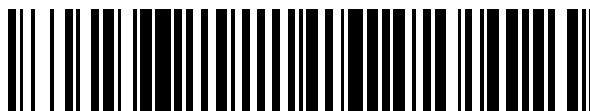


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 155**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2007 E 07782999 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 2016186**

54 Título: **Procedimientos y aparato para reacciones de amplificación secuenciales**

30 Prioridad:

01.05.2006 US 796804 P
30.04.2007 US 742028

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.04.2013

73 Titular/es:

CEPHEID (100.0%)
904 CARIBBEAN DRIVE
SUNNYVALE, CA 94089, US

72 Inventor/es:

SMITH, JOSEPH H.;
PERSING, DAVID H.;
WORTMAN, ALAN;
CHANG, RONALD y
SWENSON, DAVID

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 402 155 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

Procedimientos y aparato para reacciones de amplificación secuencial

5 **REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS**

[0001] La presente solicitud es una continuación de la solicitud de EE.UU. nº 11/742.028, presentada el 30 de abril de 2007, que reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/796.804 presentada el 1 de mayo de 2006.

10 **DECLARACIÓN DE DERECHOS A LAS INVENCIONES REALIZADAS SEGÚN INVESTIGACIÓN O DESARROLLO CON PATROCINIO FEDERAL**

[0002] NO APLICABLE

15 **REFERENCIA A UN APÉNDICE DE UN "LISTADO DE SECUENCIAS", UNA TABLA O UN LISTADO DE PROGRAMA INFORMÁTICO REMITIDO EN UN DISCO COMPACTO.**

[0003] NO APLICABLE

20 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0004] La invención se refiere en general a procedimientos para analizar en una muestra la presencia de uno o más ácidos nucleicos, y más en particular, a procedimientos para realizar reacciones de amplificación de ácidos nucleicos de etapas múltiples, especialmente reacciones en cadena de la polimerasa (PCR).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

30 **[0005]** La amplificación de ácidos nucleicos es un componente crucial de muchas técnicas usadas en la investigación, la medicina y la industria. Dichas reacciones se usan en investigación clínica y biológica, detección y vigilancia de enfermedades infecciosas, detección de mutaciones, detección de marcadores cancerosos, vigilancia ambiental, identificación genética, detección de agentes patógenos en aplicaciones de biodefensa, y similares, por ejemplo, Schweitzer y col. *Current Opinion in Biotechnology*, 12:21-27 (2001); Koch, *Nature Reviews Drug Discovery*, 3:749-761 (2004). En particular, las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) han encontrado aplicaciones en todos estos campos, incluidas aplicaciones para detección vírica y bacteriana, observación de la carga viral, detección de patógenos raros y/o difíciles de cultivar, detección rápida de amenazas bioterroristas, detección de enfermedad residual mínima en pacientes de cáncer, pruebas de patógenos en los alimentos, cribado de riego sanguíneo, y similares, por ejemplo, Mackay, *Clin. Microbiol. Infect.*, 10: 190-212 (2004); Bernard y col. *Clinical Chemistry*, 48:1178-1185 (2002). En lo que respecta a PCR, los motivos principales para este uso tan extenso son su velocidad y facilidad de uso (realizada normalmente en unas horas mediante el uso de kits estandarizados e instrumentos relativamente sencillos y de bajo coste), su sensibilidad (a menudo pueden detectarse varias decenas de copias de una secuencia diana en una muestra) y su robustez (las muestras de baja calidad o muestras conservadas, por ejemplo, muestras forenses o muestras de tejido fijado, son fáciles de analizar), Strachan y Read, *Human Molecular Genetics* 2ª Ed. (John Wiley & Sons, Nueva York, 1999).

45 **[0006]** Debido a estas ventajas, se ha suscitado interés por extender las técnicas de amplificación con el fin de dar cabida a múltiples polinucleótidos diana a partir de la misma muestra biológica. Se han adoptado varios enfoques, entre ellos: (i) realización simultáneamente de múltiples amplificaciones en una sola reacción, como PCR múltiplex, descrita por ejemplo, en Caskey y col., patente de EE.UU. 5.582.989; Elnifro y col., *Clinical Microbiology Reviews*, 13:559-570 (2000); Henegariu y col. *Biotechniques*, 23:504-511 (1997); (ii) realización en secuencia de múltiples amplificaciones en una sola reacción mediante ajustes de compromiso en las condiciones de reacción para favorecer diferentes reactivos, por ejemplo, Raja y col. *Clinical Chemistry*, 48:1329-1337 (2002); y (iii) distribución en partes alícuotas de partes de una muestra en varias cámaras de reacción para amplificaciones separadas, usando a menudo un dispositivo de microfluidica, descrito por ejemplo, en Cottingham, patente de EE.UU. 5.948.673; Mamaro y col., patente de EE.UU. 6.605.451; Enzelberger y col., patente de EE.UU. 6.960.437; Liu y col. *Anal. Chem.*, 75:4718-4723 (2003); Woudenberg y col., patente de EE.UU. 6.126.899; Gulliksen y col., *Anal. Chem.*, 76:9-14 (2004); Anderson y col., patente de EE.UU. 6.168.948; y similares. El primer enfoque ha mostrado ser difícil de implementar de forma rutinaria debido a la dificultad de encontrar condiciones de reacción en virtud de las cuales todos los reactivos, por ejemplo, diferentes cebadores y secuencias diana, se amplifiquen aproximadamente en las mismas tasas. El segundo enfoque tuvo cierto éxito sobre todo cuando se requiere una amplificación rápida de pocas secuencias de abundancias ampliamente variables; sin embargo, existen importantes restricciones en los parámetros de reacción disponibles para su manipulación con el fin de obtener amplificación preferente de diferentes

secuencias. El tercer enfoque ofrece el potencial de permitir que se realicen múltiples reacciones de amplificación en muestras únicas; sin embargo, los dispositivos microfluídicos son en general difíciles de fabricar y requieren sistemas de válvulas y redes de distribución de fluidos complejos que han impedido su aplicación extensa.

5 **[0007]** Por otra parte, en ciertas aplicaciones, dicha prueba de muestras intraoperación, y prueba de agentes infecciosos y de biodefensa, es importante emplear condiciones de reacción cerradas a los fluidos con el fin de reducir al mínimo la ocurrencia de valoraciones de falsos positivos. Los enfoques anteriores para analizar múltiples polinucleótidos diana introducen cada uno un nivel de dificultad ya sea al imponer compromisos en la elección de las condiciones de reacción, por ejemplo, un conjunto óptimo de condiciones para una reacción en su conjunto puede no ser óptimo para dianas individuales, o al requerir acceso a una reacción después de que se haya iniciado o empleando múltiples puertos para introducir la muestra, multiplicando con ello las posibilidades de contaminación, o problemas similares.

15 **[0008]** A la vista de estos problemas, sería muy útil en las aplicaciones que requieren una amplificación rápida de múltiples secuencias si se dispusiera de procedimientos adicionales para dichas operaciones que no tuvieran los inconvenientes de las tecnologías actuales.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

20 **[0009]** La presente invención se refiere a un procedimiento para realizar múltiples reacciones de amplificación en una sola cámara de reacción mediante ciclos sucesivos de carga de la mezcla de reacción, amplificación y retirada de la mezcla de reacción gastada en un sistema de reacción cerrado a los fluidos. En particular, las formas de realización de la presente invención permiten la amplificación de una pluralidad de diferentes polinucleótidos diana a partir de una sola muestra realizando amplificaciones sucesivas de diferentes polinucleótidos diana de diferentes partes de la muestra.

[0010] La invención proporciona un procedimiento según la reivindicación 1.

30 **[0011]** En el procedimiento de la invención puede usarse un sistema de reacción cerrado a los fluidos, comprendiendo el sistema de reacción cerrado a los fluidos para realizar múltiples reacciones de amplificación secuenciales: (i) una cámara de reacción selectivamente en comunicación fluida con un depósito de muestras, un depósito de residuos y una pluralidad de depósitos de reactivos que contienen diferentes reactivos de amplificación, estando cada uno de los depósitos cerrados a los fluidos; y (ii) una bomba asociada operativamente con una válvula rotatoria para realizar ciclos repetidos de (a) transferencia fluida de una parte de una muestra desde el depósito de muestras y reactivos de amplificación de al menos uno de los depósitos de reactivos a la cámara de reacción, en el que tiene lugar una reacción de amplificación para formar uno o más amplicones en una mezcla de reacción; (b) retirada de la mezcla de reacción desde la cámara de reacción y transferencia fluida de la misma al depósito de residuos después de que se detectan uno o más amplicones.

40 **[0012]** En el procedimiento de la invención puede usarse un producto legible por ordenador que comprende un programa ejecutable con ordenador para controlar el rendimiento de una pluralidad de reacciones de amplificación secuenciales. El programa comprende instrucciones para: (a) leer valores de una señal óptica a partir de una cámara de reacción de amplificación, en que la señal es el valor más reciente de una señal óptica relacionada monótonamente con la concentración de un amplicón en la reacción de amplificación; (b) determinar un nivel de señal de base a partir de los valores de la señal óptica; (c) cálculo de un valor predeterminado a partir de los valores de la señal óptica; (d) comparación del valor predeterminado con el valor más reciente de la señal óptica; y (e) repetición de la etapa (d) hasta que el valor más reciente de la señal óptica sea igual o mayor que el nivel predeterminado, después de lo cual se inicia una reacción de amplificación posterior.

50 **[0013]** En algunas formas de realización el procedimiento incluye una etapa de deslavado de la cámara de reacción después de la etapa de transferencia fluida y/o calentamiento de la cámara de reacción vacía a una temperatura de desnaturalización de ADN y enfriamiento de la cámara de reacción vacía a una temperatura de renaturalización de ADN entre reacciones sucesivas.

55 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014] Las fig. 1A-1B ilustran curvas de señal frente al número de ciclos (o el tiempo de reacción) para reacciones de amplificación, como PCR en tiempo real.

60 **[0015]** La fig. 1C es un diagrama de un aparato para implementar procedimientos de la invención.

[0016] Las fig. 2A-2K ilustran esquemáticamente la implementación de reacciones de amplificación

secuenciales en un sistema de reacción cerrado a los fluidos que emplea una válvula rotatoria y una bomba de fluidos de tipo pistón.

[0017] Las fig. 3A-3C muestran un protocolo de instrumentación y los resultados de las amplificaciones secuenciales para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA) realizadas en un sistema de amplificación GENEXPERT™ de Cepheid.

[0018] Las fig. 4A-4H muestran un protocolo de instrumentación y los resultados de amplificaciones secuenciales para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA) realizadas en un sistema de amplificación GENEXPERT™ de Cepheid usando reactivos no liofilizados.

[0019] Las fig 5A y 5B muestran los resultados de experimentos replicados para amplificación de una secuencia de control interna.

[0020] Las fig. 6A-6H muestran protocolos de instrumentación y los resultados de RT-PCR con etapas de calentamiento interreacción realizados en un sistema de amplificación GENEXPERT™ de Cepheid.

DEFINICIONES

[0021] Los términos y símbolos de química de ácidos nucleicos, bioquímica, genética y biología molecular usados en la presente memoria descriptiva siguen los tratados y textos estándar de la materia, por ejemplo, Kornberg y Baker, DNA Replication, Segunda Edición (W.H. Freeman, Nueva York, 1992); Lehninger, Biochemistry, Segunda Edición (Worth Publishers, Nueva York, 1975); Strachan y Read, Human Molecular Genetics, Segunda Edición (Wiley-Liss, Nueva York, 1999); Eckstein, editor, Oligonucleotids and Analogs: A Practical Approach (Oxford University Press, Nueva York, 1991); Gait, editor, Oligonucleotid Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1984); Sambrook y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); y similares.

[0022] "Amplicón" significa el producto de una reacción de amplificación de polinucleótidos. Es decir, es una población de polinucleótidos, normalmente bicatenarios, que son replicados a partir de una o más secuencias de partida. La una o más secuencias de partida pueden ser una o más copias de la misma secuencia, o pueden ser una mezcla de diferentes secuencias. Los amplicones pueden ser producidos por una diversidad de reacciones de amplificación cuyos productos son múltiples replicados de uno o más ácidos nucleicos diana. En general, las reacciones de amplificación que producen amplicones están "activadas por plantilla" en las que se requiere el apareamiento de bases de los reactivos, ya sean nucleótidos u oligonucleótidos, con una secuencia diana o su complemento para la creación de productos de reacción. En un aspecto, activadas por plantilla reacciones son extensiones de cebadores con una ácido nucleico polimerasa o ligamientos de oligonucleótidos con una ácido nucleico ligasa. Dichas reacciones incluyen, pero no se limitan a, reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), reacciones lineares de la polimerasa, reacciones en cadena de la ligasa (LCR), reacciones de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificaciones por círculo rodante, y similares, desveladas en las siguientes referencias: Mullis y col., patentes de EE.UU. n° 4.683.195; 4.965.188; 4.683.202; 4.800.159 (PCR); Gelfand y col., patente de EE.UU. 5.210.015 (PCR en tiempo real con sondas "TAQMAN™"); Wittwer y col., patente de EE.UU. 6.174.670; Landegren y col., patente de EE.UU. 4.988.617 ("LCR"); Birkenmeyer y col., patente de EE.UU. 5.427.930 ("gap-LCR"); Kacian y col., patente de EE.UU. 5.399.491 ("NASBA"); Walker, patentes de EE.UU. n° 5.648.211; 5.712.124 ("SDA"); Lizardi, patente de EE.UU. 5.854.033; Aono y col., patente japonesa publicación n° JP 4-262.799 (amplificación por círculo rodante); y similares. En un aspecto, los amplicones de la invención son producidos en una reacción de amplificación de ciclación por temperatura que incluye etapas repetidas de desnaturalización de productos de reacción, normalmente ADN bicatenario, a una primera temperatura, y cebadores de renaturalización para extensión de la polimerasa a una segunda temperatura. Unas reacciones de amplificación por ciclación de temperatura de especial interés son las PCR. Una reacción de amplificación puede ser una amplificación "en tiempo real" si existe una química de detección disponible que permita que un producto de reacción sea medido conforme avanza la reacción de amplificación, por ejemplo, la "PCR en tiempo real" descrita más adelante, o "la NASBA en tiempo real" tal como se describe en Leone y col., Nucleic Acid Research, 26:2150-2155 (1998), y referencias similares. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "amplificación" significa realización de una reacción de amplificación. Una "mezcla de reacción" significa una solución que contiene todos los reactivos necesarios para realizar una reacción, que puede incluir, pero no se limita a, agentes de tamponamiento para mantener el pH en un nivel seleccionado durante una reacción, sales, cofactores, reductores de oxígeno y similares.

[0023] "Cerrada" en referencia a una reacción de amplificación significa que dicha reacción tiene lugar dentro de un vaso o recipiente o cámara que no tiene aberturas a través de las cuales puedan pasar líquidos, en particular, líquidos que contienen materiales no de muestra como, por ejemplo, biomoléculas u organismos no de muestra, lo

que incluye, pero sin limitarse a, ácidos nucleicos, proteínas, virus, bacterias o similares. En un aspecto, un vaso, cámara o recipiente que contiene una reacción de amplificación cerrada puede incluir un orificio o respiradero que sea permeable a los gases pero impermeable a los líquidos, por ejemplo, un orificio que permita la purga de aire a través de una membrana de filtro pero no de líquidos en condiciones de reacción convencionales. Las membranas adecuadas para dichos orificios o respiraderos incluyen películas de poliolefina tejidas, como película TYREK® (DuPont), o similares.

[0024] "Complementario o sustancialmente complementario" se refiere a la hibridación o apareamiento de bases o la formación de un dúplex entre nucleótidos o ácidos nucleicos, como, por ejemplo, entre las dos cadenas de una molécula de ADN bicatenario o entre un cebador de oligonucleótido y un sitio de unión de cebador en un ácido nucleico monocatenario. Los nucleótidos complementarios son, en general, A y T (o A y U), o C y G. Se dice que dos moléculas de ARN o ADN monocatenario son sustancialmente complementarias cuando los nucleótidos de una cadena, alineada óptimamente y comparada con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, se aparean con al menos aproximadamente el 80% de los nucleótidos de la otra cadena, normalmente de al menos aproximadamente el 90% al 95%, y más preferentemente de aproximadamente el 98 al 100%. Alternativamente, existe complementariedad sustancial cuando una cadena de ARN o ADN se hibridará en condiciones de hibridación selectivas con su complemento. Normalmente, la hibridación selectiva se producirá cuando exista al menos aproximadamente el 65% de complementariedad en una extensión de al menos 14 a 25 nucleótidos, preferentemente de al menos aproximadamente el 75%, más preferentemente de al menos aproximadamente el 90% de complementariedad. Véase M. Kanehisa Nucleic Acid Res. 12:203 (1984).

[0025] "Producto legible por ordenador" significa cualquier medio tangible para almacenar información que pueda ser leída por o transmitida en un ordenador. Entre los productos legibles por ordenador se incluyen, pero no se limitan a, disquetes magnéticos, cintas magnéticas, discos ópticos, CD-ROM, cintas o tarjetas perforadas, dispositivos de memoria de sólo lectura, dispositivos de memoria de acceso directo, matrices de puertas, memoria electrostática y cualquier otro medio similar.

[0026] "Dúplex" significa al menos dos oligonucleótidos y/o polinucleótidos que son total o parcialmente complementarios sometidos a apareamiento de bases de tipo Watson-Crick entre todos o la mayoría de sus nucleótidos de manera que se forme un complejo estable. Los términos "renaturalización" e "hibridación" se usan indistintamente para referirse a la formación de un dúplex estable. "Perfectamente ajustado" en referencia a un dúplex significa que las cadenas de poli- u oligonucleótido que conforman el dúplex forman una estructura bicatenaria entre sí de manera que todos los nucleótidos de cada cadena experimentan apareamiento de bases de Watson-Crick con un nucleótido en la otra cadena. El término "dúplex" comprende el apareamiento de análogos de nucleósidos, como desoxiinosina, nucleósidos con bases de 2-aminopurina, PNA, y similares, que pueden emplearse. Un "desajuste" en un dúplex entre dos oligonucleótidos o polinucleótidos significa que un par de nucleótidos en el dúplex no experimenta unión de Watson-Crick.

[0027] "Cerrado a los fluidos" significa que, en condiciones operativas convencionales, los líquidos de un sistema que comprende uno o más vasos, cámaras, válvulas y/o pasos, posiblemente interconectados y en comunicación entre sí, no pueden comunicarse con el exterior de dicho sistema, y análogamente líquidos en el exterior de dicho sistema no pueden comunicarse con líquidos contenidos en el interior del sistema. En un aspecto, condiciones operativas convencionales significa que vasos, cámaras, válvulas y pasos de un sistema cerrado a los fluidos están sometidos a presión en una magnitud inferior a 689.476 Pa, o en otro aspecto, en una magnitud inferior a 344.738 Pa, o en una magnitud inferior a 206.843 Pa.

[0028] "Indicador" significa una sonda que es capaz de generar una señal óptica en presencia de un producto de una reacción de amplificación (es decir, un "producto de amplificación") de manera que cuando el producto se acumula en la mezcla de reacción la señal óptica del indicador aumenta, al menos en un intervalo predeterminado de concentraciones. Las señales ópticas incluyen, pero no se limitan a, señales fluorescentes, señales quimioluminiscentes, señales electroquimioluminiscentes, señales colorimétricas y similares. "Indicador fluorescente" significa un indicador capaz de generar una señal fluorescente en presencia de un producto de una reacción de amplificación (es decir, un "producto de amplificación") de manera que cuando el producto se acumula en la mezcla de reacción la señal del indicador fluorescente aumenta, al menos en un intervalo predeterminado de concentraciones. Los indicadores fluorescentes pueden ser no específicos, como, por ejemplo, tintes de intercalación que se unen a productos de ADN bicatenario, por ejemplo, YOPRO- 1, verde SYBR 1, y similares, Ishiguro y col. Anal. Biochem., 229: 207-213 (1995); Tseng y col. Anal. Biochem., 245: 207-212 (1997); Morrison y col. Biotechniques, 24: 954-962 (1998); o como cebadores que tienen estructuras en horquilla con una molécula fluorescente dispuesta en proximidad con un inactivador fluorescente hasta ser separado por la fuerza por una extensión de cebador, por ejemplo, Whitecombe y col. Nature Biotechnology, 17: 804-807 (1999) ("cebadores AMPLIFLUOR™"). Los indicadores fluorescentes también pueden ser específicos de secuencias diana, comprendiendo normalmente una molécula fluorescente en proximidad con un inactivador fluorescente hasta una

fracción de oligonucleótido a la que se fijan específicamente para unirse a un producto de amplificación, por ejemplo, Gelfand y col., patente de EE.UU. 5.210.015 ("TAQMAN™"); Nazarenko y col. Nucleic Acid Research, 25: 2516-2521 (1997) ("sondas escorpión"); Tyagi y col. Nature Biotechnology, 16:49-53 (1998) ("balizas moleculares"). Los indicadores fluorescentes pueden usarse en relación con PCR en tiempo real, o pueden usarse para medir la cantidad total de producto de reacción en la terminación de una reacción.

[0029] "Patrón interno" significa una secuencia de ácidos nucleicos que es amplificada en la misma reacción de amplificación que un polinucleótido diana con el fin de permitir la cuantificación absoluta o relativa del polinucleótido diana en una muestra. Un patrón interno puede ser endógeno o exógeno. Es decir, un patrón interno puede producirse naturalmente en la muestra, o puede ser añadido a la muestra antes de amplificación. En un aspecto, pueden añadirse múltiples secuencias de patrón interno exógeno a una mezcla de reacción en una serie de concentraciones predeterminadas para proporcionar una calibración con la que puede compararse un amplicón diana para determinar la cantidad de su polinucleótido diana correspondiente en una muestra. La selección del número, las secuencias, las longitudes y otras características de patrones internos exógenos es una elección de diseño rutinaria para un experto en la materia. Preferentemente, los patrones internos endógenos, también referidos en la presente memoria descriptiva como "secuencias de referencia", son secuencias naturales para una muestra que se corresponden con genes mínimamente regulados que muestran un nivel de transcripción constante e independiente del ciclo celular, por ejemplo, Selvey y col. Mol. Cell Probes, 15:307-311 (2001). Entre las secuencias de referencia ilustrativas se incluyen, pero no se limitan a, secuencias a partir de los genes siguientes: GAPDH, β 2-microglobulina, ARN ribosómico 18S y β -actina (véase también, Selvey y col., más arriba).

[0030] "Kit" se refiere a cualquier sistema de suministro para suministrar materiales o reactivos para realizar un procedimiento de la invención. En el contexto de los ensayos de reacción, dichos sistemas de suministro incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, el transporte o el suministro de reactivos de la reacción (por ejemplo, sondas, enzimas, etc., en los recipientes apropiados) y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones por escrito para realizar el ensayo, etc.) de un lugar a otro. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más receptáculos (por ejemplo, cajas) que contienen los reactivos de reacción y/o materiales de soporte relevantes. Dicho contenido puede suministrarse al recipiente pretendido conjuntamente o por separado. Por ejemplo, un primer recipiente puede contener una enzima para su uso en un ensayo, mientras que un segundo recipiente contiene sondas.

[0031] "Ligamiento" significa formar un enlace o unión covalente entre los extremos de dos o más ácidos nucleicos, por ejemplo, oligonucleótidos y/o polinucleótidos, en una reacción activada por plantilla. La naturaleza del enlace o unión puede variar ampliamente y el ligamiento puede realizarse por medios enzimáticos o químicos. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los ligamientos se realizan normalmente por medios enzimáticos para formar una unión de fosfodiéster entre un carbono 5' de un nucleótido terminal de un oligonucleótido con un carbono 3' de otro oligonucleótido. En las siguientes referencias, que se incorporan como referencia, se describen diversas reacciones de ligamiento activadas por plantilla: Whitely y col., patente de EE.UU. 4.883.750; Letsinger y col., patente de EE.UU. 5.476.930; Fung y col., patente de EE.UU. 5.593.826; Kool, patente de EE.UU. 5.426.180; Landegren y col., patente de EE.UU. 5.871.921; Xu y Kool, Nucleic Acid Research, 27:875-881 (1999); Higgins y col. Methods in Enzymology, 68:50-71 (1979); Engler y col. The Enzymes, 15:3-29 (1982); y Namsaraev, patente de EE.UU. publicación nº 2004/0.110.213.

[0032] "Dispositivo de microfluídica" significa un sistema integrado de una o más cámaras, orificios y canales que están interconectados y en comunicación fluida y han sido diseñados para realizar una reacción o procedimiento analítico, ya sea en solitario o en cooperación con un dispositivo o instrumento que proporciona funciones de apoyo, como, por ejemplo, medios de introducción de muestras, secado de fluidos y/o de reactivos, control de temperatura y un sistema de detección. La microfluídica puede incluir además válvulas, bombas y recubrimientos funcionales especializados en sus paredes interiores, por ejemplo, para evitar la adsorción de componentes de la muestra o reactivos, facilitar el movimiento de los reactivos por electroósmosis, o similares. Dichos dispositivos están fabricados normalmente en o como un sustrato sólido, que puede ser vidrio, plástico u otros materiales poliméricos sólidos, y normalmente tienen un formato plano para facilidad de detección y vigilancia del movimiento de las muestras y reactivos, especialmente por medio de procedimientos ópticos y electroquímicos. Las características de un dispositivo microfluídico tienen normalmente dimensiones en sección transversal de menos de unos centenas de micrómetros cuadrados y los pasos tienen normalmente dimensiones capilares, teniendo por ejemplo, dimensiones máximas en sección transversal desde aproximadamente 500 μm a aproximadamente 0,1 μm . Los dispositivos de microfluídica tienen normalmente capacidades de volumen comprendidas en el intervalo de 1 μl a unos nl, por ejemplo, 10-100 nl. La fabricación y el funcionamiento de dispositivos de microfluídica son bien conocidos en la técnica tal como se ilustra por medio de las siguientes referencias que se incorporan como referencia: Ramsey, patentes de EE.UU. nº 6.001.229; 5.858.195; 6.010.607; y 6.033.546; Soane y col., patentes de EE.UU. nº 5.126.022 y 6.054.034; Nelson y col., patente de EE.UU. 6.613.525; Maher y col., patente de EE.UU. 6.399.952; Ricco y col. publicación de patente internacional nº WO-02/24.322; Bjornson y col. publicación de patente

internacional n° WO-99/19.717; Wilding y col., patentes de EE.UU. n° 5.587.128; 5.498.392; Sia y col. Electrophoresis, 24:3563-3576 (2003); Unger y col. Science, 288:113-116 (2000); Enzelberger y col., patente de EE.UU. 6.960.437.

[0033] "Amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos" o "NASBA" es una reacción de amplificación basada en la actividad simultánea de una transcriptasa inversa (normalmente transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV)), una ARNasa H y una ARN polimerasa (normalmente ARN polimerasa T7) que usa dos cebadores de oligonucleótidos, y que en condiciones convencionales puede amplificar una secuencia diana en un factor en el intervalo de 10^9 a 10^{12} en 90 a 120 minutos. En una reacción NASBA, los ácidos nucleicos son una plantilla para la reacción de amplificación sólo si son monocatenarios y contienen un sitio de unión de cebador. Dado que la NASBA es isotérmica (normalmente realizada a 41°C con las enzimas anteriores), puede realizarse una amplificación específica de ARN monocatenario si la desnaturalización de ADN bicatenario se evita en el procedimiento de preparación de muestras. Es decir, es posible detectar un ARN monocatenario diana en un fondo de ADN bicatenario sin producir resultados falsos positivos causados por ADN genómico complejo, a diferencia de otras técnicas, como RT-PCR. Usando indicadores fluorescentes compatibles con la reacción, como, por ejemplo, balizas moleculares, los procedimientos NASBA pueden realizarse con detección en tiempo real del amplicón. Las balizas moleculares son oligonucleótidos con estructura de tallo y horquilla con un marcador fluorescente en un extremo y un inactivador en el otro extremo, por ejemplo, 5'-fluoresceína y ácido 3'-(4-(dimetilamino)fenil)azo)benzoico (es decir, 3'-DABCYL), según se desvela en Tyagi y Kramer (citados anteriormente). Una baliza molecular de ejemplo puede tener cadenas complementarias de tallo de seis nucleótidos, por ejemplo, 4 G o C y 2 A o T, y una horquilla específica de la diana de aproximadamente 20 nucleótidos, de manera que la baliza molecular puede formar un híbrido estable con una secuencia diana a la temperatura de reacción, por ejemplo, 41°C. Una mezcla de reacción NASBA típica es Tris-HCl 80 mM [pH 8,5], MgCl₂ 24 mM, KCl 140 mM, DTT 1,0 mM, 2,0 mM de cada dNTP, 4,0 mM cada uno entre ATP, UTP y CTP, GTP 3,0 mM e ITP 1,0 mM en DMSO al 30%. La concentración de cebador es 0,1 µM y las concentraciones de baliza molecular son 40 nM. La mezcla de enzimas es sorbitol 375 mM, 2,1 µg de BSA, 0,08 U de ARNasa H, 32 U de ARN polimerasa T7 y 6,4 U de transcriptasa inversa de AMV. Una reacción puede comprender 5 µl de muestra, 10 µl de mezcla de reacción NASBA y 5 µl de mezcla de enzimas, para un volumen total de reacción de 20 µl. Se desvelan recomendaciones adicionales para realizar reacciones NASBA en tiempo real en las siguientes referencias que se incorporan como referencia: Polstra y col. BMC Infectious Diseases, 2:18 (2002); Leone y col. Nucleic Acid Research, 26:2150-2155 (1998); Gulliksen y col. Anal. Chem., 76:9-14 (2004); Weusten y col. Nucleic Acid Research, 30(6) e26 (2002); Deiman y col. Mol. Biotechnol., 20: 163-179 (2002). Las NASBA anidadas se realizan de forma similar a las PCR anidadas; es decir, el amplicón de una primera reacción NASBA se convierte en muestra para una segunda reacción NASBA usando un nuevo conjunto de cebadores, al menos uno de los cuales se une a un lugar interior del primer amplicón.

[0034] "Nucleósido" tal como se usa en la presente memoria descriptiva incluye los nucleósidos naturales, incluyendo las formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, tal como se describe en Kornberg y Baker, DNA Replication, 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992). "Análogos" en referencia a nucleósidos incluye nucleósidos sintéticos que tienen fracciones de bases modificadas y/o fracciones de azúcares modificadas, descritas por ejemplo, por Scheit, Nucleoside Analogs (John Wiley, Nueva York, 1980); Uhlman y Peyman, Chemical Reviews, 90: 543-584 (1990), o similares, con la salvedad de que son capaces de hibridación específica. Entre dichos análogos se incluyen nucleósidos sintéticos diseñados para potenciar las propiedades de unión, reducir la complejidad, aumentar la especificidad, y similares. Se describen polinucleótidos que comprenden análogos con propiedades potenciadas de hibridación o resistencia a la nucleasa en Uhlman y Peyman (citado anteriormente); Crooke y col. Exp. Opin. Ther. Patents, 6:855-870 (1996); Mesmaeker y col. Current Opinion in Structural Biology, 5:343-355 (1995); y similares. Entre los tipos de polinucleótidos de ejemplo que son capaces de potenciar la estabilidad dúplex se incluyen oligonucleótido N3→P5' fosforamidatos (referidos en la presente memoria descriptiva como "amidatos"), ácidos nucleicos peptídicos (referidos en la presente memoria descriptiva como "PNA"), oligo-2'-O-alquilribonucleótidos, polinucleótidos que contienen C-5 propinilpirimidinas, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), y compuestos similares. Dichos oligonucleótidos están disponibles comercialmente o pueden sintetizarse usando procedimientos descritos en la literatura especializada.

[0035] "Reacción en cadena de la polimerasa", o "PCR", significa una reacción para la amplificación *in vitro* de secuencias de ADN específicas por la extensión de cebador simultánea de cadenas complementarias de ADN. En otras palabras, la PCR es una reacción para fabricar múltiples copias o replicados de un ácido nucleico diana flanqueado por sitios de unión de cebadores, comprendiendo dicha reacción una o más repeticiones de las siguientes etapas: (i) desnaturalización del ácido nucleico diana, (ii) cebadores de renaturalización a los sitios de unión de cebadores, y (iii) extensión de los cebadores por una ácido nucleico polimerasa en presencia de trifosfatos de nucleósidos. Normalmente, la reacción se cicla a través de diferentes temperaturas optimizadas para cada etapa en un instrumento de ciclación térmica. Las temperaturas concretas, las duraciones de cada etapa y las tasas de cambio entre etapas dependen de muchos factores bien conocidos para los expertos en la materia, ejemplificados

por ejemplo, por las referencias: McPherson y col. editores, PCR: A Practical Approach y PCR: A Practical Approach, 2ª Ed. (IRL Press, Oxford, 1991 y 1995, respectivamente). Por ejemplo, en una PCR convencional que usa ADN polimerasa Taq, un ácido nucleico diana bicatenario puede desnaturalizarse a una temperatura > 90°C, los cebadores se renaturalizan a una temperatura en el intervalo de 50 a 75°C, y los cebadores se extienden a una temperatura en el intervalo de 72 a 78°C. El término "PCR" comprende formas derivadas de la reacción, incluyendo, pero sin limitarse a, RT-PCR, PCR en tiempo real, PCR anidada, PCR cuantitativa, PCR multiplexada y similares. Los volúmenes de reacción se encuentran entre unos centenaes de nanolitros, por ejemplo, 200 nL, y unos centenaes de µL, por ejemplo, 200 µL. "PCR de transcripción inversa", o "RT-PCR", significa una PCR que está precedida por una reacción de transcripción inversa que convierte un ARN diana en un ADN monocatenario complementario, que a continuación se amplifica, por ejemplo, Tecott y col., patente de EE.UU. 5.168.038 "PCR en tiempo real" significa una PCR para la cual la cantidad de producto de reacción, es decir, el amplicón, es vigilada conforme avanza la reacción. Existen muchas formas de PCR en tiempo real que difieren principalmente en la química de detección usada para vigilancia del producto de reacción, por ejemplo, Gelfand y col., patente de EE.UU. 5.210.015 ("TAQMAN™"); Wittwer y col., patentes de EE.UU. nº 6.174.670 y 6.569.627 (tintes de intercalación); Tyagi y col., patente de EE.UU. 5.925.517 (balizas moleculares). Las químicas de detección para PCR en tiempo real son revisadas en Mackay y col. Nucleic Acid Research, 30:1292-1305 (2002). "PCR anidada" significa una PCR en dos fases en la que el amplicón de una primera PCR se convierte en la muestra para una segunda PCR usando un nuevo conjunto de cebadores, al menos uno de los cuales se une en un lugar interior del primer amplicón. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "cebadores iniciales" en referencia a una reacción de amplificación anidada significa los cebadores usados para generar un primer amplicón, y "cebadores secundarios" significa el o los cebadores usados para generar un segundo amplicón, o anidado. "PCR multiplexada" significa una PCR en la que se realizan múltiples secuencias diana (o una única secuencia diana y una o más secuencias de referencia) simultáneamente en la misma mezcla de reacción, por ejemplo, Bernard y col. Anal. Biochem., 273:221-228 (1999) (PCR en tiempo real de dos colores). Normalmente, se emplean distintos conjuntos de cebadores para cada secuencia que se amplifica. Normalmente, el número de secuencias diana en una PCR múltiplex está en el intervalo de 2 a 10, o de 2 a 6, o más normalmente, de 2 a 4. "PCR cuantitativa" significa una PCR diseñada para medir la abundancia de una o más secuencias diana específicas en una muestra o espécimen. PCR cuantitativa incluye cuantificación absoluta y cuantificación relativa de dichas secuencias diana. Las medidas cuantitativas se preparan usando una o más secuencias de referencia que pueden someterse a ensayo por separado o junto con una secuencia diana. La secuencia de referencia puede ser endógena o exógena a una muestra o espécimen, y en el último caso, puede comprender una o más plantillas competidoras. Las secuencias de referencia endógenas típicas incluyen segmentos de transcritos de los siguientes genes: β-actina, GAPDH, β2-microglobulina, ARN ribosómico, y similares. Las técnicas para PCR cuantitativa son bien conocidas para los expertos en la materia, tal como se ilustra en las siguientes referencias que se incorporan como referencia: Freeman y col., Biotechniques, 26:112-126 (1999); Becker-Andre y col. Nucleic Acid Research, 17:9437-9447 (1989); Zimmerman y col. Biotechniques, 21:268-279 (1996); Diviacco y col. Gene, 122:3013-3020 (1992); Becker-Andre y col. Nucleic Acid Research, 17:9437-9446 (1989); y similares.

[0036] "Polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente y ambos términos significan un polímero lineal de monómeros de nucleótidos. Los monómeros que conforman los polinucleótidos y oligonucleótidos son capaces de unirse específicamente a un polinucleótido natural por medio de un patrón regular de interacciones entre monómeros, como tipo de apareamiento de bases de Watson-Crick, apilamiento de bases, tipos de apareamiento de bases Hoogsteen o Hoogsteen inverso, o similares. Dichos monómeros y sus uniones internucleosídicas pueden ser de ocurrencia natural o pueden ser análogos de los mismos, por ejemplo, análogos de ocurrencia natural o de ocurrencia no natural. Los análogos de ocurrencia no natural pueden incluir PNA, uniones internucleosídicas de fosforotiatos, bases que contienen grupos de unión que permiten la fijación de marcadores, como, por ejemplo, fluoróforos, o haptenos, y similares. Siempre que el uso de un oligonucleótido o polinucleótido requiere procesamiento enzimático, como una extensión por una polimerasa, un ligamiento por una ligasa, o similares, un experto en la materia comprendería que los oligonucleótidos o polinucleótidos en esos casos no contendrían determinados análogos de uniones internucleosídicas, fracciones de azúcares, o bases en cualquier o cualesquiera posiciones. Los polinucleótidos tienen un tamaño comprendido normalmente entre unas unidades monoméricas, por ejemplo, de 5 a 40, cuando se refieren normalmente como "oligonucleótidos", y varios miles de unidades monoméricas. Siempre que un polinucleótido u oligonucleótido esté representado por una secuencia de letras (en mayúsculas o en minúsculas), como "ATGCCTG", se entenderá que los nucleótidos están en orden 5'→3' de izquierda a derecha y que "A" denota desoxiadenosina, "C" denota desoxicitidina, "G" denota desoxiguanosina y "T" denota timidina, "I" denota desoxiinosina, "U" denota uridina, salvo que se indique lo contrario o se deduzca del contexto. A no ser que se observe lo contrario la terminología y los convenios de numeración atómica seguirán lo desvelado en Strachan y Read, Human Molecular Genetics, 2ª Ed. (Wiley-Liss, Nueva York, 1999). Normalmente los polinucleótidos comprenden los cuatro nucleósidos naturales (por ejemplo, desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina, desoxitimidina para ADN o sus alternativas de ribosa para ARN) unidos por enlaces de fosfodiéster; sin embargo, también pueden comprender análogos de nucleótido no naturales, incluyendo, por ejemplo, bases modificadas, azúcares o uniones internucleosídicas. Para los expertos en la materia está claro que

cuando una enzima tiene requisitos de sustrato de oligonucleótido o polinucleótido específicos para la actividad, por ejemplo, ADN monocatenario, ARN/DDN dúplex o similares, la selección de la composición apropiada para los sustratos de oligonucleótido o polinucleótido es bien conocida por el experto en la materia, especialmente según las recomendaciones de tratados como Sambrook y col. *Molecular Cloning*, Segunda Edición (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989), y referencias similares.

[0037] "Cebador" significa un oligonucleótido, ya sea natural o sintético que es capaz, tras la formación de un dúplex con una plantilla de polinucleótido, de actuar como punto de inicio de la síntesis de ácidos nucleicos y de extenderse desde su extremo 3' a lo largo de la plantilla de manera que se forma un dúplex extendido. La extensión de un cebador se realiza normalmente con una ácido nucleico polimerasa, como, por ejemplo, ADN o ARN polimerasa. La secuencia de nucleótidos añadida en el procedimiento de extensión está determinada por la secuencia del polinucleótido de plantilla. Normalmente, los cebadores son extendidos por una ADN polimerasa. Los cebadores tienen normalmente una longitud en el intervalo comprendido entre 14 y 40 nucleótidos, o en el intervalo entre 18 y 36 nucleótidos. Los cebadores se emplean en una diversidad de reacciones de amplificación nucleica, por ejemplo, reacciones de amplificación lineal usando un único cebador, o reacciones en cadena de la polimerasa, empleando dos o más cebadores. Las recomendaciones para seleccionar las longitudes y secuencias de los cebadores para aplicaciones concretas son bien conocidas para los expertos en la materia, tal como se pone de relieve en las siguientes referencias que se incorporan como referencia: Dieffenbach, editor, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, 2ª Edición (Cold Spring Harbor Press, Nueva York, 2003).

[0038] "Lectura" significa un parámetro, o parámetros, que se miden y/o detectan que pueden convertirse a un número o valor. En algunos contextos, lectura puede referirse a una representación numérica real de dichos datos recogidos o registrados. Por ejemplo, una lectura de señales de intensidad fluorescente a partir de una micromatriz es la dirección y la intensidad de fluorescencia de una señal que se está generando en cada sitio de hibridación de la micromatriz; así, dicha lectura puede registrarse o almacenarse de distintas formas, por ejemplo, como una imagen de la micromatriz, como una tabla de números, o similares. Análogamente, una lectura de una PCR en tiempo real puede ser una o más señales de intensidad fluorescente dentro de bandas de frecuencia especificadas como funciones del tiempo, u otro parámetro de reacción relacionado con el tiempo.

[0039] "Específico" o "especificidad" en referencia a la unión de una molécula con otra molécula, como, por ejemplo, una secuencia diana marcada para una sonda, significa el reconocimiento, contacto y formación de un complejo estable entre las dos moléculas, junto con sustancialmente menos reconocimiento, contacto o formación de complejo de esa molécula con otras moléculas. En un aspecto, "específico" en referencia a la unión de una primera molécula con una segunda molécula significa que la magnitud en que la primera molécula reconoce y forma un complejo con otra molécula en una reacción o muestra, forma el máximo número de los complejos con la segunda molécula. Preferentemente, este máximo número es al menos del cincuenta por ciento. En general, las moléculas que intervienen en un episodio de unión específico tienen áreas en sus superficies o en cavidades que dan origen al reconocimiento específico entre la unión de moléculas entre sí. Entre los ejemplos de unión específica se incluyen interacciones anticuerpo-antígeno, interacciones con sustrato enzimático, formación de dúplex o tríplex entre polinucleótidos y/o oligonucleótidos, interacciones receptor-ligando, y similares. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "contacto" en referencia a especificidad o unión específica significa que dos moléculas están suficientemente cerca para que interacciones químicas no covalentes débiles, como las fuerzas de van der Waals, la unión de hidrógeno, las interacciones de apilamiento de bases, las interacciones iónicas e hidrófobas, y similares, dominen en la interacción de las moléculas.

[0040] "Tm" o "temperatura de fusión" significa la temperatura a la que una población de moléculas de ácido nucleico bicatenario se disocian por la mitad en cadenas únicas. En la técnica se conocen varias ecuaciones para calcular la Tm de ácidos nucleicos. Por ejemplo, puede calcularse una sencilla estimación del valor de Tm mediante la ecuación. $T_m = 81,5 + 0,41 (\% G + C)$, cuando un ácido nucleico está en solución acuosa de NaCl 1 M. Se encuentran procedimientos para calcular Tm basados en modelos más completos de formación de dúplex y disociación en Breslaue y col. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:3746-3750 (1986); y Wetmur, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 26:227-259 (1991).

[0041] "Muestra" significa una cantidad de material de una fuente biológica, ambiental, médica o del paciente para la que se busca la detección o medida de ácidos nucleicos diana. Por una parte significa que se incluye un espécimen o cultivo (por ejemplo, cultivos microbiológicos). Por otra parte, significa que incluye muestras biológicas y ambientales. Una muestra puede incluir un espécimen de origen sintético. Las muestras biológicas pueden ser animales, incluidas las humanas, fluidas, sólidas (por ejemplo, heces) o de tejidos, así como alimentos líquidos y sólidos y productos e ingredientes alimentarios como productos lácteos, verduras, carne y subproductos cárnicos, y residuos. Las muestras biológicas pueden incluir materiales tomados de un paciente que incluyen, pero sin limitarse a, cultivos, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo, semen, aspirados por punción con aguja y similares. Las muestras biológicas pueden obtenerse a partir de todas las diversas familias de animales

domésticos, así como animales silvestres o salvajes, incluyendo, pero sin limitarse a, animales como ungulados, osos, peces, roedores, etc. Las muestras ambientales incluyen material ambiental como, por ejemplo, materia superficial, tierra, agua y muestras industriales, así como muestras obtenidas de instrumentos, aparatos, equipos, utensilios, artículos desechables y no desechables de procesamiento de alimentos y productos lácteos. Estos ejemplos no deben entenderse como limitativos de los tipos de muestras aplicables a la presente invención. Los términos "muestra" y "espécimen" se usan indistintamente.

[0042] "Espectralmente resoluble" en referencia a una pluralidad de marcadores fluorescentes significa que las bandas de emisión fluorescentes de los marcadores son suficientemente distintas, es decir, suficientemente no solapadas, para que las marcas moleculares a las que están fijados los marcadores respectivos puedan distinguirse basándose en la señal fluorescente generada por los marcadores respectivos mediante sistemas de fotodetección estándar, por ejemplo, empleando un sistema de filtros de paso de banda y tubos fotomultiplicadores, o similares, tal como se ilustra mediante los sistemas descritos en las patentes de EE.UU. n° 4.230.558; 4.811.218, o similares, o en Wheelless y col. páginas. 21-76, en Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis (Academic Press, Nueva York, 1985).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0043] La práctica de la presente invención puede emplear, salvo que se indique lo contrario, técnicas y descripciones convencionales de química orgánica, tecnología de polímeros, biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica e instrumentación analítica, que están dentro del ámbito de la técnica. Dichas técnicas convencionales incluyen medida de fluorescencia, recogida de señales ópticas, control de instrumentación, análisis de datos, electrónica, ingeniería mecánica, manipulación de fluidos, y similares. Pueden obtenerse ilustraciones específicas de técnicas adecuadas con referencia a los ejemplos en la presente memoria descriptiva mostrados más adelante. Sin embargo, naturalmente, pueden usarse también otros procedimientos convencionales equivalentes. Dichas técnicas y descripciones convencionales pueden encontrarse en manuales de laboratorio estándar como Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV), usando Antibodies: A Laboratory Manual, Cells: A Laboratory Manual, PCR Primer: A Laboratory Manual, y Molecular Cloning: A Laboratory Manual (todos de Cold Spring Harbor Laboratory Press), así como otros tratados y guías citados más adelante.

[0044] La invención se refiere a un procedimiento para realizar múltiples reacciones de amplificación, como PCR, en una única cámara de reacción, especialmente en condiciones cerradas a los fluidos. En algunas formas de realización se emplea una secuencia de reacciones de amplificación para amplificar y detectar diferentes polinucleótidos diana a partir de la misma muestra biológica. En otra forma de realización el procedimiento se realiza en un sistema de reacción cerrado a los fluidos.

[0045] Entre las formas de realización del procedimiento de la invención se incluye una pluralidad de reacciones de amplificación en el intervalo de 2 a 20, inclusive; en otro aspecto, la pluralidad está en el intervalo de 2 a 10, inclusive; y en otro aspecto, la pluralidad está en el intervalo de 2 a 3, inclusive. En una forma de realización preferida, se implementan dos reacciones de amplificación por el procedimiento de la invención. Tal como se ilustra adicionalmente más adelante, normalmente un sistema de reacción cerrado a los fluidos se prepara con, o provee de (en el caso de reactores comerciales), reactivos de amplificación precargados, normalmente en forma liofilizada, en distintos depósitos, por ejemplo, uno para cada reacción de amplificación realizada. El uno o más polinucleótidos diana que deben ser amplificados en cada reacción pueden incluir una o más secuencias de referencia, o patrones internos, como controles positivos. Preferentemente, se detectan y someten a vigilancia amplicones en tiempo real usando uno o más indicadores, tal como se describe más adelante. En particular, en algunas formas de realización con control de realimentación de la sincronización de la terminación y el inicio de la reacción, se emplean reacciones de amplificación en tiempo real. En una forma de realización preferida, en la terminación de una reacción, la mezcla de reacción se retira de la cámara de reacción y se transfiere a un depósito de residuos. Normalmente, puede usarse el mismo depósito de residuos para todas las reacciones de amplificación. En una forma de realización, el depósito de residuos contiene, o puede cargarse con, reactivos para neutralizar, asegurar o reproducir por otros medios los residuos de la amplificación y/o los deslavados de la cámara de reacción de forma segura para la manipulación y el transporte. Dichos reactivos incluyen, pero no se limitan a, desinfectantes, fungicidas, bactericidas, tampones de neutralización, compuestos absorbentes de líquidos, y similares. Los compuestos de ejemplo para absorción de compuestos acuosos incluyen, pero no se limitan a, almidón hidrolizado, poliácridonitrilo y poliácridato de sodio (por ejemplo, $-\text{[CH}_2\text{-CH(C(=O)ONa)]}_n\text{}$).

[0046] Las formas de realización del procedimiento de la invención incluyen un procedimiento para el control automatizado de una secuencia de reacciones de amplificación que se implementa con las siguientes etapas: (i) amplificación de uno o más polinucleótidos diana a partir de una parte de una muestra en presencia de un indicador en una mezcla de reacción, siendo capaz el indicador de generar una señal óptica relacionada con una cantidad de

un amplicón del polinucleótido diana en la reacción de amplificación, y estando dispuesta la mezcla de reacción en una cámara de reacción; (ii) vigilancia de la señal óptica del indicador en la mezcla de reacción; (iii) retirada automática de la mezcla de reacción de la cámara de reacción y transferencia a la cámara de reacción con una mezcla de reacción posterior siempre que la señal óptica alcance o supere un nivel predeterminado; y (iv) repetición de las etapas (i) a (iii) hasta que la secuencia de reacciones de amplificación haya sido realizada. Esta forma de realización contempla además la terminación automática de una secuencia de reacciones basada en los resultados reales de la reacción. Dichas formas de realización son especialmente útiles cuando es altamente conveniente la rápida producción de resultados de prueba, especialmente resultados de prueba negativos. Por ejemplo, los microorganismos relacionados existen frecuentemente en cepas benignas y en cepas patógenas, en los que las cepas patógenas pueden ser identificadas por un elemento genético en particular, por ejemplo, un plásmido que contiene un gen que confiere patogenicidad. En consecuencia, las pruebas para una cepa patógena de un microorganismo implican frecuentemente dos o más etapas, en las que una primera etapa de la prueba determina la presencia o ausencia de algún miembro de un género o especie del microorganismo, seguido por una o más pruebas sucesivas que identifican una forma patógena en particular. En dichas pruebas secuenciales, es ventajoso terminar la prueba siempre que el resultado de una etapa en particular indique la ausencia de la cepa patógena. Por ejemplo, puede realizarse una prueba secuencial para una cepa resistente a la metilicina de *Staphylococcus aureus* (SA) que comprende una primera etapa de amplificación y detección de una secuencia génica de SA conservada y una segunda etapa de amplificación y detección de un segmento del gen *mecA*, que es responsable en gran medida de la resistencia a la metilicina. En consecuencia, una forma de realización de la forma anterior de la invención proporciona un procedimiento para identificar un organismo mediante una pluralidad de reacciones de amplificación realizadas en secuencia, en las que al menos la primera reacción de amplificación determina la presencia o ausencia de un género o especie y la reacción o reacciones posteriores determinan una cepa específica. Después de cada reacción de amplificación se toma una decisión automáticamente sobre si poner fin o continuar con la prueba siguiente. Dicha forma de realización se implementa con las etapas siguientes: (i) amplificación de uno o más polinucleótidos diana de una parte de una muestra en presencia de un indicador en una mezcla de reacción, siendo capaz el indicador de generar una señal óptica relacionada con una cantidad de un amplicón del polinucleótido diana en la reacción de amplificación, estando la mezcla de reacción dispuesta en una cámara de reacción; (ii) vigilancia de la señal óptica del indicador en la mezcla de reacción; (iii) retirada automática de la mezcla de reacción de la cámara de reacción y transferencia a la cámara de reacción con una mezcla de reacción posterior siempre que la señal óptica alcance o supere un nivel predeterminado, y en caso contrario terminación automática de la secuencia de reacciones de amplificación; y (iv) repetición de las etapas (i) a (iii) hasta que la secuencia de reacciones de amplificación se haya realizado o haya terminado la secuencia de reacciones de amplificación. En los dos aspectos anteriores de la invención, la etapa de retirada de una mezcla de reacción de la cámara de reacción incluye una etapa de deslavado de la cámara de reacción con una solución de lavado. La solución de lavado usada, es decir, el "deslavado", puede ser transferida de forma fluida a un depósito de residuos antes de una reacción posterior.

[0047] Las formas de realización del procedimiento de la invención abordan problemas que están asociados con la formación de espuma y de burbujas causada por la transferencia de mezclas de reacción hacia y desde una cámara de reacción. Es altamente conveniente evitar la formación de burbujas o espumas en los instrumentos analíticos ya que su presencia puede deteriorar frecuentemente la sensibilidad y conduce a la generación de señales espurias, sobre todo en la detección o cuantificación de analitos fluorescentes o sondas en fase líquida, por ejemplo, Jekelis (2005), Biomed Instrum Technol, 39:232-236. Se ha descubierto que la formación de espuma o burbujas se reduce o se elimina en una cámara de reacción de la invención por calentamiento de la cámara de reacción vacía después de la retirada de una mezcla de reacción y antes de la carga de una mezcla de reacción posterior. En consecuencia, en un aspecto de la invención, entre reacciones sucesivas la cámara de reacción se purga de todos los líquidos por transferencia de aire a la cámara (bien por aspiración, es decir, succión del líquido al exterior, o bien por dispensación, es decir, introducción de líquido en el interior) y se calienta durante un periodo de tiempo inmediatamente antes de cargar una mezcla de reacción sucesiva. Las etapas de purga y calentamiento pueden realizarse sucesivamente o pueden realizarse de manera que se solapen en el tiempo. En una forma de realización preferida las etapas se realizan sucesivamente de manera que la cámara de reacción primero se purga mediante transferencia de aire a su interior, después de lo cual se calienta. En algunas formas de realización, la etapa de calentamiento se implementa en dos fases, en las que la cámara se calienta a una primera temperatura y se mantiene durante un primer intervalo de tiempo seguido por el cambio a una segunda temperatura que se mantiene durante un segundo intervalo de tiempo. En un aspecto, la primera temperatura es aproximadamente la temperatura de desnaturalización de ADN, que está normalmente en el intervalo de 85°C a 100°C, o en el intervalo de 92°C a 99°C, y el primer intervalo es de 0,5 s a 10 s, o de 1 s a 3 s; y la segunda temperatura es aproximadamente la temperatura de renaturalización de ADN, que está normalmente en el intervalo de 35°C a 75°C, o en el intervalo de 45°C a 72°C, y el segundo intervalo es de 0,5 s a 10 s, o de 1 s a 3 s. En otro aspecto, la primera temperatura está en el intervalo de 94°C a 96°C y el primer intervalo es de 0,5 s a 2 s; y la segunda temperatura está en el intervalo de 45°C a 70°C y el segundo intervalo es de 1 s a 2 s. En un aspecto, todos los procedimientos descritos anteriormente tienen formas de realización en las que incluyen además una etapa de calentamiento de la cámara de reacción vacía a una temperatura de desnaturalización de ADN durante un periodo de tiempo en los intervalos

indicados. En un aspecto adicional, dicha etapa de calentamiento se sigue de una etapa de enfriamiento en la que la cámara de reacción vacía se enfría a una temperatura de renaturalización de ADN antes de la transferencia fluida de una mezcla de reacción posterior a la cámara de reacción.

[0048] En las formas de realización de la invención, se usa un aparato para realizar la secuencia de reacciones de amplificación usando diferentes partes, normalmente partes alícuotas, de una muestra individual en condiciones cerradas a los fluidos. Opcionalmente, el aparato comprende: a) un cuerpo que tiene al menos canales primero y segundo formados en el mismo; y b) un vaso de reacción que se extiende desde el cuerpo, teniendo el vaso de reacción: i) una cámara de reacción para recibir líquido; ii) un orificio de entrada conectado con la cámara de reacción por medio de un canal de entrada; y iii) un orificio de salida conectado con la cámara de reacción por medio de un canal de salida, en el que el orificio de entrada del vaso está conectado con el primer canal en el cuerpo y en el que el orificio de salida del vaso está conectado con el segundo canal en el cuerpo. El aparato incluye opcionalmente además un respiradero en comunicación fluida con el segundo canal para evacuar el gas del segundo canal. El aparato comprende opcionalmente además una fuente de presión diferencial para forzar al fluido en el primer canal en el cuerpo a que fluya a través del orificio de entrada del vaso y en la cámara de reacción. El vaso incluye opcionalmente además: i) un armazón rígido que define paredes laterales de la cámara de reacción; y ii) películas poliméricas primera y segunda fijas a lados opuestos del armazón rígido para formar paredes principales opuestas de la cámara de reacción. El cuerpo del aparato incluye además una cámara de mezclado para mezclar una muestra fluida con reactivos de amplificación, estando la cámara de mezclado conectada con el orificio de entrada del vaso por medio del primer canal. El cuerpo del aparato incluye además una cámara de residuos, o depósito, para recibir el resto del líquido retirado a través del canal de salida, estando la cámara de residuos conectada al orificio de salida del vaso por medio del segundo canal. El cuerpo del aparato ha formado además en el mismo: i) una trayectoria de flujo de la muestra; y ii) una región de separación en la trayectoria de flujo de la muestra para separar un analito deseado de una muestra de fluido, estando la región de separación conectada al orificio de entrada del vaso por medio del primer canal. Opcionalmente la región de separación en el cuerpo comprende: a) una cámara de lisado en la trayectoria de flujo de la muestra para que los virus o las células de lisado en la muestra liberen el material de los mismos; y b) al menos un soporte sólido colocado en la cámara de lisado para capturar las células o virus que deben someterse a lisado. El vaso del aparato incluye una pluralidad de paredes que definen la cámara de reacción, comprendiendo al menos una de las paredes una lámina o película flexible, y el aparato comprende además: a) al menos una superficie térmica para puesta en contacto de la lámina o película; b) medios para aumentar la presión en la cámara de reacción, en los que el aumento de presión en la cámara es suficiente para forzar la lámina o película para que se adecue a la superficie térmica; y c) al menos un elemento térmico para calentar o enfriar la superficie e inducir un cambio de temperatura dentro de la cámara.

[0049] El vaso del aparato incluye además dos paredes principales opuestas y paredes laterales que conectan las paredes principales entre sí para formar la cámara de reacción, al menos dos de las paredes laterales son transmisoras ópticamente y están desplazadas angularmente entre sí, y el aparato comprende además un sistema óptico que tiene al menos una fuente luminosa para transmitir luz a la cámara de reacción a través de una primera de las paredes laterales ópticamente transmisoras y que tienen al menos un detector para detectar la luz emitida desde la cámara a través de una segunda de las paredes laterales ópticamente transmisoras.

[0050] Según se desvela con más amplitud en el ejemplo específico mostrado más adelante, dicho aparato está accionado preferentemente en condiciones cerradas a los fluidos en el que los fluidos y reactivos se mueven por medio de una o más válvulas y bombas que pueden crear presiones diferenciales en dichos fluidos y reactivos bajo control programado. De particular interés es el uso de una bomba de tipo pistón en asociación operativa con una válvula rotatoria que permite que las cámaras y/o depósitos se coloquen de forma selectiva en comunicación fluida para transferencia de fluidos y reactivos a los lugares deseados. Tal como se describe con más detalle más adelante, el funcionamiento de dichas bombas y válvulas está controlado por un microprocesador usando técnicas convencionales. Dicho microprocesador puede recibir también datos de uno o más detectores que vigilan las señales ópticas de los productos de reacción en la cámara de reacción y basándose en dichos datos transmite señales de control a las bombas y válvulas del aparato para poner fin a las reacciones, iniciar reacciones, iniciar etapas de deslavado, y similares.

Reacciones de amplificación secuenciales

[0051] Las formas de realización de la invención incluyen reacciones de amplificación secuenciales que son una pluralidad de amplificaciones separadas de diferentes polinucleótidos diana a partir de la misma muestra, que tienen lugar en la misma cámara de reacción de un sistema de reacción cerrado a los fluidos. Las formas de realización de la invención incluyen la dosificación de partes de una sola muestra en una cámara de reacción en condiciones cerradas a los fluidos de reacción. Opcionalmente, las partes de una muestra usadas en las amplificaciones separadas pueden ser iguales en volumen, o pueden ser desiguales, y la pluralidad de partes usadas puede comprender toda la muestra (es decir, pueden ser partes alícuotas de una muestra) o puede

comprender una parte de la muestra (es decir, pueden ser partes alicuantas de una muestra). Existen abundantes recomendaciones en la literatura especializada, como ponen de relieve las citas de la sección de Definiciones, para ayudar a los expertos en la materia para preparar elecciones de diseño rutinarias con el fin de crear reacciones de amplificación individuales para la invención, lo que incluye, pero sin limitarse a, lo siguiente: (i) el número de ciclos o duraciones de cada fase; (ii) cuando los ciclos de amplificación están bajo control automatizado, la selección de niveles de señal predeterminados para decidir poner fin a una reacción en curso y avanzar a la siguiente reacción; (iii) las partes relativas de una muestra que se incluirán con cada reacción en una secuencia; (iv) el número e identidades de polinucleótidos diana que se detectarán en cada reacción de amplificación; (v) las longitudes y secuencias de cebadores para cada reacción de amplificación; (vi) si algunas secuencias de referencia deben ser amplificadas en cada reacción; (vii) los tipos de indicadores que se usarán en cada reacción de amplificación; (viii) si en cada fase debe realizarse la misma clase de reacción de amplificación, por ejemplo, para reacciones de dos amplificaciones: PCR-PCR, NASBA-NASBA, PCR-NASBA, y similares. Normalmente, las reacciones de amplificación son reacciones PCR sucesivas o NASBA sucesivas y se realizan en condiciones convencionales de reacción. Normalmente, se usan los mismos indicadores en cada reacción de amplificación de una secuencia.

[0052] Tal como se menciona anteriormente, cada reacción de amplificación tiene lugar en una mezcla de reacción que comprende una parte de una muestra y reactivos de amplificación. La selección del tamaño de una parte para una reacción de amplificación en particular es una opción de diseño de un experto en la materia que depende de factores como (i) la naturaleza (por ejemplo, secuencia, susceptibilidad de formación de estructuras secundarias, etc.) de los polinucleótidos diana, (ii) la concentración o cantidad de polinucleótidos diana esperada, (iii) las concentraciones y la naturaleza de los reactivos de amplificación, y similares. Como anteriormente, existen abundantes recomendaciones para los expertos en la materia para preparar dichas opciones de diseño rutinarias, tal como se pone de relieve en la literatura pública especializada sobre la aplicación de reacciones de amplificación en el campo de las ciencias biológicas. En general, se mezcla una parte eficaz de una muestra con reactivos de amplificación para formar una mezcla de reacción. En un aspecto, una parte eficaz es una cantidad suficiente para permitir el inicio de una reacción de amplificación. En otro aspecto, una parte eficaz es una cantidad suficiente para proporcionar en una mezcla de reacción una concentración diana de al menos 1 polinucleótido diana por ml, o en otro aspecto, al menos 10 polinucleótidos diana por ml, o en otro aspecto, al menos 50 polinucleótidos diana por ml, o en otro aspecto al menos 100 polinucleótidos diana por ml, o en otro aspecto, al menos 500 polinucleótidos diana por ml, o en otro aspecto, al menos 1.000 polinucleótidos diana por ml. En otro aspecto más, una parte eficaz es una cantidad que es del 0,5 al 50% del volumen de la muestra, o una cantidad que es del 10 al 50% del volumen de la muestra.

[0053] En algunas formas de realización, la invención incluye procedimientos de realización de reacciones de transcriptasa inversa en serie con una reacción de amplificación de fases múltiples. En una forma de realización, una pluralidad de secuencias de ARN, como, por ejemplo, ARNm seleccionados extraídos de una muestra celular o tisular, puede ser amplificada del modo siguiente: (i) transcripción mediante secuencias de ARN de reactivos de transcripción inversa, por ejemplo, en un sistema de reacción cerrado a los fluidos, para formar una muestra de polinucleótidos diana monocatenarios complementarios; (ii) transferencia de una parte de la muestra y los reactivos de amplificación a una cámara de reacción para formar una mezcla de reacción; (iii) amplificación en la mezcla de reacción de al menos un polinucleótido diana desde la parte en presencia de un indicador fluorescente, siendo el indicador fluorescente capaz de generar una señal óptica relacionada con una cantidad de un amplicón en la mezcla de reacción; (iv) vigilancia de la señal óptica del indicador fluorescente; y (v) retirada de la mezcla de reacción de la cámara de reacción e inicio de una reacción de amplificación posterior siempre que la señal óptica alcance o supere un nivel predeterminado, y (vi) repetición de las etapas (ii) a (v) hasta que se determine la ausencia, la presencia y/o la cantidad de cada polinucleótido diana de la pluralidad. La etapa de transcripción se realiza con una reacción de transcriptasa inversa convencional, cuyos componentes, es decir, reactivos de transcriptasa inversa (transcriptasa inversa, trifosfatos de nucleósido, tampón de reacción), están fácilmente disponibles comercialmente, por ejemplo, en Ambion, Inc. En un aspecto, el aspecto de la invención anterior se realiza en un sistema de reacción cerrado a los fluidos.

Control de amplificaciones secuenciales

[0054] En algunas formas de realización, la invención incluye un procedimiento para poner fin y/o iniciar automáticamente reacciones de amplificación sucesivas, ya sea con control de bucle abierto o con control de bucle cerrado basándose en medidas en tiempo real de ciertos parámetros de reacción. En algunas formas de realización con control de bucle abierto, una reacción de amplificación se realiza durante un número de ciclos predeterminado o durante un tiempo de reacción predeterminado, después de lo cual se pone fin a la reacción, por ejemplo, simplemente retirando la mezcla de reacción de la cámara de reacción, se mezcla una parte eficaz de la muestra con reactivos de amplificación apropiados para formar una nueva mezcla de reacción, se carga la nueva mezcla de reacción en la cámara de reacción y se selecciona un programa de temperaturas de tiempos para efectuar una reacción de amplificación. Opcionalmente, después de que una mezcla de reacción actual se retira de la cámara de

reacción y se transfiere al depósito de residuos, la cámara de reacción puede deslavarse para eliminar trazas de la mezcla de reacción actual que permanezcan en la cámara. Dicho deslavado se lleva a cabo realizando uno o más ciclos de transferencia de solución de lavado a partir de un depósito de solución de lavado a la cámara de reacción y de transferencia de la solución de lavado a la cámara de reacción, o el deslavado, en el depósito de residuos. Las soluciones de lavado pueden ser agua, o pueden ser agua mezclada con otros reactivos como detergentes, nucleasas o similares, que se añaden con el fin de reducir las señales espurias generadas por el material que queda de una reacción de amplificación anterior.

[0055] En algunas formas de realización con control de bucle cerrado, se vigila un parámetro de reacción de una reacción de amplificación y cuando alcanza un valor predeterminado, o cruza un valor umbral predeterminado, la reacción se detiene, al menos una parte eficaz de la muestra se mezcla con reactivos de amplificación apropiados, y se inicia una reacción de amplificación posterior. El parámetro de reacción usado para determinar cuándo iniciar una amplificación sucesiva puede ser cualquier parámetro que tenga una relación bien definida con la acumulación de productos de reacción, o en otras palabras, con el grado de terminación de una reacción. Preferentemente, el parámetro de reacción tiene una relación monótona con la acumulación de uno o más productos en una reacción, de manera que los valores crecientes del parámetro pueden guardar una correlación positiva o negativa con la cantidad o cantidades de dichos productos, que son normalmente uno o más amplicones. Los parámetros de reacción pueden incluir, pero no se limitan a, densidad óptica de la mezcla de reacción; temperatura; pH; concentración de productos de reacción secundarios; concentración de amplicón, basándose esta última, por ejemplo, en una o más señales fluorescentes, señales colorimétricas, señales quimioluminiscentes, señales electroquimioluminiscentes o señales electroquímicas; y similares. En algunas formas de realización, un parámetro de reacción está relacionado monótonamente con la concentración de al menos un amplicón en una reacción de amplificación. Dicho amplicón puede producirse a partir de un polinucleótido diana, o una secuencia de referencia u otro patrón interno. Así, en una secuencia de reacciones PCR con control de bucle cerrado, las reacciones de amplificación son PCR en tiempo real. En algunas formas de realización, el parámetro de reacción es un amplicón detectado por un indicador fluorescente cuya señal está relacionada monótonamente con la concentración del amplicón en la mezcla de reacción. Cuando existe variabilidad en la cantidad o calidad del polinucleótido diana en una muestra o espécimen, el control de bucle cerrado de las reacciones puede producir lecturas más consistentes y menos variables.

[0056] En algunas aplicaciones, una muestra puede o no contener un polinucleótido diana de interés. Así, en algunas formas de realización, se vigila el amplicón de una o más secuencias de referencia, u otro patrón interno, para determinar cuándo iniciar reacciones sucesivas. Es decir, dicho patrón interno actúa como un control positivo y un parámetro de reacción para iniciar una reacción sucesiva. En otro aspecto, los dos amplicones de un patrón interno y de un polinucleótido diana deben alcanzar o superar niveles predeterminados, que pueden ser iguales o diferentes, con el fin de iniciar una reacción sucesiva.

[0057] En algunas formas de realización, cuando una reacción de amplificación es una PCR bajo un control de bucle abierto, el número de ciclos realizados antes del inicio de la siguiente reacción está en el intervalo de entre 20 y 40, o en otro aspecto, en el intervalo de entre 20 y 30. En otras formas de realización, cuando una reacción de amplificación en curso se detiene y se inicia una reacción de amplificación posterior después de un tiempo predeterminado, el tiempo predeterminado puede seleccionarse empíricamente para el tipo de muestra en particular que se va a analizar. Por ejemplo, en muestras que tienen secuencias de referencia, el tiempo predeterminado puede seleccionarse como el tiempo promedio que se invierte en amplificar una secuencia de referencia seleccionada en cierta fracción, por ejemplo, la cuarta parte, la tercera parte, la mitad, o similares, de su valor meseta en una muestra promedio.

[0058] En algunas formas de realización, dicha terminación automática de una reacción e inicio de una reacción de amplificación posterior está bajo control de bucle cerrado. Es decir, las reacciones de amplificación de la invención se realizan preferentemente en un aparato que permite vigilar los parámetros asociados con múltiples clases de amplicones. Entre dichos parámetros se incluyen, pero no se limitan a, señales fluorescentes generadas por diferentes indicadores fluorescentes asociados con cada uno de al menos dos (y normalmente tres) polinucleótidos diana diferentes. Dicha vigilancia incluye la recogida de señales, su conversión en forma digital, el tratamiento de la información digital en un procesador para determinar si se debe poner fin a una reacción en curso e iniciar una reacción posterior, y la generación de señales de control para implementar dichos cambios. La instrumentación para realizar dichas funciones es bien conocida en la técnica, como se pone de relieve en las siguientes referencias estándar: Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2ª edición (Springer, 1999); Johnson, *Photodetection and Measurement* (McGraw-Hill Professional, 2003); Sharma y col. *Introduction to Fluorescence Spectroscopy* (Wiley-Interscience, 1999); Sokoloff, *Applications in Labview* (Prentice Hall, 2003); y similares.

[0059] Cuando las reacciones de amplificación son bajo control de bucle cerrado, el valor del parámetro de

reacción en el que se inicia una reacción posterior puede seleccionarse en múltiples formas. En algunas formas de realización, el valor se determina en función de un nivel de señal de base, o valor de ruido de fondo, o como una característica de una función que describe la acumulación de uno o más amplicones en la mezcla de reacción, según se ilustra en las fig. 1A y 1B. En la fig. 1A, las curvas (1000) y (1002) representan amplicón acumulado de, por ejemplo, una secuencia de referencia y un polinucleótido diana, respectivamente, según se determina mediante dos señales fluorescentes diferentes generadas por sondas específicas del amplicón, por ejemplo, balizas moleculares que tienen tintes fluorescentes que emiten fluorescencia en longitudes de onda distinguibles. Dichas curvas son normalmente sigmoideas tal como se ilustra, cada una de las cuales tiene una región de baja pendiente positiva por debajo de un nivel de ruido, o señal de base, (1004), una región logarítmica lineal (1010) de alta pendiente positiva, y una región de meseta (1012) de baja pendiente positiva que corresponde a la fase de la reacción en la que los reactivos se agotan y/o se acumulan productos secundarios que interfieren. En algunas formas de realización se inicia una reacción posterior cuando la curva (1002) del amplicón diana alcanza o supera un nivel predeterminado (1006), que puede ser una función de señal de base (1004). En algunas formas de realización, se inicia una reacción posterior cuando la curva (1002) del amplicón diana y la curva (1000) de una secuencia de referencia alcanzan o superan un nivel predeterminado (1006). La selección de nivel predeterminado (1006) es una opción de diseño rutinaria para el experto en la materia que puede depender de una diversidad de factores, por ejemplo, estando la probabilidad de secuencias estrechamente relacionada con la diana amplificada en la reacción (es decir, ausencia de especificidad en un ensayo), la calidad de la muestra y la magnitud en que contribuye al valor de la señal de base, el tipo de reacción de amplificación usado, el sistema de detección de señal empleado, y similares. En algunas formas de realización, el nivel predeterminado (1006) es un múltiplo del valor de la señal de base (1004). A modo de ejemplo, el nivel predeterminado (1006) puede seleccionarse entre un intervalo de entre 1,5 y 25 veces el valor de la señal de base. En otras formas de realización, el nivel predeterminado (1006) es 1,5 veces el valor de la señal de base, o 2 veces el valor de la señal de base, o 3 veces el valor de la señal de base, o 5 veces el valor de la señal de base, o 10 veces el valor de la señal de base. Un valor de la señal de base puede ser función, por ejemplo, de un promedio, de medidas fluorescentes de un número de ciclos predeterminado, o durante un intervalo de tiempo predeterminado, próximo al inicio de una reacción de amplificación. Las medidas fluorescentes pueden ser, o incluir, medidas de señales del mismo canal que para la señal fluorescente generada por el amplicón objeto de vigilancia. En algunas formas de realización, un valor de la señal de base es función de los valores de señal óptica iniciales 10, o 25, o 50, o 100 medidos para al menos una curva de crecimiento de amplicón. En algunas formas de realización, dicha función es una media aritmética de dichos valores iniciales de señal óptica. Preferentemente, el nivel predeterminado (1006) interseca a la curva (1002) y/o la curva (1000) en sus regiones logarítmicas lineales respectivas (1010). Los amplicones pueden identificarse y/o medirse con diversos marcadores que generan señales ópticas, lo que incluye pero sin limitarse a, indicadores fluorescentes, marcadores colorimétricos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores electroquimioluminiscentes, y similares.

[0060] En algunas formas de realización, el valor de un parámetro de reacción para el que se inicia una reacción posterior puede determinarse mediante la característica de una curva que describe la relación de un amplicón acumulado y el número de ciclos o el tiempo en una reacción de amplificación, según se ilustra en la fig. 1B (referido en la presente memoria descriptiva como "curva de crecimiento de amplicón"). Al igual que en la fig. 1A, la curva (1013) y la curva (1015) describen la acumulación de amplicones correspondientes a una secuencia de referencia y un polinucleótido diana, respectivamente. Las dos curvas en cada punto tienen pendientes positivas, sin embargo, la magnitud de las pendientes cambia desde los primeros momentos de la reacción a las fases tardías de la reacción, siendo las pendientes planas al principio, pronunciadas en la región logarítmica lineal, y planas de nuevo en la región meseta. Si se toma la derivada de dicha curva, se produce una función aproximadamente simétrica (1018) que tiene un máximo en el valor de tiempo o ciclo (1019). El valor (1019) es una raíz de la primera derivada de la curva (1015). El valor (1019) corresponde al punto (1014) en el que la pendiente de curva (1015) interrumpe el crecimiento e inicia el decrecimiento, es decir, es un punto de inflexión, que está situado aproximadamente en la mitad de la región logarítmica lineal, lo que hace de ella una característica atractiva de la curva (1015) para determinar un valor de señal (1022) en el que se inicia una reacción posterior. En una forma de realización adicional, puede determinarse una segunda derivada de la curva (1015) para producir otra función aproximadamente simétrica ilustrada por la curva (1021). La raíz de la curva (1021) proporciona otra característica candidata para determinar un valor de señal, por ejemplo, (1023), en el que iniciar una reacción posterior. La determinación de valores de señal correspondientes a dichas características de las curvas (1015) que describen la acumulación de amplicón se desvela en McMillan y col., patente de EE.UU. 6.783.934. Tal como se menciona anteriormente, el término "curva de crecimiento de amplicón" significa una curva, como, por ejemplo, las curvas (1000), (1002), (1013) o (1015), que describe la acumulación de amplicón en una mezcla de reacción en función del número de ciclos o el tiempo, o en función de un parámetro relacionado, por ejemplo, la temperatura en una reacción de amplificación no regulada por la temperatura, o similares. Se entiende que características, como las derivadas primera y segunda, de las curvas de crecimiento de amplicones se calculan repetidamente durante un ensayo mientras se recogen los datos que configuran la curva: Se entiende también que, debido a la naturaleza en tiempo real de los ensayos anteriores, sólo puede ser posible determinar ciertas características de una curva de crecimiento de amplicón retrospectivamente; así, dichas características pueden no ser adecuadas en todas las situaciones para determinar cuándo debería

iniciarse una reacción de amplificación posterior. La selección de una característica apropiada de una curva de crecimiento de amplicón para determinar cuándo iniciar una reacción de amplificación posterior es una opción de diseño rutinaria para un experto en la materia.

[0061] En algunas formas de realización, el control de bucle cerrado de inicio de una reacción posterior se implementa mediante la detección de una señal óptica que corresponde a un parámetro de reacción que alcanza o supera un valor predeterminado. Preferentemente, el parámetro de reacción es la concentración de un amplicón, normalmente el amplicón que corresponde a un polinucleótido diana. Se dispone de una diversidad de modelos de generación de señales fluorescentes para producir una señal fluorescente en una reacción de amplificación que está relacionada monótonamente con la concentración de amplicón. Entre dichos modelos de generación de señales fluorescentes se incluyen, pero no se limitan a, balizas moleculares, tintes de intercalación, como verde SYBR, sondas TAQMAN™, cebadores AMPLIFLUOR™, cebadores "escorpión", y similares, que se desvelan en referencias citadas anteriormente. Puede emplearse una diversidad de sistemas de instrumentación para realizar dicho control de bucle cerrado basándose en una señal óptica generada por un parámetro de reacción, como concentración de amplicón. Tal como se describe con más detalle más adelante, en un aspecto, un sistema de detección óptico multicanal desvelado por Christel y col., patente de EE.UU. 6.369.893 está bien adaptado para dichas medidas. En la fig. 1C se ilustra un diagrama de dicho sistema aplicable a la presente invención. Christel y col. proporcionan láseres de diodos (1050) a (1056) para iluminar una mezcla de reacción en la cámara de reacción (1070). La fluorescencia excitada por los diodos láser (1050) a (1056) es recogida por los detectores (1060) a (1066), que normalmente están asociados operativamente cada uno con un filtro pasabanda que restringe la longitud de onda de la luz que es detectada. Los haces de excitación de los diodos láser (1050) a (1056) pueden ser iguales o diferentes. Opcionalmente, los filtros pasabanda se seleccionan selectivamente para hacer pasar la fluorescencia emitida por una pluralidad de tintes fluorescentes resolubles espectralmente de manera que cada detector (1060) a (1066) recoja la fluorescencia principalmente de sólo uno de la pluralidad de tintes fluorescentes. Para su uso con la presente invención, a uno de los pares de diodos láser-detectores, por ejemplo, (1052) y (1062), se le asigna la detección de la señal fluorescente de un amplicón que corresponde a un polinucleótido diana, y a uno de los pares de diodos láser-detectores, por ejemplo, (1056) y (1066), se le asigna la detección de la señal fluorescente de un amplicón que corresponde a una secuencia de referencia.

[0062] El control de todos los componentes del sistema de detección y el sistema de reacción cerrado a los fluidos (1086) se realiza mediante el microprocesador (1080). Las señales ópticas recogidas por los detectores (1060) a (1066) son procesadas mediante óptica convencional y convertidas en señales eléctricas, que, después de preamplificación y acondicionamiento (1082) convencionales, son digitalizadas para su almacenamiento y/o ulterior tratamiento mediante el microprocesador (1080). Opcionalmente el microprocesador (1080) está programado para vigilar continuamente el valor de la señal recogida por uno de los detectores, por ejemplo, el detector (1062). Cuando el valor alcanza o supera un nivel preprogramado, a continuación el microprocesador (1080) inicia una subrutina que proporciona a los controladores (1084) una serie de instrucciones para accionar los componentes de sistema de reacción cerrado a los fluidos (1086) para iniciar una reacción de amplificación posterior. El microprocesador (1080) también cambia y/o regula la temperatura de cámara de reacción (1070) a través del controlador (1088). En algunas formas de realización que emplean control de bucle cerrado, el microprocesador (1080) puede calcular los valores de las características de las curvas, como (1013) o (1015) de la fig. 1B, en intervalos predeterminados de manera que puedan compararse con un nivel predeterminado. Cuando dicho valor calculado alcance o supere un nivel predeterminado, a continuación el microprocesador (1080) inicia la subrutina para iniciar una reacción de amplificación posterior, tal como se describe anteriormente.

[0063] Tal como se menciona anteriormente, un ordenador realiza preferentemente las etapas del procedimiento de iniciar una reacción posterior, tal como se describe anteriormente. En una forma de realización, un ordenador comprende una unidad de procesamiento, una memoria, un dispositivo de E/S, y estructuras asociadas de bus de direcciones/datos para la comunicación de información entre sus elementos. La unidad de procesamiento puede ser un microprocesador convencional gobernado por un sistema operativo apropiado, lo que incluye procesadores RISC y CISC, un microprocesador dedicado que usa firmware integrado o un circuito de procesamiento de señales digitales (DSP) personalizado, que está dedicado a las tareas específicas de procesamiento del procedimiento. La memoria puede estar dentro del microprocesador, es decir, antememoria de nivel 1, S-RAM rápida, es decir, antememoria de nivel 2, D-RAM, o en disco, ya sea óptico o magnético. El dispositivo de E/S puede ser cualquier dispositivo capaz de transmitir información entre el ordenador y el usuario, por ejemplo, un teclado, un ratón, una tarjeta de red, o similares. El bus de direcciones/datos puede ser un bus PCI, un bus NU, ISA, o cualquier otra estructura de bus similar. Cuando el ordenador ejecuta el procedimiento de la invención, las etapas del procedimiento descrito anteriormente pueden estar comprendidas en un programa almacenado o en un producto legible por ordenador. Dicho producto legible por ordenador puede incluir también programas para interfaces gráficas de usuario y programas para modificar los ajustes en sistemas de electroforesis o dispositivos de captura de datos. Opcionalmente pueden usarse algoritmos y productos legibles por ordenador para controlar las operaciones descritas en la fig. 1C en un sistema de reacción cerrado a los fluidos seleccionado.

[0064] Puede usarse un producto legible por ordenador que comprende un programa para su ejecución por un ordenador para controlar el rendimiento de una reacción de amplificación anidada en un sistema de reacción cerrado a los fluidos en el procedimiento de la invención. El programa puede comprender instrucciones para lo siguiente: (a) lectura de valores de una señal óptica de una reacción de amplificación en curso, estando la señal óptica relacionada monótonamente con la concentración de un amplicón en la reacción de amplificación en curso, y los valores de la señal óptica que tienen un valor más reciente; (b) determinación de un nivel de señal de base de los valores de la señal óptica; (c) cálculo de un nivel predeterminado a partir de los valores de la señal óptica; (d) comparación del valor predeterminado con el valor más reciente de la señal óptica; (e) inicio de una reacción de amplificación posterior siempre que el valor más reciente de la señal óptica sea igual o mayor que el nivel predeterminado; y (f) repetición de las etapas (d) y (e) hasta que se inicie la reacción posterior. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "el valor más reciente" en referencia a una señal óptica significa el valor que corresponde a la medida más reciente de una señal óptica por parte de un sistema de detección que está vigilando la reacción de amplificación. En otras palabras, es el valor más reciente de una curva de crecimiento de amplicón tal como se genera en el curso de una reacción de amplificación. Opcionalmente la etapa de inicio de una etapa de amplificación posterior incluye además la lectura de una tabla de partes de muestra para un valor de una parte de muestra que se usará en la reacción posterior, la recogida en la tabla de parte de muestra de los valores de tamaños de la parte que se usarán en cada reacción de una secuencia, la generación de instrucciones para eliminar la mezcla de reacción actual de la cámara de reacción, la generación de instrucciones para transferir una parte de la muestra a una cámara de mezclado, la generación de instrucciones para transferir los reactivos de amplificación de la reacción posterior a la cámara de mezclado para formar una mezcla de reacción y la generación de instrucciones para transferir la mezcla de reacción a la cámara de reacción. La etapa de inicio puede incluir además las etapas de lectura de una tabla de parámetros de reacción para valores de parámetros de reacción que se usará en la reacción posterior, en la que la tabla de parámetros de reacción recoge los valores de parámetros de reacción que se emplearán en cada reacción de la secuencia.

[0065] A modo de ejemplo, un indicador fluorescente que puede usarse con la invención es un cebador con estructura de horquilla AMPLIFLUOR™ que sirve para generar una señal fluorescente cuya intensidad está relacionada monótonamente con la concentración de un amplicón, por ejemplo, Whitcombe y col. Nature Biotechnology, 17: 804-808 (1999). Brevemente, un cebador con estructura de horquilla AMPLIFLUOR™ tiene una parte de unión a la diana, que se selecciona con un cebador convencional, y una parte en forma de horquilla en el extremo 5' de la parte de unión a la diana, que mantiene el par fluoróforo-inactivador en estrecha proximidad siempre que la estructura de horquilla esté presente, inactivando con ello cualquier señal fluorescente del fluoróforo. Durante la etapa de extensión inversa de la PCR, la región dúplex de la estructura de horquilla está desplazada cuando la cadena inversa se extiende a través de ella hasta el extremo del polinucleótido diana, moviendo con ello el inactivador lejos de la proximidad del fluoróforo de manera que se genera una señal fluorescente. Cuando se acumula el producto de ADN bicatenario, la señal fluorescente de la mezcla de reacción aumenta. Cuando la intensidad de la señal fluorescente alcanza o supera un nivel predeterminado, por ejemplo, 3 veces el valor de base, se cambia automáticamente un parámetro sensible a la diana para evitar una amplificación adicional de dicho amplicón.

[0066] En algunas aplicaciones una muestra puede contener o no un polinucleótido diana. Opcionalmente el amplicón de una o más secuencias de referencia, u otro patrón interno, es objeto de vigilancia para determinar si o cuándo iniciar una reacción en una fase posterior. Es decir, dicho patrón interno actúa como un control positivo y como un parámetro de reacción para iniciar una reacción en una fase posterior. Opcionalmente, los dos amplicones de un patrón interno y de un polinucleótido diana deben alcanzar o superar niveles predeterminados, que pueden ser iguales o diferentes, con el fin de iniciar una reacción en una fase posterior.

Sistemas para implementar los procedimientos de la invención

[0067] Los procedimientos de la invención pueden implementarse mediante una variedad de sistemas y aparatos que se basan en diferentes enfoques de ingeniería para fijación de reactivos, movimiento de reactivos y entrada y salida productos de reacción en las reacciones, control de la temperatura y detección de productos de reacción. La selección de un sistema depende de muchos factores que incluyen, pero sin limitarse a, disponibilidad de muestras o especímenes, forma de muestras o especímenes, grado de peligro o infectividad planteado por las muestras o especímenes, conveniencia de la transportabilidad, naturaleza de la reacción de amplificación empleada, número de muestras que deben someterse a ensayo, y similares. Entre los sistemas de ejemplo que pueden usarse para implementar procedimientos de la invención se incluyen sistemas de reacción cerrado a los fluidos que emplean una válvula rotatoria y una bomba de fluidos de tipo pistón bajo control de un microprocesador, tal como se desvela en Christel y col., patente de EE.UU. 6.369.893 y Dority, patente de EE.UU. 6.374.684; cubetas desechables cerradas que tienen depósitos de reactivos flexibles para activación mecánica de muestras, reactivos y productos a través de cámaras de reacción y estaciones de detección, según se desvela en Schnipelsky y col.,

patente de EE.UU. 5.229.297; y Findlay y col. Clin. Chem., 39: 1927-1933 (1993); y dispositivos de microfluídica, tal como se desvela en las referencias citadas en Definiciones, y desveladas adicionalmente en Shoji y col. Appl. Biochem. Biotechnol., 41:21-34 (1993) y J. Micromech. Microeng., 4:157-171 (1994); McCormick y col. Anal. Chem., 69:2626-2630 (1997); Cheng y col. Topics Curr. Chem., 194:215-231 (1998); Stave y col., patente de EE.UU. 6.663.833; Neri y col., patente de EE.UU. 5.714.380; Northrup y col., patente de EE.UU. 5.589.136; y similares. Dichos sistemas son capaces de transferencia fluida de reactivos, muestras y productos de reacción entre depósitos y cámaras de reacción de una forma controlada. Es decir, dichos sistemas mueven los reactivos, muestras, productos de reacción y similares, en soluciones líquidas bajo una fuerza de movimiento de líquidos de una forma dirigida. Entre las fuerzas de movimiento de líquidos se incluyen presión diferencial generada por diversas clases de bombas o depósitos de gas comprimido, bombas electrocinéticas y similares.

[0068] En algunas formas de realización, el procedimiento de la invención puede implementarse de forma cómoda mediante diseños y procedimientos específicos de operación de válvula rotatorias, depósitos de reactivos y residuos, y cámaras de reacción desveladas en general en Dority (citado anteriormente). En formas de realización adicionales, en las que se desea vigilancia de productos de amplificación en tiempo real, dicho aparato se usa de forma cómoda con el controlador de temperatura y el fluorómetro desvelados por Christel y col. (citado anteriormente). Tal como se describirá con más detalle más adelante, el aparato de Christel y col. puede usarse además para proporcionar control de bucle cerrado del inicio de una reacción de segunda fase en el sistema de reacción cerrado a los fluidos de Dority.

[0069] Las fig. 2A-2K muestran esquemáticamente el funcionamiento de un aparato que sigue el enfoque de diseño general desvelado en Dority (citado anteriormente) para realizar una secuencia de dos reacciones de amplificación para amplificar diferentes polinucleótidos diana a partir de dos partes de la misma muestra en condiciones cerradas a los fluidos. Después de cargar una muestra o espécimen en el sistema de la reacción y de preacondicionarla, por ejemplo, mediante ruptura de células de lisado, tejidos, y similares, la solución resultante, referida como la "muestra", es transferida de manera fluida a un depósito de muestras a partir del cual se dispensan las partes a una cámara de reacción bajo control programado. Así, el sistema de la reacción realiza dos ciclos de mezcla de reactivos de muestra/amplificación, carga de mezcla de reacción, amplificación y detección, y retirada de la mezcla de reacción, todos ellos en condiciones cerradas a los fluidos. En una forma de realización preferida, no mostrada, se incluye una etapa de deslavado después de cada etapa de amplificación para retirar las trazas de una mezcla de reacción anterior, reduciendo con ello los posibles productos de reacción de fondo y/o de interferencia. La etapa de deslavado puede repetirse.

[0070] La fig. 2A muestra un alojamiento (2000) que contiene una válvula rotatoria (2002) que tiene una cámara interna (2004) que está conectada operativamente a una bomba de tipo pistón (2006). Las carreras ascendentes del pistón (2056) de la bomba (2006) presurizan la cámara (2004) y fuerzan al contenido fluido al exterior a través de cualquier orificio que pudiera estar en comunicación con depósitos o similares; análogamente, las carreras descendentes del pistón (2056) de la bomba (2006) despresurizan la cámara (2004) y atraen fluidos al interior a través de cualquier orificio que pudiera estar abierto y en comunicación con depósitos o similares. Se proporcionan descripciones adicionales del funcionamiento y la construcción de dichos dispositivos de bomba-válvula rotatoria y del uso de cámara (2004) para preparación de muestras en Dority (citado anteriormente), que se incorpora como referencia para este fin. La válvula rotatoria (2002) tiene varios orificios, por ejemplo, (2050) y (2052), y pasos asociados (2008) y (2012), que permiten que la cámara (2004) esté en comunicación fluida con varios depósitos (descritos con más detalle más adelante) o con la cámara de reacción (2042) siempre que dichos orificios estén alineados con orificios correspondientes a los pasos a dichos depósitos o cámara de reacción (2042). En las formas de realización ilustrativas presentadas, los ejes longitudinales de dichos pasos asociados están dispuestos radialmente en la válvula rotatoria (2002) en uno de los dos planos perpendicular al eje de la válvula rotatoria (2002) (mostrado con líneas discontinuas (2048) y (2049)), de manera que la cámara (2004) puede disponerse en comunicación fluida con los orificios de los pasos a los depósitos, y similares, dispuesta en el alojamiento (2000). La válvula rotatoria (2002) incluye además pasos de conexión (2010), (2011) y (2013), que permiten que un orificio en un plano de la válvula se disponga en comunicación fluida con los orificios de alojamiento (2000) que están en el otro plano de la válvula rotatoria (2002). Dichos pasos de conexión no permiten la comunicación fluida con la cámara interior (2004). Según se ilustra en la fig. 2A, cuando dichos pasos de conexión están alineados en (2046) con los orificios de los pasos (2044) y (2016), los pasos (2044) y (2016) están en comunicación fluida. Análogamente, cuando dichos pasos de conexión están alineados en (2038) con los orificios de los pasos (2040) y (2036), los pasos (2040) y (2036) están en comunicación fluida. En las fig. 2A-2I, los pasos y depósitos sombreados en el alojamiento (2000) están en el plano proximal a la bomba de la válvula rotatoria (2002) (ilustrado en el panel inferior de la fig. 2A mediante la línea discontinua (2049)), mientras que los pasos y depósitos no sombreados están en el plano distal a la bomba (ilustrado en el panel inferior de la fig. 2A por la línea discontinua (2048)). Tal como se menciona anteriormente, la válvula rotatoria (2002) puede disponer la cámara interior (2004) en comunicación fluida con varios depósitos y la cámara de reacción (2042) que están conectados por pasos y tienen orificios en el asiento del alojamiento (2000) en cuyo interior gira la válvula rotatoria (2002). En el presente ejemplo,

dichos depósitos incluyen los siguientes: (i) depósito (2014) que contiene los primeros reactivos de amplificación, que pueden estar conectados de manera fluida con la válvula rotatoria (2002) por el paso (2016); (ii) depósito (2018) que contiene reactivos de lisado, por ejemplo, para romper membranas de superficie de muestras celulares, de manera que el depósito puede estar conectado de manera fluida con la válvula rotatoria (2002) por el paso (2020); (iii) depósito de muestras (2022) que contiene un material de muestra o espécimen, que puede estar conectado de manera fluida con la válvula rotatoria (2002) por el paso (2024); (iv) depósito (2026) que contiene una solución de lavado, o reactivo de lavado, que puede estar conectado de manera fluida con la válvula rotatoria (2002) por el paso (2028); (v) depósito de residuos (2030), que puede estar conectado de manera fluida con la válvula rotatoria (2002) por el paso (2032); y (vi) depósito (2034) que contiene segundos reactivos de amplificación, que puede estar conectado de manera fluida con la válvula rotatoria (2002) por el paso (2036).

[0071] Las fig. 2B a 2I ilustran el funcionamiento del aparato de la fig. 2A para realizar una secuencia de dos reacciones de amplificación en condiciones cerradas a los fluidos. Para el objetivo de divulgación del funcionamiento de formas de realización en particular de la válvula rotatoria (2002), la válvula rotatoria (2002) se muestra esquemáticamente en cada una de las fig. 2B a 2I dividida en 32 sectores, que están numerados. Adyacente a cada sector numerado de válvula rotatoria (2002) existe una posición correspondiente en el asiento del alojamiento (2000) que también está numerada. El número 32 es simplemente una opción de diseño que refleja, entre otras cosas, la capacidad de la válvula rotatoria (2002) de proporcionar interconexiones en un sistema complejo de depósitos y cámaras. Como posición de partida de la válvula rotatoria (2002), los números adyacentes entre sí en cada sector para los dos conjuntos son los mismos, según se muestra en la fig. 2B. Algunos de los números ("números internos") en la válvula rotatoria (2002) están rodeados por círculos (1, 5, 14, 17, 26, 28), y algunos de los números ("números externos") adyacentes y exteriores a la válvula rotatoria (2002) están rodeados por círculos (1, 6, 8, 21, 30, 31). Los círculos indican los sectores en los que están situados los orificios de los diversos depósitos y cámaras. Los círculos con el interior sombreado, por ejemplo, 5, 6, 8 y 17, indican orificios situados en el plano "proximal a la bomba" (2049) de válvula rotatoria (2002) y los círculos no sombreados, por ejemplo, 1, 21, 30, 31, indican orificios situados en el plano "distal a la bomba" (2048) de la válvula rotatoria (2002). Los círculos (2124), (2125) y (2126) en los sectores 14, 26 y 28, respectivamente, que tienen interiores punteados indican pasos de conexión.

[0072] Se carga una muestra o espécimen, recogido por ejemplo, usando un papel de filtro corriente, en la cámara interior por la acción de un operador, después de lo cual el sistema de la reacción se cierra a los fluidos. En la fig. 2B, la válvula rotatoria (2002) se muestra en una posición de inicio en la que el orificio 1 (2108) de la válvula está alineado con el orificio 31 (2021) del alojamiento (2000) de manera que el depósito de reactivos de lisado (2018) está en comunicación fluida con la cámara interior (2004) en la que se realizan los procedimientos de preparación de muestras. Con una carrera descendente de la bomba (2056), el reactivo de lisado se extrae a través de la trayectoria definida por el paso (2020), los orificios (2021) y (2108) y el paso (2012) para llenar (2104) la cámara interior (2004) cuando interacciona con la muestra. Las etapas de lavado pueden realizarse según se muestra en las fig. 2J y 2K y descritas más adelante, ya sea antes o después del lisado, dependiendo de la naturaleza del espécimen que se va a analizar.

[0073] En referencia a la fig. 2C, después de incubar la muestra en el reactivo de lisado, se hace girar la válvula rotatoria (2002) para alinear el orificio 1 (2108) de la válvula con el orificio 1 (2109) del alojamiento (2000), poniendo con ello la cámara interior (2004) en comunicación fluida con el depósito de muestras (2022). Una carrera ascendente del pistón (2056) impulsa la mezcla de reactivo de lisado y la muestra, referida como el "lisado" o simplemente la "muestra", desde la cámara interior (2004) al depósito de muestras (2022). A continuación se extrae una parte de la muestra del depósito de muestras (2022) y se transfiere a la cámara interior (2004) mediante una carrera descendente parcial del pistón (2056), después de lo cual se hace girar la válvula rotatoria (2002) para alinear el orificio 1 (2108) con el orificio de paso (2016) (en el sector 30) del alojamiento (2000), poniendo con ello el depósito de primeros reactivos de amplificación (2014) en comunicación fluida con la cámara interior (2004), según se muestra en la fig. 2D. Una carrera ascendente del pistón (2056) impulsa la muestra desde la cámara interior (2004) al depósito de primeros reactivos de amplificación (2014) en el que los primeros reactivos de amplificación se mezclan con la muestra para formar una primera mezcla de reacción. Según se muestra en la fig. 2E, se hace girar la válvula rotatoria (2002) para alinear el paso de conexión (2011) en el sector 26 con los orificios de paso (2016) y el paso (2044) de manera que exista comunicación fluida entre el depósito de primeros reactivos de amplificación (2014) y la cámara de reacción (2042). Simultáneamente, el paso de la válvula rotatoria (2035) está alineado con el orificio de paso (2040) (representado como un círculo sombreado en el sector 17 de la válvula rotatoria (2002)) para proporcionar la comunicación fluida entre la cámara de reacción (2042) y la cámara interior (2004). Tras una carrera descendente del pistón (2056), se extrae la primera mezcla de reacción del depósito de primeros reactivos de amplificación (2014), a través de los pasos (2016) y (2044) y a la cámara de reacción (2042), en la que tiene lugar una primera reacción de amplificación. Opcionalmente, puede hacerse girar la válvula rotatoria (2002) para cerrar los pasos (2044) y (2040) durante la reacción de amplificación. Después de que se haya completado la primera reacción de amplificación, se retira la primera mezcla de reacción de la cámara de reacción (2042) mediante una carrera descendente del pistón (2056), que extrae la mezcla a la cámara interior (2004), según se ilustra en el panel superior

de la fig. 2F, después de lo cual se hace girar la válvula rotatoria (2002) para alinear el paso (2035) con el orificio del paso (2032) de manera que el depósito de residuos (2030) esté en comunicación fluida con la cámara interior (2004). Tras una carrera ascendente del pistón (2056), la primera mezcla de reacción gastada se transfiere desde la cámara interior (2004) a través del paso (2032) al depósito de residuos (2030), según se muestra en la fig. 2G. A continuación se hace girar la válvula rotatoria (2002) para alinear el paso (2012) con el paso (2024) (no mostrado en la figura) de manera que el depósito de muestras (2022) esté en comunicación fluida con la cámara interior (2004), después de lo cual una carrera descendente del pistón (2056) extrae una parte de la muestra a la cámara interior (2004). Se hace girar la válvula rotatoria (2002) para alinear el paso (2012) (mostrado como el orificio 1 en la fig. 2H) con el paso (2036) de manera que el depósito de segundos reactivos de amplificación (2034) se ponga en comunicación fluida con la cámara interior (2004). Una carrera ascendente del pistón (2056) impulsa la parte de muestra al depósito de segundos reactivos de amplificación (2034) en el que se mezcla con los segundos reactivos de amplificación para formar una segunda mezcla de reacción. Se hace girar la válvula rotatoria (2002) para alinear el paso (2008) (orificio 5 en círculo sombreado en la fig. 2I) con el paso (2044) y el paso (2013) (mostrado como un círculo punteado en el sector 28 de la válvula rotatoria (2002)) de manera que el depósito de segundos reactivos de amplificación (2034) esté en comunicación fluida con la cámara de reacción (2042) que, a su vez, está en comunicación fluida con la cámara interior (2004). Tras una carrera descendente del pistón (2056) se extrae la segunda mezcla de reacción del depósito de segundos reactivos de amplificación (2034) a través del paso (2036), a través del paso (2040) y a la cámara de reacción (2042), en la que tiene lugar una segunda reacción de amplificación.

[0074] Tal como se menciona anteriormente, después de la incubación en el reactivo de lisado, la muestra puede lavarse opcionalmente según se muestra en las fig. 2J y 2K. Brevemente, en la fig. 2J, se hace girar la válvula rotatoria (2002) de manera que el orificio (2128) en el sector 5 se alinea con los orificio 6 (2110) del alojamiento (2000) de manera que con una carrera descendente del pistón (2056) la solución de lavado en el depósito (2026) se extrae (2200) (y (2204)) a la cámara interior (2004). Según se muestra en la fig. 2K, al hacer girar la válvula rotatoria (2002) de manera que el orificio 5 (2128) se alinee con el orificio 8 del alojamiento (2000) permitiendo la comunicación fluida entre la cámara interior (2004) y el depósito de residuos (2030), la solución de lavado en la cámara interior (2004) puede ser expulsada (2202) al depósito de residuos (2030) tras una carrera ascendente del pistón (2056). Este procedimiento puede repetirse si fuera necesario.

[0075] Debe quedar claro a partir del ejemplo anterior que el diseño de la válvula rotatoria (2002), por ejemplo, la selección del número y la clase de pasos, y la selección del número y el tipo de depósitos de reactivo en el alojamiento (2000) es una opción de diseño rutinaria para un experto en la materia.

Patrones internos

[0076] A menudo es conveniente comparar lecturas de diferentes ensayos, por ejemplo, cuando se intenta determinar si los niveles de expresión medidos de un gen diana en el espécimen de un paciente están dentro de intervalos normales. En aplicaciones médicas en particular, a menudo se desea comparar resultados de ensayos de la muestra de un paciente con los de muestras de referencia. Dichas comparaciones se realizan fácilmente determinando las proporciones entre una señal asociada con el polinucleótido diana y una señal asociada con una secuencia de referencia, o patrón interno, a partir de la misma muestra. Esto permite comparar los valores para un polinucleótido diana con los de otras muestras o especímenes. El uso y la selección de patrones internos, y en particular, de secuencias de referencia, son bien conocidos para los expertos en la materia, tal como se refleja en las siguientes referencias que se incorporan como referencia: Radonic y col. Biochem. Biophys. Res. Comm. 313:856-862 (2004); Bustin, J. Mol. Endocrinol., 29:23-39 (2002); Hoofar y col. J. Clin. Microbiol., 42:1863-1868 (2004); y similares. Se entiende que la señal o un valor asociado con una secuencia de referencia puede ser también una función, por ejemplo, un promedio, de señales o valores medidos a partir de múltiples secuencias de referencia.

[0077] El tipo de patrón interno o secuencia de referencia seleccionado depende de la naturaleza de las muestras que se van a analizar. En la Tabla 1 se recogen secuencias de referencia de ejemplo para muestras que comprenden células o tejidos de mamíferos.

Tabla 1

Secuencias de referencia de ejemplo		
Gen de referencia	Nombre de producto génico	Nº acceso NCBI
GAPDH	gliceraldehidos 3-fosfato deshidrogenasa	J02642
G6PDH	glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	X03674
HPRT	hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa	L29382
PBGD	porfobilinógeno desaminasa	X04808
Alb		L00132
Act	β -actina	M10277
Tub	α -tubulina	X01703
TBP	proteína de unión de secuencia TATA	M55654
L13	proteína ribosómica L13	X56923
β 2M	β 2-microglobulina	J00115
PPIA	peptidilprolilisomerasa A	Y00052
PLA	fosfolipasa A2	M86400
	ARN ribosómico 18S y 28S	

[0078] En algunas aplicaciones en las que se determinará la presencia o ausencia de un polinucleótido diana en una muestra, una muestra interna de la que se sabe que está presente puede ser amplificada como un control positivo junto con el polinucleótido diana, de manera que si el polinucleótido diana está ausente se genera aún una señal positiva. En dichas aplicaciones, un patrón interno puede ser un polinucleótido endógeno o puede ser un polinucleótido exógeno añadido a la mezcla de reacción para dicho fin.

Preparación de muestra o espécimen

[0079] Las muestras o especímenes que contienen polinucleótidos diana pueden provenir de una amplia diversidad de fuentes para su uso con la presente invención, incluyendo cultivos celulares, tejidos animales o vegetales, biopsias de pacientes, muestras ambientales, o similares. Las muestras se preparan para ensayos de la invención usando técnicas convencionales, que normalmente dependen de la fuente de la cual se toma una muestra o espécimen.

[0080] Las muestras o especímenes se recogen de manera que se reduce al mínimo la probabilidad de contaminación de la muestra o espécimen por elementos externos, o el entorno por la muestra o espécimen si contiene componentes peligrosos. En general, esto se realiza introduciendo una muestra para su análisis, por ejemplo, tejido, sangre, saliva, etc., directamente en una cámara de recogida de muestras en un sistema cerrado a los fluidos. Normalmente, la prevención de la contaminación cruzada de la muestra puede conseguirse inyectando directamente la muestra en la cámara de recogida de muestras a través de una abertura que puede cerrarse herméticamente, por ejemplo, una válvula de inyección, o un tabique. En general, se prefieren las válvulas que pueden cerrarse herméticamente para reducir cualquier amenaza potencial de fuga durante o después de la inyección de la muestra. Además de lo anterior, la parte de recogida de muestras del dispositivo también puede incluir reactivos y/o tratamientos para la neutralización de agentes infecciosos, la estabilización del espécimen o muestra, los ajustes de pH, y similares. Los tratamientos de estabilización y ajuste de pH pueden incluir, por ejemplo, la introducción de heparina para prevenir la coagulación de muestras de sangre, la adición de agentes de amortiguación química, la adición de inhibidores de la proteasa o la nucleasa, conservantes y similares. Dichos reactivos pueden almacenarse en general dentro de la cámara de recogida de muestras del dispositivo o pueden almacenarse en el interior de una cámara accesible por separado, en el que los reactivos pueden ser añadidos a o mezclados con la muestra después de la introducción de la muestra en el dispositivo. Estos reactivos pueden incorporarse dentro del dispositivo en forma líquida o liofilizada, dependiendo de la naturaleza y la estabilidad del reactivo usado en particular.

[0081] Antes de realizar reacciones de amplificación en una muestra, a menudo será conveniente realizar una o más operaciones de preparación de muestras en la muestra. Normalmente, estas operaciones de preparación de muestras incluirán manipulaciones como la extracción de material celular, por ejemplo, ácidos nucleicos de las muestras de células enteras, virus y similares. Una o más de estas diversas operaciones pueden incorporarse fácilmente en los sistemas cerrados a los fluidos contemplados por la presente invención.

[0082] Para aquellas formas de realización en las que se vayan a analizar células enteras, virus u otras muestras de tejidos, normalmente será necesario extraer los ácidos nucleicos de las células o virus, antes de continuar con las diversas operaciones de preparación de muestras. En consecuencia, después de la recogida de muestras, pueden liberarse los ácidos nucleicos de las células recogidas, la carga viral, etc., en un extracto en crudo,

seguido por tratamientos adicionales para preparar la muestra para operaciones posteriores, por ejemplo, desnaturalización, purificación, filtración, desalación, y similares, de proteínas contaminantes (unión a ADN). La liberación de ácidos nucleicos de las células o virus de la muestra, y la desnaturalización de proteínas de unión a ADN pueden realizarse en general mediante procedimientos de lisis químicos, físicos o electrolíticos. Por ejemplo, los procedimientos químicos emplean en general agentes de lisado para romper las células y extraer los ácidos nucleicos de las células, seguido por tratamiento del extracto con sales caotrópicas como isotiocianato de guanidinio o urea para desnaturalizar cualquier proteína contaminante y potencialmente de interferencia. En general, cuando se usan procedimientos químicos de extracción y/o desnaturalización, pueden incorporarse los reactivos apropiados dentro de una cámara de preparación de muestras, una cámara accesible separada, o pueden introducirse externamente.

[0083] Pueden usarse procedimientos físicos para extraer los ácidos nucleicos y desnaturalizar proteínas de unión a ADN. En Wilding y col., patente de EE.UU. 5.304.487, se expone el uso de salientes físicos con microcanales o partículas con bordes afilados dentro de una cámara o canal para horadar membranas celulares y extraer su contenido. Las combinaciones de dichas estructuras con elementos piezoeléctricos para agitación pueden proporcionar fuerzas de cizalla apropiadas para la lisis. Dichos elementos se describen en mayor detalle con respecto a fragmentación de ácidos nucleicos, más adelante. También pueden usarse procedimientos más tradicionales de extracción celular como, por ejemplo, el empleo de un canal con dimensión en sección transversal restringida que provoca lisis celular cuando se hace pasar la muestra a través del canal con una presión de flujo suficiente. Alternativamente, la extracción celular y la desnaturalización de proteínas contaminantes puede realizarse aplicando una corriente eléctrica alterna a la muestra. Más específicamente, se hace fluir la muestra de células a través de una matriz microtubular mientras se aplica una corriente eléctrica alterna a través del flujo de fluido. Puede usarse una diversidad de otros procedimientos dentro del dispositivo de la presente invención para realizar lisis/extracción celular, incluyendo, por ejemplo, el sometimiento de células a agitación ultrasónica, o la entrada forzada de células a través de pequeñas aberturas, sometiendo con ello a las células a un alto esfuerzo de cizalla que produce la rotura.

[0084] Después de la extracción, a menudo será conveniente separar los ácidos nucleicos de otros elementos del extracto en crudo, por ejemplo, proteínas desnaturalizadas, partículas de membrana celular, sales, y similares. La retirada de las partículas en suspensión se realiza en general por filtración, floculación o similares. Puede incorporarse fácilmente en el dispositivo una diversidad de tipos de filtro. Además, cuando se usan procedimientos de desnaturalización química, puede ser conveniente desalar la muestra antes de avanzar a la etapa siguiente. La desalación de la muestra y el aislamiento del ácido nucleico puede realizarse en general en una única etapa, por ejemplo, mediante unión de los ácidos nucleicos a una fase sólida y lavado de las sales contaminantes o realización de cromatografía por filtración de gel en la muestra, paso de sales a través de membranas de diálisis, y similares. Entre los soportes sólidos adecuados para unión a ácidos nucleicos se incluyen, por ejemplo, tierras diatomeas, sílice (es decir, lana de vidrio), o similares. También pueden incorporarse fácilmente en los dispositivos de la presente invención medios de exclusión de gel adecuados, también bien conocidos en la técnica, y están disponibles comercialmente, por ejemplo, en Pharmacia y Sigma Chemical Co.

[0085] El aislamiento y/o filtración por gel/desalación puede realizarse en una cámara adicional, o alternativamente, pueden incorporarse medios cromatográficos en particular en un canal o paso de fluidos que conducen a una cámara de reacción posterior. Alternativamente, las superficies interiores de uno o más pasos de fluidos o cámaras pueden someterse a derivación para proporcionar grupos funcionales apropiados para la purificación deseada, por ejemplo, grupos cargados, grupos de unión de afinidad y similares, es decir, oligonucleótidos poli-T para purificación de ARNm. Alternativamente, los procedimientos de desalación pueden en general aprovecharse de la alta movilidad electroforética y la carga negativa de ADN en comparación con otros elementos. También pueden usarse procedimientos electroforéticos en la purificación de ácidos nucleicos de otros contaminantes y residuos celulares. En un ejemplo, un canal de separación o cámara del dispositivo está conectado de forma fluida con dos canales o cámaras de "campo" separados que tienen electrodos, por ejemplo, electrodos de platino, dispuestos en el mismo. Los dos canales de campo están separados del canal de separación usando una barrera apropiada o "membrana de captura" que permite el paso de corriente sin permitir el paso de ácidos nucleicos u otras moléculas grandes. La barrera sirve en general para dos funciones básicas: primero, la barrera actúa para retener los ácidos nucleicos que migran hacia el electrodo positivo dentro de la cámara de separación; y en segundo lugar, las barreras evitan los efectos adversos asociados con la electrólisis en el electrodo de la entrada en la cámara de reacción (por ejemplo, actuación como una unión salina). Dichas barreras pueden incluir, por ejemplo, membranas de diálisis, geles densos, filtros PEI u otros materiales adecuados. Tras la aplicación de un campo eléctrico apropiado, los ácidos nucleicos presentes en la muestra migrarán hacia el electrodo positivo y quedarán atrapados en la membrana de captura. A continuación se lavan las impurezas de la muestra que se liberan de la membrana de la cámara aplicando un flujo de fluido apropiado. Tras la inversión del voltaje, los ácidos nucleicos son liberados de la membrana en una forma sustancialmente más pura. Los canales de campo pueden estar dispuestos en los mismos o distintos lados o extremos de una cámara de separación o canal, y pueden usarse en conjunción

con los elementos de mezclado descritos en la presente memoria descriptiva, para garantizar una eficiencia máxima de funcionamiento. Además, pueden situarse también sobre la barrera filtros gruesos para evitar cualquier ensuciamiento de las barreras por partículas en suspensión, proteínas o ácidos nucleicos, permitiendo con ello el uso repetido. En un aspecto similar, la alta movilidad electroforética de los ácidos nucleicos con sus cargas negativas, pueden usarse para separar los ácidos nucleicos de los contaminantes usando una columna corta de un gel u otra matriz o gel apropiados que ralentizarán o retardarán el flujo de otros contaminantes mientras se permite que pasen los ácidos nucleicos más rápidos.

[0086] Para una serie de aplicaciones, puede ser conveniente extraer y separar ARN mensajero de las células, residuos celulares y otros contaminantes. De este modo, en algunos casos un sistema de la presente invención puede incluir una cámara o canal de purificación de ARNm. En general, dicha purificación aprovecha las colas de poli-A en ARNm. En particular y tal como se observa anteriormente, los oligonucleótidos poli-T pueden estar inmovilizados dentro de una cámara o canal del dispositivo para actuar como ligandos de afinidad para ARNm. Los oligonucleótidos poli-T pueden quedar inmovilizados sobre un soporte sólido incorporado dentro de la cámara o canal, o alternativamente, pueden quedar inmovilizados sobre la o las superficies de la cámara o canal en sí.

[0087] En algunas aplicaciones, como la medida de polinucleótidos diana en raras células metastásicas desde la sangre de un paciente, puede realizarse una etapa de enriquecimiento antes de realizar un ensayo, como, por ejemplo, por aislamiento inmunomagnético. Dicho aislamiento o enriquecimiento puede realizarse usando una diversidad de técnicas y materiales conocidos en la técnica, según se desvela en las siguientes referencias representativas que se incorporan como referencia: Terstappen y col., patente de EE.UU. 6.365.362; Terstappen y col., patente de EE.UU. 5.646.001; Rohr y col., patente de EE.UU. 5.998.224; Kausch y col., patente de EE.UU. 5.665.582; Kresse y col., patente de EE.UU. 6.048.515; Kausch y col., patente de EE.UU. 5.508.164; Miltenyi y col., patente de EE.UU. 5.691.208; Molday, patente de EE.UU. 4.452.773; Kronick, patente de EE.UU. 4.375.407; Radbruch y col. capítulo 23, en Methods in Cell Biology, Vol. 42 (Academic Press, Nueva York, 1994); Uhlen y col. Advances in Biomagnetic Separation (Eaton Publishing, Natick, 1994); Safarik y col. J. Chromatography B, 722:33-53 (1999); Miltenyi y col. Cytometry, 11 :231-238 (1990); Nakamura y col. Biotechnol. Prog., 17:1145-1155 (2001); Moreno y col. Urology, 58:386-392 (2001); Racila y col. Proc. Natl. Acad. Sci., 95:4589-4594 (1998); Zigeuner y col. J. Urology, 169:701-705 (2003); Ghossein y col. Seminars in Surgical Oncology, 20:304-311 (2001).

[0088] Las partículas magnéticas preferidas para su uso en la realización de la presente invención son partículas que se comportan como coloides. Dichas partículas se caracterizan por un tamaño de partícula submicrométrico, que es en general inferior a aproximadamente 200 nanómetros (nm) (0,20 micrómetros), y su estabilidad a la separación gravitacional a partir de una solución durante periodos extendidos de tiempo. Además de otras muchas ventajas, este intervalo de tamaño las hace esencialmente invisibles a las técnicas analíticas aplicadas comúnmente al análisis celular. Para su uso en la presente invención se contemplan partículas dentro del intervalo de 90 a 150 nm y que tienen entre el 70 y el 90% de masa magnética. Las partículas magnéticas adecuadas están compuestas por un núcleo cristalino de material superparamagnético rodeado por moléculas que están unidas, por ejemplo, absorbidas físicamente o fijadas de forma covalente, al núcleo magnético y que confieren propiedades coloidales de estabilización. El material de recubrimiento debe aplicarse preferentemente en una cantidad eficaz para evitar interacciones no específicas entre macromoléculas biológicas encontradas en la muestra y los núcleos magnéticos. Dichas macromoléculas biológicas pueden incluir residuos de ácido siálico en la superficie de células no diana, lectinas, glucoproteínas y otros componentes de membrana. Además, el material debería contener el mayor número posible de dicha masa/nanopartícula magnética. El tamaño de los cristales magnéticos que comprenden el núcleo es suficientemente pequeño para no contener un dominio magnético completo. El tamaño de las nanopartículas es suficientemente pequeño para que su energía browniana supere su momento magnético. En consecuencia, el alineamiento con el polo norte, el polo sur y la posterior atracción/repulsión mutua de estas partículas magnéticas coloidales no parece producirse incluso con campos magnéticos moderadamente intensos, lo que contribuye a la estabilidad de la solución. Finalmente, las partículas magnéticas deben ser separables en separadores de campo externo de alto gradiente magnético. Esta característica facilita la manipulación de las muestras y proporciona ventajas económicas en las columnas de gradiente interno más complicadas cargadas con perlas ferromagnéticas o lana de acero. Las partículas magnéticas que tienen las propiedades descritas anteriormente pueden prepararse mediante la modificación de materiales de base descritos en las patentes de EE.UU. nº 4.795.698, 5.597.531 y 5.698.271, patentes que se incorporan como referencia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Reacciones sucesivas de amplificación en la misma cámara de reacción para la detección de Staphylococcus aureus (MRSA) resistente a la meticilina

[0089] En este ejemplo, se realizaron dos pruebas que usaban un ensayo de PCR estándar para MRSA (por ejemplo, véase, Warren y col. J. Clinical Microbiology, 42:5578-5581 (2004). Las dos pruebas fueron realizadas en un sistema de amplificación GENEXPERT™ de Cepheid (desvelado en varias patentes de EE.UU., entre ellas las patentes de EE.UU. n° 6.713.297; 6.403.037; 6.374.684; 6.369.893). En la primera prueba, se realizó una serie de dos ciclos de PCR en la misma cámara de reacción con una etapa de deslavado intermedia. En el primer ciclo, todos los reactivos estuvieron presentes para una PCR que generó una señal predecible y en el segundo ciclo sólo se cargó tampón en la cámara de reacción. En la segunda prueba, se realizó el mismo procedimiento que en la primera prueba, con la salvedad de que en el segundo ciclo todos los reactivos estaban presentes, como en el primer ciclo. En las dos pruebas, el sistema se programó para que realizara las etapas siguientes: (i) llenado de la cámara de reacción con una primera mezcla de reacción, (ii) realización de una primera PCR en la cámara de reacción, (iii) vaciado de la cámara de reacción de la mezcla de reacción, (iv) deslavado de la cámara de reacción con una solución de lavado [implementado por etapas (iva) llenado de la cámara de reacción con tampón TET y (ivb) vaciado de la cámara de reacción de tampón TET], (v) purga de la cámara de reacción con aire y calentamiento de la cámara de reacción; (vi) llenado de la cámara de reacción con una segunda mezcla de reacción [que en la primera prueba era simplemente tampón TET]; y (vii) realización de una segunda PCR en la cámara de reacción. Las mezclas de reacción (primera en la primera prueba, y primera y segunda en la segunda prueba) tenían composiciones idénticas.

[0090] Se prepararon cartuchos del sistema de amplificación GENEXPERT™ del modo siguiente: (1) se preparó una muestra mezclando 0,8 µl de ADN de MRSA (ATCC) a 1.000 copias/µl con 199,2 µl de tampón TET para una concentración final de 4 copias/µl o 100 copias por reacción (el tampón TET es un tampón convencional basado en Tris que contiene un agente de quelación divalente y un detergente suave, por ejemplo, Tris-HCl, EDTA y Tween-20), (2) para la prueba 2, se cargaron las cámaras 9 y 11 de un cartucho de un sistema de amplificación GENEXPERT™ con una perla de reactivo TSR y una perla de reactivo EZR; para la prueba 1, sólo se cargó una cámara con perlas TSR y EZR, y la otra cámara se cargó con tampón TET (TSR es una parte alícuota liofilizada de reactivos específicos de diana MRSA y EZR es una parte alícuota liofilizada de enzimas PCR, descritas en las publicaciones de patente de EE.UU. n° 2006/0.068.398 y 2006/0.068.399), (3) se colocaron 200 µl de muestra en la cámara 10 del cartucho de un sistema de amplificación GENEXPERT™, (4) se colocaron 500 µl de tampón TET (usado como solución de lavado) en la cámara 5 del cartucho de un sistema de amplificación GENEXPERT™. En la fig. 3A se muestra un listado detallado de las instrucciones de programación del sistema de amplificación GENEXPERT™ para las pruebas 1 y 2. Se mantuvo el protocolo de temperatura de la etapa 26 (primera PCR) durante 30 s a 95°C seguido de 45 ciclos de 1 s a 92°C, 6 s a 62°C y 6 s a 68°C. Se mantuvo el protocolo de temperatura de la etapa 43 (etapa de purga) durante 1 s a 95°C y se mantuvo durante 30 s a 45°C. El protocolo de temperatura de la etapa 65 (segunda PCR) fue el mismo que para la etapa 26. Los resultados de la prueba 1 se muestran en la fig. 3B, en la que la curva 1 (BG) es un amplicón de control (del bacilo globigii), la curva 2 es un amplicón del gen mecA de MRSA, la curva 3 es un amplicón del gen orfH de MRSA, y la curva 4 es un amplicón SPA de MRSA. Los datos indican que no tiene lugar más reacción en la segunda PCR cuando la cámara de reacción se deslava y se carga con tampón. Los resultados de la prueba 2 se muestran en la fig. 3C (los números de curvas son los mismos que para la fig. 3B). Los datos muestran una amplificación similar de dianas MRSA en la primera y en la segunda PCR.

Ejemplo 2

Detección de MRSA mediante dos reacciones de amplificación realizadas sucesivamente en la misma cámara de reacción: reactivos no liofilizados

[0091] En este ejemplo, se realizaron dos pruebas en las que se llevaron a cabo dos PCR que amplificaban diferentes secuencias diana en serie en la misma cámara de reacción. El único parámetro modificado en las dos pruebas fue el orden en el que se llevaron a cabo las reacciones. Se realizaron dos replicados de cada prueba. Al igual que en el Ejemplo 1, en este caso se usaron secuencias diana de MRSA. Para este ejemplo, se prepararon dos mezclas de reacción: una primera mezcla de reacción (MM1) que contenía los genes MRSA, mecA (marcado con una sonda Alexa 647 (A647)) y SPA (marcado con una sonda de tetrametilrodamina (TxR)) y el control interno BG (marcado con una sonda Alexa 532 (A532)); y una segunda mezcla de reacción (MM2) que contenía el gen de MRSA, orfH, (marcado con una sonda de fluoresceína (FAM)) y el control interno BG (en este caso marcado con una sonda de tetrametilrodamina (TxR)). Se proporcionan detalles adicionales de las mezclas de reacción primera y segunda en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2

Número de reacciones =15							
Componente	Conc. Reserva	Conc. Final	Ctd para 1 reacción (25 µl)	Ctd para X reacciones	Vendedor	Cat#	Lote#
TET	n/d	n/d	2,70	40,50	Anu Mokkapati	n/d	2/6/2006
Tampón 5X Lyo	5X	1X	5,0	75,00	Dave Swenson	nb 330 p. 124	051209D DS
MgCl ₂	1 M	4 mM	0,10	1,50	Ambion	9530G	023R34A
KCl	2 M	20 mM	0,25	3,75	Ambion	9640G	064R37A
dNTP	25 mM	400 µM	0,4	6,00	Inventory	001-0135	B2001A
bigC-spa Cebador directo -M216	25 µM	225 nM	0,225	3,38	Bothell	n/d	véase hoja de registro
bigC-spa Cebador inverso- M271	25 µM	225 nM	0,225	3,38	Bothell	n/d	véase hoja de registro
Sonda SPA–TxR-M316	25 µM	200 nM	0,2	3,00	Bothell	n/d	véase hoja de registro
F-MecA406-53-M398	25 µM	500 nM	0,5	7,50	Bothell	n/d	véase hoja de registro
R-MecA522-53-M399	25 µM	500 nM	0,5	7,50	Bothell	n/d	véase hoja de registro
P-MecA2-65Alx-Alx647-M350	25 µM	200 nM	0,2	3,00	Trilink	n/d	véase hoja de registro
BG096U-M274	25 µM	400 nM	0,4	6,00	Bothel	n/d	véase hoja de registro
BG-R-M275	25 µM	400 nM	0,4	6,00	Bothel	n/d	véase hoja de registro
BGCEPH1-A532-M254	25 µM	200 nM	0,2	3,00	Bothel	n/d	véase hoja de registro
Taq + 7,5 uM HM	5 unidades/ µl	6 unidades	1,2	18,00	Eppendorf	HM	060210C L
			12,50	187,50			

Tabla 3

Número de reacciones=15					
Componente	Conc. reservas	Conc. final	Ctd para 1 reacción (25 µl)	Ctd para X reacciones	Vendedor
TET	n/d	n/d	2,55	38,25	Anu Mokkapati
Tampón 5X Lyo	5X	1X	5,0	75,00	Dave Swenson
MgCl ₂	1 M	4 mM	0,10	1,50	Ambion
KCl	2 M	20 mM	0,25	3,75	Ambion
dNTP	25 mM	400 µM	0,4	6,00	Inventory
Tipo-I-Cebador-a M358	25 µM	400 nM	0,4	6,00	Bothel
Tipo-II y IV-Cebador-b M359	25 µM	400 nM	0,4	6,00	Bothel
Tipo-III-Cebador-a M362-100 µM	25 µM	400 nM	0,4	6,00	Bothel
orfX-For-C-GCA29 M363	25 µM	600 nM	0,6	9,00	Bothel
orfX-Sonda-ATC30-FAM-M361	25 µM	200 nM	0,2	3,00	Bothel
BGf2-M159	25 µM	400 nM	0,4	6,00	MWG
BGr2-M160	25 µM	400 nM	0,4	6,00	MWG
Bg-Sonda1-TxR-M314	25 µM	200 nM	0,2	3,00	Bothel
Taq+7,5uMHM	5 unidades/µl	6 unidades	1,2	18,00	Eppendorf

[0092] Para las dos pruebas, la muestra se preparó combinando ADN de MRSA y ADN de BG en un tampón TET para una concentración final de 100 copias de ADN de MRSA por 25 µl de volumen de reacción y 1.000 copias de ADN de BG por 25 µl de volumen de reacción. Para la primera prueba, se cargaron depósitos de dos cartuchos de un sistema de amplificación GENEXPERT™ del modo siguiente: se cargaron 40 µl de MM1 en la cámara 9, se cargaron 40 µl de MM2 en la cámara 11, se cargaron 180 µl de muestra en la cámara 10 y se cargaron 500 µl de tampón TET en la cámara 2. El sistema de amplificación GENEXPERT™ se programó sustancialmente del mismo modo que en el Ejemplo 1, y en la fig. 4A se ofrece una lista detallada de las etapas de programación. Los resultados se muestran en las fig. 4B-4H. Los datos de la primera prueba (MM1 seguido por MM2) se muestran en la fig. 4B y los datos de la segunda prueba (MM2 seguido por MM1) se muestran en la fig. 4C. Las señales de los amplicones de BG, mecA, orf y SPA se ofrecen en las curvas 1, 2, 3 y 4, respectivamente en las dos figuras. Los datos indican que la segunda reacción en cada caso sólo produjo un grado de amplificación bajo de las secuencias diana. Dado que las mezclas de reacción se prepararon de antemano, se especula acerca de que el segundo reactivo de la reacción se degradó antes del inicio de la reacción. Las fig. 4D-4H ofrecen una comparación directa de las mismas secuencias diana amplificadas en la primera reacción y la segunda reacción. La única secuencia diana que se amplificó de forma equivalente en las dos reacciones fue orf.

Ejemplo 3

Detección de MRSA mediante dos reacciones de amplificación realizadas sucesivamente en la misma cámara de reacción: reactivos liofilizados

[0093] En este ejemplo, se realizaron sustancialmente las mismas pruebas que en el Ejemplo 2, con la salvedad de que se usaron reactivos liofilizados para las dos PCR en cada secuencia de reacción y las concentraciones de ADN de MRSA y ADN de BG fueron 10 veces menores. En paralelo con estas pruebas, también se sometieron a ensayo los efectos de incluir o excluir un inhibidor de la polimerasa HOTMASTER™ (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). (El inhibidor HOTMASTER™ inhibe la unión de la polimerasa en una forma dependiente de la temperatura de manera que se impiden extensiones a bajas temperaturas). Los resultados de los experimentos replicados para la secuencia de control interna, BG, se muestran en las fig. 5A (reacción 1) y 5B (reacción 2). Las dos reacciones producen señales claramente detectables con la amplificación relativa de BG mejorada enormemente con el uso de reactivos liofilizados.

Ejemplo 4

Eliminación de las burbujas de la cámara de reacción mediante purga con aire y calentamiento

[0094] Tal como se indica anteriormente, la formación de burbujas en una cámara de reacción entre reacciones sucesivas de amplificación puede degradar el rendimiento de un sistema, en particular cuando los productos de amplificación son detectados por señales ópticas. Se cree que las burbujas se forman debido a una película de mezcla de reacción que permanece en la cámara de reacción después de una primera reacción (o reacción anterior). En este ejemplo, se aplicaron etapas de purga y/o calentamiento para eliminar la formación de burbujas en la cámara de reacción después de que se retirara una mezcla de reacción, pero antes de que la cámara de reacción se rellenara con una mezcla de reacción posterior. Dichas etapas se implementaron para PCR y reacciones de transcriptasa inversa, es decir, RT-PCR, simuladas sucesivas y RT-PCR reales usando un sistema de amplificación GENEXPERT™ de Cepheid, según los programas recogidos en las fig. 6A-6F (simuladas) y las fig. 6G-6H (reales). Las reacciones fueron "simuladas" en el sentido de que los reactivos no contenían sonda, cebadores o enzimas.

[0095] En el protocolo implementado por las etapas del programa de la fig. 6A, se aspiraron 600 µl de aire desde la cámara de reacción después de retirar una mezcla de reacción (RT) simulada y antes de rellenar con una mezcla de PCR simulada. El resultado fue que se observaron burbujas en 2 de las 8 cámaras de reacción. En el protocolo implementado por las etapas del programa de la fig. 6B, se calentó la cámara de reacción a 100°C durante 5 segundos después de retirar una mezcla de reacción (RT) simulada y antes de rellenar con una mezcla de PCR simulada. El resultado fue que se observaron burbujas en 4 de las 4 cámaras de reacción. En el protocolo implementado por las etapas del programa de la fig. 6C, después de retirar una mezcla de reacción (RT) simulada, se calentó la cámara de reacción a 95°C durante 5 seg seguido por enfriamiento a 48°C durante 2 seg antes de rellenar con una mezcla de PCR simulada. El resultado fue que se observaron burbujas en 0 de las 4 cámaras de reacción. En el protocolo implementado por las etapas del programa de la fig. 6D, se dispensaron 600 µl de aire a través de (en lugar de aspirado desde) la cámara de reacción después de retirar una mezcla de reacción (RT) simulada y antes de rellenar con una mezcla de PCR simulada. El resultado fue que se observaron burbujas en 1 de las 4 cámaras de reacción. En el protocolo implementado por las etapas del programa de la fig. 6E, después de retirar una mezcla de reacción (RT) simulada, se calentó la cámara de reacción a 100°C durante 3 seg seguido por enfriamiento a 48°C durante 2 seg antes de rellenar con una mezcla de PCR simulada. El resultado fue que se observaron burbujas en 0 de las 8 cámaras de reacción. En el protocolo implementado por las etapas del programa de la fig. 6F, después de retirar una mezcla de reacción (RT) simulada, se calentó la cámara de reacción a 95°C durante 1 seg seguido por enfriamiento a 70°C durante 1 seg antes de rellenar con una mezcla de PCR simulada. El resultado fue que se observaron burbujas en 0 de las 8 cámaras de reacción.

[0096] Tal como se menciona anteriormente, se realizaron dos RT-PCR reales usando una mezcla de reacción RT y una mezcla PCR según se describe en las Tablas 4 y 5, respectivamente. Brevemente, los ensayos se diseñaron para generar amplicones a partir del gen GUS, PIP y TAC en la mezcla de ARN. Se preparó una mezcla de ARN añadiendo 1,76 µl de ARN total de ganglios linfáticos humano y 0,44 µl de ARN total de mama humano a 107,8 µl de DEPC H₂O. Se cargaron tres cartuchos de un sistema de amplificación GENEXPERT™ del modo siguiente: se añadieron 400 µl de agua a la cámara 5; se añadieron 25 µl de mezcla de ARN a la cámara 6; se añadieron 42 µl de Mezcla Maestra de RT a la cámara 7; y se añadieron 20 µl de Mezcla Maestra de PCR. En una RT-PCR, la cámara de reacción se vació entre la reacción de RT y la PCR, pero no se calentó (protocolo mostrado en la fig. 6G). En la otra RT-PCR, la cámara de reacción se vació, se calentó a 95°C durante 1 seg, seguido por enfriamiento a 70°C durante 1 seg, entre la reacción de RT y la PCR (protocolo mostrado en la fig. 6H). No se produjo una diferencia significativa en la detección de amplicones entre los dos protocolos.

[0097] Las pruebas de este ejemplo indican que el calentamiento de la cámara de reacción vacía a 95°C, seguido del enfriamiento, por ejemplo, a 70°C, entre reacciones detuvo la formación de burbujas en la cámara de reacción, aun cuando la única prueba en replicado con reactivos de RT-PCR reales no fue concluyente. La aspiración o dispensación de aire en solitario a través de la cámara de reacción vacía entre las reacciones fue ineficaz para eliminar las burbujas.

Tabla 4

Número de Reacciones=4,5				
RT (Transcripción inversa)	Ctd/ 60 µl	Cantidad/ X reacciones	Conc. final	Vendedor
Agua tratada con DEPC	4,45	20,025	n/d	Ambion
Tampón 10X PCR (Tampón Plat Taq)	6	27	1X	Invitrogen
MgCl ₂ (50 mM)	6,4	28,8	5,3 y 4 mM	Invitrogen
dNTPs (2,5 mM)	7,2	32,4	300 y 225 µM	Takara
Cebador GUS RT (3 µM) BC65	1,6	7,2	80 nM/60 µl	Trilink
Cebador PIP RT (3 µM) BC67	1,6	7,2	80 nM/60 µl	Trilink
Cebador TAC RT (3 µM) BC66	1,6	7,2	80 nM/60 µl	Trilink
Protector (40 Unidades/µl)	0,5	2,25	20 unidades / 60 µl	Roche
Omniscrypt (4 U/µl)	0,65	2,925	2,6 unidades / 60 µl	Invitrogen
Total	30	135		

Tabla 5

Número de reacciones= 4,5				
PCR	Ctd/ 80 µl	Cantidad/ X reacciones	Conc. Final	Vendedor
Agua tratada con DEPC	0,4	1,8	n/d	Ambion
Tampón 10X PCR	2	9	1x	Invitrogen
20 µM GUS81fC (BC78)	2,4	10,8	600 nM	TriLink
20 µM GUSCp81r (BC77)	2,4	10,8	600 nM	TriLink
10 µM A647-GUS81P (BC57)	1,6	7,2	200 µM	TriLink
20 µM PIP-2F (BC38)	1,6	7,2	400 nM	TriLink
20 µM PIP-2rA (BC76)	1,6	7,2	400 nM	TriLink
10 µM FAM-PIP2 (BC83)	1,6	7,2	200 nM	TriLink
20 µM TACCpF (BC73)	1,6	7,2	400 nM	TriLink
20 µM TACCpR (BC74)	1,6	7,2	400 nM	TriLink
10 µM A532-TAC (BC51)	1,6	7,2	200 nM	TriLink
Taq Platino	1,6	7,2	,1 unidades/1 µl reacción	Invitrogen
Total	20	90		

[0098] Se entiende que los ejemplos y formas de realización descritos en la presente memoria descriptiva tienen fines únicamente ilustrativos y que los expertos en la materia sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos, que deben incluirse dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la presencia o ausencia de una pluralidad de diferentes polinucleótidos diana en una muestra realizando ampliaciones sucesivas de diferentes polinucleótidos de diferentes partes de la muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - (i) suministro de una cámara de reacción selectivamente en comunicación fluida con un depósito de residuos, un depósito de muestras que contiene una muestra, un primer depósito de reactivos que contiene primeros reactivos de amplificación y un segundo depósito de reactivos que contiene segundos reactivos de amplificación;
 - (ii) combinación de una primera parte de la muestra y los primeros reactivos de amplificación para formar una primera mezcla de reacción;
 - (iii) sometimiento de la primera mezcla de reacción a condiciones de reacción de amplificación en la cámara de reacción para producir un primer amplicón de uno o más polinucleótidos diana siempre que dichos polinucleótidos estén presentes en la muestra;
 - (iv) transferencia fluida de la primera mezcla de reacción al depósito de residuos;
 - (v) combinación de una segunda parte de la muestra y los segundos reactivos de amplificación para formar una segunda mezcla de reacción; y
 - (vi) sometimiento de la segunda mezcla de reacción a condiciones de reacción de amplificación en la cámara de reacción para producir un segundo amplicón de uno o más polinucleótidos diana siempre que dichos polinucleótidos estén presentes en la muestra, en el que la detección de los amplicones primero y segundo determina la presencia o ausencia de la pluralidad de diferentes polinucleótidos diana en la muestra.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, que incluye además una etapa de deslavado de la cámara de reacción después de la etapa de transferencia fluida de la primera mezcla de reacción al depósito de residuos.
3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de transferencia fluida de la primera mezcla de reacción al depósito de residuos incluye las etapas de: (i) vigilancia de una señal óptica de un indicador en la primera mezcla de reacción, estando relacionada la señal óptica con una cantidad de un amplicón de al menos uno de los polinucleótidos diana o de un patrón interno en la primera mezcla de reacción; y (ii) transferencia fluida automáticamente de la primera mezcla de reacción desde la cámara de reacción al depósito de residuos siempre que la señal óptica alcance o supere un nivel predeterminado.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, que comprende además las etapas consistentes en transferir aire en la cámara de reacción y calentar la cámara de reacción a una temperatura de desnaturalización de ADN después de la etapa de transferencia fluida de la primera mezcla de reacción al depósito de residuos.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha temperatura de desnaturalización de ADN está en el intervalo de 85 a 100°C.
6. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha temperatura de desnaturalización de ADN está en el intervalo de aproximadamente 90°C a 99°C y en el que después de la etapa de calentamiento, la cámara de reacción se enfría a una temperatura de renaturalización de ADN.
7. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de combinación de la primera parte de la muestra y los primeros reactivos de amplificación incluye la transferencia fluida de la primera parte de la muestra al primer depósito de reactivos para formar la primera mezcla de reacción y la transferencia fluida de la primera mezcla de reacción desde el primer depósito de reactivos a la cámara de reacción.
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que la etapa de combinación de la segunda parte de la muestra y los segundos reactivos de amplificación incluye la transferencia fluida de la segunda parte de la muestra al segundo depósito de reactivos para formar la segunda mezcla de reacción y la transferencia fluida de la segunda mezcla de reacción desde el segundo depósito de reactivos a la cámara de reacción.
9. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que cada una de las reacciones de amplificación es una reacción en cadena de la polimerasa.
10. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra comprende un microorganismo.

11. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que la reacción de amplificación es una cualquiera entre: una reacción en cadena de la polimerasa, una reacción lineal de la polimerasa, una reacción en cadena de la ligasa, una reacción de desplazamiento de cadena, una amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos y una reacción de amplificación por círculo rodante.

5

12. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que la señal óptica se selecciona entre el grupo que consiste en una señal fluorescente, una señal quimioluminiscente, una señal electroquimioluminiscente y una señal colorimétrica.

10

13. El procedimiento según la reivindicación 12, en el que la señal óptica es una señal óptica fluorescente generada por un indicador fluorescente.

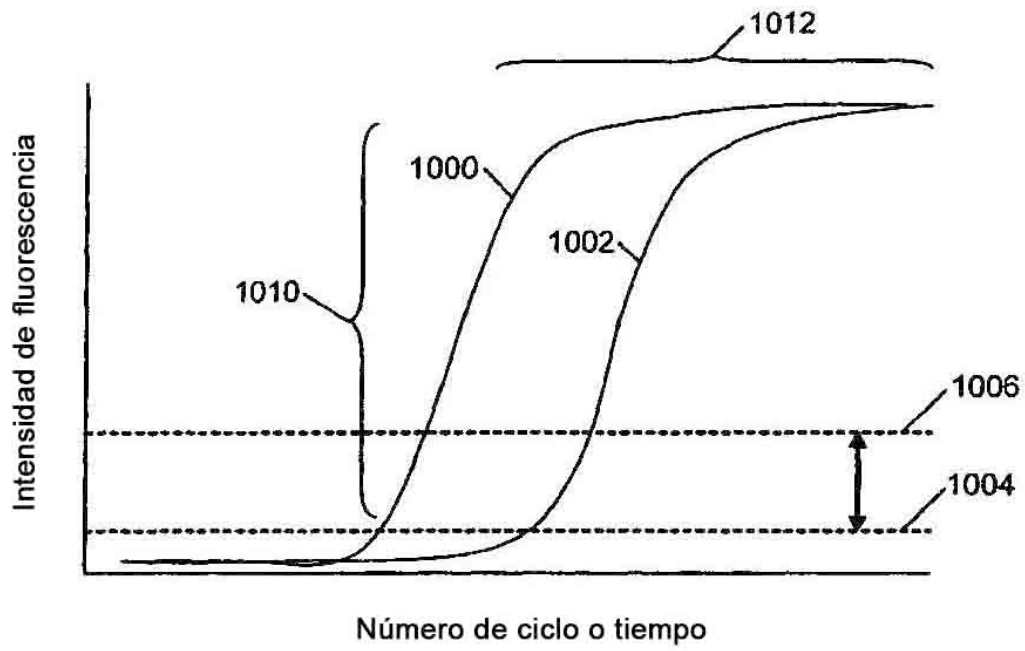


FIG. 1A

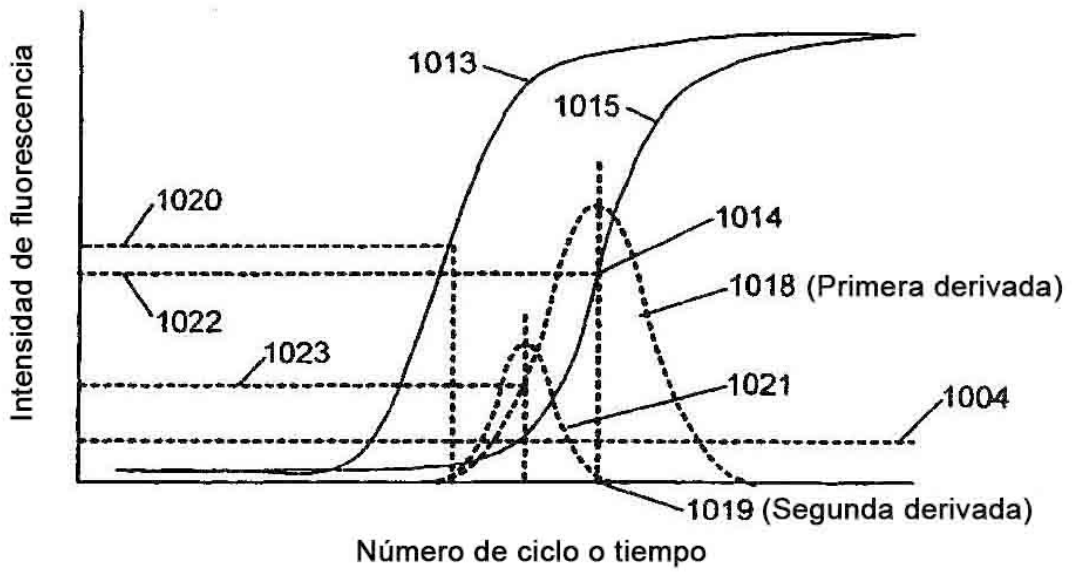


FIG. 1B

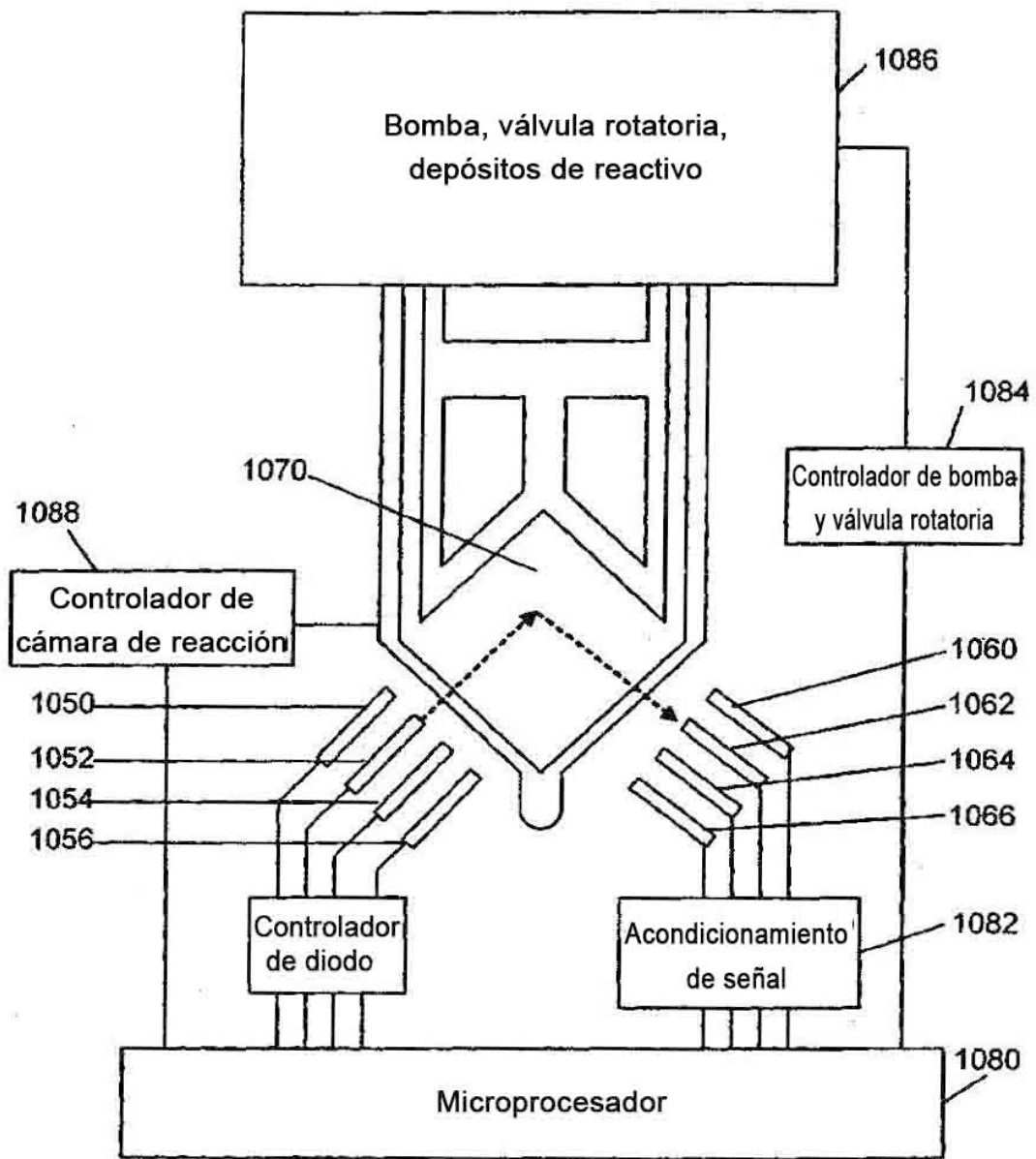


FIG. 1C

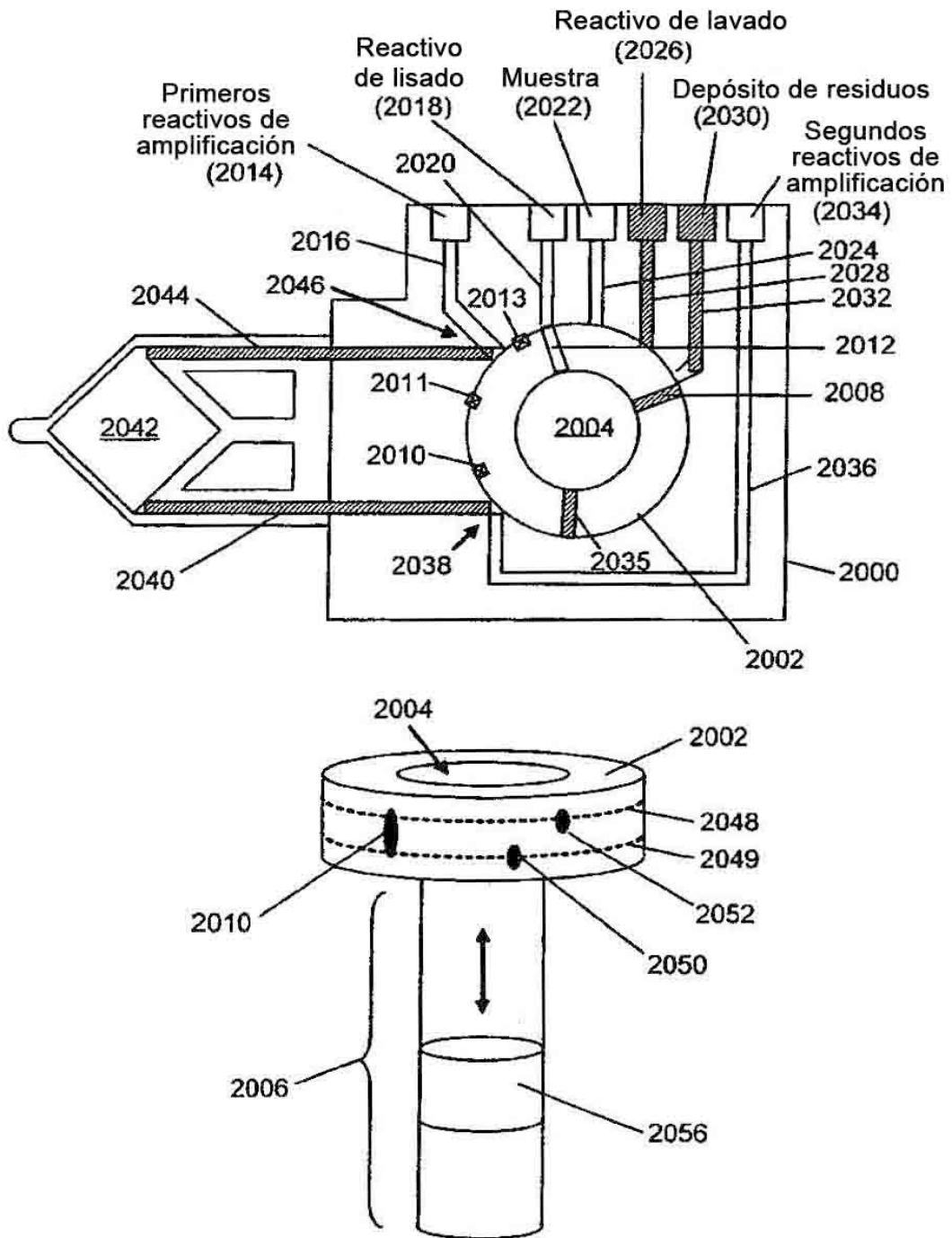
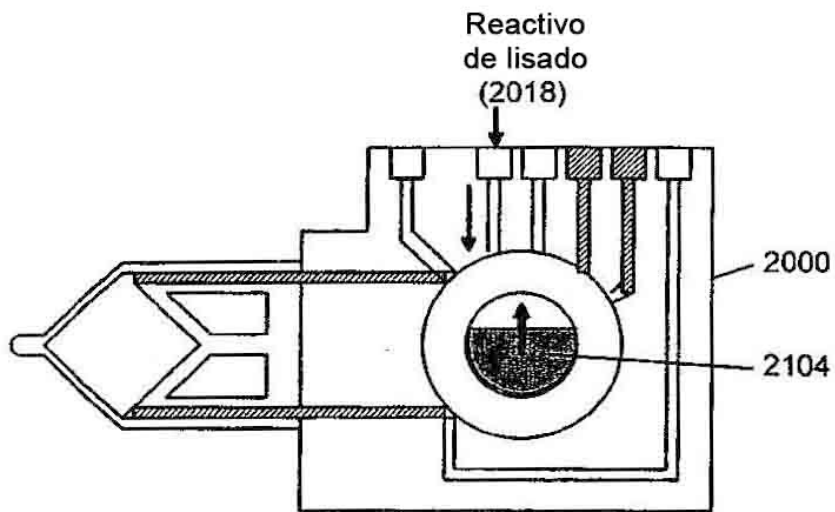


FIG. 2A



2114

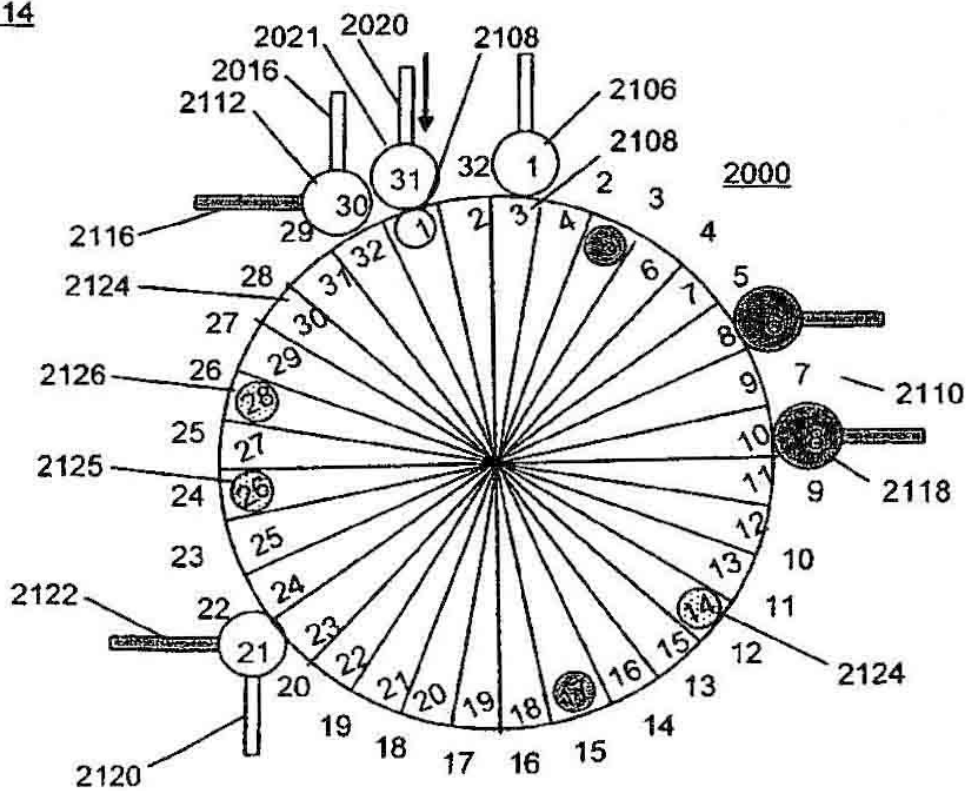


FIG. 2B

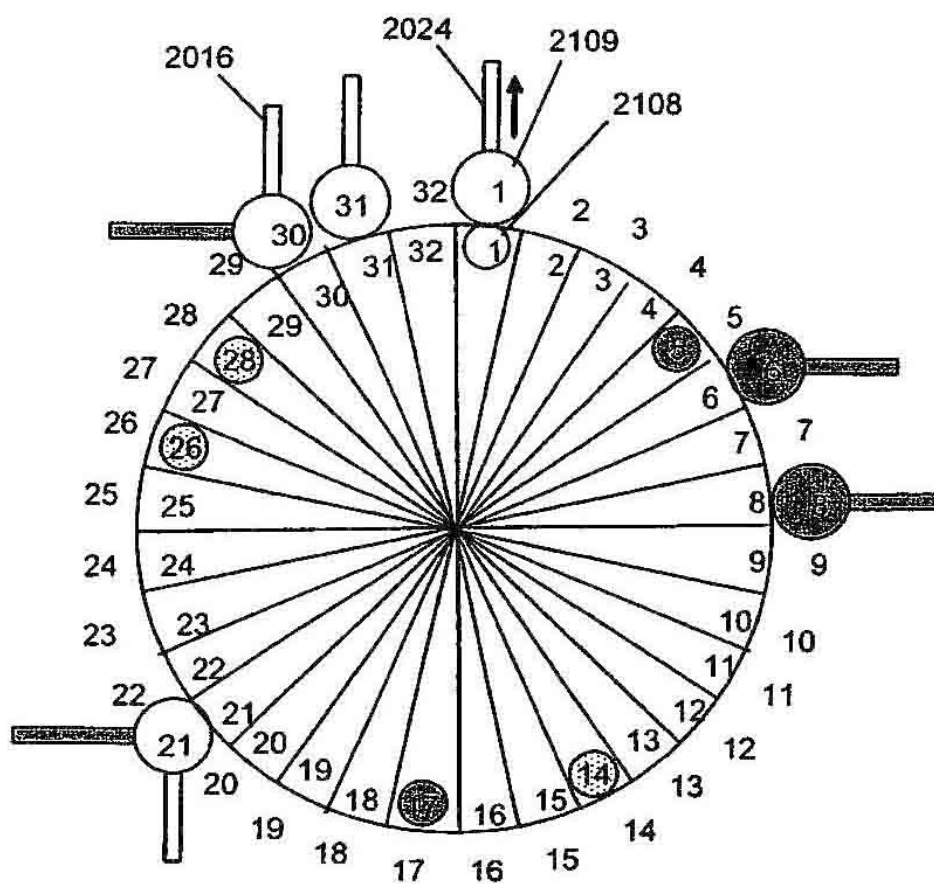
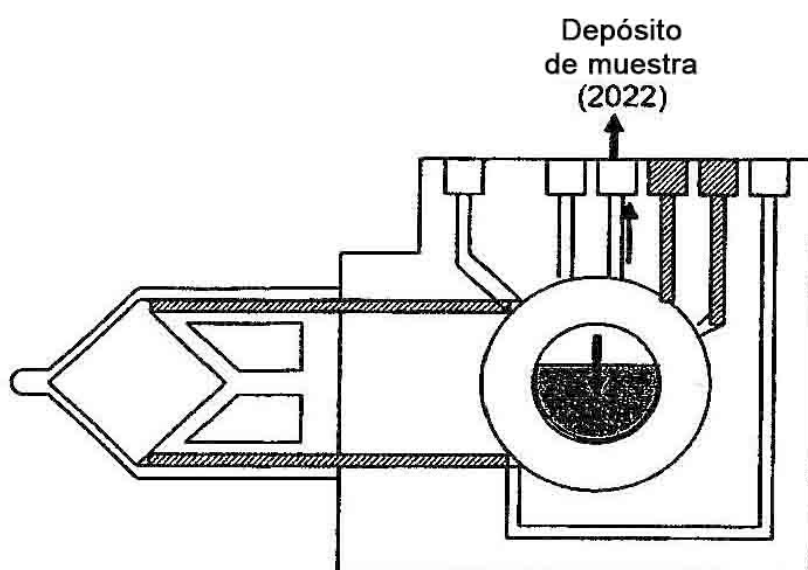
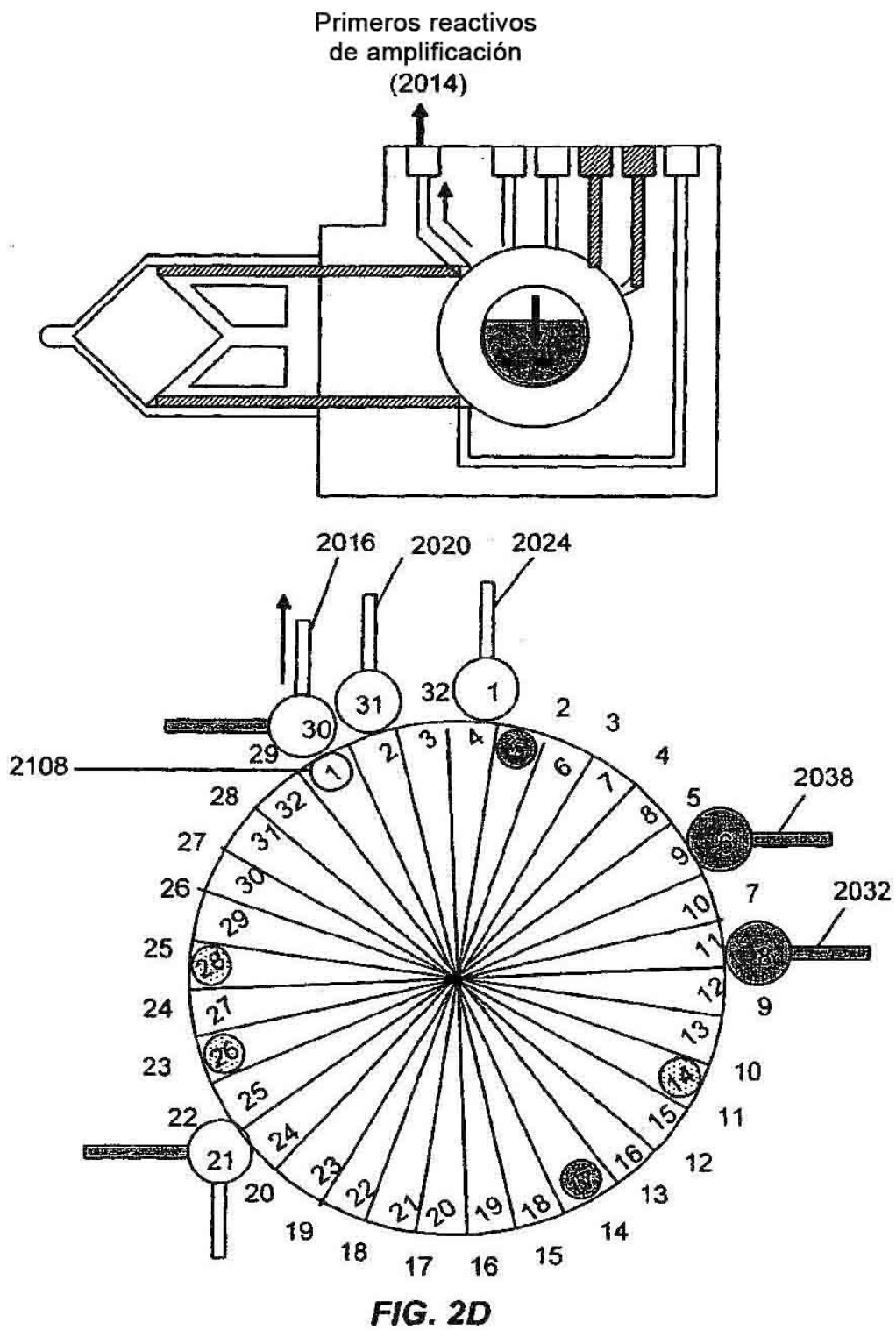
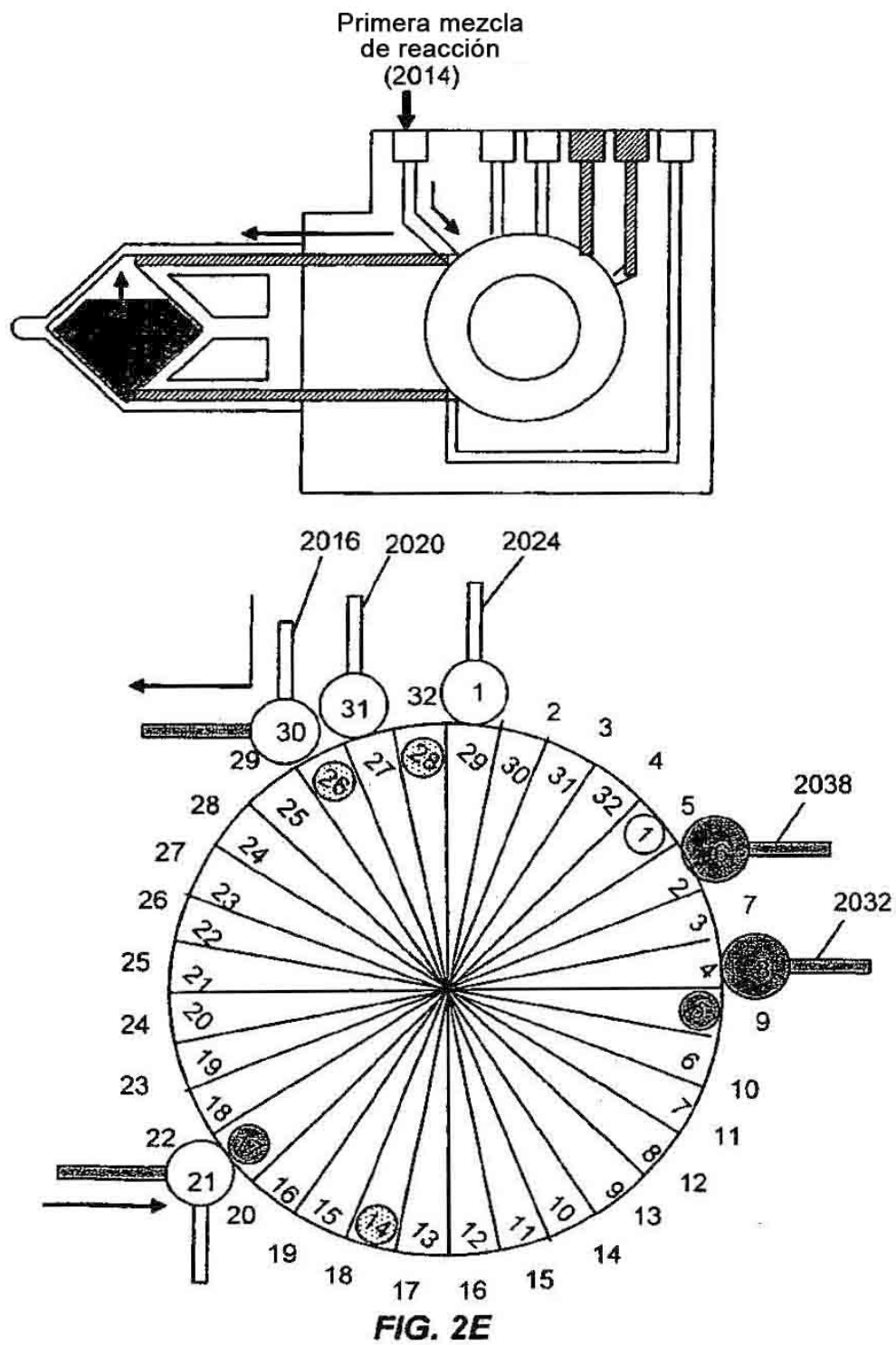


FIG. 2C





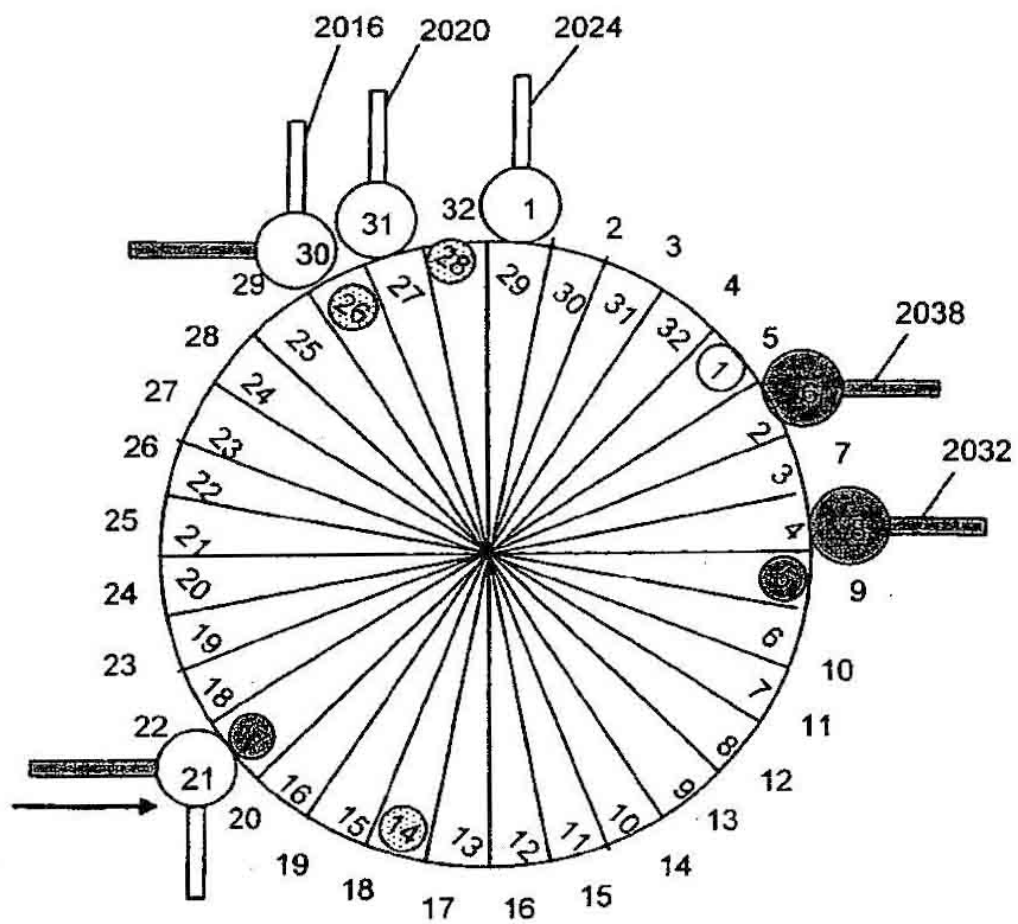
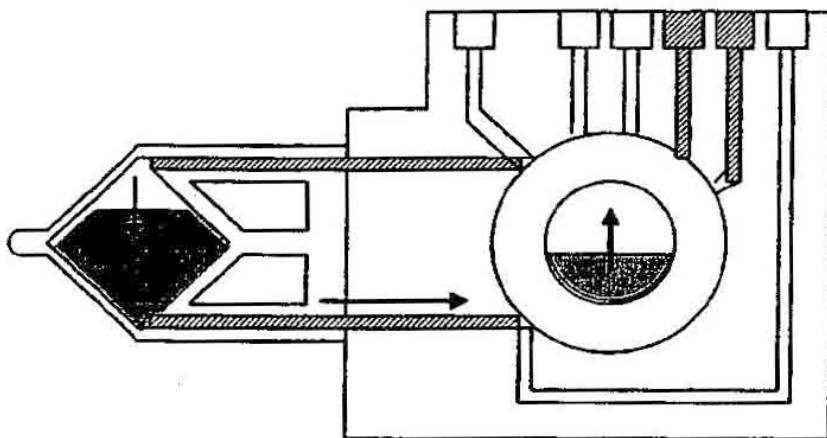
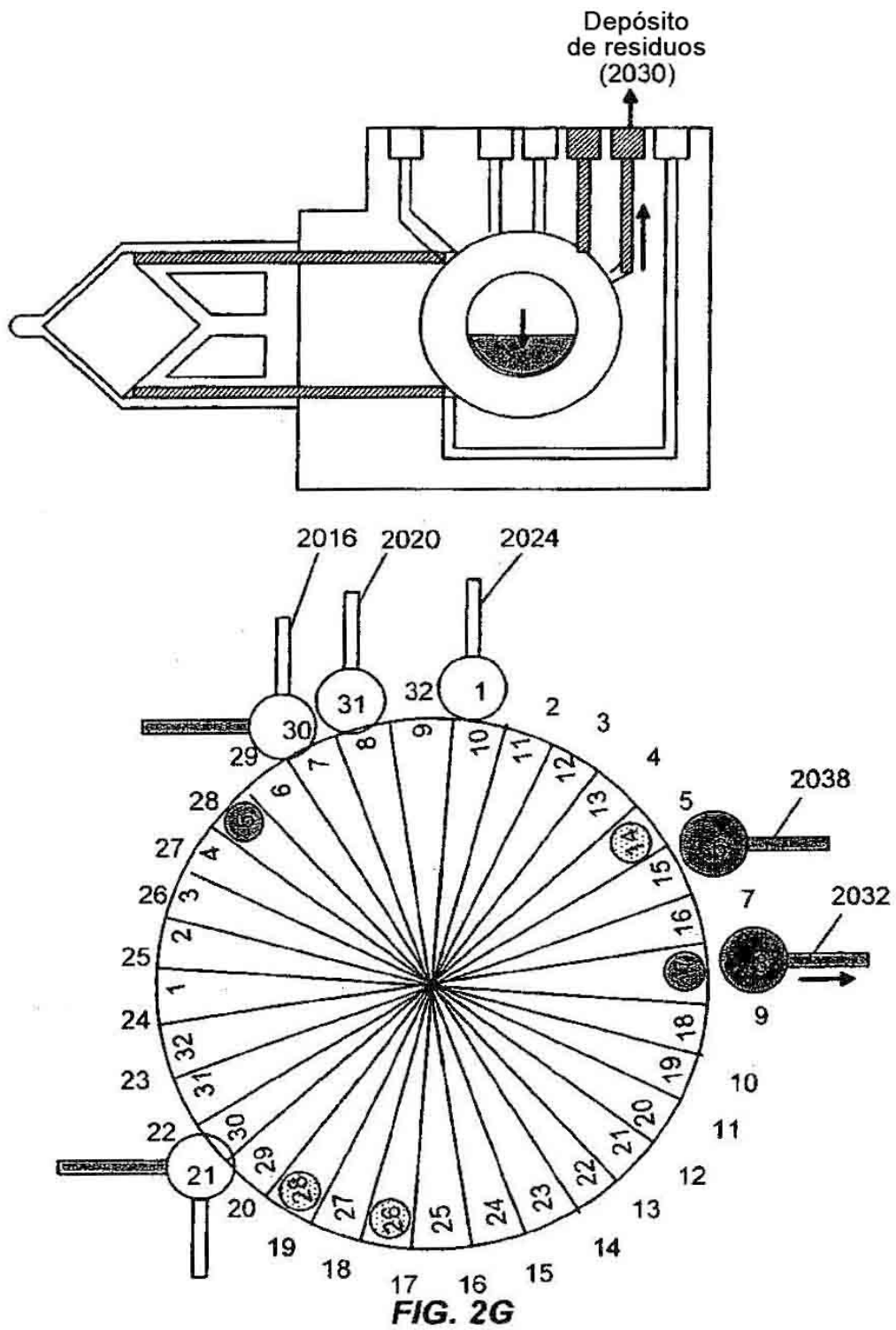


FIG. 2F



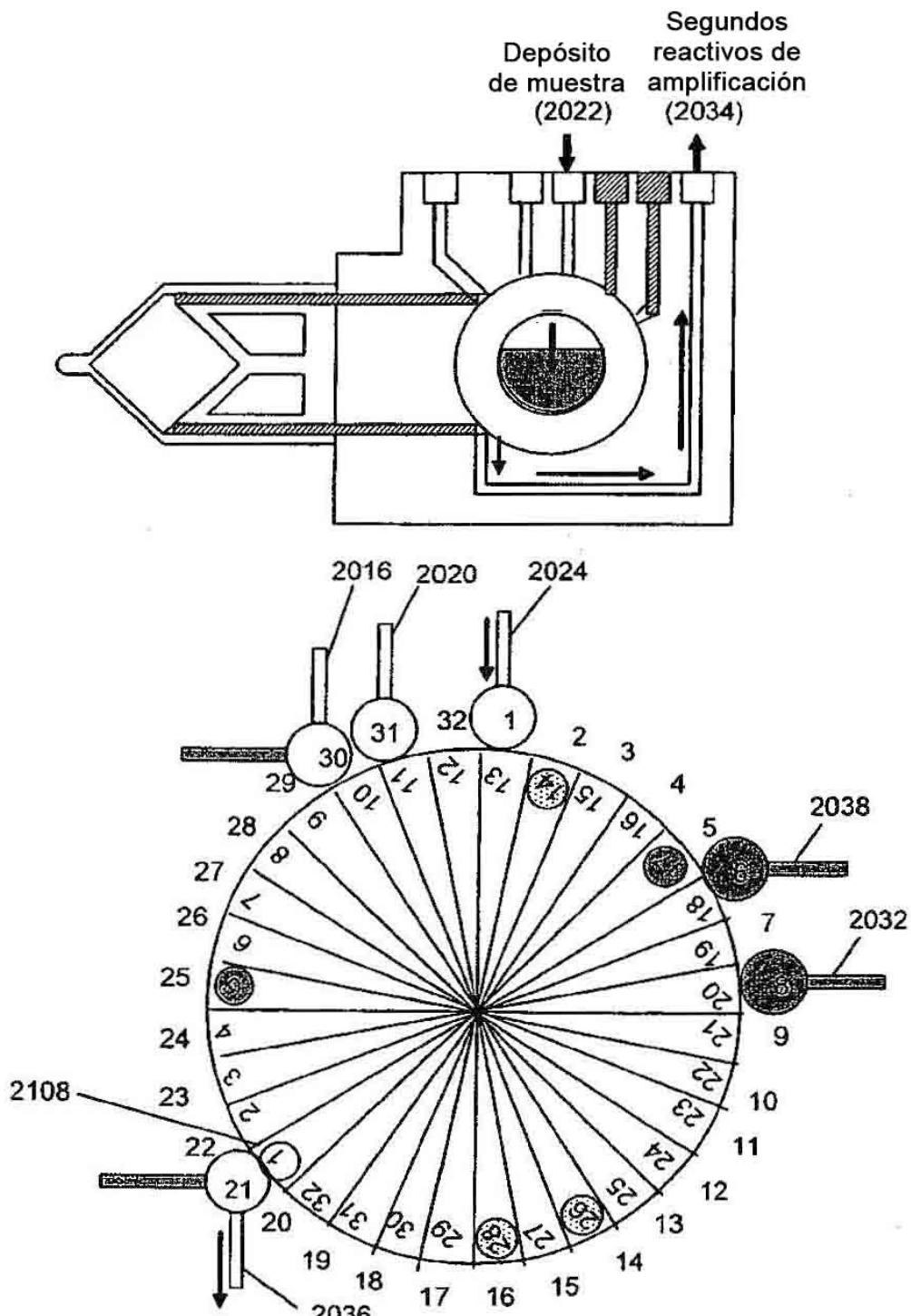


FIG. 2H

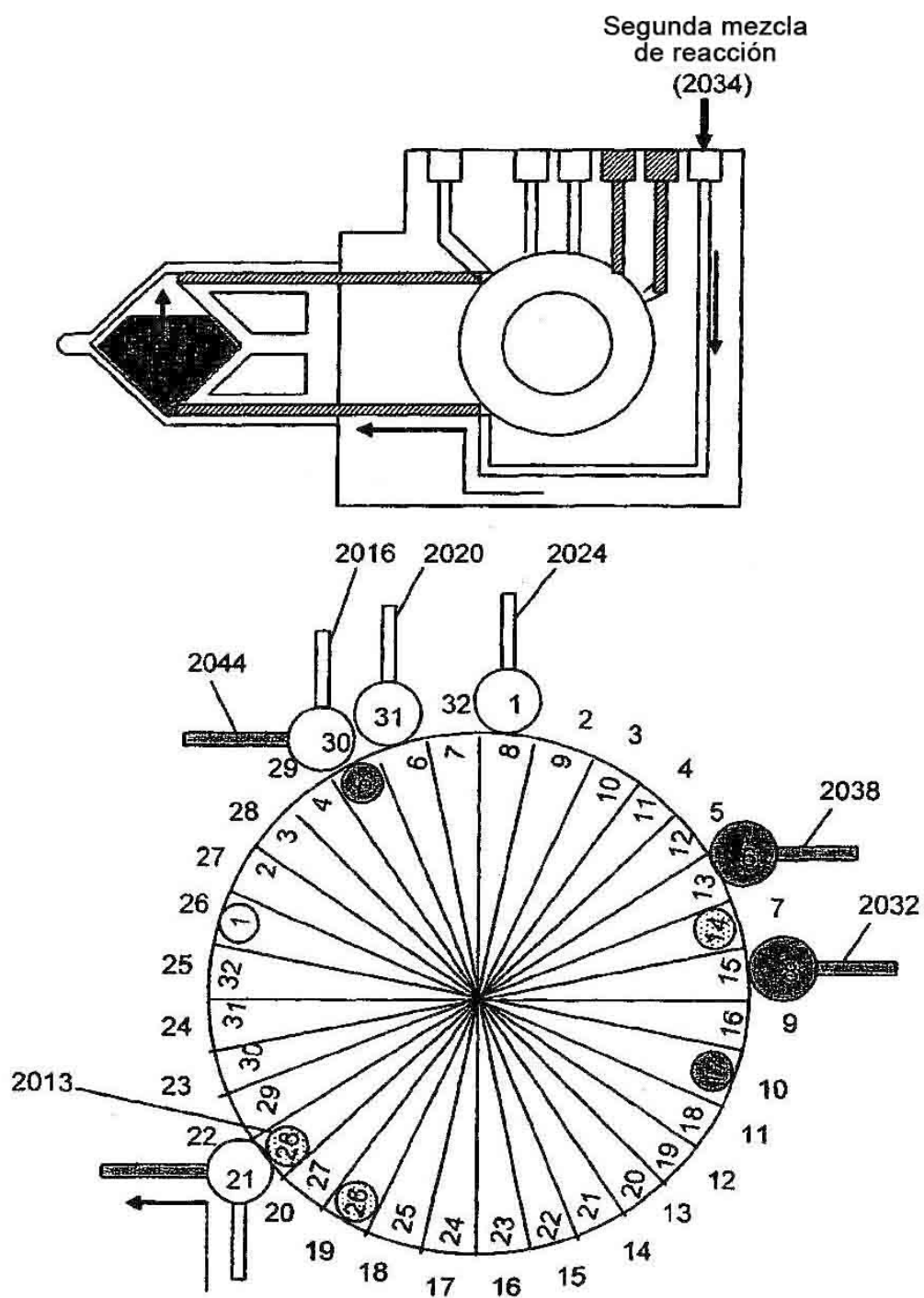


FIG. 21

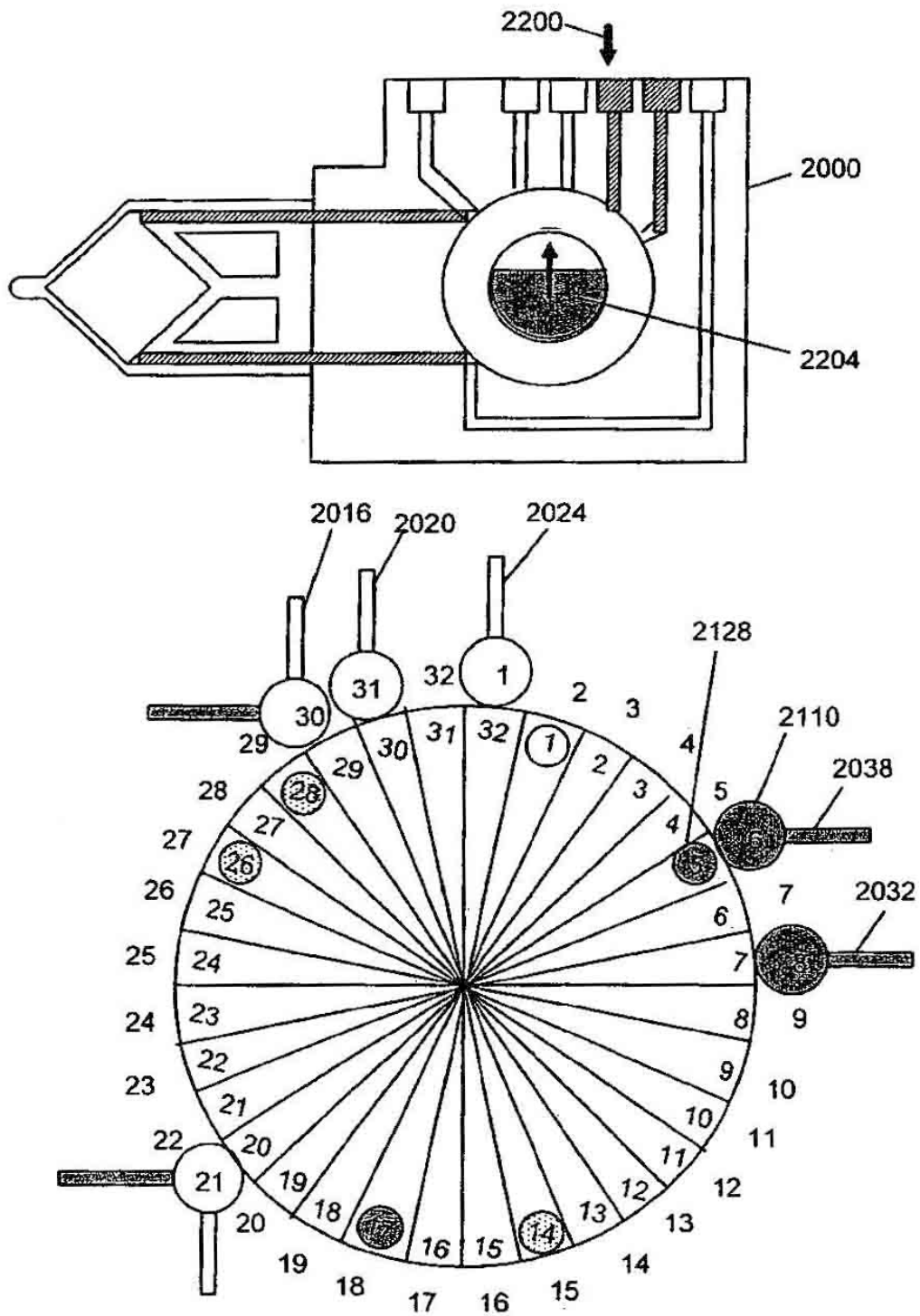


FIG. 2J

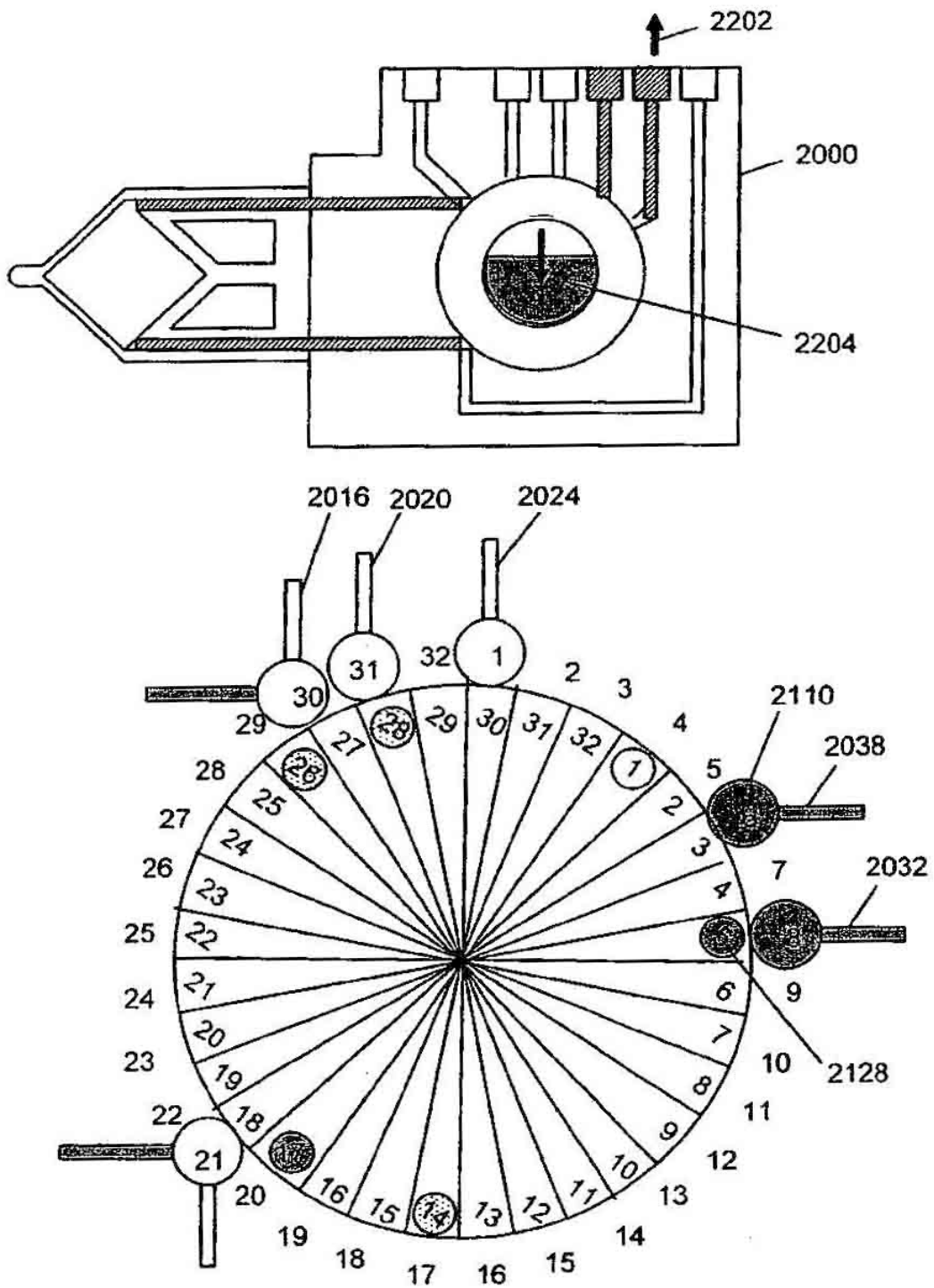


FIG. 2K

Secuencia de instrucciones			
#	Instrucción	Parámetros	
1	Activar presión	Activar presión en intervalo de 500 ms.	
2	Aspirar	De tampón TET	250 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
3	Dispensar	A residuo	250 ul @ 30 ul/seg Trayectoria de filtro
4	Esperar	3,0 segundo(s)	
5	Cambiar	A lisado	3x Asp:150@20 Disp:150@20 Trayectoria directa
6	Aspirar aire	De aire	20 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
7	Dispensar aire	A residuo	20 ul @ 20 ul/seg Trayectoria de filtro
8	Esperar	3,0 segundo(s)	
9	Aspirar	De lisado	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
10	Dispensar	A lisado	10 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
11	Dispensar	A perlas 1	55 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
12	Esperar	5,0 segundo(s)	
13	Cambiar	A perlas 1	3x Asp:40@20 Disp:40@20 Trayectoria directa
14	Aspirar	De lisado	35 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
15	Dispensar	A lisado	10 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
16	Aspirar	De perlas 1	55 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
17	Cambiar	A perlas 1	12x Disp:80@20 Asp:80@ Trayectoria directa
18	Dispensar	A Mezcla maestra	80 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
19	Esperar	10,0 segundo(s)	
20	Aspirar aire	De aire	50 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
21	Aspirar	En tubo	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
22	Dispensar	A tubo	5 ul @ 10 ul/seg Trayectoria directa
23	Esperar	3,0 segundo(s)	
24	Presurizar tubo	50 uL @ 40 ul/seg	No mover válvula tras pre...
25	Desactivar presión		
26	Protocolo	1: Mantener; 2: ciclo 3 temperaturas;	
27	Despresurizar tubo	50 uL @ 40 uL/seg	Trayectoria de filtro
28	Dispensar aire	A residuo	50 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
29	Dispensar	A tubo	60 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
30	Aspirar	De Mezcla maestra	80 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
31	Dispensar	A residuo	80 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
32	Aspirar	De tampón TET	70 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa

FIG. 3A-1

33	Dispensar	A Mezcla maestra	70 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
34	Aspirar	En tubo	60 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
35	Dispensar	A tubo	60 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
36	Esperar	3,0 segundo(s)		
37	Aspirar	De Mezcla maestra	70 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
38	Aspirar aire	De Mezcla maestra	100 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
39	Dispensar	A residuo	70 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
40	Dispensar aire	A residuo	100 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
41	Aspirar aire	De aire	500 ul @ 60 ul/seg	Trayectoria directa
42	Dispensar aire	A tubo	500 ul @ 100 ul/seg	Trayectoria directa
43	Protocolo	1: Ciclo 2 temperaturas;		
44	Cambiar	A lisado	3x Asp:100@20 Disp:100@20	Trayectoria directa
45	Aspirar aire	De aire	20 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
46	Dispensar aire	A residuo	20 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
47	Esperar	3,0 segundo(s)		
48	Aspirar	De lisado	10 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
49	Dispensar	A lisado	10 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
50	Dispensar	A perlas 2	55 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
51	Esperar	5,0 segundo(s)		
52	Cambiar	A perlas 2	3x Asp:40@20 Disp:40@20	Trayectoria directa
53	Aspirar	De lisado	35 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
54	Dispensar	A lisado	10 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
55	Aspirar	De perlas 2	55 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
56	Cambiar	A perlas 2	12x Disp:80@20 Asp:80@20	Trayectoria directa
57	Dispensar	A Mezcla maestra	80 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
58	Esperar	10,0 segundo(s)		
59	Aspirar aire	De aire	50 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
60	Aspirar	En tubo	65 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
61	Dispensar	A tubo	5 ul @ 10 ul/seg	Trayectoria directa
62	Esperar	3,0 segundo(s)		
63	Presurizar tubo	50 ul @ 40 ul/seg	No mover válvula tras pre...	
64	Desactivar presión			
65	Protocolo	1: Mantener; 2: Ciclo 3 temperaturas		
66	Despresurizar tubo	50 ul @ 40 ul/seg		

FIG. 3A-2

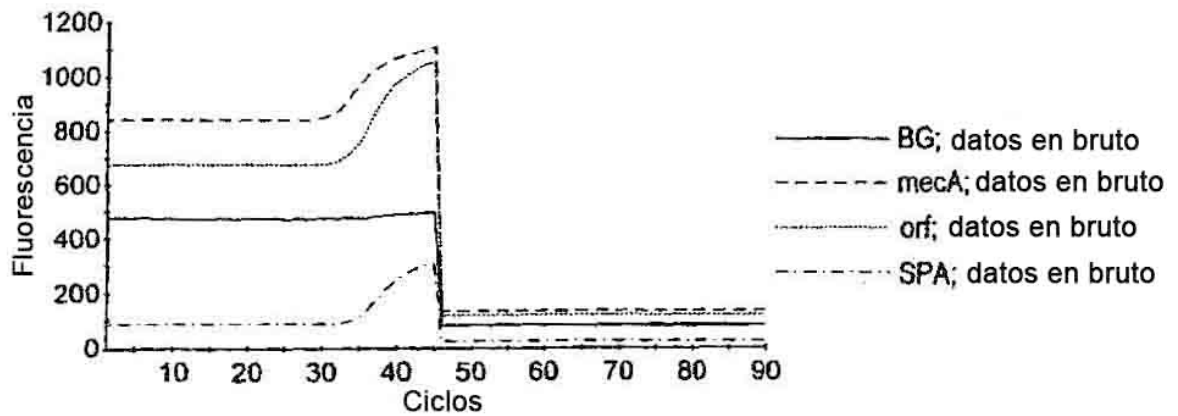


FIG. 3B

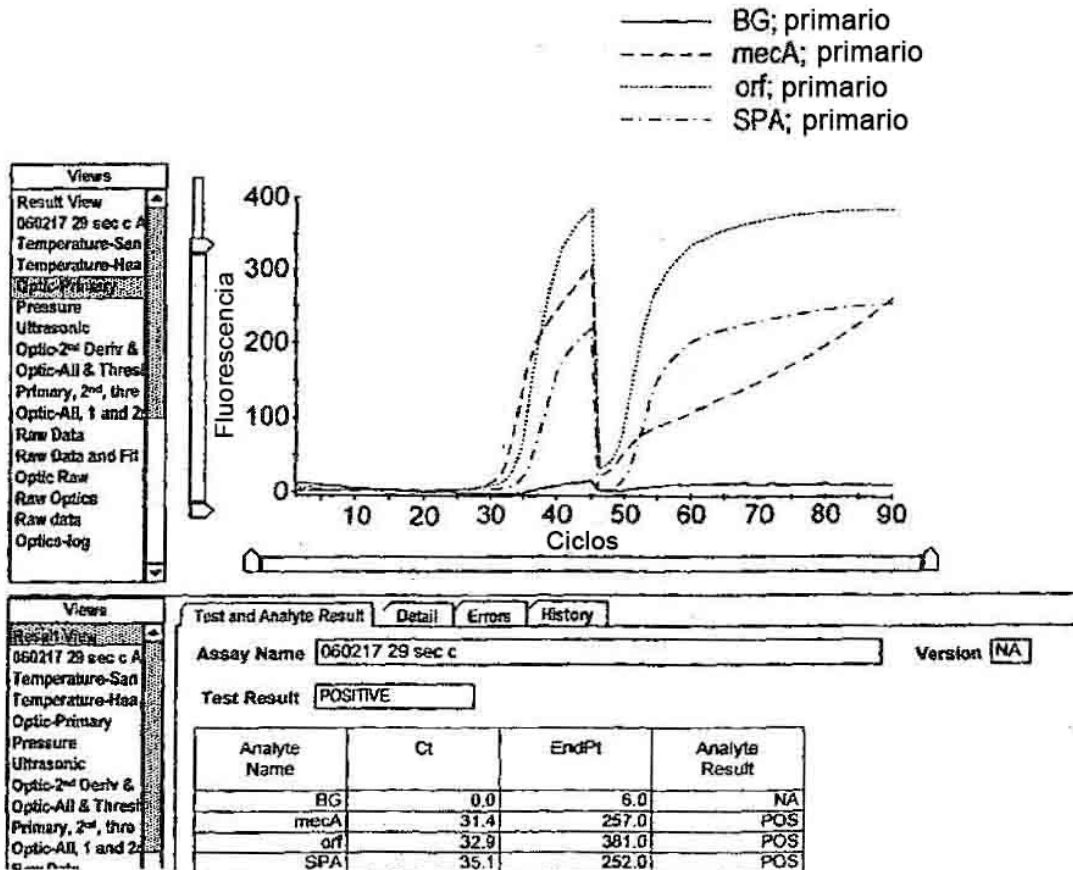


FIG. 3C

Secuencia de instrucciones			
#	Instrucción	Parámetros	
1	Activar presión	Activar presión en intervalo de 500 ms.	
2	Aspirar	De tampón TET	250 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
3	Dispensar	A residuo	250 ul @ 30 ul/seg Trayectoria de filtro
4	Esperar	3,0 segundo(s)	
5	Cambiar	A lisado	3x Asp:150@20 Disp:150@20 Trayectoria directa
6	Aspirar aire	De aire	20 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
7	Dispensar aire	A residuo	20 ul @ 20 ul/seg Trayectoria de filtro
8	Esperar	3,0 segundo(s)	
9	Aspirar	De lisado	50 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
10	Dispensar	A lisado	10 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
11	Dispensar	A perlas 1	40 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
12	Aspirar	De perlas 1	80 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
13	Cambiar	A perlas 1	12x Disp:80@20 Asp:80@20 Trayectoria directa
14	Dispensar	A Mezcla maestra	80 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
15	Esperar	10,0 segundo(s)	
16	Aspirar aire	De aire	50 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
17	Aspirar	En tubo	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
18	Dispensar	A tubo	5 ul @ 10 ul/seg Trayectoria directa
19	Esperar	3,0 segundo(s)	
20	Presurizar tubo	50 ul @ 40 ul/seg	No mover válvula tras pre...
21	Desactivar presión		
22	Protocolo	1: Mantener; 2: Ciclo de 3 temperaturas;	
23	Despresurizar tubo	50 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria de filtro
24	Dispensar aire	A residuo	50 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
25	Dispensar	A tubo	60 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
26	Aspirar	De Mezcla maestra	80 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
27	Dispensar	A residuo	80 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
28	Aspirar	De tampón TET	70 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
29	Dispensar	A Mezcla maestra	70 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
30	Aspirar	En tubo	60 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
31	Dispensar	A tubo	60 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
32	Esperar	3,0 segundo(s)	

FIG. 4A-1

33	Aspirar	De Mezcla maestra	70 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
34	Aspirar aire	De Mezcla maestra	100 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
35	Dispensar	A residuo	70 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
36	Dispensar aire	A residuo	100 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
37	Aspirar aire	De aire	500 ul @ 60 ul/seg	Trayectoria directa
38	Dispensar aire	A tubo	500 ul @ 100 ul/seg	Trayectoria directa
39	Protocolo	1: Ciclo 2 temperaturas;		
40	Cambiar	A lisado	3x Asp:100@20 Disp:100@20	Trayectoria directa
41	Aspirar aire	De aire	20 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
42	Dispensar aire	A residuo	20 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
43	Esperar	3,0 segundo(s)		
44	Aspirar	De lisado	50 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
45	Dispensar	A lisado	10 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
46	Dispensar	A perlas 2	40 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
47	Aspirar	De perlas 2	80 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
48	Cambiar	A perlas 2	12x Disp:80@20 Asp:80@20	Trayectoria directa
49	Dispensar	A Mezcla maestra	80 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
50	Esperar	10,0 segundo(s)		
51	Aspirar aire	De aire	50 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
52	Aspirar	En tubo	65 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
53	Dispensar	A tubo	5 ul @ 10 ul/seg	Trayectoria directa
54	Esperar	3,0 segundo(s)		
55	Presurizar tubo	50 ul @ 40 ul/seg	No mover válvula tras pre...	
56	Desactivar presión			
57	Protocolo	1: Mantener; 2: Ciclo 3 temperaturas;		
58	Despresurizar tubo	50 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria de filtro	

FIG. 4A-2

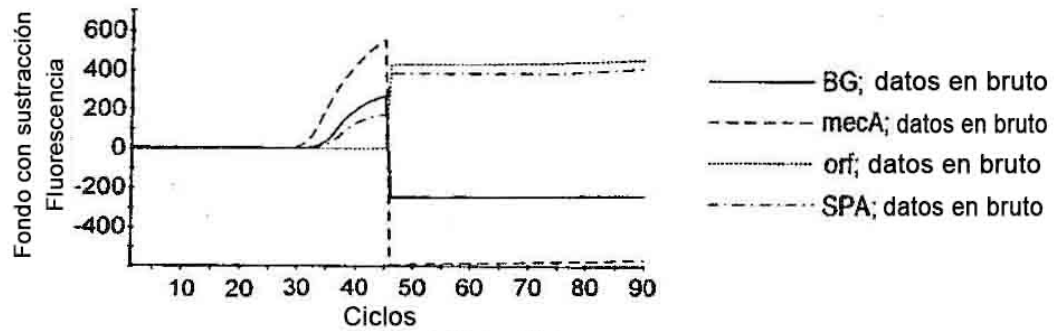
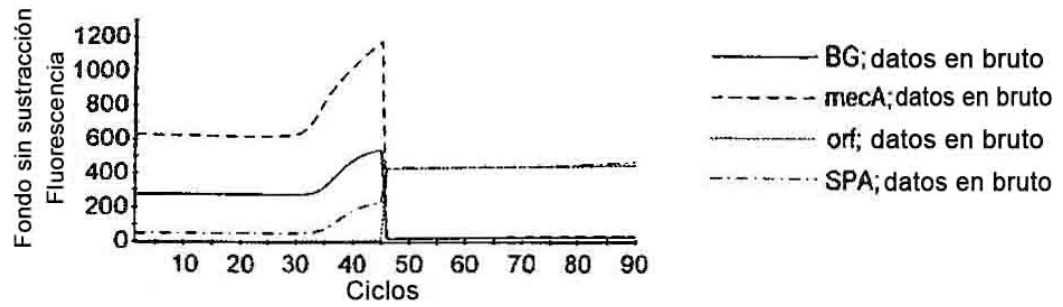


FIG. 4B

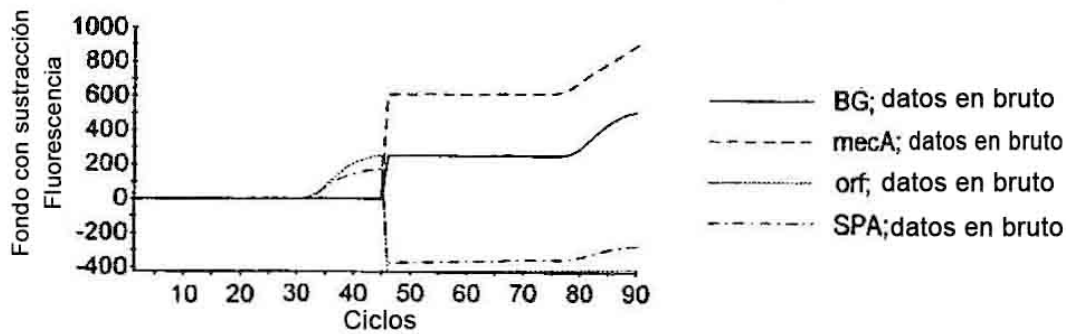
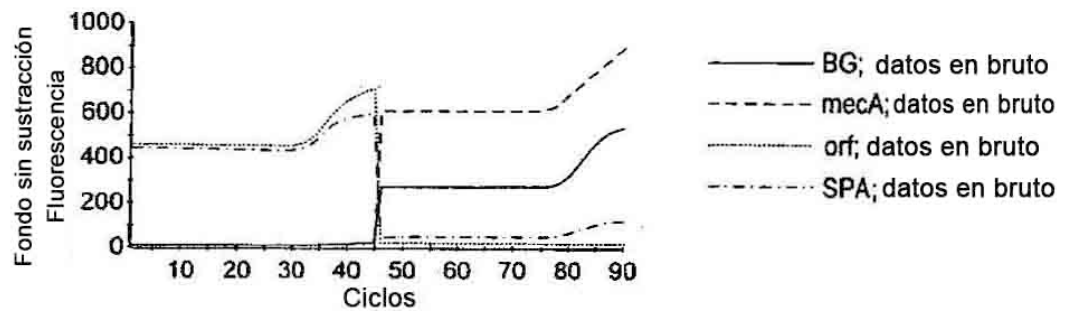


FIG. 4C

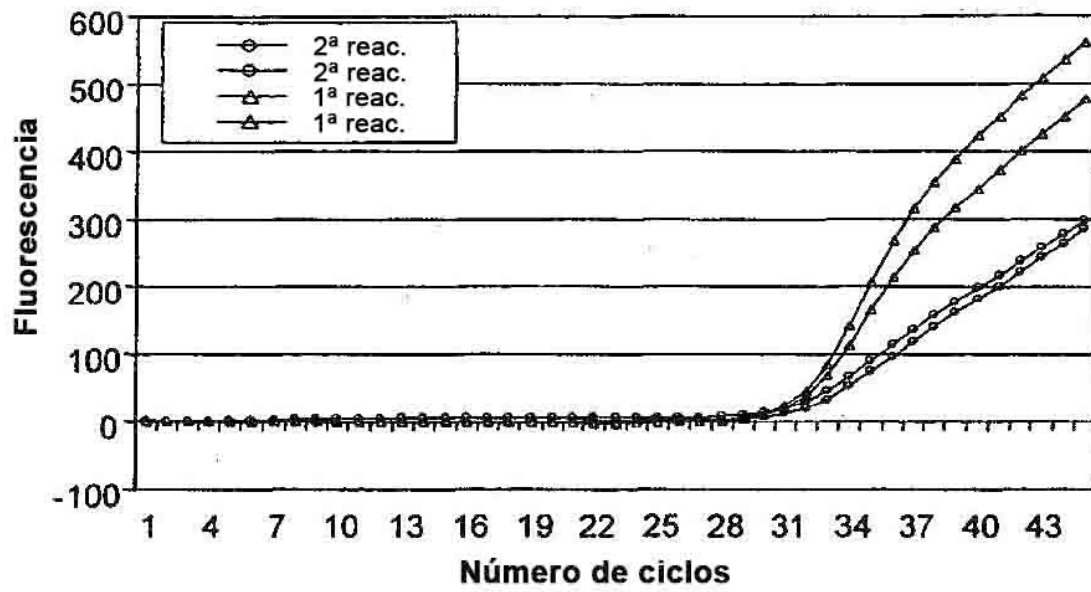


FIG. 4D

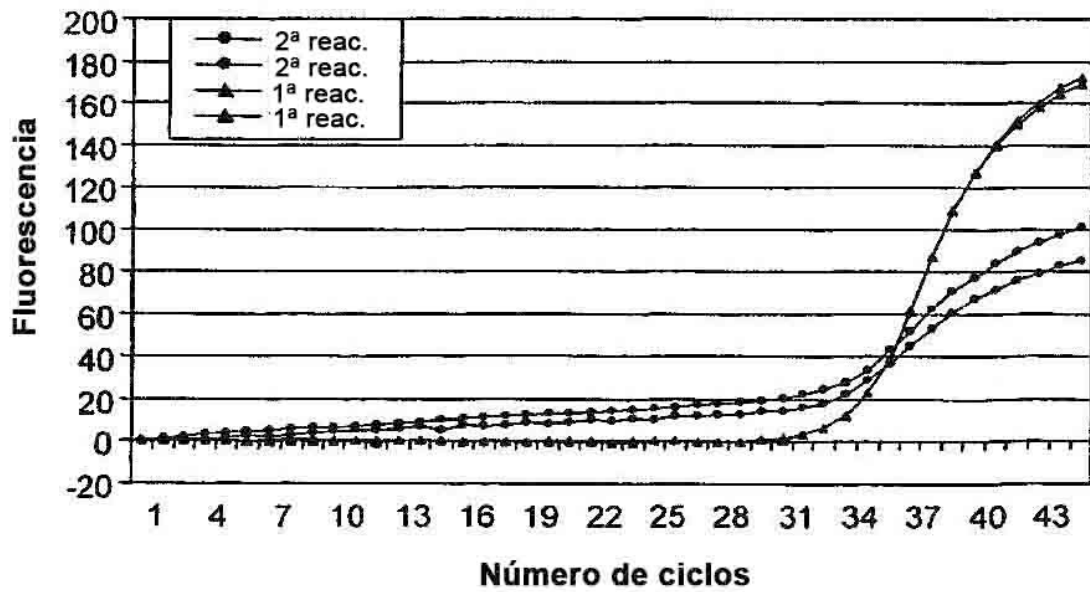


FIG. 4E

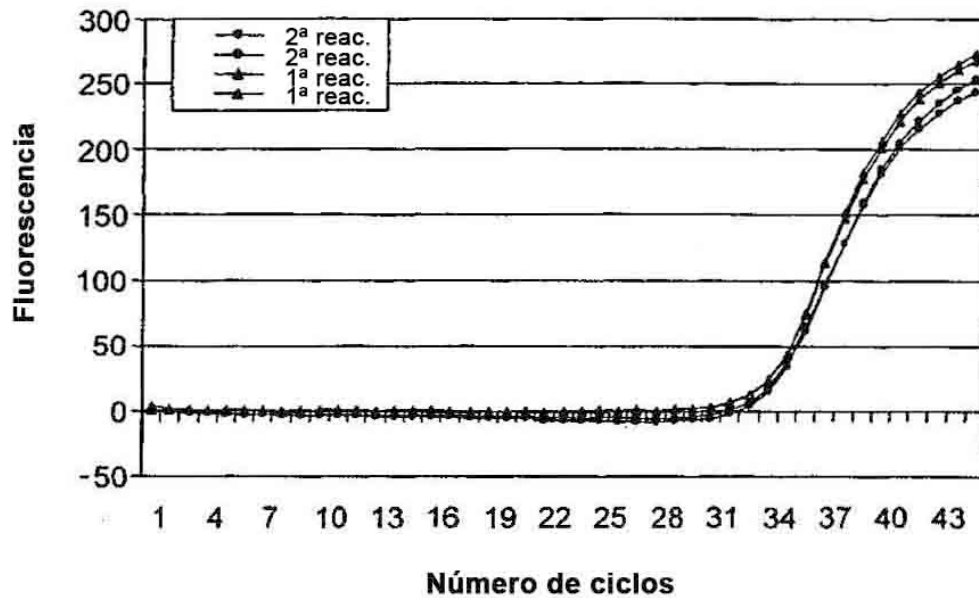


FIG. 4F

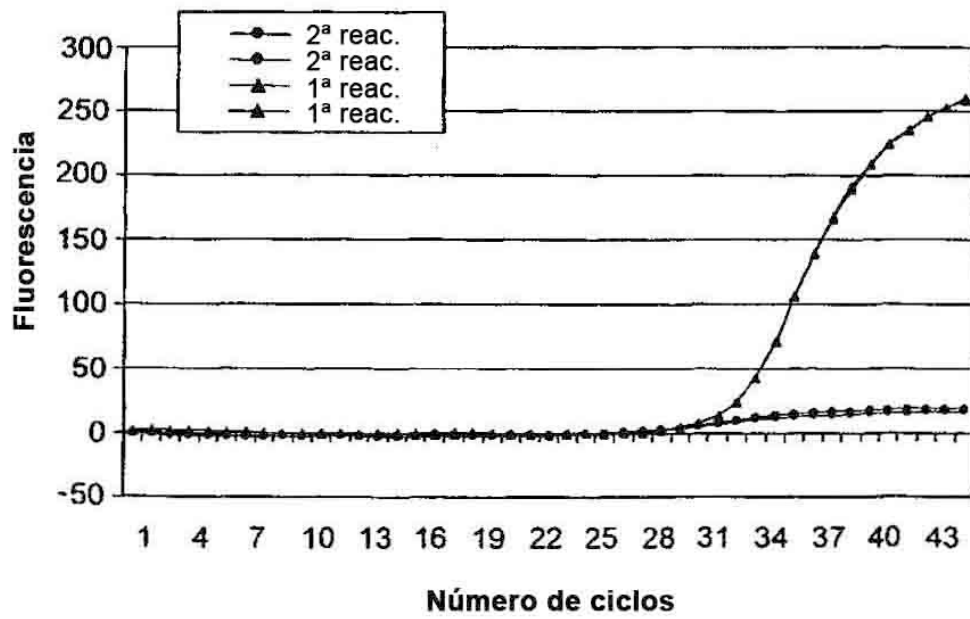
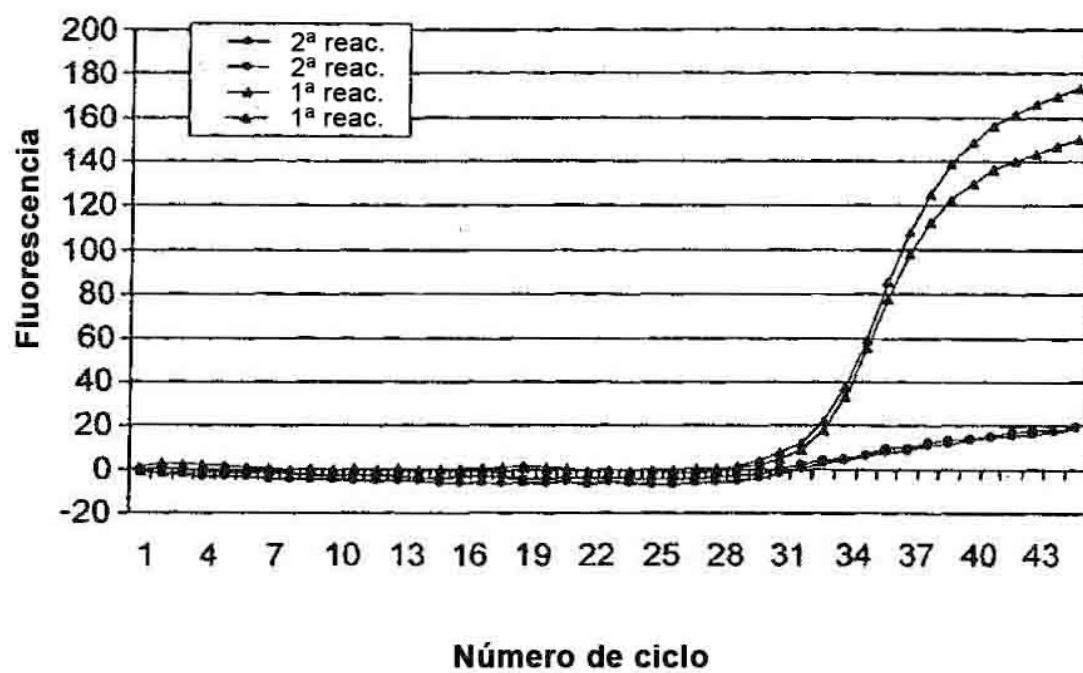


FIG. 4G

**FIG. 4H**

BG1 (Reacción 1)

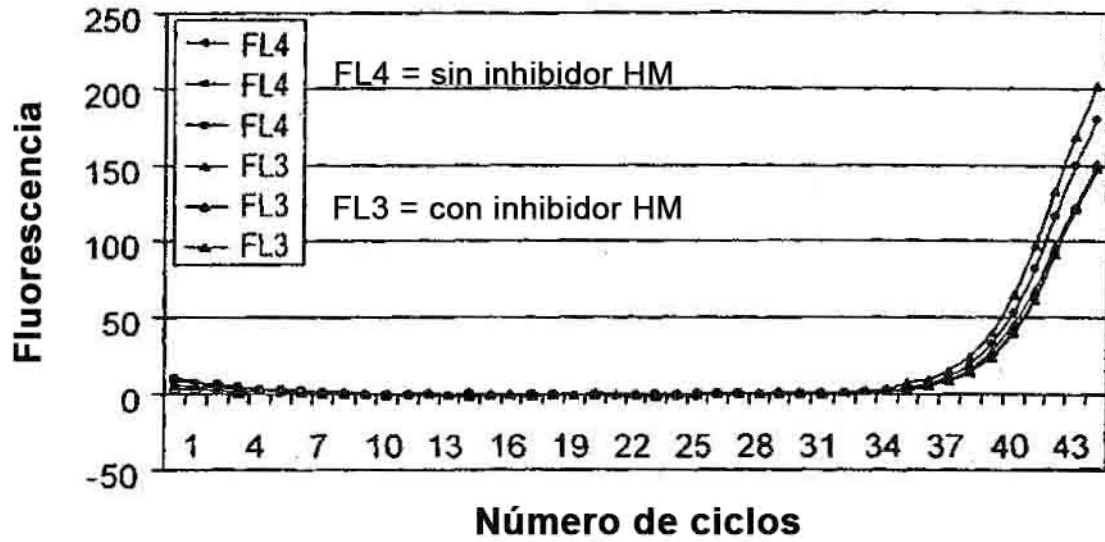


FIG. 5A

BG2 (Reacción 2)

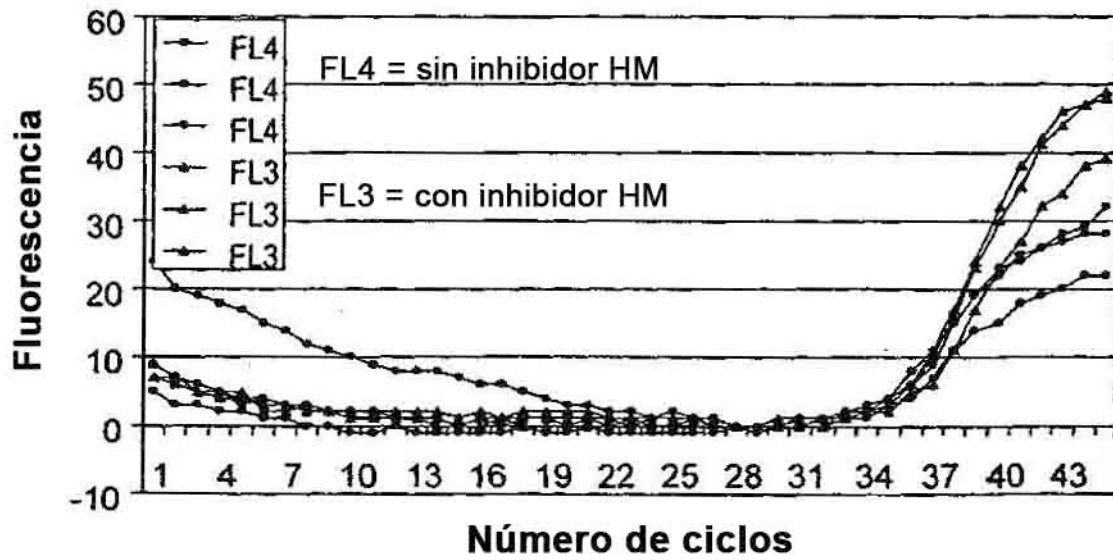


FIG. 5B

Secuencia de instrucciones			
#	Instrucción	Parámetros	
1	Activar presión	Activar presión a intervalo de 500 ms.	
2	Aspirar	De EtOH	700 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
3	Dispensar	A lisis	700 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
4	Cambiar	A lisis	4x Asp:700@60 Disp:700@60 Trayectoria directa
5	Empezar repetir	2 vez(veces)	
6	Aspirar	De lisis	675 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
7	Dispensar	A residuo	675 ul @ 10 ul/seg Trayectoria de filtro
8	Terminar repetir		
9	Aspirar	De tampón de lavado	350 ul @ 60 ul/se Trayectoria directa
10	Empezar repetir	3 vez(veces)	
11	Dispensar	A residuo	100 ul @ 10 ul/seg Trayectoria de filtro
12	Esperar	5,0 segundo(s)	
13	Terminar repetir		
14	Dispensar	A residuo	50 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
15	Aspirar aire	De aire	200 ul @60 ul/seg Trayectoria directa
16	Dispensar aire	A residuo	200 ul @60 ul/seg Trayectoria de filtro
17	Aspirar	De tampón de elución	250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
18	Dispensar	A residuo	2500 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
19	Aspirar	De tampón de elución	120 ul @ 40 ul/se Trayectoria directa
20	Dispensar	A tampón de elución	10 ul @ 10 ul/seg Trayectoria directa
21	Dispensar	A residuo	30 ul @ 5 ul/seg Trayectoria de filtro
22	Dispensar	A perlas RT	60 ul @ 20 ul/seg Trayectoria de filtro
23	Dispensar	A residuo	20 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
24	Esperar	5,0 segundo(s)	
25	Cambiar	A perlas RT	3x Asp:45@10 Disp:45@10 Trayectoria directa
26	Aspirar	De perlas RT	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
27	Dispensar	A cámara 7	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
28	Aspirar	En tubo	60 ul @ 15 ul/seg Trayectoria directa
29	Protocolo	1: Ciclo de 3 temperaturas;	
30	Dispensar	A tubo	60 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
31	Aspirar	En tubo	60 ul @ 15 ul/seg Trayectoria directa
32	Protocolo	1: Ciclo de 3 temperaturas;	

FIG. 6A-1

33	Dispensar	A tubo	60 ul@40 ul/seg	Trayectoria directa
34	Aspirar	De tampón de elución	20 ul@ 30 ul/seg	Trayectoria directa
35	Aspirar	De cámara 7	65 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
36	Dispensar	A perlas PCR	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
37	Cambiar	A perlas PCR	6x Asp:65@60 Disp:65@60	Trayectoria directa
38	Aspirar aire	En tubo	600 ul @ 100 ul/seg	Trayectoria directa
39	Dispensar aire	A aire	600 ul @ 100 ul/seg	Trayectoria directa
40	Aspirar	Para perlas PCR	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
41	Dispensar	A cámara 7	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
42	Aspirar aire	De aire	35 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
43	Aspirar	En tubo	65 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
44	Presurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa	
45	Desactivar presión			
46	Protocolo	1: Mantener; 2: Ciclo de 3 temperaturas; 3: Ciclo de 2 temperaturas;		
47	Despresurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria de filtro	

FIG. 6A-2

Secuencia de instrucciones			
#	Instrucción	Parámetros	
1	Activar presión	Activar presión a intervalo de 500 ms.	
2	Aspirar	De EtOH	700 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
3	Dispensar	A lisis	700 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
4	Cambiar	A lisis	4x Asp:700@60 Disp:700@60 Trayectoria directa
5	Empezar repetir	2 vez(veces)	
6	Aspirar	De lisis	675 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
7	Dispensar	A residuo	675 ul @ 10 ul/seg Trayectoria de filtro
8	Terminar repetir		
9	Aspirar	De tampón de lavado	350 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
10	Empezar repetir	3 vez(veces)	
11	Dispensar	A residuo	100 ul @ 10 ul/seg Trayectoria de filtro
12	Esperar	5,0 segundo(s)	
13	Terminar repetir		
14	Dispensar	A residuo	50 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
15	Aspirar aire	De aire	200 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
16	Dispensar aire	A residuo	200 ul @ 60 ul/seg Trayectoria de filtro
17	Aspirar	De tampón de elución	250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
18	Dispensar	A residuo	250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
19	Aspirar	De tampón de elución	120 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
20	Dispensar	A tampón de elución	10 ul @ 10 ul/seg Trayectoria directa
21	Dispensar	A residuo	30 ul @ 5 ul/seg Trayectoria de filtro
22	Dispensar	A perlas RT	60 ul @ 20 ul/seg Trayectoria de filtro
23	Dispensar	A residuo	20 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
24	Esperar	5,0 segundo(s)	
25	Cambiar	A perlas RT	3x Asp:45@10 Disp:45@10 Trayectoria directa
26	Aspirar	De perlas RT	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
27	Dispensar	A cámara 7	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
28	Aspirar	En tubo	65 ul @ 15 ul/seg Trayectoria directa
29	Protocolo	1: Ciclo de 3 temperaturas;	
30	Dispensar	A tubo	60 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
31	Aspirar	En tubo	60 ul @ 15 ul/seg Trayectoria directa
32	Protocolo	1: Ciclo de 2 temperaturas;	

FIG. 6B-1

33	Dispensar	A tubo	60 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
34	Aspirar	De tampón de elución	20 ul @ 30 ul/seg	Trayectoria directa
35	Aspirar	De cámara 7	65 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
36	Dispensar	A perlas PCR	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
37	Cambiar	A perlas PCR	6x Asp:65@60 Disp:65@60	Trayectoria directa
38	Aspirar	De perlas PCR	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
39	Dispensar	A cámara 7	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
40	Aspirar aire	De aire	35 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
41	Protocolo	1: Mantener;		
42	Aspirar	En tubo	65 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
43	Presurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa		
44	Desactivar presión			
45	Protocolo	1: Mantener; 2: Ciclo de 3 temperaturas; 3: Ciclo de 2 temperaturas;		
46	Despresurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg Trayectoria de filtro		

FIG. 6B-2

Secuencia de instrucciones			
#	Instrucción	Parámetros	
1	Activar presión	Activar presión a intervalo de 500 ms.	
2	Aspirar	De EtOH	700 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
3	Dispensar	A lisis	700 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
4	Cambiar	A lisis	4x Asp:700@60 Disp:700@60 Trayectoria directa
5	Empezar repetir	2 vez(veces)	
6	Aspirar	De lisis	675 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
7	Dispensar	A residuo	675 ul @ 10 ul/seg Trayectoria de filtro
8	Terminar repetir		
9	Aspirar	De tampón de lavado	350 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
10	Empezar repetir	3 vez(veces)	
11	Dispensar	A residuo	100 ul @ 10 ul/seg Trayectoria de filtro
12	Esperar	5,0 segundo(s)	
13	Terminar repetir		
14	Dispensar	A residuo	50 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
15	Aspirar aire	De aire	200 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
16	Dispensar aire	A residuo	200 ul @ 60 ul/seg Trayectoria de filtro
17	Aspirar	De tampón de elución	250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
18	Dispensar	A residuo	250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
19	Aspirar	De tampón de elución	120 ul@40 ul/seg Trayectoria directa
20	Dispensar	A tampón de elución	10 ul @ 10 ul/seg Trayectoria directa
21	Dispensar	A residuo	30 ul @ 5 ul/seg Trayectoria de filtro
22	Dispensar	A perlas RT	60 ul @ 20 ul/seg Trayectoria de filtro
23	Dispensar	A residuo	20 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
24	Esperar	5,0 segundo(s)	
25	Cambiar	A perlas RT	3x Asp:45@10 Disp:45@10 Trayectoria directa
26	Aspirar	De perlas RT	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
27	Dispensar	A cámara 7	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
28	Aspirar	En tubo	65 ul@ 15 ul/seg Trayectoria directa
29	Protocolo	1: Ciclo de 3 temperaturas;	
30	Dispensar	A tubo	60 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
31	Aspirar	En tubo	60 ul@ 15 ul/seg Trayectoria directa
32	Protocolo	1: Ciclo de 2 temperaturas;	

FIG. 6C-1

33	Dispensar	A tubo	60 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
34	Aspirar	De tampón de elución	20 ul @ 30 ul/seg	Trayectoria directa
35	Aspirar	De cámara 7	65 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
36	Dispensar	A perlas PCR	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
37	Cambiar	A perlas PCR	6x Asp:65@60 Disp:65@60	Trayectoria directa
38	Aspirar	De perlas PCR	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
39	Dispensar	A cámara 7	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
40	Aspirar aire	De aire	35 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
41	Protocolo	1: Ciclo de 2 temperaturas;		
42	Aspirar	En tubo	65 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
43	Presurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa		
44	Desactivar presión			
45	Protocolo	1: Mantener; 2: Ciclo de 3 temperaturas; 3: Ciclo de 2 temperaturas		
46	Despresurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg Trayectoria de filtro		

FIG. 6C-2

Secuencia de instrucciones			
#	Instrucción	Parámetros	
1	Activar presión	Activar presión a intervalo de 500 ms.	
2	Aspirar	De EtOH	700 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
3	Dispensar	A lisis	700 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
4	Cambiar	A lisis	4x Asp:700@60 Disp:700@60 Trayectoria directa
5	Empezar repetir	2 vez(veces)	
6	Aspirar	De lisis	675 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
7	Dispensar	A residuo	675 ul @ 10 ul/seg Trayectoria de filtro
8	Terminar repetir		
9	Aspirar	De tampón de lavado	350 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
10	Empezar repetir	3 vez(veces)	
11	Dispensar	A residuo	100 ul @ 10 ul/seg Trayectoria de filtro
12	Esperar	5,0 segundo(s)	
13	Terminar repetir		
14	Dispensar	A residuo	50 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
15	Aspirar aire	De aire	200 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
16	Dispensar aire	A residuo	200 ul @ 60 ul/seg Trayectoria de filtro
17	Aspirar	De tampón de elución	250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
18	Dispensar	A residuo	250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
19	Aspirar	De tampón de elución	120 ul @40 ul/seg Trayectoria directa
20	Dispensar	A tampón de elución	10 ul @ 10 ul/seg Trayectoria directa
21	Dispensar	A residuo	30 ul @ 5 ul/seg Trayectoria de filtro
22	Dispensar	A perlas RT	60 ul @ 20 ul/seg Trayectoria de filtro
23	Dispensar	A residuo	20 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
24	Esperar	5,0 segundo(s)	
25	Cambiar	A perlas RT	3x Asp:45@10 Disp:45@10 Trayectoria directa
26	Aspirar	De perlas RT	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
27	Dispensar	A cámara 7	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
28	Aspirar	En tubo	65 ul @ 15 ul/seg Trayectoria directa
29	Protocolo	1: Ciclo de 3 temperaturas;	
30	Dispensar	A tubo	60 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
31	Aspirar	En tubo	60 ul @ 15 ul/seg Trayectoria directa
32	Protocolo	1: Ciclo de 2 temperaturas;	

FIG. 6D-1

33	Dispensar	A tubo	60 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
34	Aspirar	De tampón de elución	20 ul @ 30 ul/seg	Trayectoria directa
35	Aspirar	De cámara 7	65 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
36	Dispensar	A perlas PCR	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
37	Cambiar	A perlas PCR	6x Asp:65@60 Disp:65@60	Trayectoria directa
38	Aspirar aire	De aire	600 ul @ 100 ul/seg	Trayectoria directa
39	Dispensar aire	A tubo	600 ul @ 100 ul/seg	Trayectoria directa
40	Aspirar	De perlas PCR	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
41	Dispensar	A cámara 7	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
42	Aspirar aire	De aire	35 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
43	Aspirar	En tubo	65 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
44	Presurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa	
45	Desactivar presión			
46	Protocolo	1: Mantener; 2: Ciclo de 3 temperaturas; 3: Ciclo de 2 temperaturas;		
47	Despresurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria de filtro	

FIG. 6D-2

Secuencia de instrucciones			
#	Instrucción	Parámetros	
1	Activar presión	Activar presión a intervalo de 500 ms.	
2	Aspirar	De EtOH	700 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
3	Dispensar	A lisis	700 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
4	Cambiar	A lisis 4x Asp:700@60 Disp:700@60	Trayectoria directa
5	Empezar repetir	2 vez(veces)	
6	Aspirar	De lisis	675 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
7	Dispensar	A residuo	675 ul @ 10 ul/seg Trayectoria de filtro
8	Terminar repetir		
9	Aspirar	De tampón de lavado	350 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
10	Empezar repetir	3 vez(veces)	
11	Dispensar	A residuo	100 ul @ 10 ul/seg Trayectoria de filtro
12	Esperar	5,0 segundo(s)	
13	Terminar repetir		
14	Dispensar	A residuo	50 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
15	Aspirar aire	De aire	200 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
16	Dispensar aire	A residuo	200 ul @ 60 ul/seg Trayectoria de filtro
17	Aspirar	De tampón de elución	250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
18	Dispensar	A residuo	250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
19	Aspirar	De tampón de elución	120 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
20	Dispensar	A tampón de elución	10 ul @ 10 ul/seg Trayectoria directa
21	Dispensar	A residuo	30 ul @ 5 ul/seg Trayectoria de filtro
22	Dispensar	A perlas RT	60 ul @ 20 ul/seg Trayectoria de filtro
23	Dispensar	A residuo	20 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
24	Esperar	5,0 segundo(s)	
25	Cambiar	A perlas RT 3x Asp:45@10 Disp:45@10	Trayectoria directa
26	Aspirar	De perlas RT	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
27	Dispensar	A cámara 7	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
28	Aspirar	En tubo	65 ul @ 15 ul/seg Trayectoria directa
29	Protocolo	1: Ciclo de 3 temperaturas;	
30	Dispensar	A tubo	60 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
31	Aspirar	En tubo	60 ul @ 15 ul/seg Trayectoria directa
32	Protocolo	1: Ciclo de 2 temperaturas;	

FIG. 6E-1

33	Dispensar	A tubo	60 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
34	Aspirar	De tampón de elución	20 ul @ 30 ul/seg	Trayectoria directa
35	Aspirar	De cámara 7	65 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
36	Dispensar	A perlas PCR	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
37	Cambiar	A perlas PCR	6x Asp:65@60 Disp:65@60	Trayectoria directa
38	Aspirar	De perlas PCR	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
39	Dispensar	A cámara 7	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
40	Dispensar aire	De aire	35 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
41	Protocolo	1: Ciclo de 2 temperaturas;		
42	Aspirar	En tubo	65 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
43	Presurizar tubo	35 ul @40 ul/seg	Trayectoria directa	
44	Desactivar presión			
45	Protocolo	1: Mantener; 2: Ciclo de 3 temperaturas; 3: Ciclo de 2 temperaturas;		
46	Despresurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria de filtro	

FIG. 6E-2

Secuencia de instrucciones			
#	Instrucción	Parámetros	
1	Activar presión	Activar presión a intervalo de 500 ms.	
2	Aspirar	De EtOH	700 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
3	Dispensar	A lisis	700 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
4	Cambiar	A lisis	4x Asp:700@60 Disp:700@60 Trayectoria directa
5	Empezar repetir	2 vez(veces)	
6	Aspirar	De lisis	675 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
7	Dispensar	A residuo	675 ul @ 10 ul/seg Trayectoria de filtro
8	Terminar repetir		
9	Aspirar	De tampón de lavado	350 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
10	Empezar repetir	3 vez(veces)	
11	Dispensar	A residuo	100 ul @ 10 ul/seg Trayectoria de filtro
12	Esperar	5,0 segundo(s)	
13	Terminar repetir		
14	Dispensar	A residuo	50 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
15	Aspirar aire	De aire	200 ul @ 60 ul/seg Trayectoria directa
16	Dispensar aire	A residuo	200 ul @ 60 ul/seg Trayectoria de filtro
17	Aspirar	De tampón de elución	250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
18	Dispensar	A residuo	250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
19	Aspirar	De tampón de elución	120 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
20	Dispensar	A tampón de elución	10 ul @ 10 ul/seg Trayectoria directa
21	Dispensar	A residuo	30 ul @ 5 ul/seg Trayectoria de filtro
22	Dispensar	A perlas RT	60 ul @ 20 ul/seg Trayectoria de filtro
23	Dispensar	A residuo	20 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
24	Esperar	5,0 segundo(s)	
25	Cambiar	A perlas RT	3x Asp:45@10 Disp:45@10 Trayectoria directa
26	Aspirar	De perlas RT	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
27	Dispensar	A cámara 7	65 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
28	Aspirar	En tubo	65 ul @ 15 ul/seg Trayectoria directa
29	Protocolo	1: Ciclo de 3 temperaturas;	
30	Dispensar	A tubo	60 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
31	Aspirar	En tubo	60 ul @ 15 ul/seg Trayectoria directa
32	Protocolo	1: Ciclo de 2 temperaturas;	

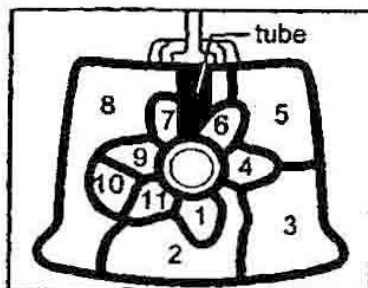
FIG. 6F-1

33	Dispensar	A tubo	60 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
34	Protocolo	1: Ciclo de 2 temperaturas;		
35	Aspirar	De tampón de elución	20 ul @ 30 ul/seg	Trayectoria directa
36	Aspirar	De cámara 7	65 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
37	Dispensar	A perlas PCR	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
38	Aspirar	A perlas PCR	6x Asp:65@60 Disp:65@60	Trayectoria directa
39	Aspirar	De perlas PCR	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
40	Dispensar	A cámara 7	85 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
41	Aspirar aire	De aire	35 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria directa
42	Aspirar	En tubo	65 ul @ 20 ul/seg	Trayectoria directa
43	Presurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa		
44	Desactivar presión			
45	Protocolo	1: Mantener; 2: Ciclo de 3 temperaturas; 3: Ciclo de 2 temperaturas;		
46	Despresurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg Trayectoria de filtro		

FIG. 6F-2

Secuencia de instrucciones			
#	Instrucción	Parámetros	
1	Activar presión	Activar presión a intervalo de 100 ms.	
2	Aspirar	De tampón de elución	250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
3	Dispensar	A residuo	250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
4	Aspirar	De ARN	20 ul @ 10 ul/seg Trayectoria directa
5	Dispensar	A ARN	2 ul @ 10 ul/seg Trayectoria directa
6	Dispensar	A Mezcla maestra RT	18 ul @ 10 ul/seg Trayectoria directa
7	Cambiar	A Mezcla maestra RT 3x Asp:45@10 Disp:45@10 Trayectoria directa	
8	Aspirar	En tubo	60 ul @ 15 ul/seg Trayectoria directa
9	Protocolo	1: Ciclo de 3 temperaturas;	
10	Dispensar	A tubo	60 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
11	Aspirar	En tubo	60 ul @ 15 ul/seg Trayectoria directa
12	Protocolo	1: Ciclo de 2 temperaturas;	
13	Dispensar	A tubo	60 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
14	Aspirar	De Mezcla maestra RT	60 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
15	Dispensar	A Mezcla Maestra PCR	60 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
16	Cambiar	A Mezcla Maestra PCR 6x Asp:65@60 Disp:65@60 Trayectoria directa	
17	Aspirar	De Mezcla maestra PCR...	80 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
18	Dispensar	A Mezcla maestra RT	80 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
19	Aspirar aire	De cámara 4	35 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
20	Aspirar	En tubo	60 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
21	Presurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg	No mover
22	Desactivar presión		
23	Protocolo	1: Control sonda; 2: Mantener; 3: Ciclo de 3 temperaturas; 4: Ciclo de 2 temperaturas;	
24	Despresurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg	Trayectoria de filtro

Cartucho
Prefiltro-Filtro 25 Alta presión v. 1

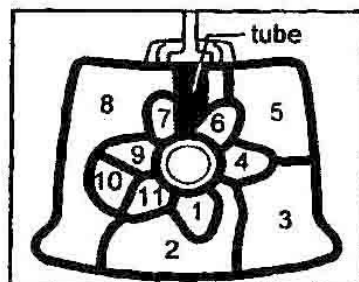


Cámaras			
#	Nombre	Nombre	Vol. actual (ul)
1		0	0
2		0	0
3		0	0
4		0	0
5	Tampón de elución	400	0
6	ARN	25	0
7	Mezcla maestra RT	42	0
8	Residuo	0	0
9	Mezcla Maestra PCR	20	0
10		0	0
11		0	0

FIG. 6G

Secuencia de instrucciones		
#	Instrucción	Parámetros
1	Activar presión	Activar presión a intervalo de 100 ms.
2	Aspirar	De tampón de elución 250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
3	Dispensar	A residuo 250 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
4	Aspirar	De ARN 20 ul @ 10 ul/seg Trayectoria directa
5	Dispensar	A ARN 2 ul @ 10 ul/seg Trayectoria directa
6	Dispensar	A Mezcla maestra RT 18 ul @ 10 ul/seg Trayectoria directa
7	Cambiar	A Mezcla maestra RT 3x Asp:45@10 Disp:45@10 Trayectoria directa
8	Aspirar	En tubo 60 ul @ 15 ul/seg Trayectoria directa
9	Protocolo	1: Ciclo de 3 temperaturas;
10	Dispensar	A tubo 60 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
11	Aspirar	En tubo 60 ul @ 15 ul/seg Trayectoria directa
12	Protocolo	1: Ciclo de 2 temperaturas;
13	Dispensar	A tubo 60 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
14	Protocolo	1: Ciclo de 2 temperaturas;
15	Aspirar	De Mezcla maestra RT 60 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
16	Dispensar	A Mezcla Maestra PCR 60 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
17	Cambiar	A Mezcla Maestra PCR 6x Asp:65@60 Disp:65@60 Trayectoria directa
18	Aspirar	De Mezcla Maestra PCR 80 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
19	Dispensar	A Mezcla maestra RT 80 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
20	Aspirar aire	De cámara 4 35 ul @ 40 ul/seg Trayectoria directa
21	Aspirar	En tubo 60 ul @ 20 ul/seg Trayectoria directa
22	Presurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg No mover
23	Desactivar presión	
24	Protocolo	1: Control sonda; 2: Mantener; 3: Ciclo de 3 temperaturas; 4: Ciclo de 2 temperaturas;
25	Despresurizar tubo	35 ul @ 40 ul/seg Trayectoria de filtro

Cartucho
Prefiltro-Filtro 25 Alta presión v. 1



Cámaras			
#	Nombre	Nombre	Vol. actual (ul)
1		0	0
2		0	0
3		0	0
4		0	0
5	Tampón de elución	400	0
6	ARN	25	0
7	Mezcla maestra RT	42	0
8	Residuo	0	0
9	Mezcla Maestra PCR	20	0
10		0	0
11		0	0

FIG. 6H