



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 238**

51 Int. Cl.:
B03C 1/28 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00953054 .4**
96 Fecha de presentación : **14.07.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1202808**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.05.2002**

54 Título: **Método para mezclar partículas magnéticas con un fluido.**

30 Prioridad: **19.07.1999 EP 99202354**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73 Titular/es: **bioMérieux B.V.**
Boseind 15, P.O. Box 84
5280 AB Boxtel, NL

72 Inventor/es:
Kreuwel, Hermanus, Johannes, Maria y
Verwimp, Emiel, Gerebern, Maria

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 315 238 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para mezclar partículas magnéticas con un fluido.

5 La presente invención se refiere al uso de partículas magnéticas o magnetizables y, en particular, a métodos para mezclar partículas magnéticas o (super)paramagnéticas eficientemente con un fluido y a la separación de las partículas magnéticas de un fluido, seguida en forma opcional por la resuspensión de las partículas en otro fluido.

10 Se utilizan a menudo partículas magnéticas en procesos de separación. Existen muchos métodos de ensayos biológicos y métodos de purificación en los cuales se emplean partículas magnéticas. Por ejemplo, métodos de inmunoensayo, ensayos de hibridación de ácidos nucleicos y similares. También pueden usarse partículas magnéticas en métodos de purificación, para aislar componentes particulares, proteínas, ácidos nucleicos, del material en el que estaban contenidos. Las partículas pueden utilizarse para separar ciertos componentes de una mezcla, por ejemplo, porque están recubiertas con un reactivo con afinidad específica por el componente. Las partículas magnéticas pueden arrastrarse, por ejemplo, hasta la pared de un recipiente en el que estaba contenido el fluido con las partículas magnéticas y el fluido puede quitarse y, opcionalmente, reemplazarse por otro fluido. De este modo, las partículas pueden mezclarse con el fluido del cual se extraerá el componente específico, el componente se unirá a la partícula magnética y puede utilizarse un imán para separar las partículas con el componente del resto de la mezcla en el fluido. Opcionalmente las partículas magnéticas pueden lavarse y pueden separarse en otro fluido. O el componente puede quitarse de las partículas otra vez pasando a otro fluido.

Es bien conocido el uso de partículas magnéticas para purificar un ácido nucleico (AN) buscado a partir de una muestra biológica.

25 Se han descrito, por ejemplo, métodos de purificación para ácidos nucleicos utilizando partículas magnéticas en el documento EP757106 (Toyobo) y WO 96/41811 (Boehringer Mannheim). En estas solicitudes, se describen métodos en los que una solución muestra que contiene un ácido nucleico se trata con una sustancia caotrópica para liberar el ácido nucleico. Después de liberar el AN de la entidad biológica en el tampón de lisis, el AN se une a las partículas magnéticas. Se utilizan con este fin tanto partículas recubiertas con una sonda específica del blanco como así también partículas que poseen un recubrimiento de óxido metálico (por ejemplo sílice), dando una unión genérica a todo AN contenido en la muestra. Después de unirse al blanco, se eliminan los componentes que actúan como interferencias, tales como restos celulares, enzimas, proteínas, anti-coagulantes y sales, lavando las partículas magnéticas en un (conjunto de) tampón (tampones) de lavado. Finalmente, el AN purificado se libera de las partículas mezclando las partículas en un pequeño volumen de tampón de elución. Este proceso se denomina elución ya que es el ácido nucleico que se eluye de las partículas.

El documento WO 96/26011 describe un método para dispersar/mezclar partículas.

40 Para un lavado y una elución eficientes es necesario que las partículas magnéticas estén bien dispersas y mezcladas en los tampones adecuados. En general, este proceso de lavado y elución puede verse dificultado por la agregación o coagulación de las partículas magnéticas causadas ya sea por la adsorción sobre las partículas magnéticas de componentes específicos de la muestra lisada (por ejemplo ADN genómico) o por campos magnéticos dipolares residuales inducidos en las partículas. En particular, el uso de partículas (magnéticas) recubiertas con sílice con muestras que contienen cantidades significativas de ADN genómico (sangre completa, esputo, tejido), produce una pella compacta que es difícil de procesar.

Métodos bien conocidos para la mezcla de perlas (magnéticas) en un tampón fluido son la agitación con vórtice, la sonicación o el pipeteado. Sin embargo, estos métodos son difíciles de automatizar y/o conllevan el riesgo de contaminación de muestra a muestra por generación de aerosoles o pueden degradar el AN buscado. Además, estos métodos no se adaptan bien a volúmenes de fluido muy pequeños (típicamente, 0,01 ml) como pueden requerirse para el proceso de elución.

55 El método de acuerdo con la invención es especialmente apto para utilizar con procedimientos de aislamiento, donde, por lo general, un ingrediente ha de ser aislado en forma bastante pura a partir de un volumen relativamente grande de muestra líquida, y concentrado a un volumen más pequeño de otro fluido para resultar adecuado para su uso posterior.

60 En el caso de un método para el aislamiento de un ácido nucleico, dicho uso posterior puede ser un método de amplificación de un ácido nucleico o un ensayo para la detección de un ácido nucleico, o ambos.

En el documento WO 91/09308 (Diatec Instruments), se describe un método y aparato para separar y resuspender partículas superparamagnéticas.

65 En esta solicitud se reveló que pueden agregarse partículas superparamagnéticas y resuspenderse por posterior aplicación de diferentes campos magnéticos. La primera y segunda aplicaciones del campo magnético podían ser provistas con el mismo imán, que después se hizo rotar alrededor del recipiente que contenía las partículas a una ubicación diferente. También podían utilizarse, sin embargo, dos electroimanes espaciados opuestos. Estos electroimanes

ES 2 315 238 T3

se activaban alternadamente para producir el primer y segundo campos magnéticos que mantienen las partículas en suspensión y las mezclan con el fluido en el que estaban contenidas.

5 En el documento US 3985649 se describe un método para la separación de partículas magnéticas de un fluido. Las partículas pueden separarse de un fluido aproximando las partículas íntimamente con un imán y pueden moverse a través del fluido a lo largo de la pared de un recipiente. Inclusive pueden sacarse del fluido de esta manera y pueden transportarse a un segundo recipiente.

10 En el documento US 4988618 se describe un dispositivo para utilizar con ensayos en los que se prueban múltiples muestras de pequeño volumen al mismo tiempo. Este tipo de ensayos se puede realizar, por ejemplo, en placas de microtitulación. Micropartículas magnéticas están presentes en cada pocillo de la placa de microtitulación. De este modo, el dispositivo posee múltiples orificios y los orificios están rodeados, cada uno, por múltiples imanes permanentes, preferentemente cuatro. La estructura resultante de imanes y orificios es rígida; se procura que los imanes no se muevan y están montados en relaciones fijas mutuas y con respecto a la base del dispositivo. Todos los imanes están alineados y la orientación del campo de los imanes puede ser tal que todos los imanes tengan la misma dirección de campo o que imanes vecinos tengan direcciones de campo opuestas. La orientación de los imanes da lugar de este modo a cuatro sitios de atracción de punto por orificio. Los imanes se utilizan puramente con fines separativos. Se describe en la patente que el dispositivo puede comprender además un medio para agitar los reactivos dentro de los recipientes.

20 La presente invención se refiere a un método que permite una mezcla eficiente de partículas magnéticas o magnetizables presentes en un fluido y, opcionalmente, la separación de dichas partículas de dicho fluido. Se hace uso de un campo magnético de direcciones opuestas y cambiantes. Se ha encontrado que cuando partículas magnéticas o magnetizables presentes en un fluido se someten a estos campos magnéticos, estas partículas están expuestas a la influencia del campo y en contacto eficiente con el fluido. Tales partículas normalmente tienen la tendencia a formar un coágulo, que puede evitar la mezcla eficiente con un fluido. Se ha hallado que sometiendo el recipiente en el que se encuentran el fluido y las partículas a campos magnéticos de direcciones diferentes y cambiantes, las partículas se separan de manera eficiente entre sí y se arrastran a través del fluido en forma tal que tiene lugar un proceso de mezcla muy eficiente. El método permite la mezcla eficiente de partículas aun con volúmenes muy reducidos de fluido. Por consiguiente, el método de la invención tiene la ventaja de que puede ahorrar, por ejemplo, fluidos de lavado y puede permitir la reducción del volumen o de los fluidos necesarios. Por consiguiente, por ejemplo en procesos de aislamiento, el método de la invención permite la purificación de reactivos presentes en concentraciones elevadas. Además, mientras que los métodos de la técnica anterior pueden ser laboriosos e insumir mucho tiempo, el método es rápido y fácil de ejecutar.

35 De este modo, la invención proporciona un método de mezcla según la reivindicación 1.

En este contexto, el término “mezcla” significa que las partículas y el fluido están en íntimo contacto. Así, mezcla significa “contacto” de una manera muy eficiente, tal como cuando las partículas deben lavarse o hacerse reaccionar con componentes presentes en el fluido. Mezcla, en este contexto, no necesariamente proporciona una mezcla homogénea después que ha finalizado el proceso. Cuando los imanes se retiran, las partículas pueden separarse hacia el fondo del recipiente en el que se encuentran o pueden mantenerse sobre la pared del recipiente en una ubicación particular mediante la acción de los imanes. El proceso de mezcla puede, por ejemplo, ser utilizado para lavar las partículas o para hacerlas reaccionar con un componente del fluido, o para unir un componente del fluido a un reactivo recubierto sobre las partículas. De la misma forma, el proceso de mezcla puede dar como resultado la elución de cierto componente presente originalmente en las partículas al fluido circundante. El método de la invención se aplica a cada uno de estos procesos y proporciona una forma eficiente, rápida y conveniente de poner en contacto partículas magnéticas o susceptibles de ser magnetizadas con un volumen de cierto fluido.

50 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método general para mezclar partículas magnéticas con un fluido de manera casi independiente de su nivel de granulación/agregación. El método permite además liberar reactivos unidos a las partículas, por ejemplo un ácido nucleico, y concentrarlos en pequeños volúmenes. El método es sencillo de automatizar y muy adecuado para lograr formatos de elevado rendimiento. Reduce al mínimo el riesgo de contaminación por gotículas o aerosoles.

55 Durante un ciclo de lavado (o elución) las partículas (agregadas) son arrastradas en el fluido de izquierda a derecha colocando un primer imán próximo a la pared externa derecha del recipiente y posteriormente quitando el primer imán y colocando, al mismo tiempo, un segundo imán cerca de la pared (izquierda) opuesta del recipiente a fin de arrastrar las partículas hacia la dirección contraria.

60 El dispositivo comprende medios para sostener los envases y más de un imán y los medios para mover a dichos imanes respecto de la posición de dichos recipientes y/o medios para mover a dichos envases con respecto a la posición de dicho imanes de forma tal que los envases estén sometidos a campos magnéticos con direcciones diferentes y cambiantes.

65 Preferentemente, los imanes se mueven respecto de los envases.

Los envases pueden tener cualquier forma conveniente. Se puede utilizar cualquier recipiente adecuado para contener una muestra de fluido en la cual hay partículas magnéticas dispersas. De preferencia, los recipientes son adecuados

ES 2 315 238 T3

para contener pequeñas muestras de fluido. Por ejemplo, pueden ser tubos Eppendorf, recipientes para PCR o tiras para placas de microtitulación).

5 Los imanes pueden colocarse en diferentes configuraciones respecto de los envases. Se puede utilizar cualquier configuración que permita el movimiento de los imanes respecto de la posición de los envases o viceversa y que dé como resultado campos magnéticos de polaridades diferentes y cambiantes dentro del alcance de las reivindicaciones.

10 Se encontró que este proceso de lavado (o elución) se hace particularmente eficiente con los dos imanes ordenados de forma tal que ambos se repelan fuertemente entre sí (al enfrentarse uno al otro con polos similares N-N o S-S). Debido a este ordenamiento, las líneas de los campos magnéticos en el área de los recipientes en la que se encuentran las cuentas magnéticas muestran un cambio fuerte y repentino en la dirección durante cada ciclo. Cuando el envase se coloca entre dos imanes que se repelen fuertemente entre sí debido a que sus polaridades similares están enfrentadas (N-N o S-S), el más leve movimiento de cualquiera de los dos imanes o de los envases entre sí dará como resultado cambios repentinos fuertes del campo magnético al cual están sometidas las partículas presentes en el envase. Se ha encontrado que esto da como resultado una forma muy eficiente de mezclar las partículas con el fluido, aun cuando las partículas, como tales, tienden a formar un coágulo o ya lo hayan formado dentro del fluido.

Los imanes se configuran, preferentemente, de tal forma que cada imán repele a cada uno de los imanes vecinos.

20 Los imanes pueden alinearse de tal forma que imanes de polaridades distintas pueden moverse una y otra vez a lo largo de caminos rectos paralelos sobre lados opuestos de cada envase de tal manera que la dirección del campo magnético en cada envase se invierte repetidamente.

25 Esto se puede lograr de manera ventajosa colocando los imanes en línea de tal forma que los imanes que están alineados tengan sus polos orientados en la misma dirección y que todos los imanes ubicados en líneas vecinas, es decir sobre el otro lado de los envases próximos a la primera línea de imanes, tengan sus polos orientados en la dirección inversa respecto de los polos de los imanes ubicados en la primera línea.

30 Cuando se mueven los imanes, esto puede dar como resultado que los envases se coloquen de manera repetida entre dos imanes enfrentados entre sí con el mismo polo.

Los imanes y los envases se pueden colocar en filas paralelas y las filas de imanes se pueden mover en direcciones opuestas a lo largo de las líneas de envases.

35 Pero, por supuesto, sobre la base del concepto esencial del método de la invención, también se pueden diseñar otras configuraciones.

40 En el dispositivo, los imanes son móviles respecto de los envases tal como se ilustra en la Figura 1. Las partículas magnéticas están en un tampón fluido contenidas en un recipiente. Las partículas (agregadas) son arrastradas a través del fluido de derecha a izquierda y viceversa mediante el traslado de un conjunto de al menos dos imanes dispuestos de tal forma que el campo magnético inducido en el recipiente cambia la polaridad con cada movimiento de los imanes.

45 El método se puede utilizar con más recipientes e imanes. Por lo tanto, el método y el dispositivo según la invención permiten realizar un proceso discontinuo de varios recipientes al mismo tiempo. El método y el dispositivo según la invención son especialmente adecuados para tratar un gran volumen de fluido en cada uno de sus respectivos recipientes al mismo tiempo.

50 En el dispositivo, los recipientes y los imanes se disponen siguiendo configuraciones interpuestas. Esta distribución permite usar el método de la invención para obtener un formato de alto rendimiento.

55 En la Figura 2 se ilustra una realización en la cual los recipientes y los imanes se colocan en configuraciones geométricas interpuestas. Los recipientes (por ejemplo tubos Eppendorf, recipientes para PCR o tiras para placas de microtitulación) se colocan en una configuración geométrica con los imanes fijos a una segunda configuración que se mueve en relación a los recipientes.

De esta forma, se procesa simultáneamente una gran serie de muestras. La adición o la aspiración de fluidos se pueden efectuar en forma manual o mediante un dispensador con múltiples puntas según se conoce en la técnica.

60 El método de la invención también se puede usar con un sistema cerrado. Es decir, un sistema en el cual el fluido, por ejemplo, no está contenido en un recipiente, sino en un tubo. Por lo tanto, con recipientes como los utilizados con el método de la invención, no sólo se hace mención a recipientes usados en procesos discontinuos sino también a recipientes utilizados en sistemas cerrados, tales como tubos y similares. En la Figura 3 se ilustra tal realización alternativa de un dispositivo según la invención. Las partículas y el fluido no están contenidos en un recipiente sino en un tubo, lo que permite procesar las partículas en un sistema cerrado.

65 Dependiendo del uso exacto buscado de un dispositivo de la presente invención, son posibles varias modificaciones y variaciones del tema descrito más arriba. Por ejemplo, la forma del recipiente se puede modificar y también se pueden realizar más cambios relacionados con la ubicación de los imanes respecto de dichos recipientes.

ES 2 315 238 T3

Un método de mezcla según la presente invención es especialmente adecuado para utilizar en la purificación de, por ejemplo, un ácido nucleico proveniente de material biológico de partida.

5 Para un propósito específico, el dispositivo se puede modificar aún más para que cumpla con los requisitos del uso deseado.

Los ajustes pueden dar como resultado mejores formas para separar las partículas del fluido. El dispositivo también puede ajustarse de tal forma que pueda utilizarse con muestras de distintos volúmenes de fluido.

10 En una realización preferida según la invención, los imanes pueden no solamente moverse respecto de la posición de los recipientes sino que además pueden moverse a lo largo de las paredes de los recipientes (que serían verticales cuando los recipientes están en posición vertical).

15 De esta forma, la posición de los imanes se puede ajustar según el volumen de fluido de los recipientes. Por lo tanto, cuando sólo hay un volumen muy pequeño de fluido para mezclarse con las partículas, el imán estará en una posición que es inferior a la que tendrá cuando haya un volumen de fluido mayor en el mismo recipiente.

20 El hecho de que los imanes se puedan mover en dirección vertical tiene la ventaja adicional de que ahora los imanes se pueden utilizar para arrastrar las partículas hacia la parte inferior del recipiente aun cuando se utiliza un volumen mayor de fluido. Por lo tanto, esto permite retirar una gran parte del volumen de fluido, por ejemplo, mediante una pipeta, mientras que el imán retiene las partículas en el fondo.

25 Opcionalmente, cuando los imanes se pueden mover en dirección vertical a lo largo de las paredes de los recipientes, también se pueden usar para extraer las partículas a lo largo de las paredes del recipiente hasta una posición por encima de la superficie del fluido. De esa forma, las partículas se pueden separar del fluido y el fluido remanente se puede retirar del recipiente o, por ejemplo, se puede reemplazar por otro fluido, después de lo cual las partículas se pueden arrastrar por debajo del nivel de fluido y mezclar con el fluido nuevo usando los imanes.

30 Es evidente que el diseño del dispositivo permite muchas variaciones en los métodos de uso dentro del alcance de la invención.

En la Figura 4 se ilustra el movimiento de los imanes en dirección vertical.

35 Para permitir el uso del dispositivo con un procedimiento que involucra el tratamiento posterior de las partículas con varios fluidos en diferentes volúmenes y lograr mezcla y separación eficientes de las partículas con/de los respectivos fluidos, también se pueden hacer ajustes a los recipientes.

40 Si se utiliza un recipiente grande con volumen muy pequeño de fluido, puede surgir el problema de que las partículas ya no puedan ponerse en contacto con el fluido, simplemente porque el volumen de fluido está más o menos esparcido en el fondo del recipiente y ni siquiera cubre las partículas.

45 Por lo tanto, los recipientes se pueden diseñar de forma que puedan utilizarse con diferentes volúmenes de fluido y aun permitan mezcla eficiente de los volúmenes de fluido con las partículas. El uso de tales recipientes es, asimismo, parte de la presente invención.

50 Para permitir el uso de fluidos de volúmenes considerablemente diferentes, se puede utilizar un recipiente que comprenda una parte que sea adecuada para contener pequeñas muestras de fluido, mientras que esta parte está conectada a otra parte que es adecuada para contener muestras de gran volumen. En la Figura 4 se ilustra un ejemplo de tal recipiente.

El recipiente de múltiples usos está representado en la Figura 4 y viene provisto de una punta de pipeta con un diámetro relativamente pequeño adecuado para contener muestras de pequeño volumen, mientras que la parte ubicada por encima de la punta de pipeta es adecuada para contener muestras de mayores volúmenes.

55 Tal como se indica en la Figura 4, este recipiente es adecuado para utilizar el dispositivo con volúmenes pequeños y grandes de fluido y como tal, se puede ajustar la altura de los imanes respecto del recipiente según corresponda.

60 Además, la punta de pipeta permite la recolección de las partículas de una muestra de gran volumen moviendo los imanes en la orientación descendente. La mayor parte del fluido se puede entonces extraer del recipiente sin extraer accidentalmente partículas.

Un método de mezcla de la invención es adecuado especialmente para ser utilizado en un método de aislamiento de ácido nucleico de muestras biológicas.

65 Un método típico de aislamiento de ácido nucleico es el diseñado por R.Boom *et al.*, tal como se describe en EP 389063.

ES 2 315 238 T3

El “Método de Boom” implica el tratamiento del material biológico con una solución tampón de lisis que contiene una sustancia caotrópica tal como guanidina-isotiocianato y una fase sólida silícica. La fase sólida silícica se puede proporcionar en la forma de partículas magnéticas de sílice. El ácido nucleico liberado del material mediante la solución tampón de lisis se va a adherir a las partículas (magnéticas) silícicas. Por lo tanto, las partículas y el material biológico de la solución tampón de lisis deben estar en contacto total entre sí, y es ahí donde entraría a actuar el uso del dispositivo según el método. Las partículas con el ácido nucleico adherido se pueden separar posteriormente del resto de la muestra utilizando un imán (que también puede lograrse con un dispositivo según la invención con la condición de que esté adaptado para ese propósito). Posteriormente, el ácido nucleico que contiene las partículas debe lavarse para lo cual se requiere mezclar las partículas con una solución tampón de lavado. Esta es otra función que el dispositivo puede realizar según la invención. Después las partículas se retiran del fluido de lavado y se ponen en contacto con un tampón de elución (una vez más se requiere el contacto total entre las partículas y el tampón de elución) y en esta forma el ácido nucleico es liberado de las partículas hacia el tampón de elución. En general, los volúmenes de fluido requeridos para el lavado serán alrededor de 10 veces mayores que para la elución. Un volumen típico de lavado (por recipiente por paso de lavado) es de 0,2-0,5 ml. El volumen típico para el tampón de elución es de 0,010-0,050 ml.

La realización del dispositivo en el que los imanes también pueden moverse en dirección vertical y se utilizan recipientes que poseen una punta de pipeta para el uso de volúmenes de fluido más pequeños es especialmente adecuada para utilizar con el denominado “método de Boom” para el aislamiento de ácidos nucleicos, según se describió anteriormente.

Cuando el dispositivo se utilice con un método similar al método de Boom, esto puede efectuarse con el siguiente procedimiento:

Un volumen típico requerido para un paso de lavado sería de 0,2 a 0,5 ml, que es un volumen relativamente grande. Por lo tanto, durante el lavado las partículas magnéticas se encuentran en la parte superior del recipiente (nivel 1, fig. 4, situación 1). Sin embargo, para la mayoría de las aplicaciones el ácido nucleico buscado debe concentrarse en un volumen típico de tampón de 10 a 50 μ l. Volúmenes de fluido tan pequeños son difíciles de manejar. Es difícil controlar el tamaño de un volumen tan pequeño como así también manipularlo en un recipiente en combinación con partículas magnéticas para formar una suspensión para realizar pasos libres de ataduras.

La Fig. 4 muestra un método que supera las dificultades citadas.

Después de completar el procedimiento de lavado, las partículas son capturadas a un costado de la pared del recipiente (nivel 1, situación 1) y el fluido de lavado se aspira con la punta de una pipeta. A continuación, el recipiente se llena con tampón de elución fresco (alrededor de 0,2 ml) y las partículas magnéticas se transportan hacia abajo hasta el extremo inferior del recipiente (nivel 3) bajando los imanes (situación 2). El transporte de las partículas puede acelerarse trasladando la configuración de imanes como se hace durante el lavado mientras se mueve hacia abajo. La composición del tampón ET es tal que no se libera nada de ácido nucleico de la sílice en tanto la temperatura del tampón no sea mayor que la temperatura ambiente.

A continuación, mientras se aspira, la punta se introduce en el recipiente hasta que su extremo inferior esté a un nivel que corresponda al volumen de tampón ET requerido (por ejemplo, 10 μ l, véase la situación 3).

A continuación, un bloque calefactor se pone en contacto con el recipiente para elevar la temperatura del tampón a 55-60°C (situación 4).

A continuación, comienza el verdadero procedimiento de elución trasladando los imanes horizontalmente como durante el procedimiento de lavado, pero esta vez a nivel 3. Preferentemente, durante la elución, el bloque calefactor permanece en contacto con el recipiente para mantener la temperatura del tampón de elución a 55-60°C.

Finalmente, después de completada la elución, el bloque calefactor se aleja de los recipientes (hacia abajo) y los imanes se mueven hasta el nivel 2 (situación 5) para retirar las partículas del tampón de elución que está listo ahora para un posterior procesamiento (amplificación, secuenciamiento). Preferentemente, para permitir que el bloque calefactor se ponga en contacto con el recipiente durante la elución sin perturbar el proceso de elución (situación 4), el bloque calefactor tiene un diseño especial que tiene en cuenta las dimensiones de la configuración magnética además de la forma del recipiente. El bloque calefactor preferentemente se construye con un material no magnético. Por ejemplo, el bloque calefactor se fabrica con aluminio y contiene un elemento calefactor cerámico como se conoce en el estado de la técnica.

De este modo, se ilustra cómo el dispositivo puede utilizarse para automatizar y acelerar los procedimientos existentes, que en la actualidad deben realizarse ya sea en forma manual o en dispositivos automatizados más complicados.

Desde luego que el uso de un dispositivo encontrará aplicación en muchos ensayos biológicos o procesos de purificación.

ES 2 315 238 T3

Breve descripción de las figuras

Figura 1: El concepto básico de un arreglo de acuerdo con la invención

5 Figura 2: Dispositivo en el cual los soportes para los recipientes y los imanes están colocados en geometrías de configuración interpuesta y los imanes están alineados de tal modo que los imanes de polaridades opuestas pueden moverse hacia adelante y atrás en caminos rectos paralelos a lo largo de sitios opuestos de cada recipiente, de modo tal que la dirección del campo magnético en cada recipiente se invierte repetidamente.

10 Figura 3: Dispositivo en el cual los recipientes son parte de un sistema cerrado, por ejemplo un tubo.

Figura 4: Dispositivo en el cual los imanes también pueden moverse en dirección vertical de manera de ubicarse a diferentes alturas con respecto a las paredes de los recipientes y los recipientes son envases de forma tubular provistos de una punta de pipeta para retener pequeños volúmenes de fluidos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 315 238 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Método para mezclar, en uno o más recipientes, partículas magnéticas o (super)paramagnéticas con un fluido, utilizando más de un imán, que comprende:

- colocar los imanes y los soportes para los recipientes en geometrías de configuraciones interpuestas;
- someter los recipientes a campos magnéticos con direcciones diferentes y cambiantes mediante
- 10 - el movimiento de los imanes con respecto a la posición del/de los recipiente(s) y/o el movimiento de los recipientes con respecto a las posiciones de los imanes, así **caracterizado** por
- separar eficientemente las partículas entre sí y
- 15 - atraer las partículas a través del fluido, donde el movimiento es hacia adelante y hacia atrás describiendo caminos paralelos.

20 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, donde los recipientes, por movimiento de los recipientes o movimiento de los imanes en una primera y segunda configuraciones de imanes adyacentes, se someten a campos magnéticos de polaridad opuesta.

25 3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde, como consecuencia de mover ya sea los imanes o los recipientes, las partículas magnéticas o (super)paramagnéticas en el fluido de los respectivos recipientes, se mueven repetidamente entre dos imanes correspondientes que se enfrentan entre sí con el mismo polo, estando dispuestos los correspondientes imanes en configuraciones de imanes adyacentes en lados opuestos de los recipientes, estando uno mantenido en una primera configuración de imanes y el otro mantenido en una segunda configuración de imanes.

30 4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde los imanes de una respectiva configuración de imanes se mueven en forma concertada con respecto a la posición de los recipientes y/o los recipientes de una respectiva configuración de imanes se mueven en forma concertada entre sí con respecto a la posición de los imanes de manera tal que las partículas magnéticas o (super)paramagnéticas se mueven a través del fluido hacia un lado del recipiente acercando un primer imán con su polo magnético a la pared del recipiente y, posteriormente, se mueven hacia

35 el lado opuesto acercando un segundo imán a la pared opuesta del recipiente, por lo cual dicho segundo imán tiene el mismo polo magnético que el primer imán, de tal modo que la dirección del campo magnético en cada recipiente se invierte repetidamente.

40 5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde los imanes se mueven con respecto a los recipientes.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1-5, que comprende los siguientes pasos:

45 (a) poner material de partida con un tampón de lisis apropiado y partículas de sílice magnetizables en al menos un recipiente mantenido como uno de una pluralidad de recipientes en una fila que define una colección de recipientes que mantiene los recipientes en una alineación espaciada;

(b) mezclar el contenido de al menos un recipiente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5;

50 (c) acumular las partículas en una pared del recipiente utilizando los imanes;

(d) retirar la mayor parte del fluido de la muestra del dispositivo;

55 (e) añadir una cantidad suficiente de tampón de lavado al dispositivo;

(f) repetir los pasos (b) a (d);

(g) añadir una cantidad adecuada de tampón de elución al dispositivo;

60 (h) bajar arrastrando las partículas hasta la punta de pipeta del recipiente moviendo los imanes a una posición más baja;

(i) opcionalmente calentar el recipiente moviendo un bloque calefactor hasta la inmediata proximidad de los recipientes;

65 (j) opcionalmente retirar una cantidad apropiada de tampón de elución del dispositivo;

ES 2 315 238 T3

(k) repetir el paso (b);

(l) mover los imanes en dirección vertical a una posición por encima del nivel del fluido; y

5 (m) recolectar el tampón de elución con el recipiente del ácido nucleico aislado en el mismo.

10

15

20

25

30

35

40

45

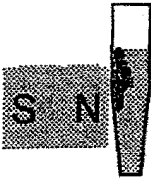
50

55

60

65

Fig.1
Vista lateral



Vista superior

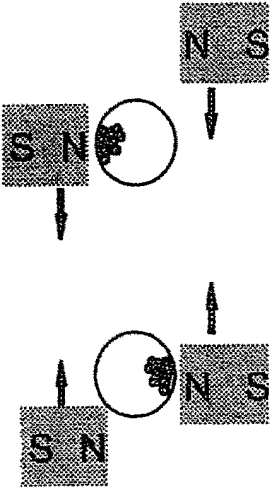


Fig.2

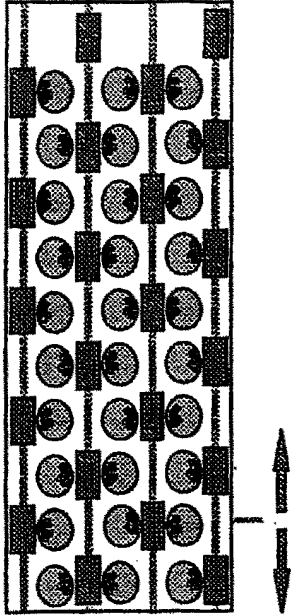


Fig.3

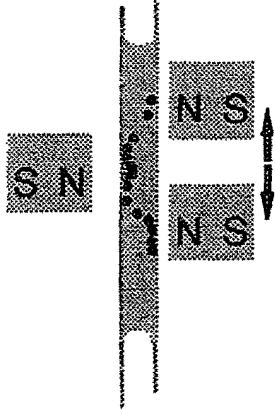


Fig.4

