico combinado con reactivos de proceso a una cámara de detección de la ruta fluidica (tras la oclusión y/o apertura del canal fluidico a otro subconjunto de las posiciones de oclusión). La muestra de ácido nucleico combinada con reactivos de proceso puede entonces procesarse en una cámara diagnóstica que está acoplada a la ruta fluidica.

Como un experto en la técnica reconocerá a partir de la descripción detallada anterior y a partir de las figuras y reivindicaciones, pueden hacerse modificaciones y cambios a las realizaciones del método 100 sin separarse del alcance del método 100.

2. Restos de afinidad de ejemplo

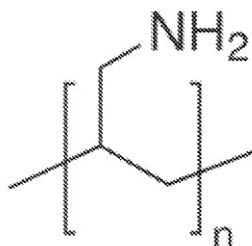
Las moléculas de ácido nucleico están típicamente cargadas de forma negativa en condiciones estándar de procesado. En dichos procesos, los restos cargados de forma positiva pueden capturar y retener las moléculas de ácido nucleico cargadas de forma negativa; sin embargo, los restos cargados de forma positiva pueden unirse de forma demasiado fuerte con los ácidos nucleicos unidos llevando a un proceso irreversible por el que el ácido nucleico unido no puede

liberarse en la disolución para el procesado/análisis adicional. Dos nuevas moléculas que son capaces de unir ácido nucleico de manera reversible se describen a continuación, en donde la unión reversible se modula cambiando el pH del medio.

2.1 Poli(alilamina)

- 5 La poli(alilamina), o PAA, es un polielectrolito catiónico preparado mediante la polimerización de alilamina. La alilamina es un compuesto orgánico con la fórmula $C_3H_5NH_2$.

Una molécula de PAA ejemplar tiene la siguiente fórmula:

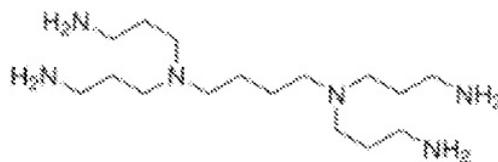


- 10 La PAA es típicamente una molécula lineal que consiste en unidades de repetición de alilamina; sin embargo, formulaciones alternativas de PAA pueden mostrar alguna ramificación. En una realización de una nueva formulación de PAA, se sintetiza un amplio intervalo de pesos moleculares de PAA y se utilizan en una realización controlando el grado de polimerización durante la síntesis de la PAA. Debido a su fuerte afinidad por el ácido nucleico, la PAA de longitudes significativamente más largas (pesos moleculares mayores que 30.000 Da) pueden unirse a ácidos nucleicos diana demasiado fuertemente dando por resultado la liberación ineficaz del ácido nucleico diana unido. Por consiguiente, la PAA de pesos moleculares menores que 30.000 Da son preferibles y pueden sintetizarse controlando el grado de polimerización (p.ej., por reacciones de terminación de cadena, por reacciones de transferencia de cadena, por reacciones de escisión de cadena). Sin embargo, la unión fuerte inducida por PAA con pesos moleculares mayores que 30.000 Da puede atenuarse por medio del uso de disoluciones de elución más fuertes (p.ej., disoluciones de elución con un pH de 14). La PAA puede actuar como un inhibidor de reacciones enzimáticas, debido a su fuerte propensión a unirse a ácidos nucleicos y otras especies cargadas de forma negativa. Por consiguiente, es preferible que la PAA no esté en disolución con el ácido nucleico durante el análisis, por ejemplo, durante el procesado de la muestra de ácido nucleico en la etapa S170 como se describe en la sección 1 anterior.

2.2 Dendrímero de polipropilamina tetramina

- 25 El dendrímero de polipropilamina tetramina de Generación 1, o DABAM de Generación 1, es un dendrímero polielectrolito catiónico. Los dendrímeros son moléculas repetitivamente ramificadas. Un dendrímero es típicamente simétrico alrededor de un núcleo, y a menudo adopta una estructura tridimensional esférica.

Una molécula de DABAM ejemplar tiene la siguiente fórmula:



- 30 DABAM es típicamente una molécula lineal con la fórmula $[-CH_2CH_2N(CH_2CH_2CH_2NH_2)_2]_2$. Las realizaciones de ejemplo de DABAM adecuadas para usar en los métodos descritos en la presente memoria se sintetizan y se utilizan en una variación controlando la formación del dendrímero durante la síntesis. Debido a su fuerte afinidad por ácidos nucleicos, el DABAM de generaciones significativamente mayores (p.ej., más allá de la Generación 2) pueden unirse al ácido nucleico demasiado fuertemente dando por resultado la liberación ineficaz de los ácidos nucleicos unidos. Por consiguiente, los DABAM de generación menor que 2 son preferibles y pueden sintetizarse controlando el grado de polimerización del dendrímero (p.ej., por reacciones de terminación de cadena, por reacciones de transferencia de cadena, por reacciones de escisión de cadena). Sin embargo, la unión fuerte inducida por DABAM de generación mayor que o igual a 2 puede atenuarse por medio del uso de disoluciones de elución más fuertes (p.ej., disoluciones de elución con un pH de 14). Además, el DABAM puede actuar como un inhibidor de reacciones enzimáticas, debido a su fuerte propensión a unirse a ácidos nucleicos y otras especies cargadas de forma negativa. Por consiguiente, es preferible que el DABAM no se encuentre en disolución con el ácido nucleico durante el análisis, por ejemplo, durante el procesado de la muestra de ácido nucleico en la etapa S170 como se describe en la sección 1 anterior.

2.3 Materiales de soporte

Los restos de afinidad, tales como la PAA y el DABAM descritos en la sección 2.1 y 2.2, pueden inmovilizarse en un sustrato adecuado para facilitar la posterior captura de ácidos nucleicos diana unidos al sustrato (p.ej., por separación magnética, separación basada en el tamaño, separación basada en la densidad, o enfoque). Un proceso para acoplar el resto de afinidad al sustrato se basa principalmente en la creación de un enlace covalente entre el resto de afinidad y la micropartícula, y en una variación como se describe a continuación, un grupo ácido carboxílico (-COOH) puede usarse para formar el enlace covalente entre las micropartículas y los restos de afinidad.

Como se muestra en la Figura 3, un método 200 para acoplar las micropartículas con los restos de afinidad comprende activar las micropartículas carboxiladas con EDAC S210 para formar un conjunto de compuestos de micropartícula-éster reactivo; tratar el conjunto de compuestos de micropartícula-éster reactivo con una N-hidroxisuccinimida para formar un conjunto de compuestos de micropartícula-éster reactivo de amina S220; combinar el conjunto de compuestos de micropartícula-éster reactivo de amina con un conjunto de restos de afinidad seleccionados del grupo que comprende PAA y DABAM S230 para producir una disolución de micropartícula-resto; y lavar la disolución de micropartícula-resto, produciendo así un conjunto de micropartículas unidas de forma covalente al conjunto de restos de afinidad mediante enlaces amida S240. El método 200 sirve para producir un conjunto de micropartículas unidas al resto para el aislamiento de ácido nucleico. Preferiblemente, las micropartículas son magnéticas para facilitar el aislamiento del ácido nucleico por separación magnética; sin embargo, las micropartículas pueden caracterizarse de forma alternativa por cualquier característica adecuada que facilite el aislamiento de ácido nucleico, como se describe anteriormente en la sección 1.

En un ejemplo específico, como se muestra en la Figura 3, el método 200 comprende activar las micropartículas carboxiladas magnéticas con EDAC en la etapa S110 para formar un conjunto de compuestos de micropartícula magnética-éster reactivo; tratar el conjunto de compuestos de micropartícula magnética-éster reactivo con una N-hidroxisulfosuccinimida para formar un conjunto de compuestos de micropartícula-éster reactivo de amina S220; combinar el conjunto de compuestos de micropartícula-éster reactivo de amina con un conjunto de restos de afinidad seleccionados del grupo que comprende PAA de peso molecular menor que 30.000 Da y DABAM de generación menor que dos S230 para producir una disolución de micropartícula-resto; y lavar de forma repetida la disolución micropartícula-resto, produciendo así un conjunto de micropartículas magnéticas unidas de forma covalente al conjunto de restos de afinidad mediante enlaces amida S240.

Otras variaciones y ejemplos del método 200 pueden comprender realizar las etapas del método 200 de forma simultánea y/o en cualquier orden adecuado, y usar cualquier componente alternativo adecuado para formar enlaces entre las micropartículas y los restos de afinidad.

3. Ejemplos representativos y resultados del método

Las secciones 3.1-3.17 describen ejemplos representativos de métodos de aislamiento de ADN y ARN a partir de múltiples fuentes. Los reactivos específicos usados en los ejemplos representativos, que incluyen disoluciones de restos de unión, disoluciones de lavado y disoluciones de elución, se describen en la sección 4 posterior.

3.1 Método de aislamiento de ARN representativo y resultados: Ejemplo 1

Un primer ejemplo del método 100 comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, fluido cerebroespinal (CSF) como una muestra biológica representativa, y partículas víricas de Enterovirus (EV) como la diana modelo. En el primer ejemplo, se añadieron 200 µL de CSF con 2 µL de lisato de partículas víricas de EV y después se mezclaron con 500 µL de tampón de recogida 1 (CBR-1) de ARN y 300 µL de agua libre de nucleasa en los ejemplos de las etapas S110 y S120. Como comparación, una cantidad similar de lisato de partículas de EV se añadió en una disolución de 1 mL comprendida por 500 µL de tampón CBR-1 y 500 µL de agua libre de nucleasa y se procesó de forma simultánea. En un ejemplo de la etapa S130, se dejó que el ARN se uniera a los restos de afinidad PAA recubiertos en las micropartículas magnéticas durante 10 minutos a 60°C. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ARN unido se lavaron dos veces (2X) con 500 µL de disolución de WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150 y el ARN capturado se eluyó de la matriz de afinidad usando ELU-2 a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. El ARN aislado se eluyó en 10 µL de ELU-2 y 8 µL del eluido se usaron para RT-PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como se muestra en la Figura 4, los resultados del aislamiento de ARN como se elucida por el ensayo de RT-PCR de Enterovirus en tiempo real indican que el proceso de aislamiento de ARN es sustancialmente igualmente eficiente en la matriz de la muestra biológica en comparación con una muestra de tampón sencillo. Esto indica que el método de ejemplo 100 y los reactivos de aislamiento de ácido nucleico son eficaces en la captura, liberación y limpieza del ARN diana en la matriz CSF en el primer ejemplo.

3.2 Método de aislamiento de ARN representativo y resultados: Ejemplo 2

Un segundo ejemplo del método 100 comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, medio de transporte M4 que contiene un frotis nasal (donante) como una muestra biológica representativa, y partículas víricas de Enterovirus (EV) como la diana modelo. En el segundo ejemplo, 500 µL de medios de transporte M4 que contenían un frotis nasal (donante) se añadieron con 2 µL de o una dilución de 10^{-2} (alta) o una dilución de 10^{-4} (baja) de ARN de EV (purificado desde 200 µL de lisato de partículas víricas y eluido en 20 µL de volumen total) y

después se mezclaron con 500 μ L de tampón de recogida 1 (CBR-1) de ARN y 0,4 mg de proteinasa K en los ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que el ARN se uniera a los restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas durante 10 minutos a 60°C en un ejemplo de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ARN unido se lavaron dos veces (2X) con 250 μ L de disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150, y el ARN capturado se eluyó desde la matriz de afinidad usando ELU-2 a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. El ARN se eluyó entonces en 10 μ L de ELU-2 y 8 μ L del eluido se usaron para RT-PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como comparación, una cantidad similar de ARN de EV se usó directamente en RT-PCR en tiempo real tanto a niveles de entrada bajos como altos como una referencia, que correlacionaría con una eficiencia de extracción del 100%. Como se muestra en la Figura 5, los resultados del aislamiento de ARN como se elucida por un ensayo de RT-PCR de Enterovirus en tiempo real indican que el proceso de aislamiento de ARN es eficiente en la matriz de muestra biológica en comparación con las muestras de control de PCR de entrada que no se sometieron al proceso completo de extracción. Un pequeño desplazamiento en la amplificación de las muestras extraídas no indica necesariamente una pérdida en la eficiencia de extracción o sensibilidad. Esto indica que el método de ejemplo 100 y los reactivos de aislamiento de ácido nucleico son eficaces en la captura, liberación y limpieza del ARN diana en la matriz de medios de transporte M4.

3.3 Método de aislamiento de ARN representativo y resultados: Ejemplo 3

Un tercer ejemplo del método 100 comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, medio de transporte universal (UTM) que contiene un frotis nasal (donante) como una muestra biológica representativa, y partículas víricas de Enterovirus (EV) como la diana modelo. En el tercer ejemplo, 500 μ L de medios de transporte UTM que contenían un frotis nasal (donante) se añadieron con 2 μ L de una dilución 10^{-4} de ARN de EV (purificado a partir de 200 μ L de lisato de partículas víricas y eluido en 20 μ L de volumen total) y después se mezclaron con 500 μ L de tampón de recogida 1 (CBR-1) de ARN y 0,6 mg de proteinasa K en los ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que se uniera el ARN a las partículas de afinidad PAA recubiertas en micropartículas magnéticas durante 10 minutos a 60°C en un ejemplo de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ARN unido se lavaron dos veces (2X) con 100 μ L o 250 μ L de disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150 y el ARN capturado se eluyó desde la matriz de afinidad usando ELU-2 a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. El ARN se eluyó en 10 μ L de ELU-2 y 8 μ L del eluido se usaron para RT-PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa 170. Como comparación, una cantidad similar de ARN de EV se usó directamente en RT-PCR en tiempo real como una referencia, que correlacionaría con una eficiencia de extracción del 100%. Como se muestra en la Figura 6, los resultados del aislamiento de ARN como se elucida por un ensayo de RT-PCR de Enterovirus en tiempo real indican que el proceso de aislamiento de ARN es eficiente en la matriz de muestra biológica en comparación con las muestras de control de PCR de entrada que no se sometieron al proceso de extracción completo. Esto indica que el método de ejemplo 100 y los reactivos de aislamiento de ácido nucleico son eficaces en la captura, liberación y limpieza del ARN diana en la matriz de medios de transporte UTM.

3.4 Método de aislamiento de ARN representativo y resultados: Ejemplo 4

Un cuarto ejemplo del método 100 comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, medio de transporte M4 que contiene frotis nasal (donante) como una muestra biológica representativa, y partículas víricas de Enterovirus (EV) como la diana modelo. En el cuarto ejemplo, se añadieron 500 μ L de medios de transporte M4 que contenían un frotis nasal (donante) con 2 μ L de diluciones de diez veces de lisato de partícula vírica de EV y después se mezclaron con 500 μ L de tampón de recogida 1 (CBR-1) de ARN y 0,4 mg de proteinasa K en los ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que se uniera el ARN a los restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas durante 10 minutos a 60°C en un ejemplo de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ARN unido se lavaron dos veces (2X) con 100 μ L de disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150, y el ARN capturado se eluyó de la matriz de afinidad usando ELU-2 a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. El ARN se eluyó en 10 μ L de ELU-2 y 2 μ L del eluido se usaron para el RT-PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como se muestra en la Figura 7, los resultados del aislamiento de ARN como se elucidan por un ensayo de RT-PCR de Enterovirus en tiempo real indican que el proceso de aislamiento de ARN es eficiente en la matriz de la muestra biológica como se demuestra por la curva estándar generada a partir de los valores Ct de RT-PCR obtenidos de las muestras extraídas diluidas en serie. Esto indica que el método de ejemplo 100 y el proceso de extracción de ácido nucleico de ARN en los medios de transporte UTM son tanto eficientes como sensibles, con un amplio intervalo dinámico.

En otras variaciones de los ejemplos primero a cuarto que implican extracciones de ARN, el método del ejemplo 100 puede comprender cualquier combinación adecuada de: añadir guanidina a un tampón de lisis de ARN (p.ej., GuSCN 50 mM), añadir guanidina a un tampón de extracción del frotis (p.ej., GuHCl 2M, GuHCl 2,5 M), proporcionar cualquier tampón de lisis adecuado (p.ej., TRIS 50 mM pH 7 con Tritón X al 1%, EDTA 50 mM, y GuHCl 2M; Tris 1 mM pH 8 en Tritón X al 1% y EDTA 100 mM), unir ARN a micropartículas recubiertas con resto de afinidad a cualquier temperatura adecuada (p.ej., 37-60°C durante hasta 10 minutos), usar cualquier cantidad adecuada (p.ej., 7,5 μ g) de ARNt durante la lisis, usar muestras frescas o congeladas, proporcionar cualquier condición de lavado adecuada (p.ej., 1x de lavado salino, 1x de lavado salino + 1x de lavado de TRIS 1mM pH 8), proporcionar cualquier condición de unión adecuada (p.ej., 2x de unión de TRIS 1mM pH 8 a 37°C, 2x de TRIS 1mM pH 8 a 60°C), eluir con cualquier condición de elución

adecuada (p.ej., temperatura ambiente a 85°C, 1 minuto-10 minutos), proporcionar cualquier composición adecuada de una disolución de elución (p.ej., NaOH 20 mM, NaOH 40 mM, KOH), y usar cualquier mezcla de PCR adecuada para las extracciones de EV.

3.5 Método de aislamiento de ADN representativo y resultados: Ejemplo 5

5 Un quinto ejemplo del método 100 comprende usar restos de afinidad DABAM recubiertos en micropartículas magnéticas, orina humana (donante), plasma humano y frotis bucal (donante) como matrices de muestra biológica representativa, y ADN de *Streptococo* del grupo B (GBS) (ATCC, Virginia) como la diana modelo. En el quinto ejemplo, se añadieron 500 µL de orina o plasma con 10 pg de ADN de GBS y después se mezclaron con 500 µL de tampón de recogida 2 (CBD-2) de ADN en ejemplos de las etapas S110 y S120. De forma alternativa, se añadió un frotis bucal a 1 mL de tampón de recogida 1 (CBD-1) de ADN que contenía 0,4 mg de proteínaasa K y después se añadieron con 10 pg de ADN de GBS en otros ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que se uniera el ADN a los restos de afinidad DABAM recubiertos en micropartículas magnéticas durante 10 minutos a temperatura ambiente o 60°C dependiendo de la matriz usada en los ejemplos de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ADN unido se lavaron con 500 µL de disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150, y el ADN capturado se eluyó desde la matriz de afinidad usando ELU-1 y calentando las micropartículas a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. El ADN se eluyó en 10 µL de ELU-1 y 8 µL del eluido se usaron para PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como comparación, una cantidad similar de ADN de GBS se usó directamente en PCR en tiempo real como referencia, que correlacionaría con una eficiencia de extracción del 100%. Como se muestra en la Figura 8, los resultados del aislamiento de ADN como se elucidan por un ensayo de PCR en tiempo real de GBS indican que el proceso de aislamiento de ADN es eficiente en las matrices de muestras biológicas en comparación con las muestras de control de PCR de entrada que no se sometieron al proceso completo de extracción. Un pequeño desplazamiento en la amplificación de las muestras extraídas no indica necesariamente una pérdida en la eficiencia de extracción o sensibilidad. Esto indica que el método de ejemplo 100 y los reactivos de aislamiento del ácido nucleico son eficaces en la captura, liberación y limpieza del ADN diana en matrices de orina, plasma y frotis.

3.6 Método de aislamiento de ADN representativo y resultados: Ejemplo 6

Un sexto ejemplo del método 100 comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, orina humana (donante) como una muestra biológica representativa, y ADN de *Streptococo* del grupo B (GBS) como la diana modelo. En el sexto ejemplo, se añadieron 500 µL de orina (obtenida del donante) con 10 pg de ADN de GBS y después se mezclaron con 500 µL de tampón de recogida 2 (CBD-2) de ADN en los ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que se uniera el ADN a los restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas durante 10 minutos a temperatura ambiente en un ejemplo de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ADN unido se lavaron con 500 µL de disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150 y el ADN capturado se eluyó de la matriz de afinidad usando ELU-2 y calentando las micropartículas a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. El ADN se eluyó en 10 µL de ELU-2 y 2 µL del eluido se usaron para PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como comparación, una cantidad similar de ADN de GBS se usó directamente en PCR en tiempo real como una referencia que correlacionaría con una eficiencia de extracción del 100%. Como se muestra en la Figura 9, los resultados del aislamiento de ADN como se elucidan por un ensayo de PCR en tiempo real de GBS indican que el proceso de aislamiento de ADN es eficiente en la matriz de muestra biológica en comparación con la muestra de control de PCR de entrada que no se sometió al proceso completo de extracción. Un pequeño desplazamiento en la amplificación de las muestras extraídas no necesariamente indica una pérdida en la eficiencia de extracción o sensibilidad. Esto indica que el método de ejemplo 100 y los reactivos de aislamiento del ácido nucleico son eficaces en la captura, liberación y limpieza del ADN diana en matriz de orina.

3.7 Método de aislamiento de ADN representativo y resultados: Ejemplo 7

Un séptimo ejemplo del método 100 comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, plasma humano (donante, obtenido de Bioreclamation, Inc.) como una muestra biológica representativa y ADN de *Streptococo* del grupo B (GBS) como la diana modelo. En el séptimo ejemplo, se añadieron 500 µL de plasma con 10 pg de ADN de GBS y después se mezclaron con 500 µL de tampón de recogida 2 (CBD-2) de ADN en ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que se uniera el ADN a los restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas durante 10 minutos a temperatura ambiente en un ejemplo de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ADN unido se lavaron con 500 µL de disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150 y el ADN capturado se eluyó de la matriz de afinidad usando ELU-2 y calentando las micropartículas magnéticas a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. El ADN se eluyó en 10 µL de ELU-2 y 2 µL del eluido se usaron para PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como comparación, una cantidad similar de ADN de GBS se usó directamente en PCR en tiempo real como una referencia, que correlacionaría con una eficiencia de extracción del 100%. Como se muestra en la Figura 10, los resultados del aislamiento de ADN como se elucidan por un ensayo de PCR en tiempo real de GBS indican que el proceso de aislamiento de ADN es eficiente en la matriz de muestra biológica en comparación con la muestra de control de PCR de entrada que no se sometió al proceso de extracción completo. Un pequeño

desplazamiento en la amplificación de las muestras extraídas no indica necesariamente una pérdida en la eficiencia de extracción o sensibilidad. Esto indica que el método de ejemplo 100 y los reactivos de aislamiento del ácido nucleico son eficaces en la captura, liberación y limpieza del ADN diana en la matriz de plasma.

3.8 Método de aislamiento de ADN representativo y resultados: Ejemplo 8

5 Un ejemplo octavo del método 100 comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, muestras de frotis simulados como una muestra biológica representativa y ADN de estreptococo del Grupo B (GBS) como la diana modelo. En el octavo ejemplo, se añadió un frotis bucal (obtenido de un donante) a 1 mL de tampón de recogida 1 (CBD-1) de ADN que contenía 0,4 mg de proteinasa K y después se añadió con 10 pg de ADN de GBS en los ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que se uniera el ADN a los restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas durante 10 minutos a 37°C en un ejemplo de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ADN unido se lavaron con 500 µL de disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150, y el ADN capturado se eluyó desde la matriz de afinidad usando ELU-2 y calentando las micropartículas a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. El ADN se eluyó en 10 µL de ELU-2 y 2 µL del eluido se usaron para PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como comparación, una cantidad similar de ADN de GBS se usó directamente en PCR en tiempo real como una referencia, que correlacionaría con una eficiencia de extracción del 100%. Como se muestra en la Figura 11, los resultados del aislamiento de ADN como se elucida por un ensayo de PCR en tiempo real de GBS indican que el proceso de aislamiento de ADN es eficiente en la matriz de muestra biológica en comparación con la muestra de control de PCR de entrada que no se sometió al proceso de extracción completa. Un pequeño desplazamiento en la amplificación de las muestras extraídas no indica necesariamente una pérdida en la eficiencia de extracción o sensibilidad. Esto indica que el método de ejemplo 100 y los reactivos de aislamiento del ácido nucleico son eficaces en la captura, liberación y limpieza del ADN diana en una matriz de frotis simulado.

3.9 Método de aislamiento de ADN representativo y resultados: Ejemplo 9

25 Un noveno ejemplo del método 100 comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, muestras de medios de transporte de frotis simulados como muestras biológicas representativas y ADN de estreptococo del grupo B (GBS) como la diana modelo. En el noveno ejemplo se añadieron 500 µL de medios de transporte M4 (M4) o medios de transporte universal (UTM) que contenían un frotis bucal (obtenido de un donante) con 10 pg de ADN de GBS y después se mezclaron con 500 µL de tampón de recogida 3 (CBD-3) de ADN y 0,4 mg de proteinasa K en los ejemplos de las etapas S110 y S120. Para la comparación, se prepararon muestras de "frotis seco" añadiendo un frotis bucal a 1 mL de tampón de recogida 1 (CBD-1) de ADN que contenía 0,4 mg de proteinasa K y después se añadió con 10 pg de ADN de GBS. Se dejó que se uniera el ADN a los restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas durante 10 minutos a 37°C en un ejemplo de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante unido en un ejemplo de la Etapa S140, las micropartículas magnéticas con ADN unido se lavaron con 500 µL de disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150 y el ADN capturado se eluyó desde la matriz de afinidad usando ELU-2 y calentando las micropartículas a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. El ADN se eluyó en 10 µL de ELU-2 y 2 µL del eluido se usaron para PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como comparación, una cantidad similar de ADN de GBS se usó directamente en PCR en tiempo real como una referencia, que correlacionaría con una eficiencia de extracción del 100%. Como se muestra en la Figura 12, los resultados del aislamiento de ADN como se elucidan por un ensayo de PCR en tiempo real de GBS indican que el proceso de aislamiento de ADN es eficiente en las matrices de muestra biológica en comparación con la muestra de control de PCR de entrada que no se sometió al proceso de extracción completo. Un pequeño desplazamiento en la amplificación de las muestras extraídas no necesariamente indica una pérdida en la eficiencia de extracción o sensibilidad. Esto indica que el método de ejemplo 100 y los reactivos de aislamiento del ácido nucleico son eficaces en la captura, liberación y limpieza del ADN diana en matrices de medios de transporte de frotis simulado.

45 3.10 Método de aislamiento de ADN representativo y resultados: Ejemplo 10

Un décimo ejemplo del método 100 comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, sangre completa como una muestra biológica representativa y ADN de Estreptococo del grupo B (GBS) como la diana modelo. En el décimo ejemplo, se añadieron 100 µL de sangre completa (donante, obtenida de Bioreclamation, Inc.) a 1 mL de tampón de recogida 1 (CBD-1) de ADN que contenía 0,4 mg de proteinasa K y después de añadió con 10 pg de ADN de GBS en los ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que se uniera el ADN a los restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas durante 10 minutos a 37°C en un ejemplo de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ADN unido se lavaron dos veces con 500 µL de disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150, y el ADN capturado se eluyó desde la matriz de afinidad usando ELU-2 y calentando las micropartículas a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. Se eluyó el ADN en 25 µL de ELU-2 y 8 µL del eluido se usaron para PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como comparación, una cantidad similar de ADN de GBS se usó directamente en PCR en tiempo real como una referencia que correlacionaría con una eficiencia de extracción del 100%. Como se muestra en la Figura 13, los resultados del aislamiento de ADN como se elucidan mediante un ensayo de PCR en tiempo real de GBS indican que el proceso de aislamiento de ADN es eficiente en la matriz de muestra biológica en comparación con la muestra de control de PCR de entrada que no se sometió al proceso de extracción

completo. Un pequeño desplazamiento en la amplificación de las muestras extraídas no indica necesariamente una pérdida en la eficiencia de extracción o sensibilidad. Esto indica que el método de ejemplo 100 y los reactivos de aislamiento del ácido nucleico son eficaces en la captura, liberación y limpieza del ADN diana en una matriz de sangre completa.

- 5 En otras variaciones del décimo ejemplo, el método de ejemplo 100 puede comprender cualquier combinación adecuada de: pre-lisis de proteinasa K con cualquier concentración adecuada de NaCl (p.ej., 200 mM, 500 mM, 750 mM, 1 M), proporcionar un tampón de lisis con cualquier concentración adecuada de EDTA y/o TRIS (p.ej., TRIS 50 mM, EDTA 50 mM), proporcionar una disolución de lisis con cualquier cantidad adecuada de proteinasa K (p.ej., +/- 20-40 μ L de 20 mg/mL de proteinasa K), cualquier otra cantidad adecuada de muestra de sangre (p.ej., 10 μ L, 25 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 250 μ L, 500 μ L), cualquier otra concentración adecuada de NaOH (p.ej., 20 mM, 40 mM) en una disolución de elución, cualquier cantidad adecuada (p.ej., 30-45 μ L) de restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas, filtración de la muestra de sangre, cualquier número adecuado de etapas de lavado (p.ej., 1 lavado, 2 lavados) y congelar y/o descongelar la muestra de sangre.

3.11 Método de aislamiento de ADN representativo y resultados: Ejemplo 11

- 15 Un ejemplo decimoprimer del método 100 comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, orina (donante) como una muestra biológica representativa y ADN de estreptococo del grupo B (GBS) como la diana modelo. En el ejemplo decimoprimer, se añadieron 500 μ L de orina (obtenida de un donante) con diluciones en una serie de diez veces de ADN de GBS desde 1 ng a 10 fg y después se mezclaron con 500 μ L de tampón de recogida 2 (CBR-2) de ADN en los ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que se uniera el ADN a los restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas durante 10 minutos a temperatura ambiente en un ejemplo de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ADN unido se lavaron con 500 μ L de disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150, y el ADN capturado se eluyó de la matriz de afinidad usando ELU-2 a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. Se eluyó ADN en 10 μ L de ELU-2 y 2 μ L del eluido se usaron para PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como se muestra en la Figura 14, los resultados del aislamiento de ADN como se elucidan por un ensayo de PCR de GBS en tiempo real indican que el proceso de aislamiento de ADN es eficiente en la matriz de muestra biológica como se demuestra por la curva estándar generada a partir de los valores Ct de PCR obtenidos de las muestras extraídas diluidas en serie. Esto indica que el método de ejemplo 100 y el proceso de extracción de ácido nucleico de ADN en una matriz de orina es tanto eficiente como sensible, con un intervalo dinámico ancho.
- 25
- 30 En otras variaciones del ejemplo decimoprimer, el método de ejemplo 100 puede comprender cualquier combinación adecuada de: proporcionar una disolución de lisis con cualquier cantidad adecuada de proteinasa K (p.ej., 20-40 μ L de 20 mg/mL de proteinasa K) y proporcionar cualquier disolución de lavado adecuada (p.ej., TRIS 1 mM, pH, NaCl 150 mM).

3.12 Método de aislamiento de ADN representativo y resultados: Ejemplo 12

- 35 Un decimosegundo ejemplo del método 100 comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, plasma (donante) como una muestra biológica representativa, y ADN de estreptococo del grupo B (GBS) como la diana modelo. En el decimosegundo ejemplo, se añadieron 500 μ L de plasma con diluciones en una serie de diez veces de ADN de GBS desde 1 ng a 10 fg y después se mezclaron con 500 μ L de tampón de recogida 2 (CBR-2) de ADN en ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que se uniera el ADN a los restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas durante 10 minutos a temperatura ambiente en un ejemplo de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ADN unido se lavaron con 500 μ L de disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150, y el ADN capturado se eluyó desde la matriz de afinidad usando ELU-2 a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. El ADN se eluyó en 10 μ L de ELU-2 y 2 μ L del eluido se usaron para PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como se muestra en la Figura 15, los resultados del aislamiento de ADN como se elucidan mediante un ensayo de PCR de GBS en tiempo real indican que el proceso de aislamiento de ADN es eficiente en la matriz de muestra biológica como se demuestra por la curva estándar generada desde los valores Ct de PCR obtenida a partir de las muestras extraídas diluidas en serie. Esto indica que el método de ejemplo 100 y el proceso de extracción del ácido nucleico de ADN en una matriz de orina es tanto eficiente como sensible, con un amplio intervalo dinámico.
- 45

3.13 Método de aislamiento de ADN representativo y resultados: Ejemplo 13

- Un ejemplo decimotercero del método 100, que demuestra el efecto del tiempo de unión, comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, plasma humano (donante) como una muestra biológica representativa y ADN de estreptococo del Grupo B (GBS) (ATCC, Virginia) como la diana modelo. En el ejemplo decimotercero, se añadieron 500 μ L de plasma con 10 pg de ADN de GBS y después se mezclaron con 500 μ L de tampón de recogida 2 (CBD-2) de ADN en los ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que se uniera el ADN a los restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas durante 0, 2, 5 o 10 minutos a temperatura ambiente en los ejemplos de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ADN unido se lavaron con 500 μ L de disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150, y el ADN capturado se eluyó de la matriz de afinidad usando ELU-2 y calentando las micropartículas a
- 55

85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. Se eluyó el ADN en 10 µL de ELU-2 y 8 µL del eluido se usaron para PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como se muestra en la Figura 16, los resultados del aislamiento de ADN como se elucidan por un ensayo de PCR en tiempo real de GBS indican que los reactivos de aislamiento de AN son eficaces en la captura, liberación y limpieza del ADN diana en la matriz de plasma a tiempos de unión a o por encima de dos minutos en el método de ejemplo 100.

3.14 Método de aislamiento de ADN representativo y resultados: Ejemplo 14

Un ejemplo decimocuarto del método 100, que demuestra el efecto de la temperatura de unión, comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, plasma humano (donante) como una muestra biológica representativa y ADN de estreptococo del grupo B (GBS) (ATCC, Virginia) como la diana modelo. En el ejemplo decimocuarto, se añadieron 500 µL de plasma con 10 pg de ADN de GBS y se mezclaron después con 500 µL de tampón de recogida 2 (CBD-2) de ADN en los ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que se uniera el ADN a los restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas durante 10 minutos a temperatura ambiente, 37°C, 45°C o 60°C en los ejemplos de las etapas S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ADN unido se lavaron con 500 µL de disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150 y el ADN capturado se eluyó de la matriz de afinidad usando ELU-2 y calentando las micropartículas a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. Se eluyó el ADN en 10 µL de ELU-2 y 8 µL del eluido se usaron para PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como una comparación, una cantidad similar de ADN de GBS se usó directamente en PCR en tiempo real como una referencia, que correlacionaría con una eficiencia de extracción del 100%. Como se muestra en la Figura 17, los resultados del aislamiento de ADN como se elucidan por un ensayo de PCR en tiempo real de GBS indican que el método de ejemplo 100 y los reactivos de aislamiento del ácido nucleico son eficaces en la captura, liberación y limpieza del ADN diana en la matriz de plasma a temperaturas de unión entre temperatura ambiente y 45°C.

Preferiblemente, las variaciones del método 100 para las extracciones de ácido nucleico en plasma comprenden eluir a un volumen de elución de 20 µL, proporcionar 40 µL de 20 mg/mL de proteinasa K en una disolución de lisis, proporcionar un lavado salino (p.ej., NaCl 150 mM en Tris 1 mM pH 8,0), usar AptaTaq polimerasa, y proporcionar un tiempo de elución más largo (p.ej., 5-10 minutos). Sin embargo, en otras variaciones de los ejemplos decimosegundo a decimocuarto, el método de ejemplo 100 puede comprender cualquier combinación adecuada de: usar cualquier volumen adecuado de una disolución de elución (p.ej., 10 µL-25 µL de disolución de elución), proporcionar cualquier composición adecuada de una disolución de elución (p.ej., NaOH 20 mM, NaOH 40 mM, KOH), proporcionar una disolución de lisis con cualquier cantidad adecuada de proteinasa K (p.ej., +/- 20-40 µL de 20 mg/mL de proteinasa K), usar cualquier polimerasa adecuada (p.ej., TAq Nativa, AptaTaq), usar plasma fresco o congelado, eluir a cualquier temperatura adecuada (p.ej., temperatura ambiente a 85°C), usar micropartículas magnéticas de cualquier hidrofiliicidad (p.ej., hidrófilas, hidrófobas), usar cualquier cantidad adecuada de resto de afinidad (p.ej., 100-300 µg de PAA) en cualquier volumen adecuado (p.ej., 30 µL), proporcionar cualquier disolución de lavado adecuada (p.ej., TRIS 1 mM pH 8 con NaCl 50-200 mM, KCl 200 mM en TRIS 10 mM pH 8, TRIS 10 mM pH 8 con tween al 0,1% y NaCl 1M, SDS al 0,5% en TRIS 1 mM pH 8, NaCl 200 mM en TRIS 1 mM pH 8), suspender de nuevo las micropartículas magnéticas en un tampón de liberación, no suspender de nuevo las micropartículas magnéticas en un tampón de liberación, y proporcionar cualquier temperatura de desnaturalización adecuada (p.ej., 85-95°C) y/o temperatura de hibridación (55-60°C) durante el procesado para PCR.

3.15 Método de aislamiento de ADN representativo y resultados: Ejemplo 15

Un ejemplo decimoquinto del método 100, que demuestra el efecto de la temperatura de unión, comprende usar restos de afinidad PAA recubierta en micropartículas magnéticas, orina (donante) como una muestra biológica representativa y ADN de estreptococos del grupo B (GBS) como la diana modelo. En el ejemplo decimoquinto, se añadieron 500 µL de orina (obtenida de un donante) con 10 pg de ADN de GBS y después se mezclaron con 500 µL de tampón de recogida 2 (CBD-2) de ADN en ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que se uniera el ADN a los restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas durante 10 minutos a temperatura ambiente, 37°C, 45°C o 60°C en ejemplos de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ADN unido se lavaron con 500 µL de disolución de WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150, y el ADN capturado se eluyó de la matriz de afinidad usando ELU-2 y calentando las micropartículas a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. El ADN se eluyó en 10 µL de ELU-2 y 8 µL del eluido se usaron para el PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como comparación, una cantidad similar de ADN de GBS se usó directamente en PCR en tiempo real como una referencia, que correlacionaría con una eficiencia de extracción del 100%. Como se muestra en la Figura 18, los resultados del aislamiento de ADN como se elucidan por un ensayo de PCR en tiempo real de GBS indican que el método de ejemplo 100 y los reactivos de aislamiento del ácido nucleico son eficaces en la captura, liberación y limpieza del ADN diana en la matriz de orina a temperaturas de unión entre la temperatura ambiente y 60°C.

En otras variaciones del ejemplo decimoquinto, el método de ejemplo 100 puede comprender cualquier combinación adecuada de: proporcionar una disolución de lisis con cualquier cantidad adecuada de proteinasa K (p.ej., +/- 20-40 µL de 20 mg/mL de proteinasa K) y proporcionar cualquier disolución de lavado adecuada (p.ej., TRIS 1 mM pH 8, NaCl 150 mM).

3.16 Método de aislamiento de ADN representativo y resultados: Ejemplo 16

Un ejemplo decimosexto del método 100, que demuestra el uso de dos disoluciones de elución diferentes, comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, orina humana (donante) como una muestra biológica representativa y ADN de estreptococo del grupo B (GBS) como la diana modelo. En el ejemplo decimosexto, se añadieron 500 µL de orina (obtenida del donante) con 10 pg de ADN de GBS y después se mezclaron con 500 µL de tampón de recogida 2 (CBD-2) de ADN en ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que se uniera el ADN a los restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas durante 10 minutos a temperatura ambiente en un ejemplo de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, las micropartículas magnéticas con ADN unido se lavaron con 500 µL de disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150 y el ADN capturado se eluyó de la matriz de afinidad usando ELU-2 o ELU-3 y calentando las micropartículas a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. El ADN se eluyó en 10 µL de ELU-2 o ELU-3 y 8 µL del eluido se usaron para PCR en tiempo real en un ejemplo de la etapa S170. Como comparación, una cantidad similar de ADN de GBS se usó directamente en PCR en tiempo real como una referencia, que correlacionaría con una eficiencia de extracción del 100%. Como se muestra en la Figura 19, los resultados del aislamiento de ADN como se elucidan mediante un ensayo de PCR en tiempo real de GBS indican que el proceso de aislamiento de ADN es eficiente en la matriz de muestra biológica en comparación con la muestra de control de PCR de entrada que no se sometió al proceso completo de extracción. Un pequeño desplazamiento en la amplificación de las muestras extraídas no necesariamente indica una pérdida en la eficiencia de extracción o sensibilidad. Esto indica que el método de ejemplo 100 y los reactivos de aislamiento del ácido nucleico son eficaces en la captura, liberación y limpieza del ADN diana en matriz de orina usando o NaOH o KOH.

En otras variaciones del ejemplo decimosexto, el método de ejemplo 100 puede comprender cualquier combinación adecuada de: proporcionar una disolución de lisis con cualquier cantidad adecuada de la proteinasa K (p.ej., +/- 20-40 uL de 20 mg/mL de proteinasa K) y proporcionar cualquier disolución de lavado adecuada (p.ej., TRIS 1 mM pH 8, NaCl 150 mM).

3.17 Método de aislamiento de ARN y ADN representativo y resultados: Ejemplo 17

Un ejemplo decimoséptimo del método 100, que demuestra el uso de reactivos de aislamiento del ácido nucleico para la extracción de ácido nucleico total (ANT), comprende usar restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas, medios de transporte M4 como una muestra biológica representativa, y partículas víricas de Enterovirus (EV) como la diana de ARN modelo y ADN de estreptococo del grupo B como diana de ADN modelo. En el ejemplo decimoséptimo, se añadieron 500 µL de M4 con diluciones en una serie de diez veces de 1 µL de lisato de partículas víricas de EV y 1 µL de ADN de GBS y después se mezclaron con 500 µL de tampón de recogida 3 (CBR-3) de ARN en ejemplos de las etapas S110 y S120. Se dejó que se unieran el ARN y el ADN a los restos de afinidad PAA durante 10 minutos a 37°C en un ejemplo de la etapa S130. Tras la eliminación del sobrenadante no unido en un ejemplo de la etapa S140, los restos de afinidad PAA recubiertos en micropartículas magnéticas se lavaron dos veces (2X) con 500 µL de la disolución WSH-1 en un ejemplo de la etapa S150, y después el ARN y ADN capturados se eluyeron de la matriz de afinidad usando ELU-2 a 85°C durante 3 minutos en un ejemplo de la etapa S160. El eluido se dividió y se usaron 2 µL para PCR en tiempo real para la diana de GBS o RT-PCR en tiempo real para la diana de ARN de EV en los ejemplos de la etapa S170. Como se muestra en la Figura 20, los resultados del aislamiento de ANT como se evidencian por curvas estándar producidas a partir de un ensayo de RT-PCR de Enterovirus en tiempo real y ensayo de GBS en tiempo real indican que el método de ejemplo 100 y el proceso de aislamiento del ácido nucleico es igualmente eficiente en la purificación de ARN o ADN de la misma muestra.

4. Reactivos de ejemplo usados en los métodos de ejemplo

Las siguientes formulaciones de reactivo de ejemplo se usaron en los ejemplos descritos en las secciones 3.1-3.17. Las cantidades en paréntesis que siguen a los nombres del componente indican cantidades usadas para formar un volumen de 1 litro de una respectiva formulación del reactivo.

Formulación de CBR-1 [tampón de TCEP 2X]: agua ultrapura (946 mL), Tris 1M pH 7,0 (20 mL), hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfina, o TCEP, (14,3 g), y Tritón-X 100 (20 mL).

Formulación de CBR-2 [tampón bajo en TCEP 2X] (1 L): agua ultrapura (959 mL), Tris 1M pH 8,0 (20 mL), TCEP (1,43 g), y Tritón-X 100 (20 mL).

CBR-3 [tampón de EDTA solo 2X]: agua ultrapura (560 mL), Tris 1M pH 8,0 (20 mL), EDTA 0,5M pH 8,0 (400 mL) y Tritón-X 100 (20 mL).

CBD-1 [SP1]: agua ultrapura (931 mL), Tris 1M pH 7,0 (50 mL), citrato sódico (5,88 g), ácido bórico (1,24 g), EDTA 0,5M pH 8,0 (2 mL) y Tritón-X 100 (10 mL).

CBD-2 [SP2]: agua ultrapura (480 mL), Tris 1M pH 7,0 (100 mL), citrato sódico (11,76 g), ácido bórico (2,48 g), EDTA 0,5M pH 8,0 (400 mL), y Tritón-X 100 (20 mL).

CBD-3 [SP3]: agua ultrapura (862 mL), Tris 1M pH 7,0 (100 mL), citrato sódico (11,76 g), ácido bórico (2,48 g), EDTA 0,5M pH 8,0 (4 mL), y Tritón-X 100 (20 mL).

CBD-4 [TT]: agua ultrapura (978 mL), Tris 1M pH 8,0 (2 mL), y Tritón-X 100 (20 mL).

Disolución de lavado [WSH-1]: agua ultrapura (999 mL) y Tris 1M pH 8,0 (1 mL).

5 Disolución de elución [ELU-1] – NaOH 20 mM: agua ultrapura (980 mL) y NaOH 1N (20 mL).

Disolución de elución [ELU-2] – NaOH 40 mM: agua ultrapura (960 mL) y NaOH 1N (40 mL).

Disolución de elución [ELU-3] – KOH 40 mM: agua ultrapura (960 mL) y KOH 1N (40 mL).

10 Los métodos 100, 200 y el sistema de la realización preferida y las variaciones de los mismos pueden expresarse y/o implementarse al menos en parte como una máquina configurada para recibir un medio legible por ordenador que almacena instrucciones legibles por ordenador. Las instrucciones se ejecutan preferiblemente mediante componentes ejecutables por ordenador preferiblemente integrados con el sistema y una o más porciones de un procesador y/o un controlador. El medio legible por ordenador puede almacenarse en cualquier medio legible por ordenador adecuado tal como RAM, ROM, memoria flash, EEPROM, dispositivos ópticos (CD o DVD), discos duros, unidades de disquete o cualquier dispositivo adecuado. El componente ejecutable por ordenador es preferiblemente un procesador general o específico de la aplicación, aunque cualquier dispositivo de hardware o combinación de hardware/firmware dedicado
15 adecuado puede ejecutar de forma alternativa o adicional las instrucciones.

20 Las figuras ilustran la arquitectura, funcionalidad y operación de posibles implementaciones de sistemas, métodos y productos de programas informáticos según las realizaciones preferidas, configuraciones de ejemplo y variaciones de los mismos. A este respecto, cada bloque en el diagrama de flujo o diagramas de bloque puede representar un módulo, segmento o parte de código, que comprende una o más instrucciones ejecutables para implementar la(s) función(ones) lógica(s) especificada(s). Debería anotarse también que, en algunas implementaciones alternativas, las funciones anotadas en el bloque pueden darse fuera del orden anotado en las figuras. Por ejemplo, dos bloques mostrados en sucesión pueden, de hecho, ejecutarse sustancialmente de forma simultánea, o los bloques pueden ejecutarse a veces en el orden inverso, dependiendo de la funcionalidad implicada. También se anotará que cada bloque de los diagramas
25 de bloque y/o ilustración del diagrama de flujo, y combinaciones de bloques en los diagramas de bloque y/o ilustración de diagrama de flujo, puede implementarse por sistemas basados en hardware para un propósito especial que realizan a las funciones o actos especificados, o combinaciones de hardware para un propósito especial e instrucciones informáticas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el aislamiento del ácido nucleico que comprende:

- 5 • Recibir una disolución de resto de unión en una cámara de proceso, en donde la disolución de resto de unión comprende un tampón de recogida y un conjunto de micropartículas magnéticas recubiertas con resto de afinidad modificadas con grupos funcionales carboxilo, en donde el conjunto de micropartículas magnéticas recubiertas con resto de afinidad comprenden el dendrímero de polipropileno tetramina (DABAM) (Generación 1) unido por amida al conjunto de micropartículas magnéticas por medio de los grupos funcionales carboxilo;
- 10 • Poner en contacto la disolución de resto de unión con una muestra biológica, en la cámara de proceso, produciendo así una mezcla de resto-muestra;
- 15 • Incubar la mezcla de resto-muestra para unir de forma reversible el material de ácido nucleico de la muestra biológica al conjunto de micropartículas recubiertas con resto de afinidad, produciendo así un conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto;
- Separar de forma magnética el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto de la mezcla de resto-muestra, en donde separar de forma magnética el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto comprende:
 - Ocluir una ruta fluidica de un cartucho microfluidico a un conjunto de posiciones de oclusión; y
 - Distribuir la mezcla de resto-muestra en la ruta fluidica, en donde la ruta fluidica se configura para pasar a través de un campo magnético;
- 20 • Lavar el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto; y
- Liberar una muestra de ácido nucleico del conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto con una disolución de elución caracterizada por un pH mayor que 10.

2. El método según la reivindicación 1, en donde recibir la disolución de resto de unión comprende recibir un conjunto de micropartículas magnéticas unidas de forma covalente a un conjunto de moléculas de resto de afinidad, en donde poner en contacto la disolución de resto de unión con la muestra biológica comprende aspirar la disolución de resto de unión junto con la muestra biológica desde la cámara de proceso y dispensar la disolución de resto de unión con la muestra biológica a la cámara de proceso, y en donde separar el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto de la mezcla de resto-muestra comprende separar de forma magnética el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto de la mezcla de resto-muestra.

3. El método según la reivindicación 2 en donde incubar la mezcla resto-muestra comprende calentar la disolución de resto-muestra a una temperatura en el intervalo de 25-95°C durante 5-60 minutos, lisando así de forma simultánea la muestra biológica y facilitando la unión de material de ácido nucleico de la muestra biológica al conjunto de micropartículas recubiertas con resto de afinidad.

4. El método según la reivindicación 2, en donde ocluir la ruta fluidica comprende ocluir la ruta fluidica al conjunto de posiciones de oclusión y en donde la ruta fluidica se acopla a una cámara de desechos, de manera que el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto se captura en el campo magnético y un volumen de desecho de la mezcla de resto-muestra se distribuye a la cámara de desechos.

5. El método según la reivindicación 1 en donde recibir la disolución de resto de unión comprende recibir un tampón de unión que se configura además para ayudar en la lisis de células que contienen ácido nucleico de la muestra biológica, liberando así material de ácido nucleico de la muestra biológica para la unión.

6. El método según la reivindicación 1 en donde recibir la disolución de resto de unión comprende recibir un tampón de unión configurado para ayudar en la atenuación de la actividad nucleolítica de la muestra biológica.

7. El método según la reivindicación 2, en donde lavar el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto comprende; ocluir la ruta fluidica del cartucho microfluidico en el conjunto de posiciones de oclusión; en donde la ruta fluidica está acoplada a una cámara de desechos, de manera que el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto se captura en el campo magnético; y distribuir una disolución de lavado a través de la ruta fluidica y en la cámara de desechos en una operación de flujo continuo.

8. El método según la reivindicación 1, en donde lavar el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto comprende transferir la mezcla de resto-muestra a un recipiente de fluido, capturar el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto en el recipiente de fluido, y lavar el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto usando una serie de etapas de aspiración y dispensación.

9. El método según la reivindicación 8, en donde lavar comprende distribuir una disolución de lavado a través del recipiente de fluido a un caudal entre 1 y 10 microlitros/segundo, con un volumen de disolución de lavado total de entre 50 y 2000 microlitros.

10. El método según la reivindicación 2, en donde liberar la muestra de ácido nucleico del conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto comprende ocluir la ruta fluidica del cartucho microfluidico a un segundo conjunto de

posiciones de oclusión; y distribuir una disolución de elución en la ruta fluidica, induciendo así un desplazamiento de pH configurado para liberar la muestra de ácido nucleico del conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto.

11. El método según la reivindicación 10, que comprende además capturar el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto en el campo magnético y aspirar la muestra de ácido nucleico de la ruta fluidica.

5 12. El método según la reivindicación 1, en donde liberar la muestra de ácido nucleico del conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto comprende poner en contacto el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto con una disolución de elución caracterizada por un pH que está en el intervalo de pH 10 a pH 13, y en donde liberar la muestra de ácido nucleico comprende eluir la muestra de ácido nucleico en 3-100 uL de la disolución de elución.

10 13. Un método para el aislamiento y la concentración simultáneos de ADN y ARN desde una muestra biológica, comprendiendo el método:

- Recibir una disolución de resto de unión en una cámara de proceso, en donde la disolución de resto de unión comprende un tampón de recogida y un conjunto de micropartículas recubiertas con resto de afinidad, en donde el conjunto de micropartículas recubiertas con resto de afinidad comprende dendrímero de polipropileno tetramina (DABAM) (Generación 1) unido por amida a un conjunto de micropartículas magnéticas;
- 15 • Mezclar la disolución de resto de unión con entre 10 uL y 2 mL de una muestra biológica, en la cámara de proceso, produciendo así una mezcla de resto-muestra;
- Incubar la mezcla de resto-muestra para unir de forma reversible el material de ácido nucleico de la muestra biológica al conjunto de micropartículas recubiertas con resto de afinidad, produciendo así un conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto;
- 20 • Separar de forma magnética el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto de la mezcla de resto-muestra,
 - En donde separar de forma magnética el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto de la mezcla de resto-muestra comprende aspirar la mezcla de resto-muestra; ocluir una ruta fluidica de un cartucho microfluidico a un conjunto de posiciones de oclusión; y distribuir la mezcla de resto-muestra en la ruta fluidica, en donde la ruta fluidica se configura para pasar a través de un campo magnético y se acopla a una
 - 25 cámara de desechos, de manera que el conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto se captura en el campo magnético y un volumen de desecho de la mezcla de resto-muestra se distribuye a la cámara de desechos; y
- 30 • Eluir una muestra de ácido nucleico que comprende ADN y ARN diana del conjunto de partículas de ácido nucleico unido al resto, en menos que 20 uL de una disolución de elución caracterizado por un pH mayor que 10.

14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la disolución de elución se caracteriza por un pH entre 12 y 13.

15. Una composición que comprende: una micropartícula magnética modificada con un grupo funcional carboxilo; y DABAM (Generación 1) unido por amida a la micropartícula magnética por medio del grupo funcional carboxilo.

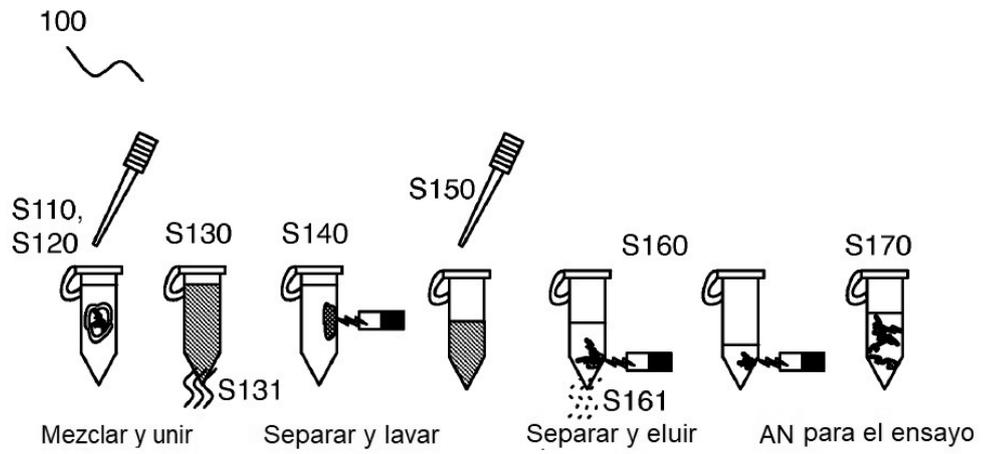


FIGURA 1A

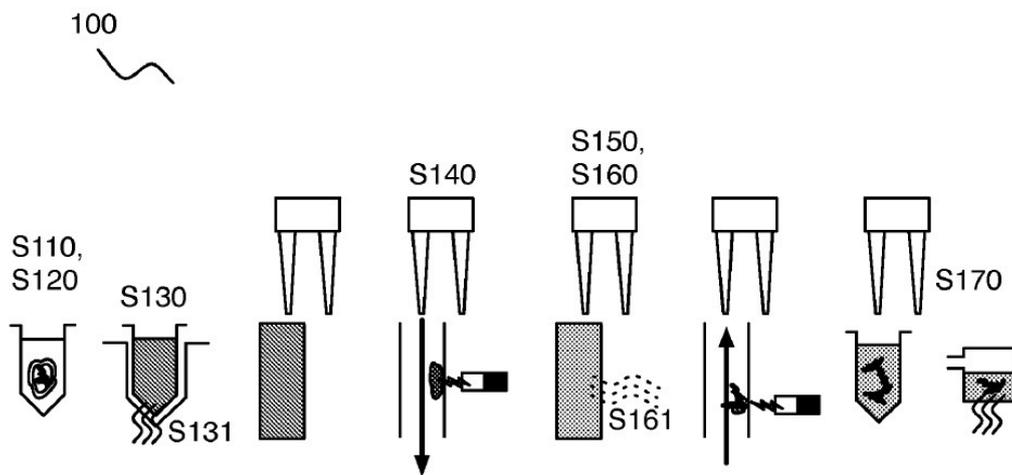


FIGURA 1B

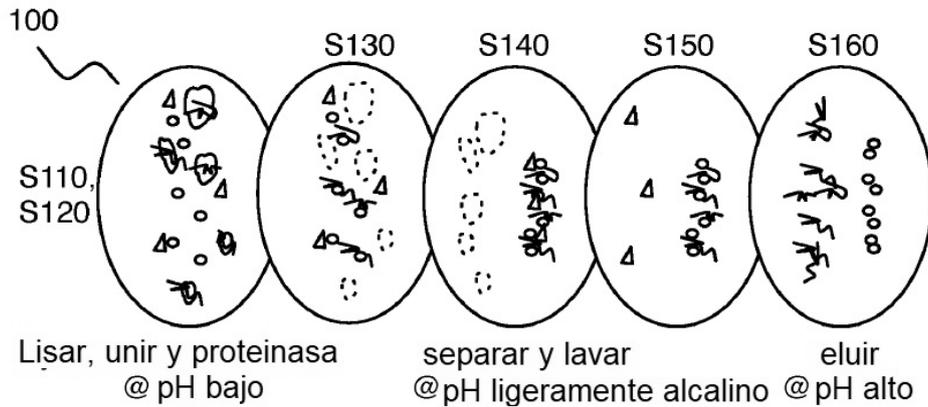


FIGURA 1C

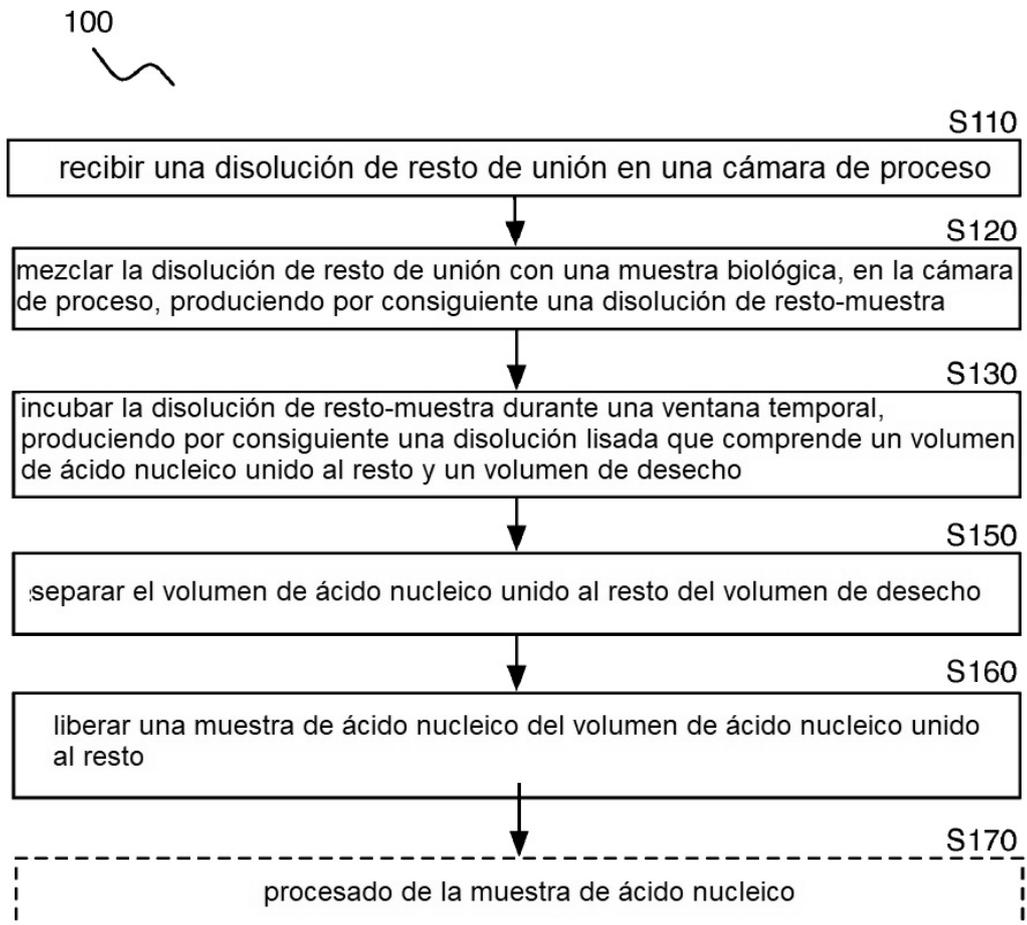


FIGURA 2

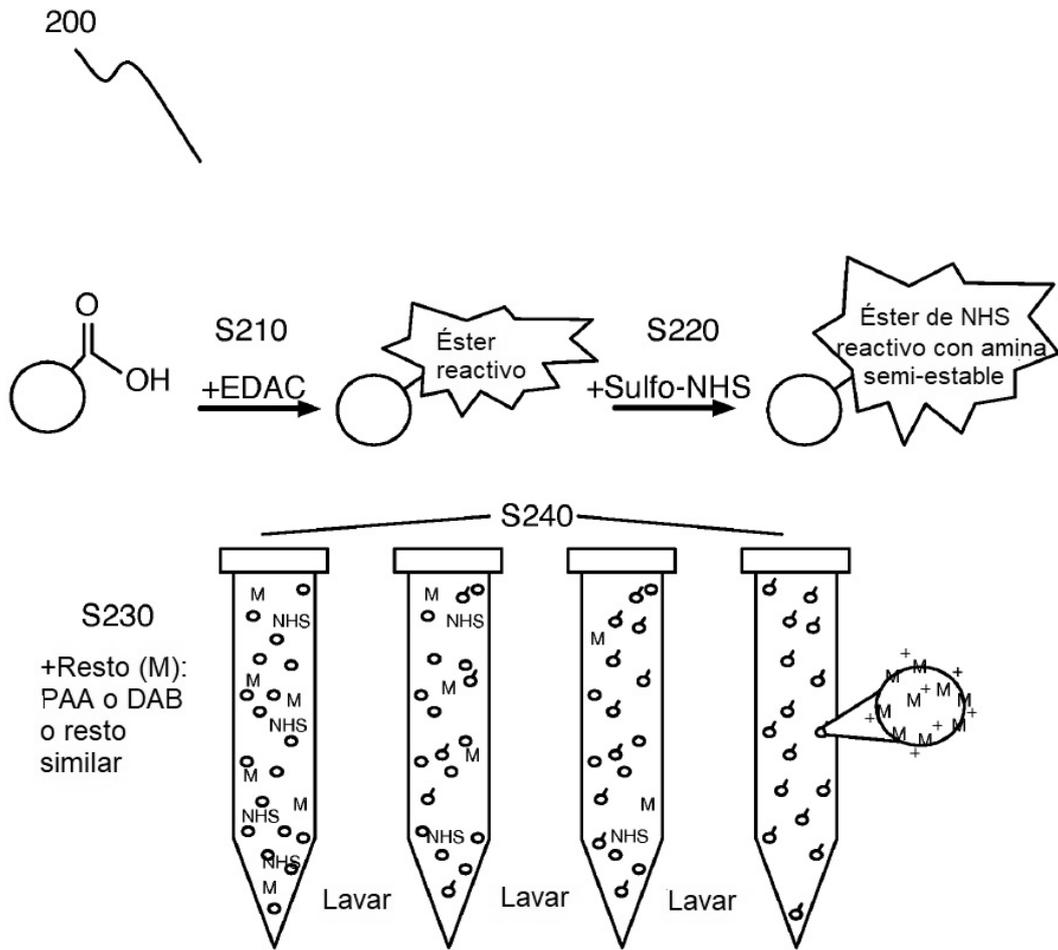


FIGURA 3

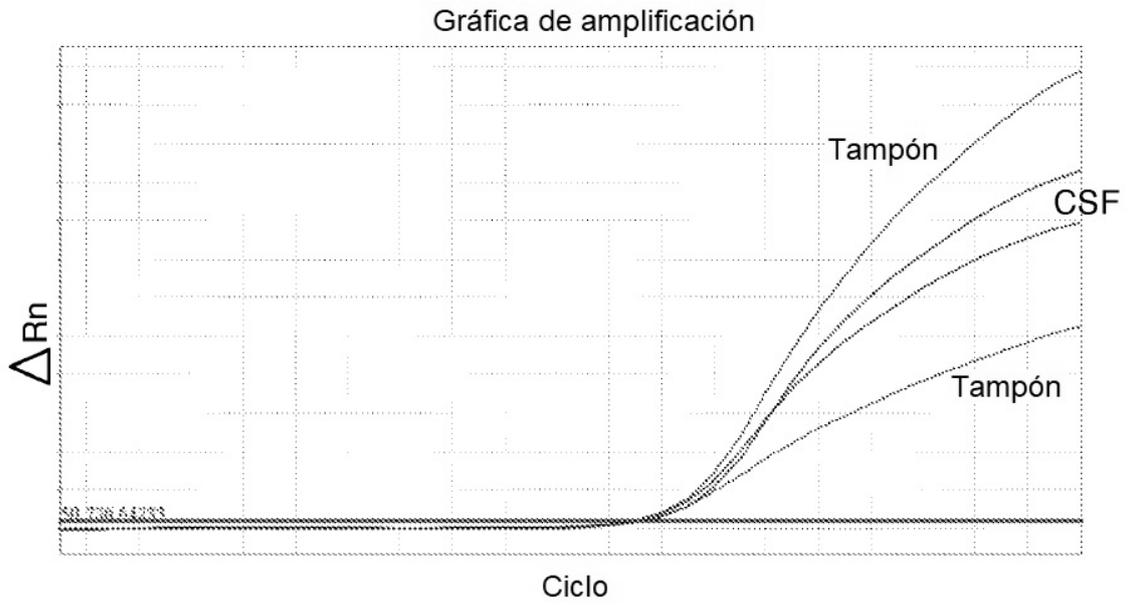


FIGURA 4

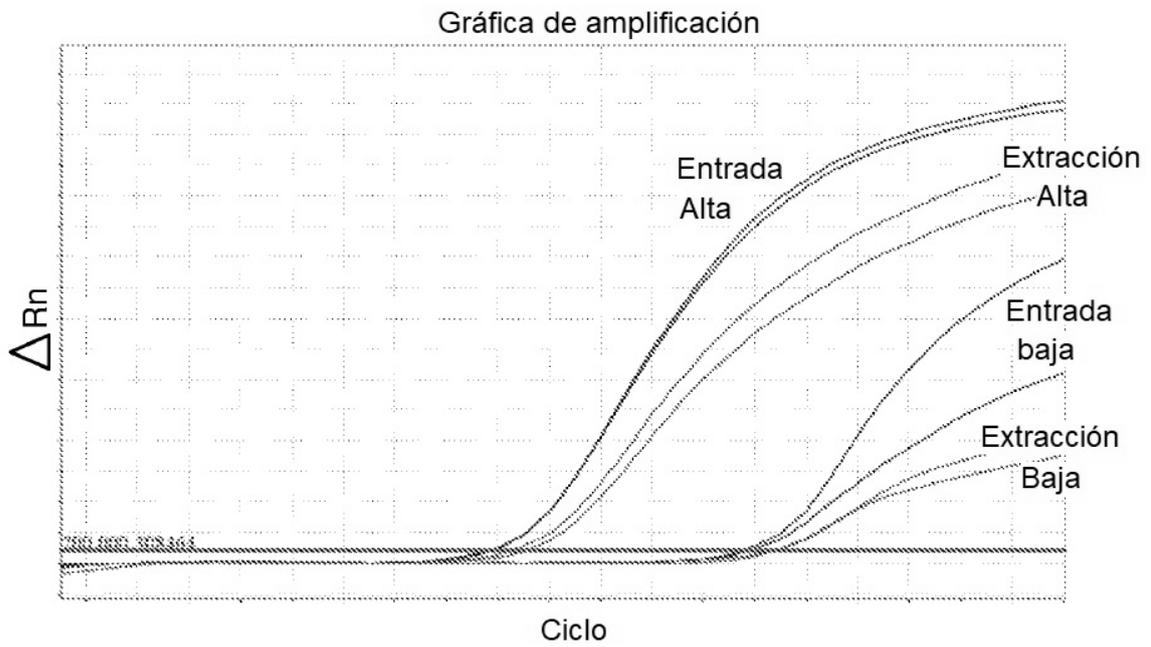


FIGURA 5

Gráfica de amplificación

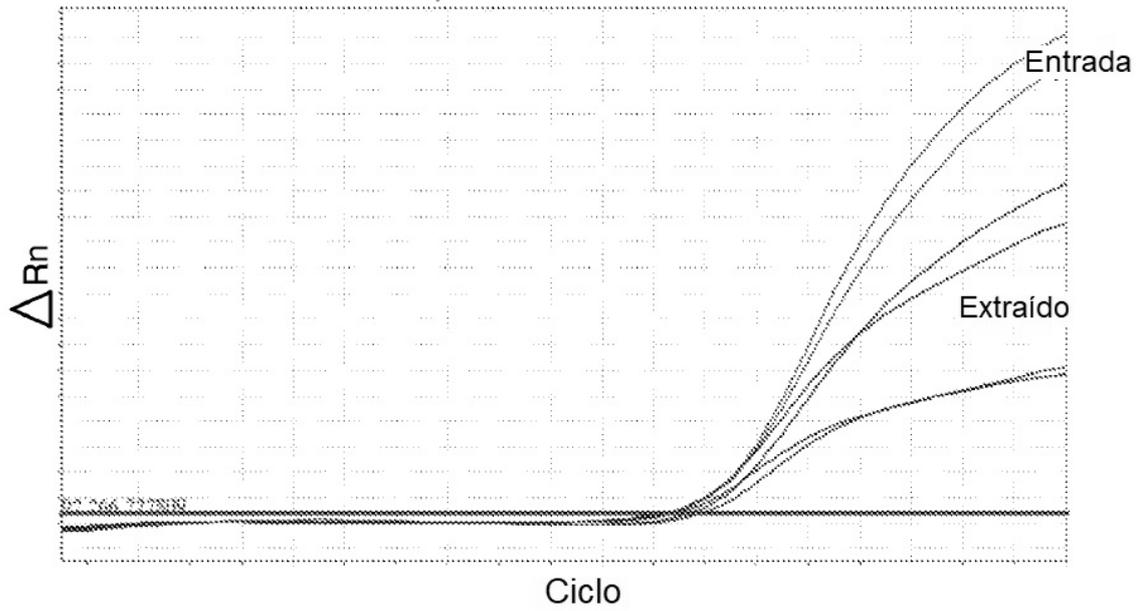


FIGURA 6

Gráfica de amplificación

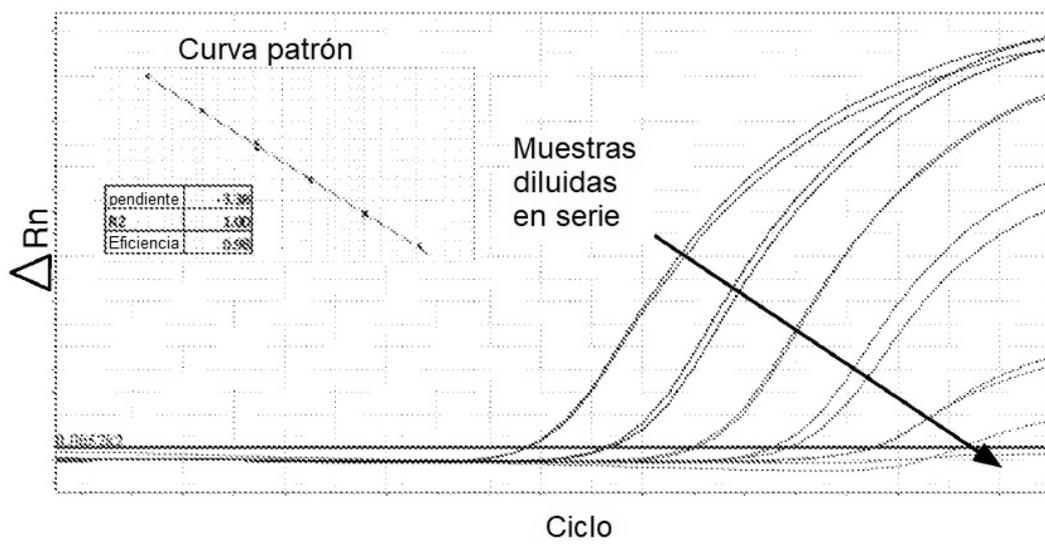


FIGURA 7

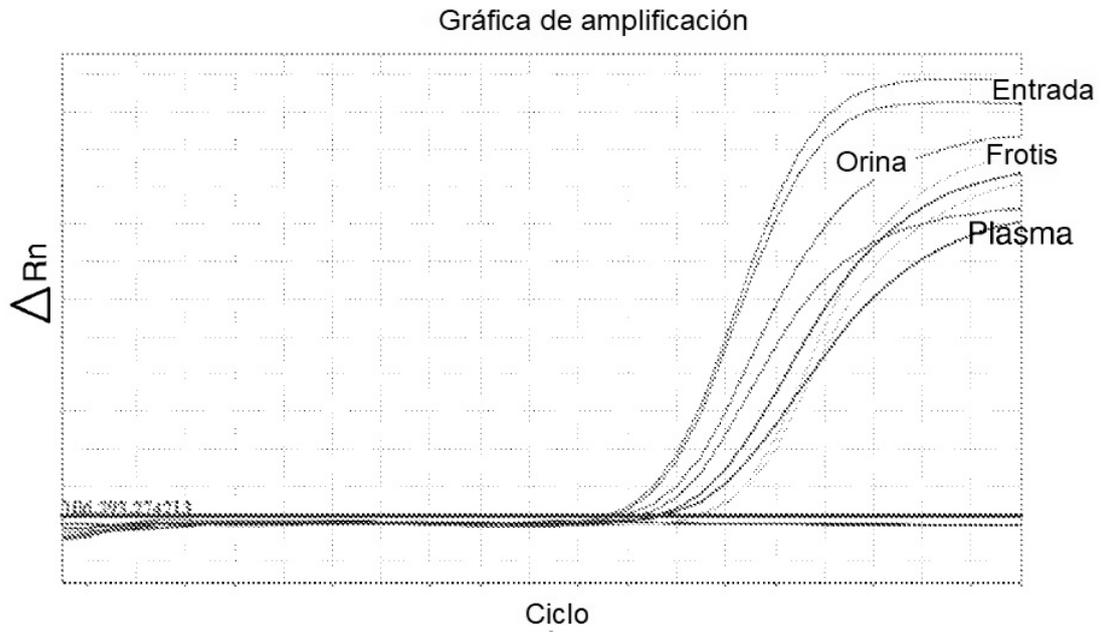


FIGURA 8

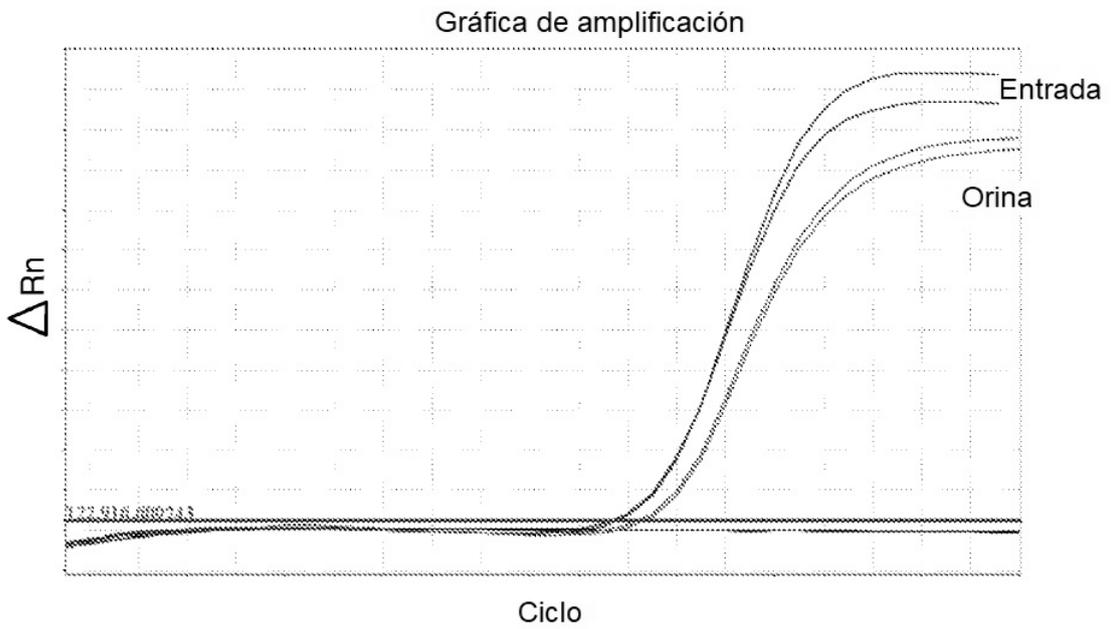


FIGURA 9

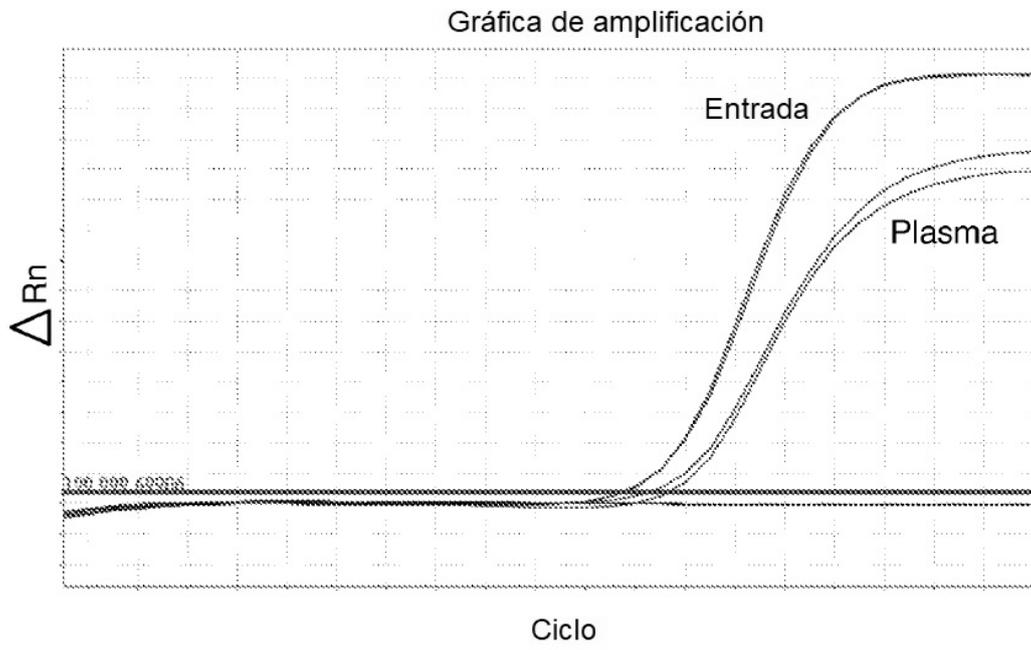


FIGURA 10

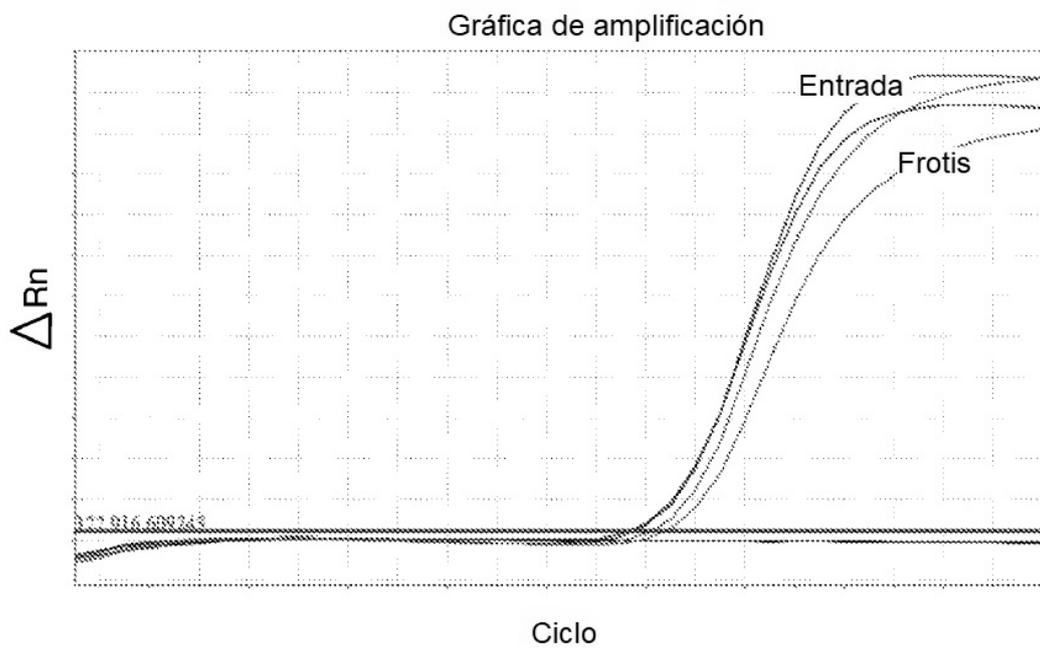


FIGURA 11

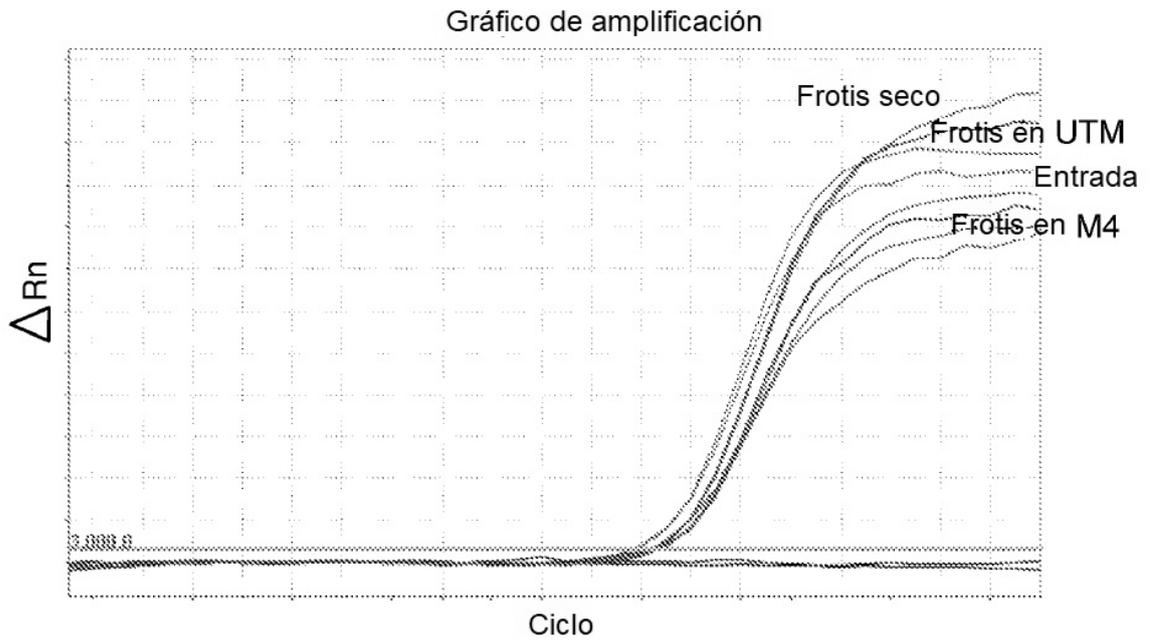


FIGURA 12

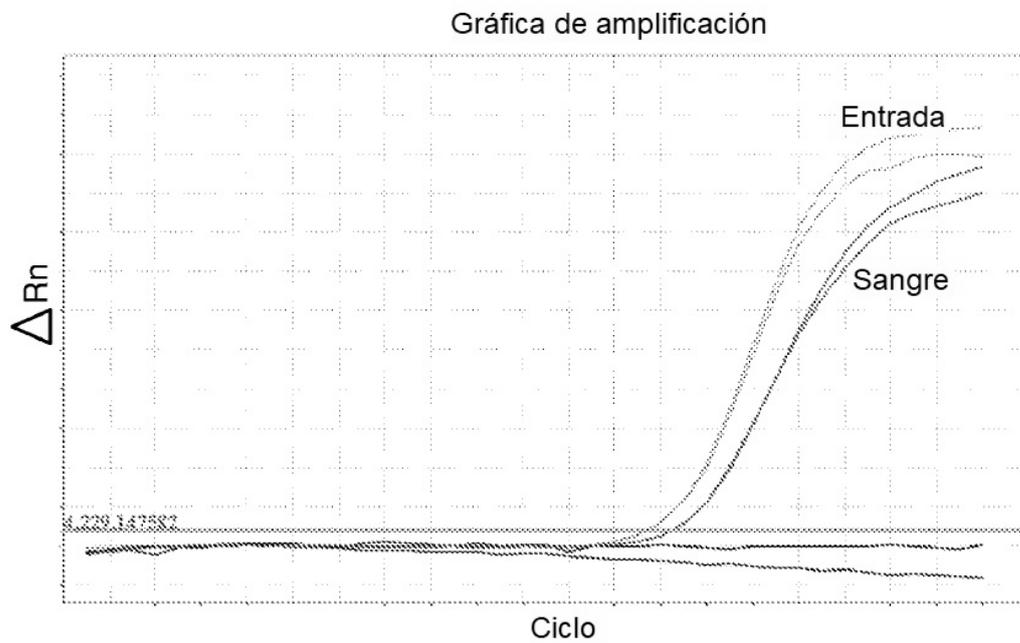


FIGURA 13

Gráfica de amplificación

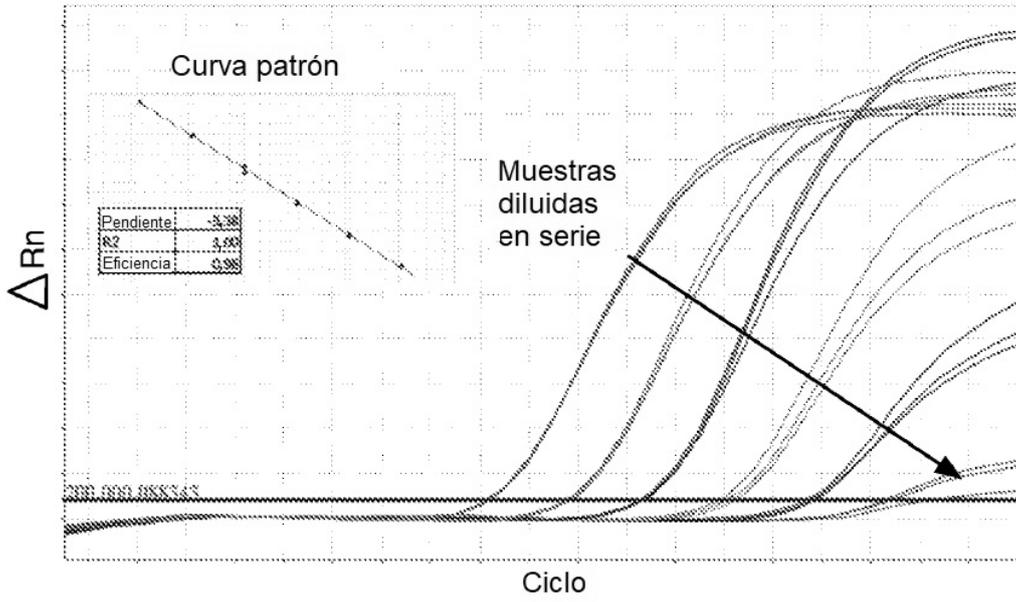


FIGURA 14

Gráfica de amplificación

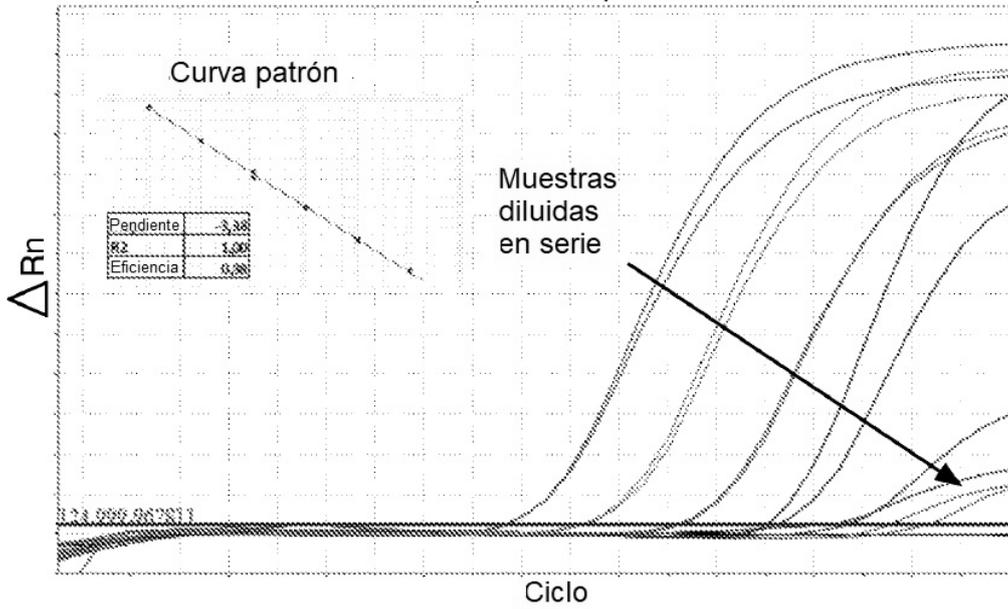


FIGURA 15

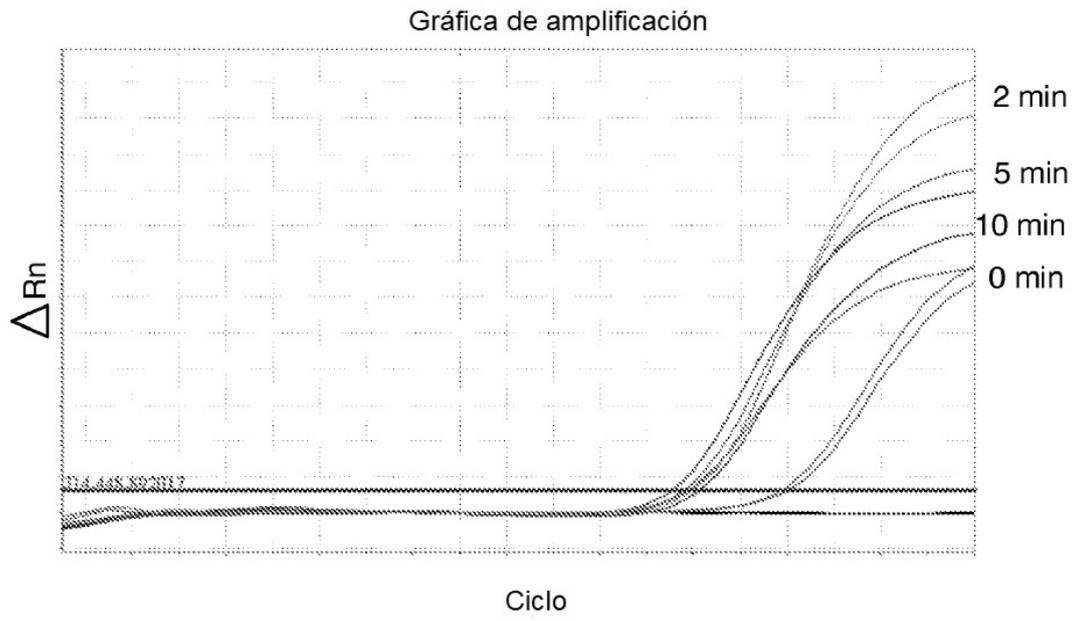


FIGURA 16

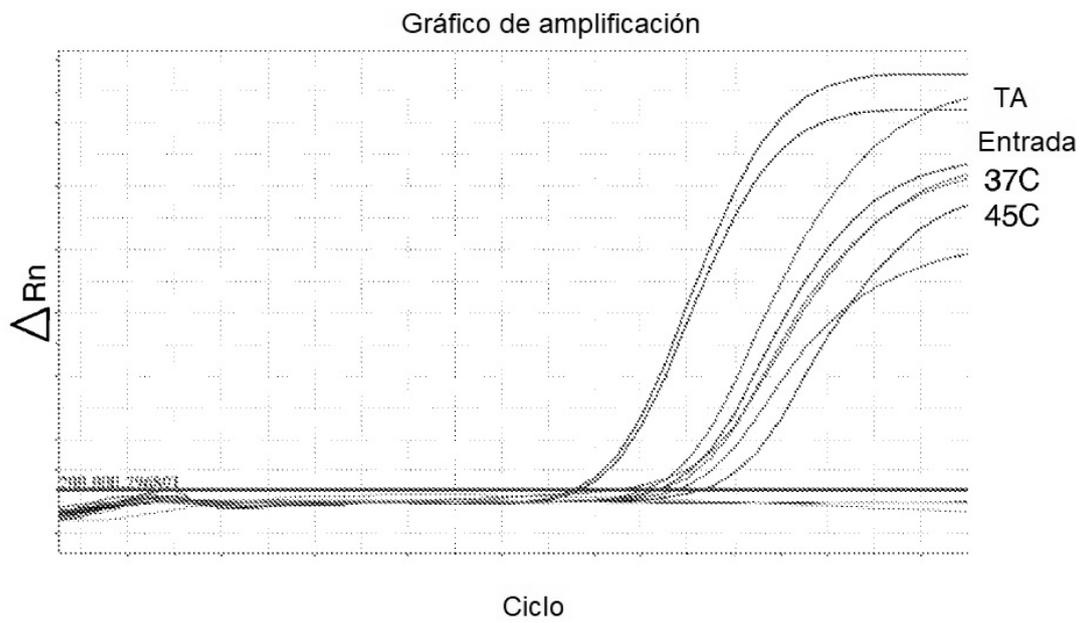


FIGURA 17

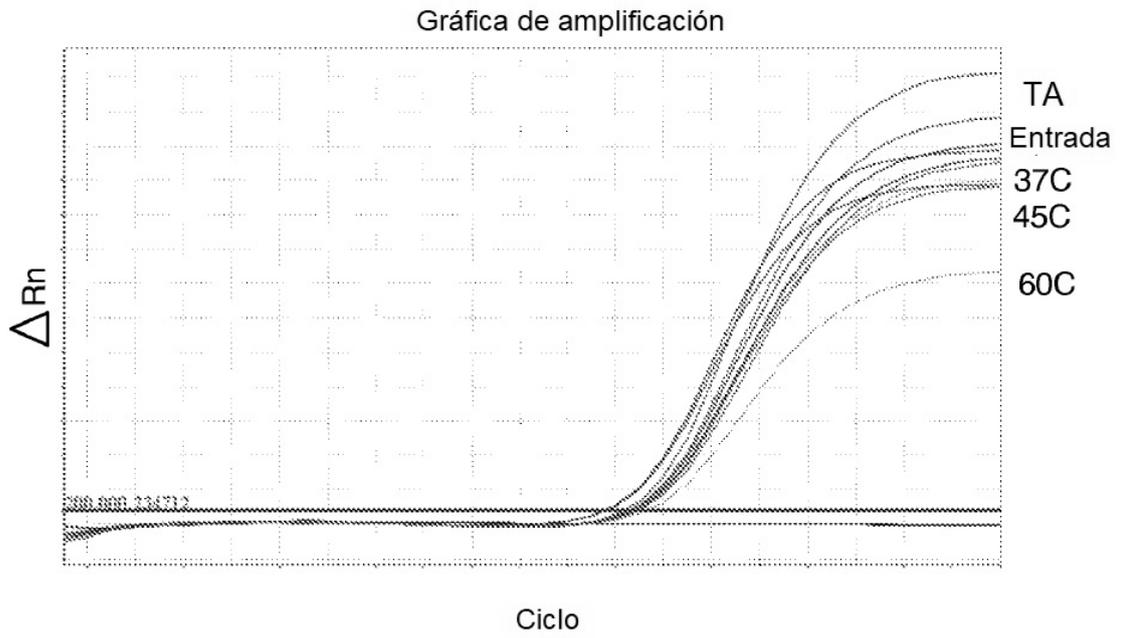


FIGURA 18

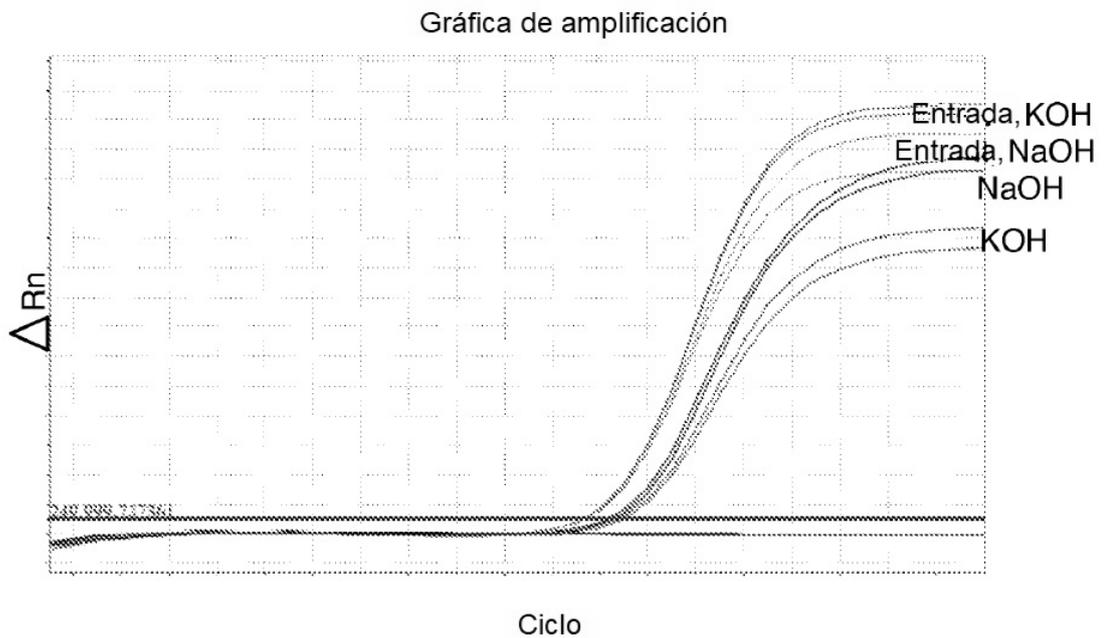


FIGURA 19

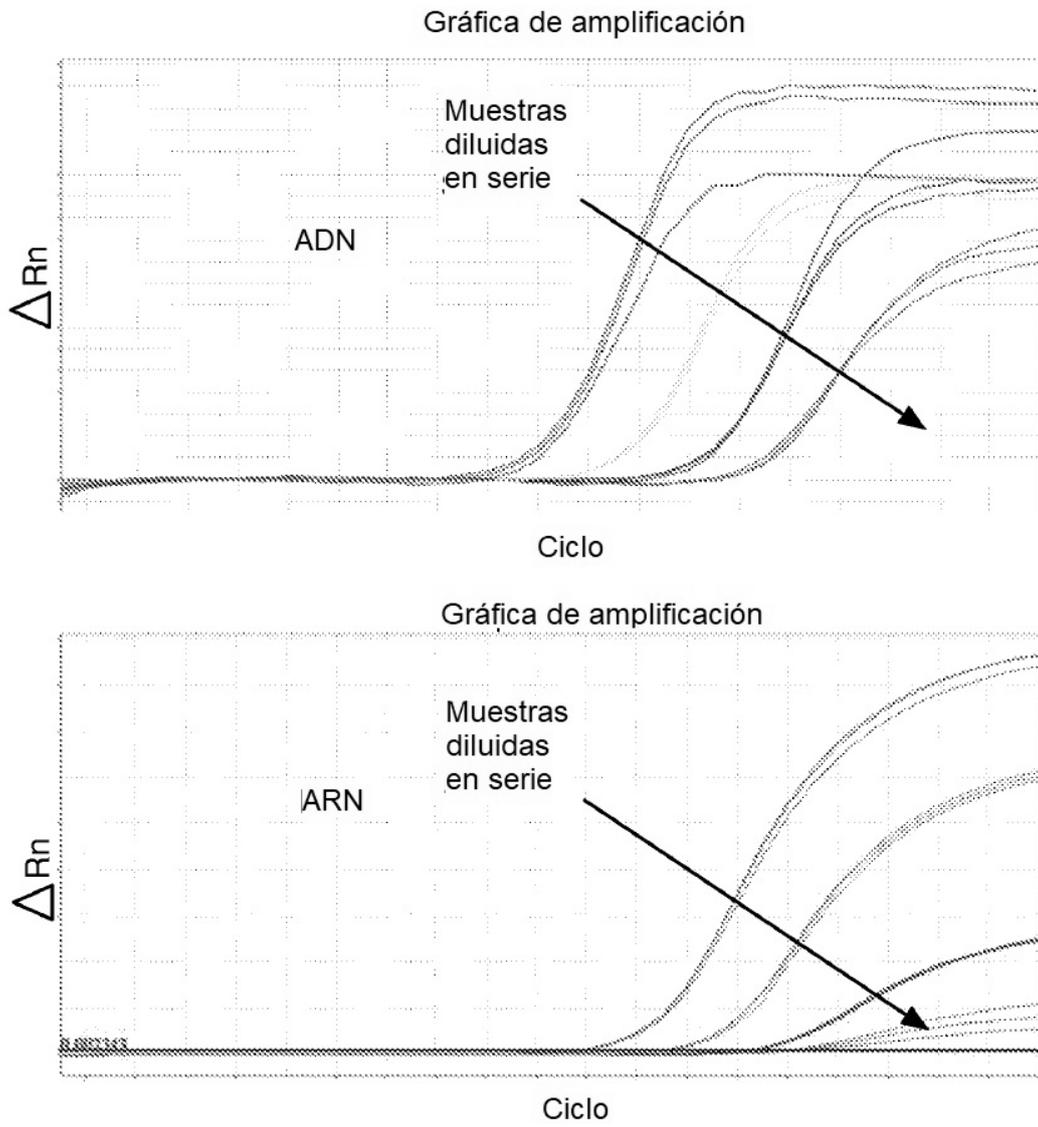


FIGURA 20