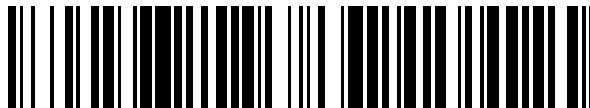


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 633**

51 Int. Cl.:
G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02714795 .8**
96 Fecha de presentación: **28.01.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1354192**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2003**

54 Título: **CARTUCHO DE SEPARACIÓN BIOLÓGICA DE MÚLTIPLES CANALES.**

30 Prioridad:
26.01.2001 US 264605 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.12.2011

73 Titular/es:
Qiagen Sciences, LLC
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874 , US

72 Inventor/es:
AMIRKHANIAN, Varouj;
LIU, Ming-Sun y
MOONEY, Paul

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 370 633 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

Cartucho de separación biológica de múltiples canales.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Referencias cruzadas

10 Se hace referencia a la Patente norteamericana N° 2002113213, titulada "Detección óptica en un sistema de separación biológica de múltiples canales" ("*Optical Detection In A Multi-Channel Bio-Separation System*"), depositada concurrentemente con la presente el 28 de enero de 2002 (Registro de Representante N°: 1031/209), la cual se ha asignado en común con ella a la BioCal Technology, Inc., el mismo asignatario de la presente invención.

2. Campo de la invención

15 La presente invención se refiere a la separación biológica y, más particularmente, a un cartucho portátil para soportar columnas de separación múltiple con óptica de detección integrada y un depósito de reactivo, así como a un sistema de separación biológica que incorpora el cartucho.

3. Descripción de la técnica relacionada

20 El análisis biológico, tal como el análisis de ADN [ácido desoxirribonucleico], está experimentando rápidamente la transición de una búsqueda de precisión puramente científica a un procedimiento rutinario con una fiabilidad acrecentada y demostrada. Los investigadores médicos, farmacéuticos e investigadores forenses se sirven, todos ellos, del análisis de ADN en la consecución de sus cometidos. Y sin embargo, debido a la complejidad del equipo que detecta y mide las muestras de ADN y a la dificultad a la hora de preparar las muestras, los procedimientos de análisis de ADN existentes consumen, a menudo, mucho tiempo y son caros. Es, por tanto, deseable reducir el tamaño, el número de partes y el coste del equipo, facilitar el manejo de las muestras durante el procedimiento y, en general, disponer de un detector simplificado, de bajo coste y alta sensibilidad.

30 Un tipo de instrumento de análisis de ADN separa moléculas de ADN basándose en la electroforesis. Pueden utilizarse técnicas de electroforesis para separar fragmentos de ADN para aplicaciones de genotipificación, incluyendo pruebas de identidad de personas, análisis de la expresión, detección de patógenos, detección de mutaciones y estudios farmacogenéticos. El término "electroforesis" se refiere al movimiento de una molécula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. La electroforesis puede utilizarse para separar moléculas que tienen relaciones de carga a masa equivalentes pero diferentes masas. Los fragmentos de ADN son un ejemplo de tales moléculas.

35 Existe una variedad de instrumentos disponibles en el mercado que aplican la electroforesis para analizar muestras de ADN. Uno de tales tipos es un instrumento de electroforesis de gel en pastilla de múltiples pasajes, el cual, como sugiere su nombre, se sirve de una pastilla de gel sobre la que se colocan las muestras de ADN. Se aplican cargas eléctricas a través de la pastilla de gel, que hacen que la muestra de ADN se separe en fragmentos de ADN de diferentes masas.

40 Otro tipo de instrumento de electroforesis es el instrumento de electroforesis por capilaridad (CE –"capillary electrophoresis"). Aplicando electroforesis en una columna capilar de sílice fundido que porta una solución tampón o amortiguadora, el requisito de tamaño de la muestra es significativamente menor y la velocidad de separación y la resolución pueden incrementarse múltiples veces en comparación con el método de electroforesis de gel en pastilla. Estos fragmentos de ADN se detectan a menudo, en la CE, dirigiendo luz a través de la pared capilar, a los componentes que se separan de la muestra que se ha marcado con un material fluorescente, y detectando las emisiones de fluorescencia inducidas por la luz incidente. Las intensidades de la emisión son representativas de la concentración, de la cantidad y/o del tamaño de los componentes de la muestra. En el pasado, se han venido desarrollando para instrumentos de CE los métodos de detección por fluorescencia inducida por láser (LIF –"laser-induced fluorescence"). La detección por fluorescencia es, a menudo, el método que se elige en los campos de la genómica y la proteómica debido a su sobresaliente sensibilidad en comparación con otros métodos de detección.

55 Algunos de los retos a la hora de diseñar instrumentos basados en CE y protocolos de análisis de CE conciernen a las técnicas de detección de las muestras. En el caso de la detección por fluorescencia, se han venido prestando considerables atenciones al diseño de, por ejemplo, la fuente de radiación, la detección óptica, la sensibilidad y la fiabilidad de la detección, el coste y la fiabilidad de la estructura de la óptica de detección. En el pasado, se requería una fuente de luz de una potencia relativamente alta, tal como un láser. Cuando la luz es dirigida a través de la pared del capilar, a los componentes de la muestra separados que se encuentran en el ánima del capilar, la luz se esparce o dispersa en la interfaz entre la pared capilar exterior / aire y en la interfaz entre la pared capilar interior / solución amortiguadora (dispersión Raman), lo que oscurece o corrompe la intensidad de la emisión de fluorescencia. De forma similar, las emisiones de fluorescencia se dispersan en las interfaces de la pared. En el pasado se desarrollaron diversas técnicas para recoger de forma más completa las emisiones de fluorescencia con el fin de mejorar la intensidad de la señal y, por tanto, la sensibilidad de la detección. Estas técnicas implican componentes móviles y no móviles, o fijos, adicionales que se añaden a la relativa complejidad y coste de la

instalación de detección.

Las limitaciones de diseño de los instrumentos de electroforesis de la técnica anterior se han visto exacerbadas en el desarrollo de instrumentos basados en CE de múltiples capilares. Por ejemplo, la detección por fluorescencia inducida por láser (LIF) de barrido confocal ha sido adoptada en los sistemas de electroforesis de capilares múltiples. La detección confocal de barrido está basada en un sistema óptico de barrido. El uso de partes móviles no es ideal cuando se toma en consideración la simplicidad, la robustez y el bajo coste del instrumento. Asimismo, la baja o escasa profundidad focal del objetivo del microscopio para el detector confocal plantea serias exigencias sobre las tolerancias de los componentes mecánicos y ópticos. Por otra parte, el método de barrido óptico generalmente implica un ciclo de trabajo más largo por cada capilar. De esta forma, en el caso de que se aumente la escala del instrumento con el propósito de generar una productividad del proceso más elevada, la sensibilidad del sistema puede verse comprometida. Asimismo, otro método de detección es la detección de flujo anular o envolvente. La principal desventaja del detector de flujo anular es el sistema de flujo altamente sofisticado que se necesita para garantizar un flujo anular o envolvente fiable con una diafonía óptica mínima entre los canales. Se plantean exigencias extremas sobre las tolerancias de los componentes ópticos y mecánicos si se quieren satisfacer las exigencias de robustez de los usuarios finales. La sensibilidad del dispositivo es muy buena, pero no es obvio que este principio de detección por fluorescencia resulte adecuado para un análisis de ADN de elevada producción y, con todo, de bajo coste.

Cambios adicionales en los instrumentos basados en CE de múltiples capilares estaban relacionados con el soporte de los capilares. La Patente norteamericana N° 5.198.091, de Burolla et al., describe un cartucho de capilares para electroforesis que emplea una gran longitud de conjuntos ordenados de capilares. Esta Patente puede incluir un espacio hueco definido en torno al capilar para la circulación de un fluido refrigerante, pero no incluye ningún depósito como parte integrante del cartucho. La Patente norteamericana N° 5.413.686, de Klein et al., describe un analizador de electroforesis por capilaridad en múltiples canales que incluye una pluralidad de capilares. Se muestran depósitos en el aparato analizador, pero estos consisten en múltiples depósitos y son independientes de los capilares, no integrados en un soporte de capilares. Se muestra también óptica de detección en el aparato, pero esta no está integrada en un soporte de capilares compacto. La Patente norteamericana N° 5.338.427, de Shartle et al., describe un cartucho de separación de un único uso para un instrumento de electroforesis por capilaridad, en el que se han dispuesto tubos capilares horizontalmente en un conjunto ordenado coplanario. El cartucho de separación de un único uso separa reemplaza los grandes depósitos de reactivo por gotas semiesféricas de reactivo.

Por otra parte, el documento US 5.916.428 describe un sistema de electroforesis automatizado. El sistema se sirve de un cartucho de capilares que tiene una pluralidad de tubos capilares. El cartucho tiene un primer conjunto ordenado de extremos capilares que sobresalen de uno de los lados de una placa. El primer conjunto ordenado de extremos capilares están separados entre sí sustancialmente de la misma manera que los pozos de una bandeja de microvaloración de un tamaño estándar. Esto ofrece la posibilidad de llevar a cabo simultáneamente electroforesis por capilaridad en muestras presentes en cada uno de los pozos de la bandeja. El cartucho de capilares tiene dos realizaciones. En una de las realizaciones, los segundos extremos de los tubos capilares están también dispuestos en dicho conjunto ordenado. En la segunda realización, los segundos extremos están en comunicación con una la cavidad interior de una celda de presión en la que pueden introducirse soluciones, geles y similares. La celda de presión permite la aplicación de una alta presión para limpiar y vaciar los tubos capilares. Se describe también un aparato para llevar a cabo una electroforesis de geles por capilaridad automatizada utilizando tales cartuchos.

Asimismo, los sistemas actuales para la química de soluciones amortiguadores en gel no permiten el uso del instrumento de CE que es específico de ciertas aplicaciones. En otras palabras, los actuales instrumentos de CE requieren la coincidencia del capilar (con diferentes revestimientos y tamaños de columna) con el reactivo de solución amortiguadora para diferentes aplicaciones de separación (diferentes tipos, velocidades, resoluciones).

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un sistema de separación biológica que hace uso de un cartucho de múltiples canales eficiente, compacto, simplificado, portátil, intercambiable, reutilizable, de bajo coste, reciclable y fácil de ensamblar, carente de partes móviles, para separación biológica, el cual tiene una óptica integrada previamente alineada y un depósito de reactivo integrado. El cartucho soporta, por ejemplo, múltiples capilares para la separación de CE. El depósito integrado, que contiene un medio de soporte de separación (por ejemplo, una solución amortiguadora en gel), es común a todos los capilares. La química del medio y las características de los capilares (por ejemplo, el tamaño de los capilares, su revestimiento y longitud) se definen para cada cartucho. Pueden intercambiarse fácilmente diferentes cartuchos en el sistema de separación biológica para adecuarse a la separación basada en una muestra particular. El depósito se acopla a una bomba de presión de aire que presuriza el depósito de gel al objeto de purgar y llenar los capilares con solución amortiguadora como medio de soporte de separación. De acuerdo con la presente invención, se integra en el interior del cartucho una óptica que requiere una alineación fina con respecto a las zonas de detección (tal como fibra óptica para dirigir la radiación incidente o las emisiones de radiación).

De acuerdo con la presente invención, el cartucho soporta múltiples capilares para la separación de CE. El cartucho incluye partes de cuerpo ensambladas, fibras de excitación, capilares, electrodos, un depósito de solución amortiguadora / gel, y óptica integrada para la entrada de radiación externa. El depósito está equipado con un único electrodo común a todos los capilares.

En la presente invención, la óptica está integrada en el interior del cartucho. De acuerdo con la presente invención, el sistema de excitación óptica está integrado con el cartucho. El sistema de excitación incluye dirigir la luz de excitación, a través de fibras de excitación, a una zona de detección mediante acoplamiento de LEDs con lentes de microbola. Las fibras de excitación son encaminadas hacia un conjunto de acanaladuras en V adyacentes a cada capilar. En un aspecto adicional de la presente invención, la presente invención proporciona un instrumento de separación biológica que incorpora el cartucho de separación biológica de múltiples canales de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para una comprensión adicional de la naturaleza y ventajas de la invención, así como del modo de uso preferido, deberá hacerse referencia a la siguiente descripción detallada, leída en conjunción con los dibujos que se acompañan. En los dibujos que siguen, los mismos números de referencia designan partes iguales o similares a lo largo de todos los dibujos.

La Figura 1 es una vista esquemática de un sistema de electroforesis por capilaridad que incorpora la presente invención.

La Figura 2 es una vista en perspectiva del sistema / máquina de electroforesis por capilaridad de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 3 es un diagrama del sistema de control.

La Figura 4 es una vista en perspectiva del tramo o sección inferior del cartucho, provisto de fibras de excitación.

La Figura 5 es una vista en perspectiva del tramo o sección media y la sección inferior del cartucho con fibras de excitación, antes de ser unidas.

La Figura 6 es una vista en perspectiva de la sección media y la sección inferior del cartucho con fibras de excitación, después de ser unidas.

La Figura 7 es una vista en perspectiva desde delante de la sección media y la sección inferior de la Figura 6, combinadas, provistas de capilares, antes de ser unidos.

La Figura 8 es una vista en perspectiva desde delante de la sección media y la sección inferior del cartucho, provistas de capilares, después de haberse ensamblado.

La Figura 9 es una vista en perspectiva desde detrás de la sección media y la sección inferior del cartucho, con el depósito de gel.

La Figura 10 es una vista en perspectiva desde delante de la sección media y la sección inferior del cartucho, con el depósito de gel y las cubiertas frontal y trasera.

La Figura 11 es una vista en perspectiva desde delante del cartucho con la óptica de detección insertada.

La Figura 12 es una vista en corte y en perspectiva desde delante del cartucho de la Figura 11, con el sistema óptico de excitación y emisión.

La Figura 13 es una vista en corte y en perspectiva del cartucho, con un esquema del sistema detector.

La Figura 14 es una vista en corte y en perspectiva desde delante del cartucho, con el sistema óptico de excitación y emisión.

La Figura 15 es una vista ampliada del corte A de la Figura 14 y una vista en corte y en perspectiva de la sección A del cartucho mostrado en la Figura 13.

La Figura 16 es una vista en corte y en perspectiva de la sección B del cartucho mostrado en la Figura 13.

La Figura 17 es una vista en corte y en perspectiva de la zona de detección, con lente, sonda, capilar y fibra de excitación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Esta invención se describe a continuación con referencia a diversas realizaciones, haciendo referencia a las figuras. Si bien esta invención se describe en términos del mejor modo de alcanzar los objetivos de esta invención, se apreciará por los expertos de la técnica que es posible llevar a cabo variaciones a la vista de estas enseñanzas, sin apartarse del espíritu o ámbito de la invención.

La presente invención está dirigida a un nuevo sistema de CE y a una nueva configuración de cartucho en la que la radiación incidente (por ejemplo, procedente de una fuente de láser o de LED) para la detección de analitos separados es dirigida a través de las paredes limítrofes o de contorno de la zona de detección o de la columna de separación. Para el propósito de ilustrar los principios de la presente invención, y no como limitación, la presente invención se describe con referencia a realizaciones encaminadas a la electroforesis capilar y la fluorescencia inducida por radiación.

Haciendo referencia a la Figura 1, se ilustra en ella esquemáticamente un sistema de separación biológica, más específicamente, un sistema de electroforesis por capilaridad (CE —“capillary electrophoresis”) 200 que incorpora la

presente invención. El sistema de CE 200 comprende generalmente una columna de separación capilar 22 (por ejemplo, de entre 200 μm y 500 μm de diámetro exterior) que define un canal de separación 36 (por ejemplo, de entre 25 μm y 200 μm de diámetro interior). La columna capilar 22 puede estar hecha de sílice fundido, vidrio, poliimida u otros materiales plásticos / cerámicos / vítreos. Las paredes internas de la columna de separación 22 (es decir, las paredes del canal de separación 36) pueden ser revestidas con un material que puede acumular una carga electrostática para facilitar la electroforesis y/o la migración electrocinética de los componentes de la muestra. El canal de separación 36 se llena con un medio de soporte de separación, el cual puede ser simplemente una solución amortiguadora en curso o fluyente, o bien una matriz de gel de cribado. Para la detección por fluorescencia inducida por radiación, la matriz de gel incluye un fluoróforo conocido, tal como el bromuro de etidio.

Uno de los extremos de la columna capilar 22 se sumerge en un depósito 28 de solución amortiguadora / gel fluyente 34. El otro extremo de la columna capilar 22 se acopla al vial 26 de muestra. Se comprende que las configuraciones de detección mostradas en las otras realizaciones pueden ser igualmente implementadas en un sistema similar al sistema de CE 20. También, el canal de separación 36 puede ser un solo capilar o microcanal recto en el que un tramo o sección de detección que es más cercana al depósito de gel en el extremo de salida, es la zona de detección, lo que es el modo actualmente preferido de la presente invención. Un detector 24 de radiación se encuentra situado fuera de una sección transparente de las paredes del capilar, en la zona de detección 30. Una fibra de excitación 16 se extiende desde una fuente 28 de radiación (por ejemplo, un LED o un láser) y está dirigida a la zona de detección 30, por el exterior de las paredes de la columna. Los electrodos 12 y 14, que son parte del conjunto de cartucho, están acoplados a los depósitos 26 de solución amortiguadora y al depósito 28 de gel con el fin de completar el camino o recorrido de electroforesis.

En aras de la completitud, baste hacer una breve mención del funcionamiento del sistema de CE 200. En funcionamiento, una muestra biológica preparada (por ejemplo, una muestra de ADN), obtenida directamente de una máquina de reacción en cadena de polimerasa (PCR –“Polymerase Chain Reaction”), se introduce en el extremo lejano de la columna capilar, lejos de la zona de detección, mediante cualquiera de diversas maneras que no forman parte de la presente invención (por ejemplo, la inyección electrocinética desde un depósito de muestra o la inyección de presión física con el uso de una bomba de jeringa). La muestra se une al fluoróforo.

Cuando se aplica un potencial de CC [corriente continua (DC –“Direct Current”)] (por ejemplo, de entre 1 y 30 kV) entre unos electrodos 12 y 14, la muestra migra por efecto del potencial eléctrico aplicado a lo largo del canal de separación 36 (por ejemplo, el ADN que está negativamente cargado se desplaza a través del gel de cribado con una matriz con pigmento integrado / fluoróforo, hacia un electrodo positivo, según se muestra en la Figura 1) y se separa en bandas de componentes de muestra. La extensión o grado de la separación y la distancia recorrida a lo largo del canal de separación 36 depende de diversos factores, tales como la movilidad de migración de los componentes de muestra, la masa y el tamaño o longitud de los componentes de muestra, y el medio de soporte de separación. Las fuerzas de impulsión en el canal de separación 36 para la separación de las muestras pueden ser por medios electroforéticos, de presión, o de flujo electroosmótico (EOF –“electro-osmotic flow”).

Cuando la muestra llega a la zona de detección, la radiación de excitación es dirigida, a través de la fibra de excitación 16, a la zona de detección. Los componentes de la muestra emiten fluorescencia con intensidades proporcionales a las concentraciones de los respectivos componentes de la muestra (proporcionales a la cantidad de material de marcación fluorescente). El detector 24 detecta las intensidades de la fluorescencia emitida a una longitud de onda diferente de la de la radiación incidente. La radiación emitida que se detecta puede ser analizada por métodos conocidos. Para un sistema automatizado, un controlador 32 controla las operaciones del sistema de CE 200.

Sistema de CE basado en cartucho de múltiples capilares

El conjunto ordenado capilar de múltiples canales incluye doce zonas de detección 30 definidas por microcanales 36 en un cuerpo de cartucho (véase también la Figura 2). El cuerpo de cartucho de sustrato puede haberse mecanizado, conformado térmicamente, conformado por ataque fotoquímico superficial o moldeado por inyección (por ejemplo, de un plástico acrílico, PET [polietileno], Ultem, Glastic, Fluorosint, o cualquier plástico ópticamente transparente), a fin de soportar el conjunto ordenado capilar de múltiples canales en las acanaladuras en V de alineación de la óptica integrada. El cartucho de la presente invención incluye un conjunto ordenado capilar de sílice fundido de doce canales (de 16 cm de longitud) que se utiliza para la separación y la detección de las muestras como parte de un conjunto de cartucho desechable. Cuando el cartucho se fija al sistema de CE para el que se ha diseñado para ser utilizado, las fibras de excitación (es decir, fibras multimodo de sílice o plástico, de 0,22 N.A. (apertura numérica –“numerical aperture”)) que están integradas con los microcanales 36, se dirigen a la zona de detección 30. Cada canal está acoplado a un LED. La luz de LED se proyecta hacia el lado de los capilares 36. En esta realización particular, un gel de cribado llena los microcanales / conjunto ordenado capilar 36.

La Figura 2 muestra el diseño de un cartucho 100 de múltiples canales, instalado en un sistema de CE 200 de acuerdo con esa realización de la presente invención, el cual proporciona un fácil manejo de columnas de separación de múltiples canales y permite un fácil acoplamiento óptico de las zonas de detección a la óptica de detección del instrumento de CE. La Figura 2 muestra una vista en perspectiva global o de conjunto del instrumento

de CE 200 (analizador de ADN) con el cartucho de doce capilares dispuesto en su lugar. El instrumento de análisis de ADN completamente automatizado 200 tiene una base 74, que soporta un mecanismo de bandeja modular 80 de manejo de muestra en el plano X-Z, el cual desplaza dos placas 70 y 72 con respecto al cartucho 100 de múltiples capilares soportado sobre una ménsula de soporte 164. El sistema 200 proporciona un fácil manejo de las columnas de separación de múltiples canales y permite un fácil acoplamiento óptico de las zonas de detección a la óptica de detección del instrumento de CE 200.

El cartucho 100 se describe con mayor detalle más adelante. Brevemente, el cartucho 100 incluye un conjunto ordenado capilar de sílice fundido de doce canales que se utiliza para la separación y la detección de las muestras como parte de un conjunto de cartucho desechable y/o portátil e intercambiable 100. El conjunto ordenado capilar de múltiples canales incluye doce zonas de detección definidas por unos microcanales existentes en el cartucho 100. El cartucho 100 de múltiples canales que se muestra en la Figura 2 sostiene hasta 12 capilares 140 de entre 12 y 16 cm de largo. El cartucho 100 de múltiples canales está integrado con un depósito superior 124 de solución tampón o amortiguadora de salida, común a todos los capilares 140, el cual está acoplado directamente a una bomba de presión de aire modular 78. La bomba de presión 78 proporciona la presión de aire requerida para llenar la totalidad de los 12 capilares con el gel de cribado contenido en el depósito 124 y para purgar el gel del curso previo desde los capilares, durante el proceso de rellenado. Dependiendo de la viscosidad del gel, pueden aplicarse presiones de hasta 275,79 kPa (40 PSI) a los capilares 140, a través del depósito 124 lleno de gel. El depósito 124 de gel del cartucho está equipado con un electrodo común integral o incorporado (ánodo; no mostrado) para la totalidad de los 12 capilares, el cual se conecta automáticamente a una fuente de energía de alta tensión 76 para electroforesis, cuando se instala dentro del instrumento 200. Un ventilador o enfriador Peltier situado en la estructura adyacente al cartucho 100, proporciona un control de la temperatura del cartucho. El cartucho presentará unos orificios de ventilación (de entrada y de salida) para la circulación de aire (aire controlado en su temperatura, destinado a ser introducido en el cartucho desde el lado del instrumento). Una fuente de energía 66 proporciona energía de CC [corriente continua (DC –“Direct Current”)] al sistema de CE 200.

En la Figura 3 se muestra un diagrama de bloques del controlador 32 para el sistema de CE 200. El controlador comprende una CPU [unidad central de procesamiento –“central processing unit”] 910, un convertidor de A/D [de analógico a digital] 912 destinado a convertir las señales de detección procedentes del PMT [tubo fotomultiplicador –“photo-multiplier tube”] 178 (Figura 13) en señales digitales correspondientes, y una interfaz de E/S [entrada / salida (I/O –“input / output”)] 914 para transferir y recibir señales hacia y desde las respectivas partes del instrumento de CE 200 por medio de instrucciones procedentes de la CPU 910. Un controlador de temperatura 916 controla el ventilador o enfriador Peltier 63 que controla la temperatura de la cámara de electroforesis para el cartucho 100 de conjunto ordenado de microcanales / capilares. La interfaz de E/S 914 está acoplada con el controlador de temperatura 916, el cual también controla la fuente de energía de alta tensión 76 para la inyección de la muestra y las funciones de electroforesis del instrumento de CE 200, un circuito 921 para modular la fuente de radiación de excitación (por ejemplo, LEDs), sensores, una bomba de aire, una válvula de aire, así como unos motores para el portamuestras o platina X-Z del instrumento de CE 200. La CPU 910 puede acoplarse, de manera adicional, a una computadora personal externa 918, la cual lleva a cabo, a su vez, un tratamiento de datos o una función de control adicional para el sistema de CE 200. La CPU 210 y/o el PC 918 pueden estar programados con funciones de control dictadas por software LabVIEW™ disponible en la National Instruments Corporation, a fin de controlar diversas características y funciones del analizador de ADN de múltiples canales automatizado 200.

Los componentes del controlador 32, con la excepción del PC 218, pueden estar empaquetados como un cuadro o placa electrónica 64 (Figura 2) y un ventilador de refrigeración 62, incorporados en el sistema de CE 200 y conectados eléctricamente al PC 218 a través de un acceso o puerta en serie (no mostrada), o bien pueden formar parte de un módulo controlador independiente situado fuera del sistema de CE 200. La CPU 210 y/o el PC 218 están programados para llevar a cabo las diversas funciones de control y propiedades del sistema de CE 200. El PC 218 puede estar configurado para proporcionar el control de panel frontal (es decir, la interfaz de usuario) para el instrumento 200, y la placa 64 puede haberse configurado para proporcionar los controles de detección escalonados en el tiempo / multiplexados en el tiempo. Estará al alcance de una persona experta en la técnica implementar el código de programa dadas las funciones y características aquí divulgadas. Se ha proporcionado para el instrumento 200 un filtro / conmutador de potencia de A/C [alterna / continua] (Figura 2).

La inyección de las muestras se consigue por métodos electrocinéticos. La fuente de energía de alta tensión 76 se utiliza para suministrar entre 0 y 20 kV de campo eléctrico a los capilares llenos de gel para la inyección electrocinética y las separaciones de fragmentos de ADN. Cada uno de los 12 LEDs de energía luminosa de banda ancha (FWHM [anchura total a la mitad del máximo –“full width at half maximum”] = 47 nm) está conectado por medio de fibras ópticas de transmisión luminosa individuales (fibras multimodo de sílice o plástico con núcleo de 200 micras y 0,22 N.A.) a cada una de las zonas de detección de los capilares dentro del cartucho 100 para la excitación de los fragmentos de ADN separados.

En funcionamiento, el mecanismo de transporte 80 de la bandeja de manejo de muestra, con una placa de 96 pozos (8 x 12), se utiliza para introducir las muestras de ADN amplificadas (o analitos) en cada canal 36 de microánima. Dentro de los microcanales 36 se encuentran unos tubos capilares 22 de vidrio o revestidos de poliimida, de un

menor diámetro interior (entre 25 y 100 μm), que se utilizan como columnas de separación. El mecanismo de transporte X-Z 80 hace avanzar paso a paso una fila de pozos portadores de muestra bajo la fila de puntas de capilares, y sumerge las puntas en los pozos. Al aplicar una cierta tensión, la inyección electrocinética desplaza una cantidad conocida de la muestra de ADN hacia el principio de la columna de separación 140. Tras la inyección, las muestras de ADN procedentes de la bandeja 72 de muestras pueden ser reemplazadas por una solución amortiguadora fluyente procedente de la bandeja 70. Alternativamente, tras la inyección, el mecanismo de transporte 80 puede avanzar paso a paso para desplazar una fila de 12 pozos que contienen solución amortiguadora hasta su posición bajo el cartucho para reemplazar los doce pozos que contienen muestras de ADN. Aplicando una alta tensión a través de la longitud total del canal de separación capilar y el microcanal 36, se consigue la separación de la muestra de ADN en fragmentos de ADN. Se aplica una alta tensión de hasta 1.000 V/cm (típicamente, de 300 V/cm), que proporciona unas rápidas separaciones de menos de 10 minutos a lo largo de toda la longitud del canal de separación. La longitud de separación total es aproximadamente 12,5 cm hasta la zona de detección. La longitud de los capilares de separación insertada dentro del microcanal es aproximadamente 6,5 cm. La alta tensión se aplica a una longitud activa total de entre 16 y 17 cm, la cual puede ser la longitud desde el fondo hasta la parte superior de un único capilar, con un diámetro interno de 75 micras, dentro del depósito de gel, a modo de capilar de separación y detección individual. Durante la electroforesis, la velocidad a la que los fragmentos de ADN se desplazan a través del gel de cribado es inversamente proporcional a su masa; es decir, los fragmentos más ligeros (o más pequeños) de ADN se desplazan más rápidamente que los más pesados (o más grandes). A medida que los fragmentos se aproximan al extremo de la columna de separación 22 y entran en la zona de detección 30, la energía luminosa de excitación procedente de cada uno de los doce LEDs (no mostrados) se suministra, a través de fibras ópticas de transmisión luminosa individuales, desde el exterior de la zona de detección, iluminando los fragmentos de ADN en migración procedentes de la bandeja 72 de muestras. A medida que los fragmentos de ADN se desplazan a través del gel de cribado o la solución de polímero lineal (por ejemplo, Mops-Tris a 25 mM, con pH 7,55, según se hace referencia a ella en "Pace Setter", Vol. 3, Tema 1, abril de 1999), un pigmento de intercalación de ADN (bromuro de etidio) existente en el seno del gel de cribado permite la migración de los fragmentos de ADN que se han de detectar. Los experimentos han demostrado que pueden conseguirse sensibilidades de detección de 100 ng/ml (0,02 ng de la mezcla de ensayo de DNA de HaellI digest ϕX174), lo que es varios órdenes de magnitud mejor que los dispositivos de electroforesis de gel en pastilla que utilizan el mismo pigmento de intercalación. Como los doce LEDs están multiplexados en el tiempo (con una frecuencia de muestreo de entre 10 y 100 Hz), doce señales de emisión acopladas a doce fibras de detección de emisión, alcanzarán el PMT individual de una forma escalonada en el tiempo, por medio de un único conjunto de mazo de fibras.

Para prepararse para la siguiente tanda con una muestra diferente, el gel antiguo procedente de la tanda anterior es purgado de los capilares presurizando el depósito para rellenar los capilares con gel nuevo. Las bandejas 70 y 72 porta soluciones de limpieza, recogida de residuos, y muestras. El gel purgado es recogido por una de las bandejas 70 y 72 mediante la colocación de las puntas de los capilares en una fila de pozos de recogida de residuos situada en una de las bandejas. Las puntas de los capilares pueden ser limpiadas con agua o una solución de limpieza colocando y sumergiendo las puntas de los capilares en dicha solución, en los pozos de bandeja apropiados. Una vez que los capilares son rellenados y quedan listos para la siguiente tanda, las puntas de los capilares son sumergidas en las muestras al recolocar las bandejas 70 y 72. La secuencia anteriormente mencionada del procedimiento puede haberse programado como una de las funciones automatizadas del controlador 32.

Se aprecia que, debido a que los analitos de muestra que han fluido al depósito de gel por las salidas de los capilares se encuentran en tan pequeña cantidad y concentración volumétrica, en comparación con el volumen del depósito, y a que cabe esperar que los analitos se mezclen dentro del depósito de gel, tan solo habrá en el depósito una traza despreciable de los analitos de tandas pasadas y esta se encontrará uniformemente distribuida en el gel que rellena los capilares para la siguiente tanda. Cualquier perturbación o ruido ocasionado por esta traza despreciable constituirá un ruido de fondo relativamente pequeño que puede ser fácilmente eliminado de la señal detectada en el análisis de los datos.

Las Figuras 4-9 muestran las etapas para ensamblar los componentes del cartucho. Estas se describen aquí con propósitos ilustrativos y no se pretende que se tomen en sentido limitativo. La Figura 4 muestra el cuerpo de sección inferior 110 del cartucho 100. En el extremo superior del cuerpo de sección inferior 110 se encuentran unas aberturas 126 a través de las cuales se colocan ciertas porciones de las fibras de excitación 116; después de ser colocadas a través de estas aberturas, las fibras de excitación 116 se unen en su lugar. (Pueden utilizarse también otros medios para asegurar estos componentes.) En el extremo inferior del cuerpo de sección inferior 110 se encuentran unos electrodos 114 que están también unidos (o moldeados por inserción como parte del cuerpo 110). Los capilares 140 (Figura 7) son insertados en unos orificios 139 y guiados a estos electrodos 114. Para un cartucho de doce capilares, hay el doble de fibras de excitación (es decir, veinticuatro fibras de excitación, en el caso de una innovación para detecciones del tipo de longitud de onda dual). Estas fibras de excitación 116 se han colocado de manera que se alternen en torno a los doce capilares 140. Esto se observa más claramente en tanto en cuanto las aberturas 126a y 126b de las fibras pueden ser utilizadas para las fibras de excitación 116a y 116b (Figura 4) para el capilar 140, respectivamente.

La Figura 3 muestra la adición del cuerpo de sección media 120 del cartucho al cuerpo de sección inferior 110

representado en la Figura 4. El cuerpo de sección media 120 del cartucho se ha diseñado de tal manera que la parte 132 no obstruye el recorrido de las fibras de excitación 116 ni el de los capilares 140. La parte 132 tiene un diseño en zigzag que no encierra las fibras de excitación 116 y que es generalmente horizontal cuando el cartucho está en funcionamiento. Esta parte 132 también tiene unos orificios 138 a través de los cuales se sitúan los capilares 140, como se mostrará en figuras adicionales. El extremo superior 131 del cuerpo de sección media 120, que formará parte del depósito, también tiene unos orificios 139 a través de los cuales se colocarán los capilares 140.

Una vez que se ha montado el cuerpo de sección media 120 del cartucho sobre el cuerpo de sección inferior 110, tal como se muestra en la Figura 6, se colocan los capilares 140, revestidos de poliimida, a través de los orificios 139 y 138 de capilar, hasta que llegan al extremo inferior del cuerpo de sección inferior 110 (véase la Figura 7). Los capilares 140 tienen una ventana sometida a sobreexposición de la que se ha eliminado el revestimiento de poliimida para proporcionar una ventana de detección. Pueden utilizarse unas grapas 136 para asegurar los capilares 140 al cuerpo de sección media 120 del cartucho. En el extremo superior 131 del cuerpo de sección media 120 existe un electrodo (ánodo) común 134 para los capilares que se extiende en el interior del depósito.

La Figura 8 muestra el cartucho con los cuerpos de sección media y de sección inferior 110 y 120, respectivamente. Los capilares se extienden desde la parte superior del cuerpo de sección media 120 (de tal manera que las puntas 141 de los capilares sobresalen en la abertura 131 del depósito) hasta el fondo del cuerpo de sección inferior 110 con los electrodos (cátodos) 114. Se muestra también la zona de detección 155 de los capilares. Las fibras de excitación 116 se muestran a través de las aberturas 126 de fibra (véase también la Figura 4), hasta el conjunto 150 de bloque de acanaladuras en V, donde la luz procedente de las fibras de excitación es dirigida a los capilares.

En la Figura 9 se muestra una vista trasera del cartucho. El cartucho está integrado en un depósito 130 para solución amortiguadora de parte superior / salida, común a todos los capilares. El depósito 130 de gel está fijado al cuerpo de sección media 120 con una junta tórica 144 como elemento de obturación. El depósito 130 de gel tiene una capacidad de aproximadamente 18 cc y puede tener unas ventanas transparentes, o traslúcidas, en cada lado para la inspección del nivel del gel. El depósito 130 de gel está acoplado a una bomba de presión de aire modular 78 (véase también la Figura 2). La bomba de presión 78 proporciona la presión de aire requerida para llenar los 12 capilares con el gel de cribado. Dependiendo de la viscosidad del gel, se han aplicado presiones de hasta 275,79 kPa (40 PSI) a los capilares a través del depósito lleno de gel. El cartucho 100 tiene un único electrodo (ánodo) 134 en la abertura superior del cuerpo de sección media 120, así como múltiples electrodos (cátodos) 114 en el cuerpo de sección inferior 110, formando parte del conjunto de cartucho. El depósito 140 de gel del cartucho está equipado con un electrodo empotrado o incorporado (ánodo) 134, común para los doce capilares, que se conecta automáticamente a la fuente de potencia de alta tensión 76 a través de unos pasadores de ajuste por salto prefabricados para electroforesis, cuando se instala dentro del instrumento 200 (analizador de ADN). Se utiliza una fuente de energía de alta tensión disponible en el mercado (es decir, Emco) para entregar de 0 a 20 kV de campo eléctrico a los capilares 140 llenos de gel para la inyección electrocinética y las separaciones de fragmentos de ADN.

El depósito 130 que contiene gel es obturado o cerrado, tal como herméticamente cerrado por el cuerpo del cartucho, lo que permite manejar el cartucho sosteniéndolo en cualquier orientación sin que se produzcan fugas de gel. (Existe una fuga o exposición despreciable en las puntas de los capilares debido a la tensión superficial y a la elevada viscosidad dentro de la microánima de los capilares.) El cartucho 100 tiene un diafragma de caucho (no mostrado) que es perforado por una aguja (o cualquier objeto punzante) montada en un instrumento, que proporciona presión de aire desde la bomba 78 al interior del cartucho. Esto permite que la presión del aire llene los capilares con el gel / solución amortiguadora después de cada tanda de separación, y purgue el gel antiguo procedente de la tanda anterior del procedimiento. Esta solución garantiza la adecuada contención del gel dentro del depósito del cartucho; también proporciona unos medios simples y fiables para acceder el depósito de gel y para proporcionar suficiente presión de aire para que el gel llene los capilares antes de aplicar la elevada tensión con el fin de efectuar la separación de CE.

El cartucho 100 también tiene unos accesos o puertas ópticas de detección 161, a través de las cuales se ajustan las sondas 170 de detector (Figura 11). A través de cada una de estas puertas ópticas de detección 161, se sitúan unas microlentes 166 para óptica de recogida de emisión, seguidas por unos retenedores de lente de elastómero 168. El cartucho tiene también una cubierta obturadora, o una banda 142 de abertura de múltiples canales, en la puerta óptica de detección 161. La banda de abertura 142 puede consistir en un material de poliéster delgado de aproximadamente 0,5 mm de espesor, que evitará que entren al interior del área de óptica de recogida partículas de polvo u objetos extraños. Las aberturas 142 se abrirán cuando el conjunto ordenado de detección 170 que contiene la óptica de recogida entre en el cartucho. Las aberturas 142 se cerrarán de nuevo cuando el conjunto ordenado de detección 170 sea retirado del conjunto de cartucho. El obturador puede también ser una cubierta o ventana mecánica, la cual se abre cuando se sitúa a modo de elemento interpuesto o interfaz con la óptica de detección del instrumento.

La última fase del ensamblaje del cartucho se muestra en la Figura 10, con la cubierta frontal 146 y la cubierta trasera 148. La cubierta trasera 148 tiene unos orificios 162 para cada una de las puertas ópticas de detección 161.

Existen también unos orificios de ventilación 165 a través de los cuales fluye aire enfriado al interior del cartucho para refrigerar los capilares.

Las Figuras 11 y 12 muestran la vista trasera 124 del cartucho 100 con una visión más clara del conjunto ordenado 170 de fibras de recogida de emisión. La Figura 12 muestra que el cuerpo de sección inferior 110 es simétrico, en vista frontal y trasera (es decir, véase los LEDs dispuestos especularmente 184a y 184b). La Figura 13 muestra una vista en corte y en perspectiva del cartucho 100 con una sonda 171 de detector procedente del conjunto ordenado de detección óptica de recogida de emisión 170, acoplada a un único tubo fotomultiplicador (PMT –“photo-multiplier tube”) 178 a través de un conector de fibra 174 y un filtro de emisión 176.

La Figura 14 muestra una vista en corte del cartucho 100, conjuntamente con los sistemas ópticos de excitación y de emisión. El cartucho 100 está soportado por un marco o bastidor de soporte 164. El cartucho, cuando se instala dentro del instrumento a través de su bastidor de soporte 164, queda mecánicamente alineado con unos conjuntos de módulo de LEDs / tambor. La estructura del cuerpo inferior del cartucho 110 proporciona los medios de alineación ópticos o el acoplamiento del conjunto 188 de tambor de lente a las fibras de excitación en el interior del cartucho. El sistema de excitación incluye las lentes de microbola de acoplamiento 182 con los respectivos LEDs 184. La luz de excitación procedente de los LEDs 184 es dirigida, a través de las fibras de excitación 116, a la zona de detección 155 de los capilares. El sistema de emisión incluye el conjunto ordenado 170 de fibras de recogida de emisión, el cual está conectado por el lado trasero 122 del cartucho 100.

El cartucho tiene unas formaciones de alineación destinadas a ser alineadas fácilmente con el módulo de detección microóptico en el interior del instrumento 200. El conjunto ordenado de detección óptico 170 y el conjunto ordenado de LEDs 184 están, ambos, cargados por muelles o resortes, lo que proporciona fuerzas de sollicitación independientemente a cada conjunto 188 de tambor de lente (es decir, LED o manguito de empalme de fibra) para una alineación fiable y reproducible con el cartucho. El cartucho tiene las formaciones de tipo cónico adecuadas (es decir, un asiento de lente cónico 186) para aceptar el resorte y los conjuntos ordenados cargados por resorte provenientes del instrumento, tal y como se describirá con mayor detalle más adelante.

Sistema de excitación

Una vista más cercana de la sección A de la Figura 14 muestra el sistema de excitación en la Figura 15. Esta también muestra una vista en corte según un ángulo de la sección A del cartucho en la Figura 13. El sistema de excitación está soportado por el bastidor de soporte de excitación 164, el cual se ajusta en el cartucho (Figura 10) durante el uso (tal y como se muestra en la Figura 11). Puesto que la fibra de excitación 116 debe recibir luz y redirigir la luz a lo largo de su recorrido hacia la zona de detección capilar 155, el sistema de excitación está configurado para permitir que la luz necesaria entre en la fibra de excitación 116 a través de una lente esférica o de bola 182, desde el LED 184. El sistema de excitación incluye la lente de bola 182, el LED 184, un muelle o resorte de elastómero 190, todos los cuales están dispuestos en el interior del tambor 188 de lente, un resorte helicoidal 192, el bastidor de soporte de excitación 164, un retenedor 194, y un contacto 196 del LED. Dentro del tambor 188 de lente, el resorte de elastómero carga o empuja el LED 184 contra la lente de bola 182. El resorte helicoidal 192, que descansa sobre el bastidor de soporte de excitación 164, proporciona una sollicitación axial y angular dentro del tambor 188 de lente, por lo que permite que la lente de bola 182 se centre con precisión en el asiento de lente cónico 186. Estas dos fuerzas de carga proporcionan un camino de contacto más próximo que recorrer para la luz de excitación, desde el LED 184, a través de la lente de bola 182, hasta la fibra de excitación 116.

Dos fibras de excitación 116 para dos longitudes de onda (para cada capilar) están integradas en el interior del cartucho 100, con una alineación fija, en estrecha proximidad con la zona de detección 155 del capilar. Estas dos fibras de excitación 116 se acoplan a dos LEDs 184 (por ejemplo, de dos colores diferentes: 526 nm y 473 nm) cuando el cartucho se instala en el interior del instrumento de CE 200 (es decir, el analizador de ADN). Pueden separarse y detectarse los dos colores por parte de dos filtros de emisión de dos colores situados en el módulo de detección (módulo 178 de PMT). El cartucho puede tener capacidades de un solo color o monocromáticas para aplicaciones de análisis de fragmentos de ADN y también puede ser perfeccionado de manera que tenga capacidades de detección de dos colores para otras aplicaciones. Se hace referencia a la Solicitud de Patente Provisional norteamericana N° _____, titulada “Un dispositivo electroforético portátil para análisis multiplexado en múltiples colores” (“*A Portable Multi-color Multiplexed Analysis Electrophoretic Device*”), depositada el 19 de octubre de 2001 (Registro de Representante N°: 1031/207), que se ha asignado en común a la BioCal Technology, Inc., el mismo asignatario de la presente invención.

Sistema de detección

La Patente norteamericana N° 2002113213, titulada “Detección óptica en un sistema de separación biológica de múltiples canales” (“*Optical Detection in A Multi-Channel Bio-Separation System*”), depositada de forma concurrente el 28 de enero de 2002 (Registro de Representante N°: 1031/209), que se ha asignado a la BioCal Technology, Inc., el mismo asignatario de la presente invención, está dirigida, de forma más específica, al esquema de detección escalonada / multiplexada en el tiempo que puede adoptarse en el sistema de CE 200 para el que se ha diseñado para ser utilizado el cartucho 100.

Una vista más cercana de la sección B de la Figura 13 muestra el sistema de detección, o emisión, en la Figura 16. La luz de excitación procedente de una fuente luminosa (por ejemplo, el LED 184) viaja por la fibra de excitación 116 hasta la zona de detección 155 del capilar 140. Un manguito de empalme 210 de fibra refuerza y protege la fibra de excitación 116 que está insertada dentro del bloque 150 de acanaladuras en V. Dos fibras de excitación 116 pueden ser guiadas a un único bloque 150 de acanaladuras en V, de manera que ambas dirigen luz desde las dos aberturas en ángulo inferiores del bloque de acanaladuras en V. La realización preferida para alinear cada fibra de excitación con un capilar consiste en un único bloque que incorpora unas acanaladuras en V mecanizadas que albergan tanto el capilar como la fibra en alineación precisa el uno con la otra. El bloque puede haberse fabricado utilizando una máquina herramienta para una parte ranurada, o por moldeo por inyección. Puede utilizarse, asimismo, una parte de mecanizado perforada con broca transversalmente, dentro de la cual se alojarán los capilares y fibras en unos orificios mecanizados con precisión, en lugar de en acanaladuras en V.

Cuando la luz de excitación es dirigida a la zona de detección 155 (véase también la Figura 17), el sistema de detección detecta luz emitida, o señales de emisión, a 90 grados con respecto al plano de excitación. Es necesaria una óptica de colimación al objeto de colimar el haz de emisión, puesto que la fibra de emisión 180 se encuentra fuera del líquido o gel. La apertura numérica de la fibra de excitación 116 determina la magnitud de la densidad de potencia dirigida al seno del gel, cerca de la zona de detección. La fuente de luz de excitación puede ser un LED 184, que es relativamente barato, o un láser (que puede ser un láser de estado sólido, un láser de gas, un láser de colorante o similar). Las emisiones de fluorescencia procedentes de los componentes o analitos separados, en la zona de detección, son recogidas a través de las microlentes 166 y 167 y dirigidas, a través de una fibra de recogida de emisión 180, a un detector. Entre estas dos lentes de bola 166 y 167 se encuentra un elemento separador 206. El capilar 140 puede tener paredes transparentes, o bien paredes opacas provistas de una ventana transparente para dirigir las emisiones a las microlentes 166 y 167. La lente 166 se utiliza para recoger las emisiones y tiene, preferiblemente, una propiedad de ángulo de captación elevado (por ejemplo, es una microlente de zafiro con un índice de refracción $n = 1,76$, de la Swiss Jewel Company, Modelo #B2.00, que tiene una corta distancia focal con una elevada apertura numérica (N.A. –“numerical aperture”). La lente 167 es para acoplar la luz de emisión colimada producida por la lente de zafiro a la fibra de emisión 180 (por ejemplo, es una microlente BK-7, disponible en la Swiss Jewel Co.). La luz fluorescente, que tiene una longitud de onda más alta (por ejemplo, entre 570 nm y 630 nm) que la luz de excitación, es entonces encaminada por una fibra óptica 180 de núcleo grande (fibras de 370 μm de diámetro exterior, de 0,22 N.A., aunque pueden también estar comprendidas en intervalos de: entre 100 y 1.000 μm de diámetro exterior, y entre 0,12 y 0,5 N.A.), a un detector (por ejemplo, un tubo fotomultiplicador (PMT) Hamamatsu R5984), tras haber pasado por filtros de emisión de paso largo para separación de colores (por ejemplo, utilizando entre 570 nm y 630 nm). Las señales de emisión son reemitidas por unas fibras de emisión 180 al interior del módulo de detección (detector 178 de PMT), donde son filtradas por un único o múltiples filtros de emisión 176 y son leídas (detectadas) según un esquema multiplexado en el tiempo (escalonado en el tiempo). La fibra de detección 180 puede ser observada más claramente en asociación con el sistema de óptica de detección según se ha descrito y mostrado en la Figura 13.

Se aprecia adicionalmente que la zona de detección no es necesariamente una zona bien definida con límites o contornos bien definidos, debido a la naturaleza de la sustancia, a la radiación incidente y a las emisiones de fluorescencia. Se trata generalmente de una zona en la que la luz procedente de la fibra de excitación es dirigida para provocar emisiones de fluorescencia, y la óptica de detección es apuntada para captar una parte de tales emisiones de fluorescencia. La luz procedente de la fibra de excitación puede provocar emisiones de fluorescencia fuera de la zona de detección, y algunas de las emisiones procedentes del interior de la zona pueden no ser detectadas por la óptica de detección. Cuanto más cerca está la fibra de excitación de la zona de detección o más alta es la densidad de potencia de la luz de excitación, más intensas son las señales de emisión recogidas.

En el dispositivo de CE de múltiples capilares de la presente invención, las fuentes de luz de excitación de fluorescencia pueden ser LEDs azules o verdes de gran brillo. Las propiedades atractivas de los LEDs como fuentes luminosas son su bajo coste, su pequeño tamaño, su larga vida útil, su buena intensidad y su estabilidad resultante del bajo ruido, así como la posibilidad de dirigir una modulación electrónica de la intensidad. Los LEDs contemplados en esta invención están basados en tecnología de materiales de InGaN (por ejemplo, HLMP-CB15 y HLMP-CM15, de la Agilent), con una potencia de salida luminosa promedio de entre 2,5 mW y 3 mW. Las características espectrales con su longitud de onda de pico y media anchura (nm) de los LEDs de InGaN indican que estos LEDs pueden utilizarse para la excitación de fluorescencia con un espectro de excitación comprendido en el intervalo de 440 nm a 570 nm (por ejemplo, fluorescina, rodamina, bromuro de etidio, naranja de tiazol), y para una frecuencia comprendida en el intervalo entre 1 Hz y 100 MHz. Puesto que el tiempo de respuesta de estos LEDs es muy alto (de unos pocos cientos de nanosegundos), estos pueden ser batidos o pulsados a corrientes directas más grandes, de hasta 100 mA en un modo de funcionamiento por impulsos, a fin de obtener picos radiantes elevados. El funcionamiento por impulsos de los LEDs puede conseguirse, típicamente, por los circuitos de excitación del transistor. Pueden alcanzarse, típicamente, una salida de luz de LED de pico significativamente más alto, gracias a impulsos de corriente de excitación grandes a bajos ciclos de trabajo (es decir, del 5%, 10%, 25% o 50%), que para el funcionamiento de CC [corriente continua].

Es posible utilizar LEDs de diferentes colores (es decir, LEDs azules o verdes) como fuentes de excitación para la

excitación de diferentes fluoróforos (diferentes aplicaciones). La realización preferida utiliza LEDs de intervalos de longitud de onda de entre 500 nm y 600 nm, y, específicamente, a 524 nm. Un segundo módulo de LED, o un LED de un segundo color, puede ser añadido al presente diseño para obtener un dispositivo de detección de longitud de onda dual, al llevar dos longitudes de onda al microcanal mediante el uso de una o dos fibras. La actual plataforma de detección / separación puede ser expandida o ampliada con unos módulos de LED dual, mediante la disposición de la óptica de excitación y recogida con un segundo PMT, a fin de proporcionar un detector de fragmentos de ADN por detección de fluorescencia de múltiples longitudes de onda.

Las fuentes de luz de excitación pueden cambiarse por LEDs o diodos de láser (láser de estado sólido de semiconductor). Alternativamente, pueden ser láser por impulsos (por ejemplo, láser de estado sólido, láser de gas, láser de colorante, láser de fibra). La razón principal para el uso de LEDs (es decir, verde, de 524 nm) es su bajo coste, su gran brillo y su gran compacidad. Pueden utilizarse también LEDs del tipo de montura superficial (SMT – “Surface Mount Type”), utilizando un esquema bien acoplado por fibra, o bien directamente tope con tope, a capilares con el fin de suministrar luz de excitación a los analitos en separación. Una fuente de luz alternativa para este instrumento serían diodos de láser comprendidos en el intervalo entre 400 nm y 800 nm.

Una persona experta en la técnica constatará que el instrumento que incorpora la esencia de esta invención puede también ser utilizada para otros análisis biomoleculares. Por ejemplo, mediante la alteración del gel o solución amortiguadora de separación, el sistema puede ser también modificado para analizar biomoléculas como proteínas, carbohidratos y lípidos. Utilizando un cierto número de cartuchos de múltiples canales de la presente invención que tienen diferentes composiciones químicas de solución amortiguadora / gel, capilares, etc., una composición química de solución amortiguadora / gel particular, con un capilar en correspondencia (por ejemplo, con revestimientos de paredes internas y tamaños de columna particulares), se pueden intercambiar fácilmente para adecuarse a las aplicaciones de separación basadas en muestras concretas y condiciones operativas, a fin de conseguir diferentes separaciones, tipos, velocidades, resoluciones, etc. Un mismo cartucho puede ser apartado y posteriormente reutilizado para la realización de futuras operaciones de separación. En comparación con los sistemas de CE de la técnica anterior, el tiempo de preparación para aprestar el presente sistema de CE 200 utilizando el cartucho 100 para llevar a cabo un ensayo diferente, puede ser reducido significativamente, puesto que la columna de separación, el medio de separación y al menos la óptica de detección, que requiere una alineación fina con respecto a los capilares, están, todos ellos, contenidos dentro de los cartuchos. La capacidad de reutilización del cartucho reduce significativamente el coste de material para el sistema de CE. También, puesto que la matriz de gel con pigmento intercalado está herméticamente encerrada dentro del cartucho, esta proporciona una buena solución para obtener un producto medioambientalmente seguro / “verde”. El fluoróforo y/o la matriz de gel pueden contener agentes carcinógenos y otros materiales peligrosos para la salud y el medioambiente. Al envasar el gel dentro del cartucho, ello facilita significativamente el manejo y mejora la seguridad. El cartucho puede ser recogido y dispuesto en correspondencia, de una manera medioambientalmente segura, o bien puede ser reciclable, de manera que las partes gastadas o consumidas son reemplazadas o renovadas por técnicos adiestrados, a fin de evitar daños al medioambiente.

Con esta solución automatizada y modular, provista de óptica integrada y autoalineación (sin partes microópticas móviles), de múltiples canales, el funcionamiento del instrumento se hace más simple, más fiable y, con todo, proporciona una elevado ritmo de producción. El cartucho 100 con óptica autocontenida y previamente alineada con respecto a los canales de separación, puede ser fácilmente montado por salto elástico dentro del sistema de CE 200. Por otra parte, este esquema de detección de múltiples canales puede ser ampliado o aumentado en escala hasta más de 12 o incluso un número N de canales de detección (por ejemplo, 96 canales) sin perjudicar la sensibilidad de la detección. La otra ventaja de este método de detección simple del tipo multiplexado en el tiempo es que se da una diafonía despreciable o nula entre los canales, en comparación con cualesquiera otros esquemas de detección de LIF de alta producción.

Si bien en las realizaciones anteriormente descritas, las múltiples fuentes de radiación están a una misma longitud de onda, se contempla también la posibilidad de configurar las múltiples fuentes de radiación en diferentes longitudes de onda con el fin de complementar las muestras específicas, las aplicaciones de detección basadas en las muestras o las composiciones químicas del gel en los diferentes capilares.

La radiación incidente para la detección puede ser dirigida a la zona de detección, y/o las emisiones de radiación procedentes de la zona de detección pueden ser suministradas como salida axialmente a lo largo del medio de separación. Puede adoptarse una zona de detección ensanchada. Se hace referencia a la Patente norteamericana Nº 2002197735, titulada “Detección óptica en un dispositivo de separación biológica utilizando una entrada de radiación axial” (“*Optical Detection in Bio-Separation Device Using Axial Radiation Input*”), a la Patente norteamericana Nº 2002197736, titulada “Detección óptica en un dispositivo de separación biológica utilizando una salida de radiación axial” (“*Optical Detection in Bio-Separation Device Using Axial Radiation Output*”), y en la Patente norteamericana Nº 2002196442, titulada “Detección óptica en un dispositivo de separación biológica utilizando una zona de detección ensanchada” (“*Optical Detection in Bio-Separation Device Using a Widened Detection Zone*”), todas ellas depositadas el 22 de junio de 2001, las cuales se han asignado en común a la BioCal Technology, Inc., el mismo asigntario de la presente invención.

5 El instrumento, de bajo coste, de la presente invención tiene un diseño de cartucho de múltiples canales desechable / reciclable (ya que la mayoría de las partes del cuerpo de cartucho pueden ser recuperadas y reenvasadas o reutilizadas ulteriormente). Las únicas partes que serán reemplazadas son los capilares y el gel, un sistema de
10 detección de fluorescencia y un mecanismo de bandeja de manejo de muestras incorporado (una placa de 96 pozos). Los experimentos han demostrado que los análisis de las muestras se completan en solo de 4 a 10 minutos por cada doce canales (doce resultados paralelos para doce muestras de ensayo). El sistema de análisis de ADN es una estación de trabajo autónoma y de alta productividad que se ocupa de un análisis completo de fragmentos de ADN, desde la inyección hasta la detección y la recogida de datos de los fragmentos. La sensibilidad para un único
15 capilar utilizando el modo de detección descrito de la presente invención es del orden de 0,02 ng del fragmento de ADN en menos de 10 minutos de separaciones (utilizando la mezcla de ensayo de ADN bacteriófaga HaeIII digest ϕ X174). Este tipo de solución destinada a tener doce microcanales / capilares discurriendo en paralelo, produce resultados en 10 minutos para las doce muestras sometidas a electroforesis. Esta clase de velocidad de separación y de sensibilidad de detección es varios órdenes de magnitud mejor que las técnicas de electroforesis con gel en pastilla convencional.

20 Si bien la invención se ha mostrado y descrito de forma particular con referencia a las realizaciones preferidas, se comprenderá por parte de los expertos de la técnica que pueden realizarse diversos cambios en la forma y en el detalle. Por ejemplo, la fuente de radiación de excitación puede consistir, por ejemplo, en LEDs, diodos de láser (láser de estado sólido semiconductor), láser por impulsos, o pulsados (por ejemplo, láser de estado sólido, láser de gas, láser de colorante, láser de fibra), u otras fuentes de radiación. Los LEDs (por ejemplo, verde, de 524 nm) están asociados con un coste bajo, un gran brillo y una alta compacidad. Una fuente de luz relativamente barata alternativa para la presente invención pueden ser diodos de láser en el intervalo visible, en el UV y/o en el infrarrojo. Pueden utilizarse, por ejemplo, los diodos de láser comprendidos en el intervalo entre 400 nm y 900 nm, y, más específicamente, en el intervalo entre 400 nm y 600 nm.

25 Una persona experta en la técnica constatará que el instrumento que incorpora la esencia de esta invención puede también utilizarse para un análisis biomolecular distinto del análisis de ADN. Por ejemplo, alterando el gel o solución amortiguadora de separación, el sistema puede también ser modificado para analizar moléculas biológicas tales como proteínas, carbohidratos y lípidos.

30 A modo de ejemplo y no como limitación, el esquema de detección de la presente invención se describe en asociación con la electroforesis capilar y la detección de fluorescencia inducida por radiación. Se comprende que la presente invención es también aplicable a la detección de analitos separados, basándose en un fenómeno de separación biológica distinto de la electroforesis y en la detección de emisiones de radiación distintas de las emisiones por fluorescencia, incluyendo otros tipos de radiación de emisión, tales como la fosforescencia, la luminiscencia y la quimioluminiscencia, así como la detección basada en la absorbencia.

35 Por otra parte, si bien los canales de separación de las realizaciones descritas se definen por columnas o tubos cilíndricos, se comprende que los conceptos de la presente invención son igualmente aplicables a canales de separación definidos por canales abiertos, por ejemplo, microcanales definidos por ataque químico superficial en un sustrato (dispositivos de tipo microfluídico, o chips biológicos o biochips).

40 El mecanismo de transporte puede haberse configurado para mover las bandejas en un plano horizontal, y puede haberse proporcionado un mecanismo de transporte adicional para mover el cartucho verticalmente para acceder a las bandejas.

45 De acuerdo con ello, la invención divulgada ha de considerarse meramente como ilustrativa y limitada en su ámbito únicamente de acuerdo con lo especificado en las reivindicaciones que se acompañan.

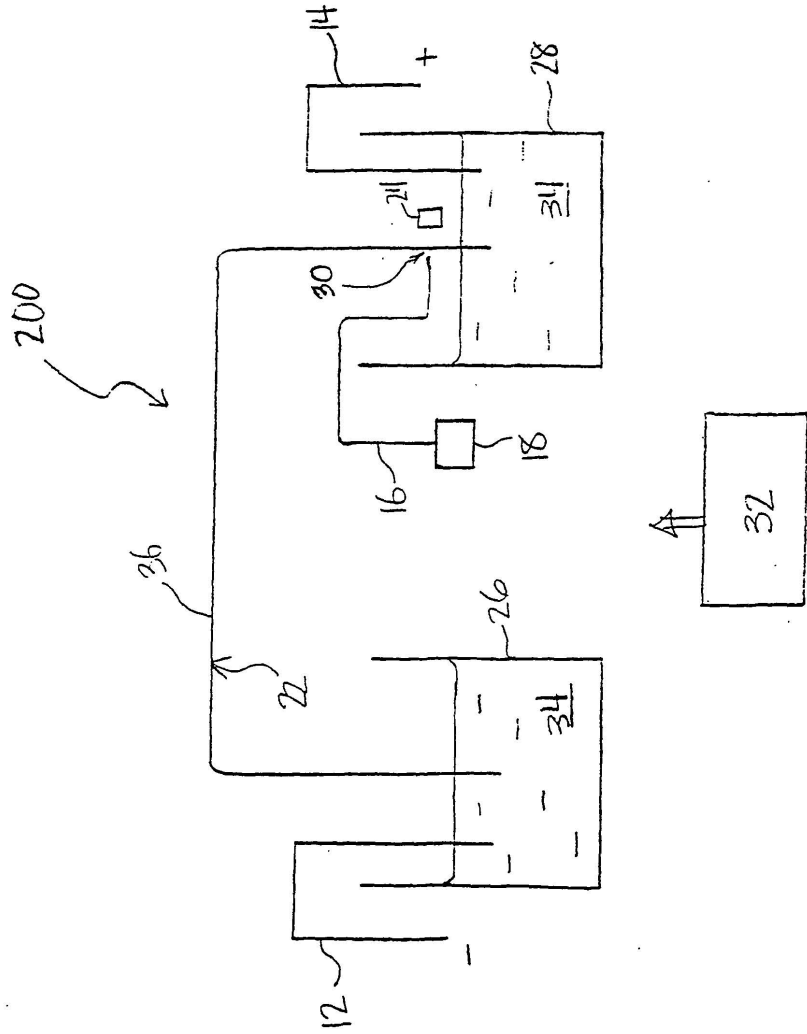
50

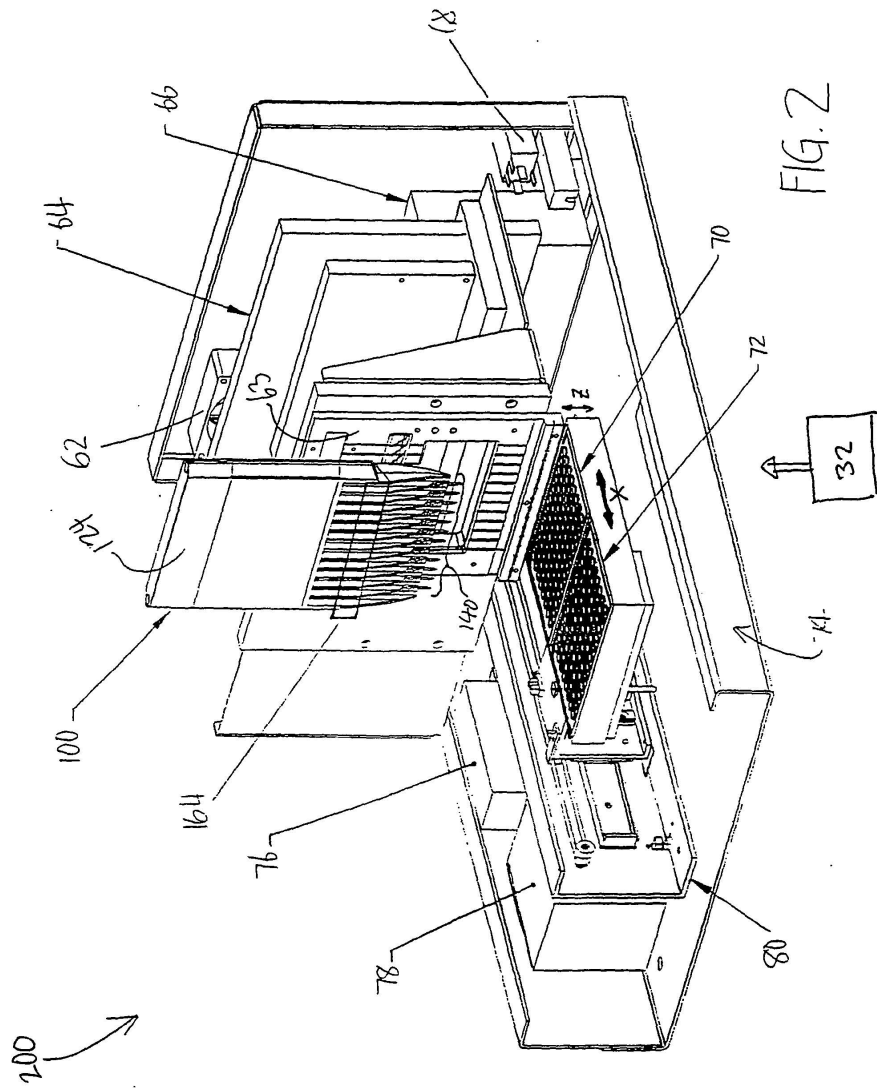
REIVINDICACIONES

- 1.- Un cartucho (100) de múltiples canales para separación biológica, que comprende:
- 5 un cuerpo (120);
 una pluralidad de canales de separación capilares (36) para analitos en el cuerpo, de tal manera que cada canal de separación capilar (36) define una ventana de detección;
 una cámara contenida en el cuerpo (120); y
 medios ópticos;
- 10 **caracterizado por que:**
- la cámara define un depósito (13) y contiene un gel de soporte de separación que está encerrado herméticamente contra fugas cuando el cartucho (100) se manipula sujetando el cartucho en cualquier orientación;
- 15 de tal manera que el depósito (130) se encuentra en comunicación de fluido común con los canales de separación capilares (36); y
 de tal modo que los medios ópticos están empotrados o incorporados e integralmente soportados dentro del cuerpo con el fin de dirigir luz de excitación hacia dicha ventana de detección o emisión de radiación procedente de dicha ventana, de forma que dichos medios ópticos comprenden unos accesos o puertas de detección ópticas (161) y unas fibras ópticas de excitación (116) que tienen un extremo alineado por el cuerpo (120) con los canales de separación capilares (136) y que tienen otro extremo situado por el cuerpo (120) con el fin de acoplarse a unas fuentes de radiación externas (184).
- 25 2.- El cartucho de múltiples canales de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por** al menos una de las características siguientes: portátil, reciclable, reutilizable e intercambiable con otros cartuchos que tienen uno diferente de entre el medio de soporte de separación y los canales de separación capilares (36).
- 3.- El cartucho de múltiples canales de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende
 30 adicionalmente un electrodo (134) conectado eléctricamente al depósito (130).
- 4.- El cartucho de múltiples canales de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende adicionalmente un electrodo adicional (114), conectado eléctricamente a cada extremo de los canales de separación capilares (36) que se encuentran lejos del depósito (130).
- 35 5.- El cartucho de múltiples canales de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual los canales de separación capilares (36) comprenden unas columnas capilares (22) soportadas por el cuerpo.
- 6.- El cartucho de múltiples canales de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el gel es de un tipo adecuado para la electroforesis capilar.
- 40 7.- El cartucho de múltiples canales de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una interfaz para introducir aire a presión en el interior del depósito (130) con el fin de purgar y llenar los canales de separación capilares (36) con el medio de soporte de separación.
- 45 8.- El cartucho de múltiples canales de acuerdo con la reivindicación 7, en el cual la interfaz incluye un diafragma que puede ser perforado para introducir aire a presión en el interior del depósito (130).
- 9.- Un sistema (200) de separación biológica, que comprende:
- 50 una base (74);
 un cartucho (100) de múltiples canales para la separación biológica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, soportado sobre la base (74);
 medios de colocación (80), soportados sobre la base con el fin de colocar muestras con respecto a los
 55 canales de separación capilares (38), y en comunicación de fluido con los canales de separación capilares (36);
 medios de separación para llevar a cabo una separación biológica de las muestras a lo largo de los canales de separación capilares; y
 medios de control (32) para controlar las operaciones del sistema de separación biológica.
- 60 10.- El sistema de separación biológica de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende adicionalmente:
- una fuente de radiación (184), que dirige radiación a la zona de detección (155); y
 un detector (24), que detecta la radiación procedente de la zona de detección (155).
- 65

- 11.- El sistema de separación biológica de acuerdo con la reivindicación 9, en el cual los medios de separación comprenden un mecanismo electroforético que lleva a cabo una separación por electroforesis de las muestras contenidas en los canales de separación capilares (36).
- 5 12.- El sistema de separación biológica de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende adicionalmente unos medios de presión (78), que presurizan el depósito (130) para purgar y llenar los canales de separación capilares (36).
- 10 13.- El sistema de separación biológica de acuerdo con la reivindicación 11, en el cual los medios de separación comprenden una fuente de tensión (76) que proporciona un potencial eléctrico para llevar a cabo una separación por electroforesis de las muestras contenidas en los canales de separación capilares (46).
- 15 14.- El sistema de separación biológica de acuerdo con la reivindicación 9, en el cual los medios de colocación comprenden un mecanismo de colocación (80) que sitúa las muestras soportadas en un plano horizontal con respecto al cartucho de múltiples canales (100), de tal manera que los canales de separación capilares (36) están en comunicación de fluido con el recipiente.
- 20 15.- El sistema de separación biológica de acuerdo con la reivindicación 9, en el cual los canales de separación capilares (36) comprenden unas columnas capilares (22) soportadas por el cuerpo (120), y las columnas capilares (22) tienen unos extremos (140) que se extienden desde el cartucho (100) de múltiples canales, de tal manera que el mecanismo de colocación (80) coloca los extremos (140) con respecto al recipiente (72) de muestras, de tal modo que los extremos (140) acceden a las muestras.

FIG. 1





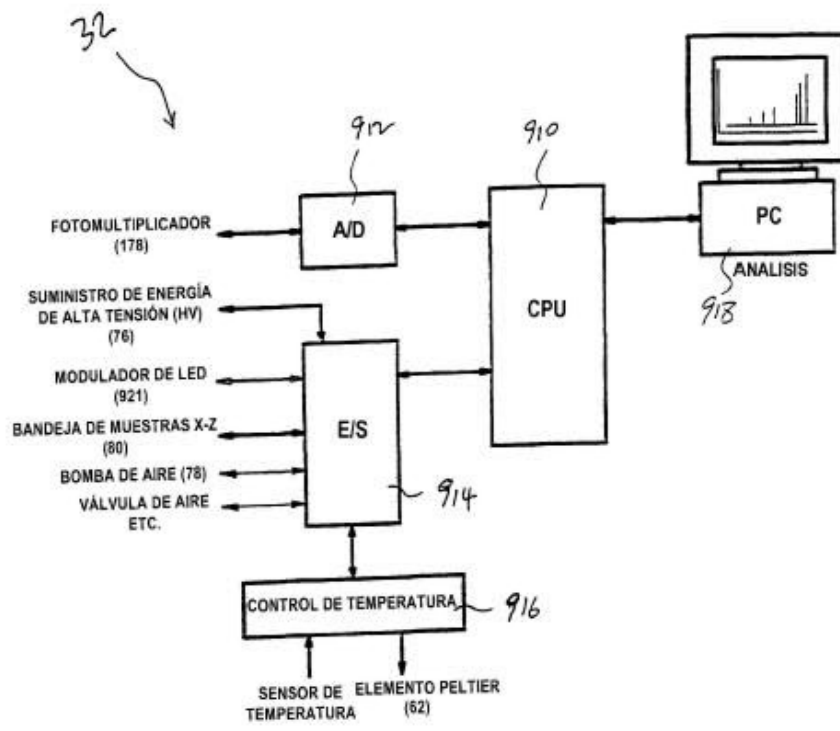
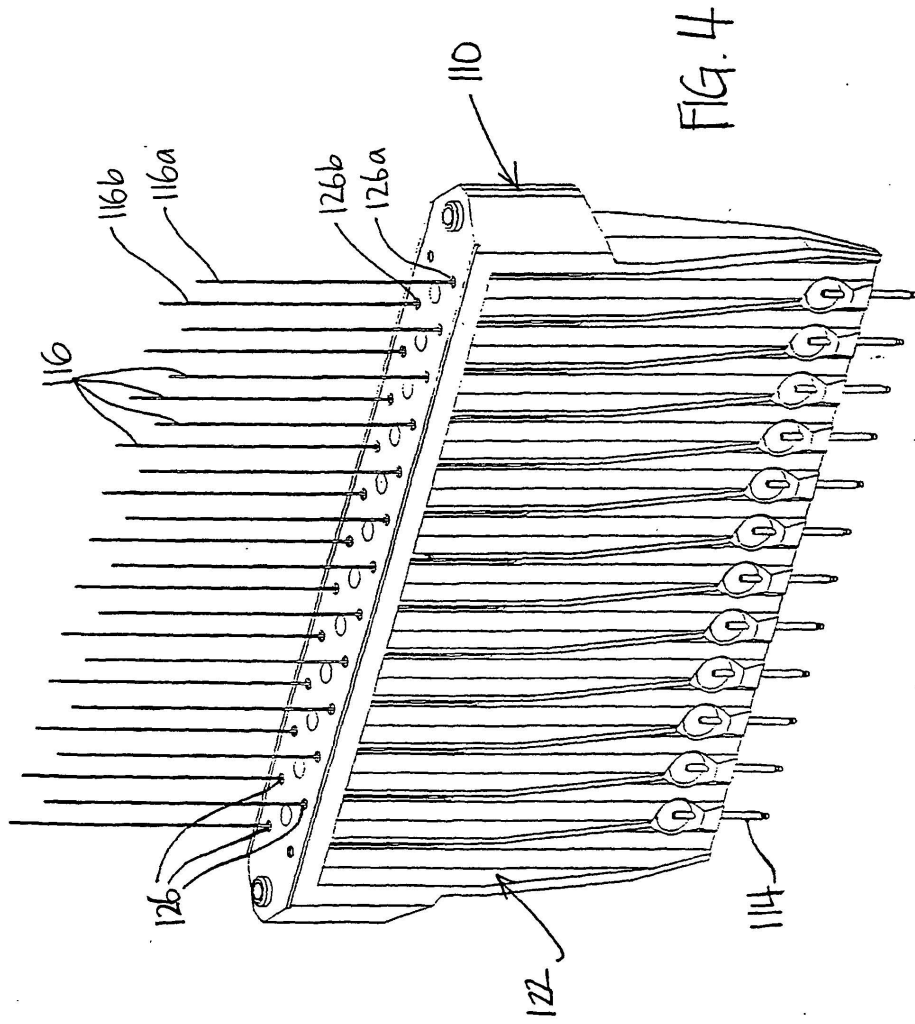
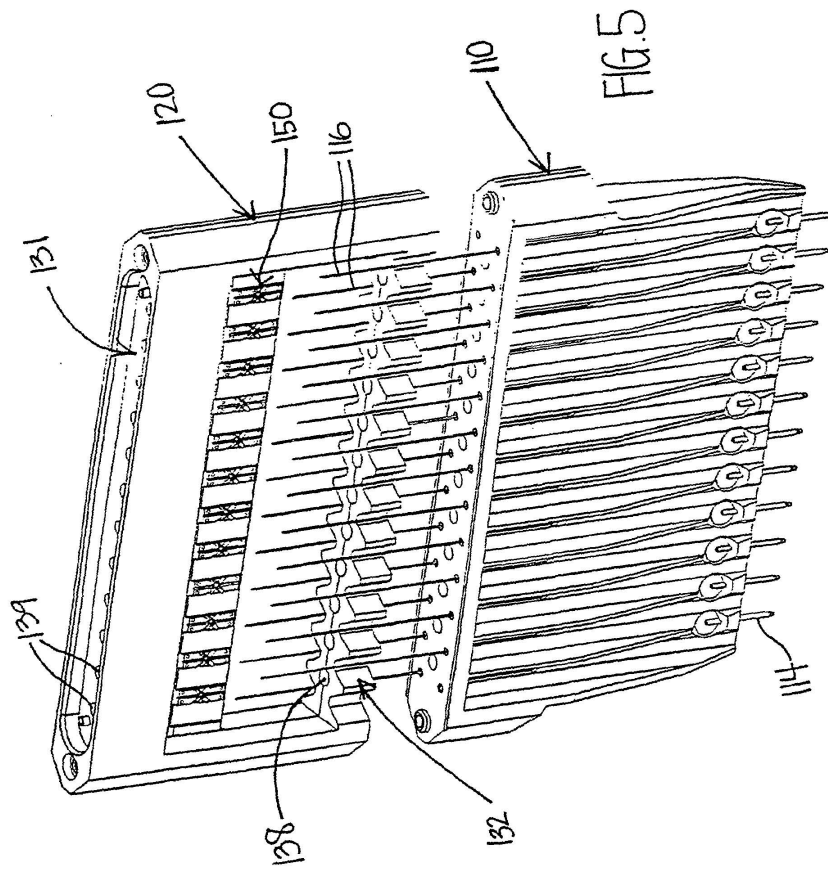
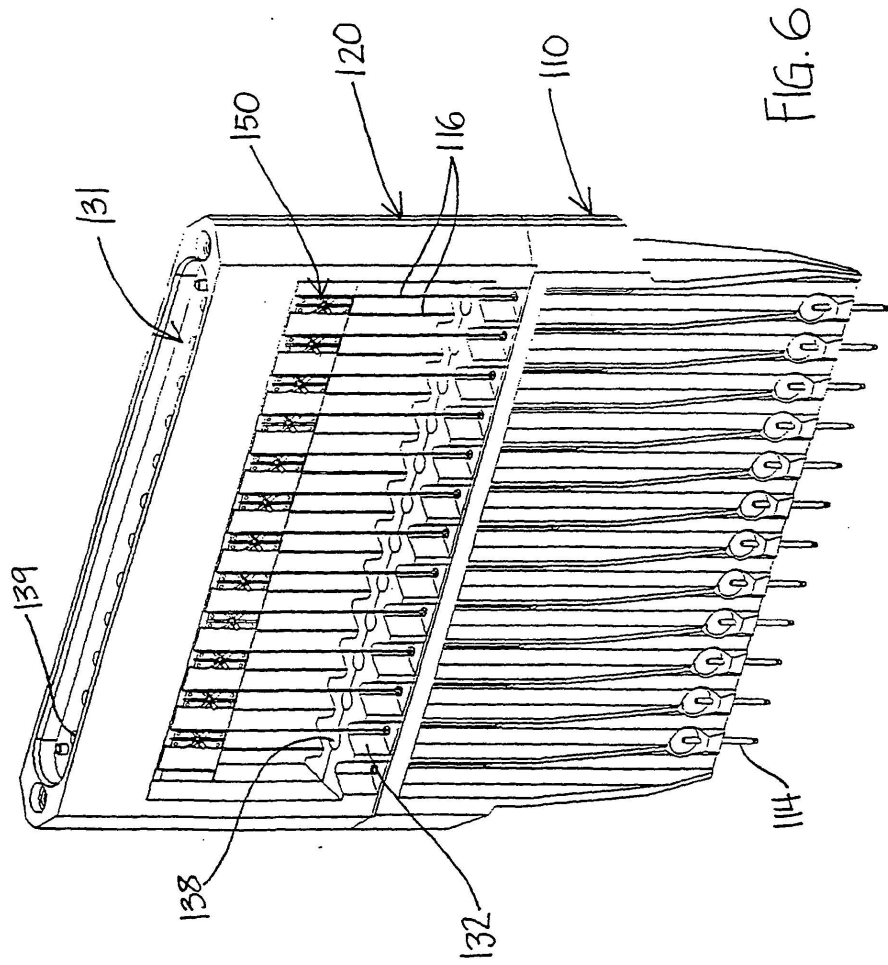
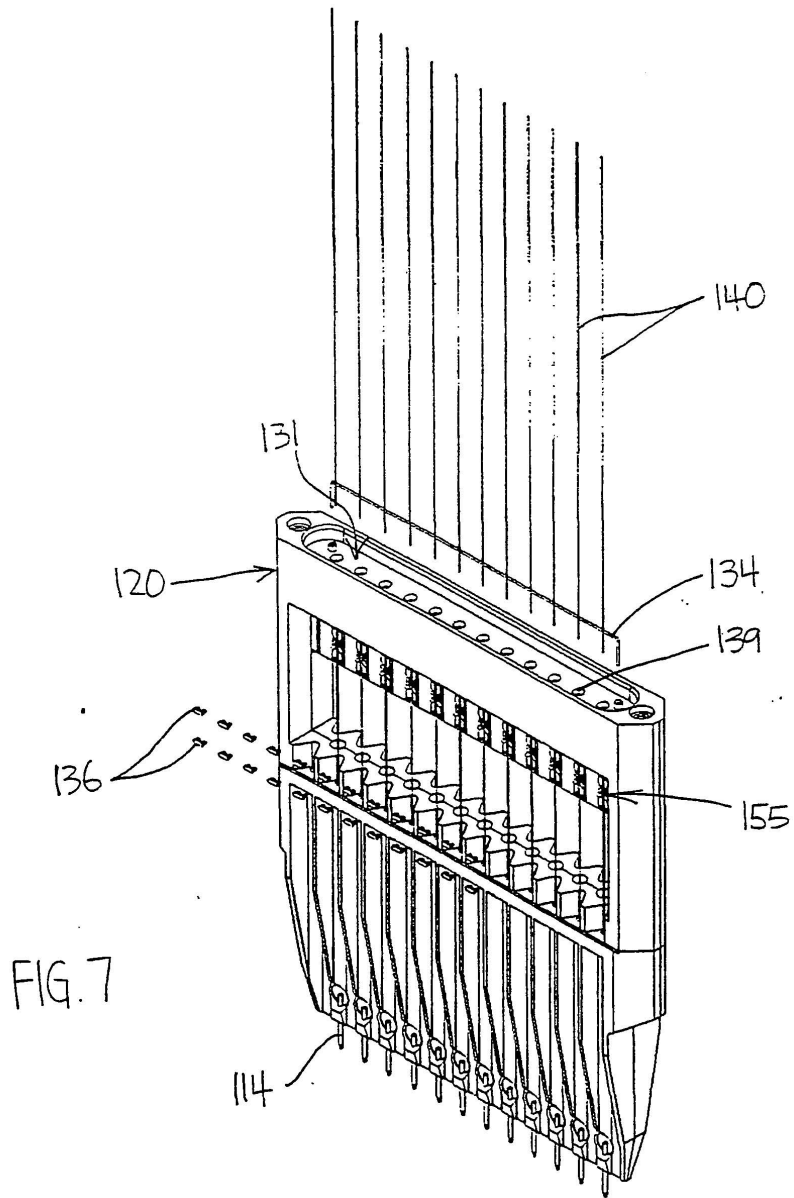


FIG. 3









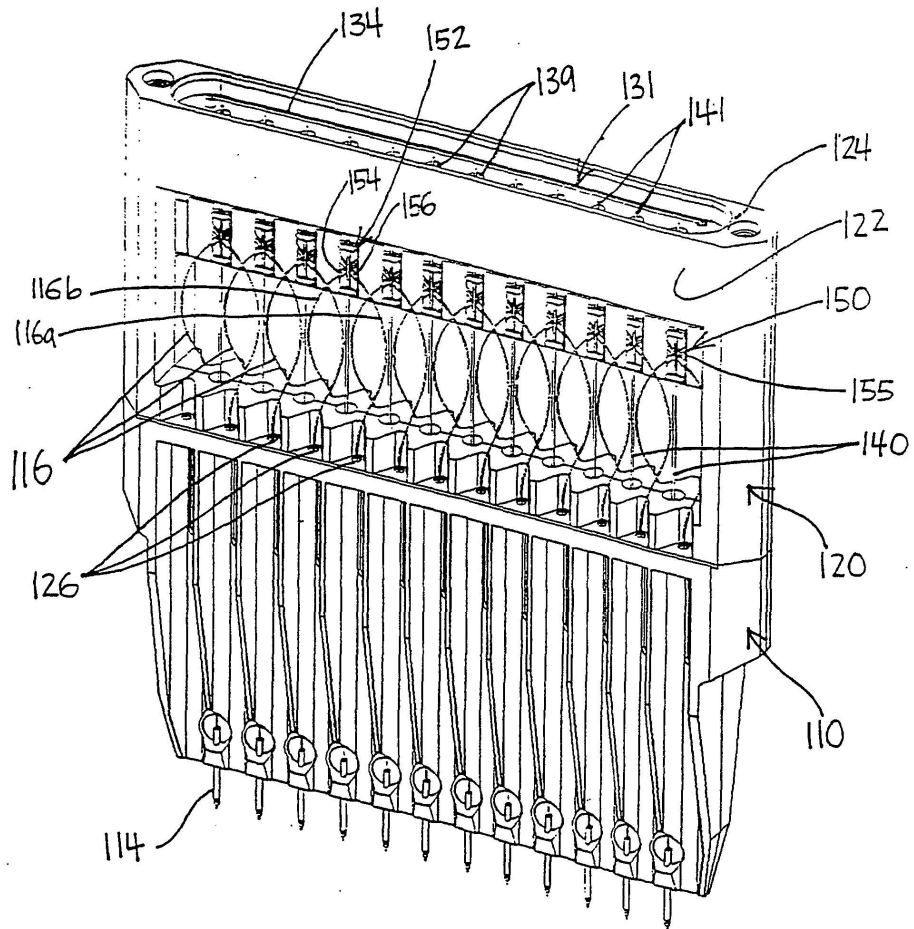
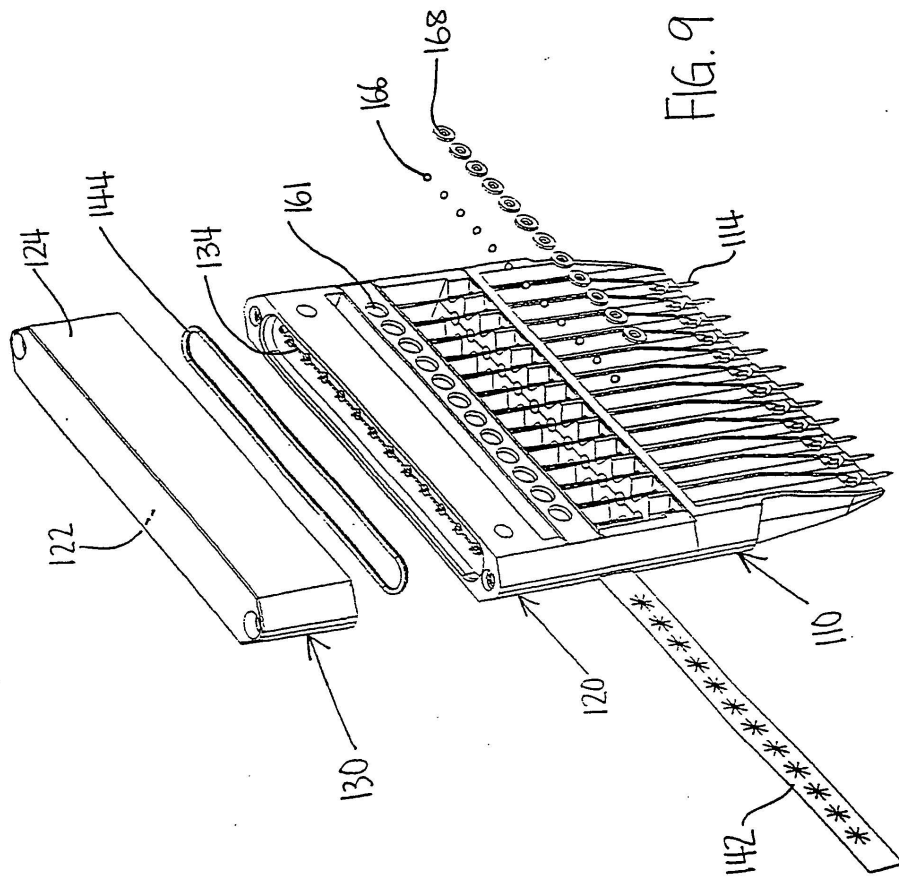


FIG. 8



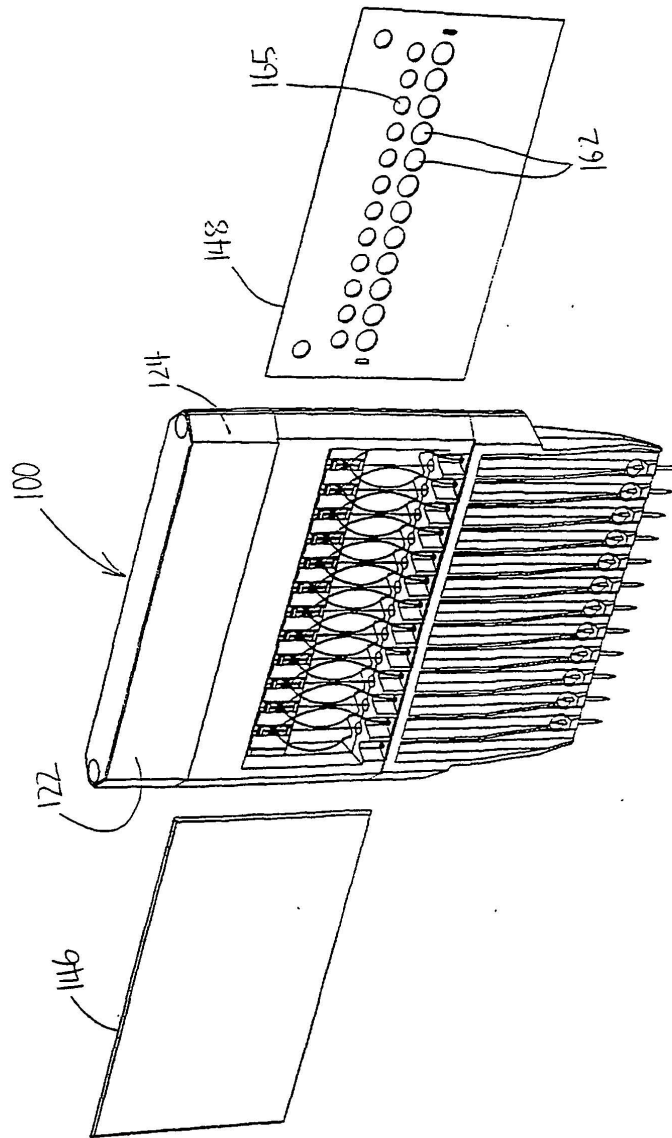


FIG 10

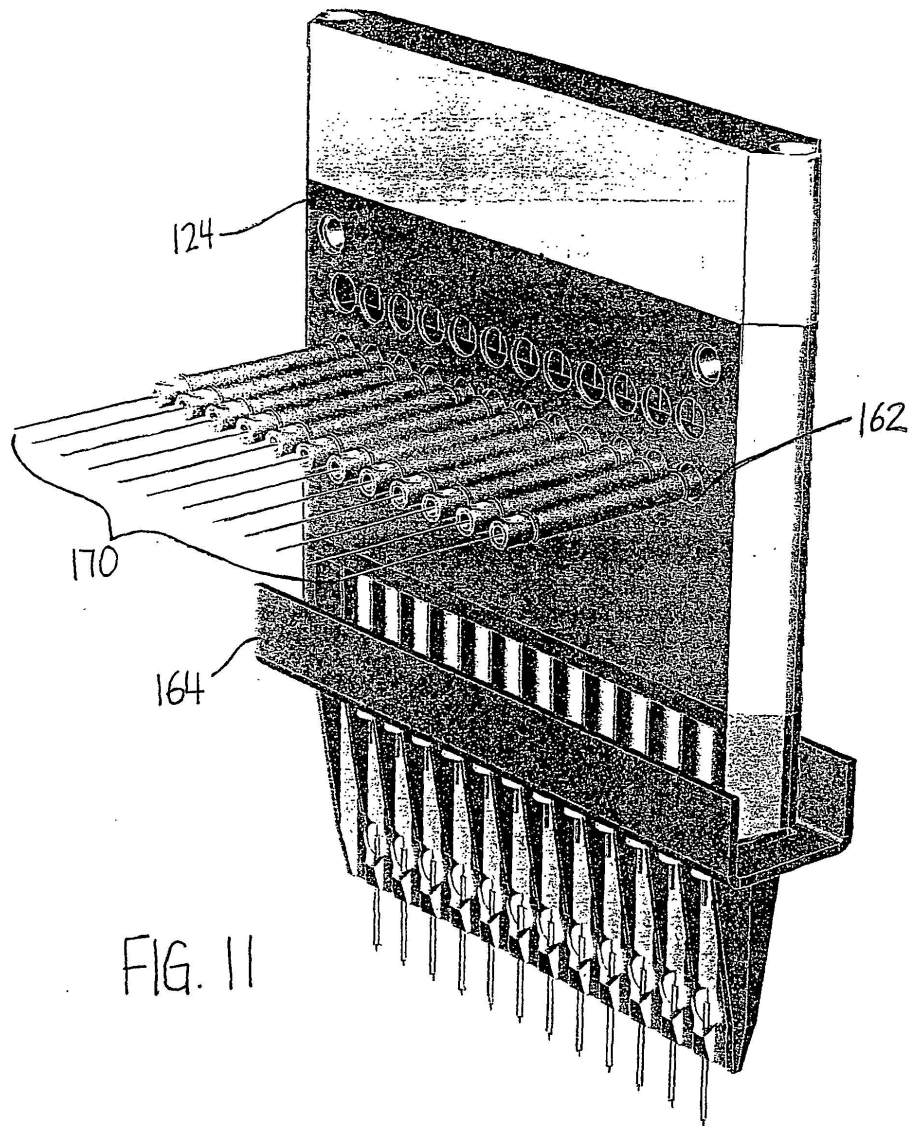
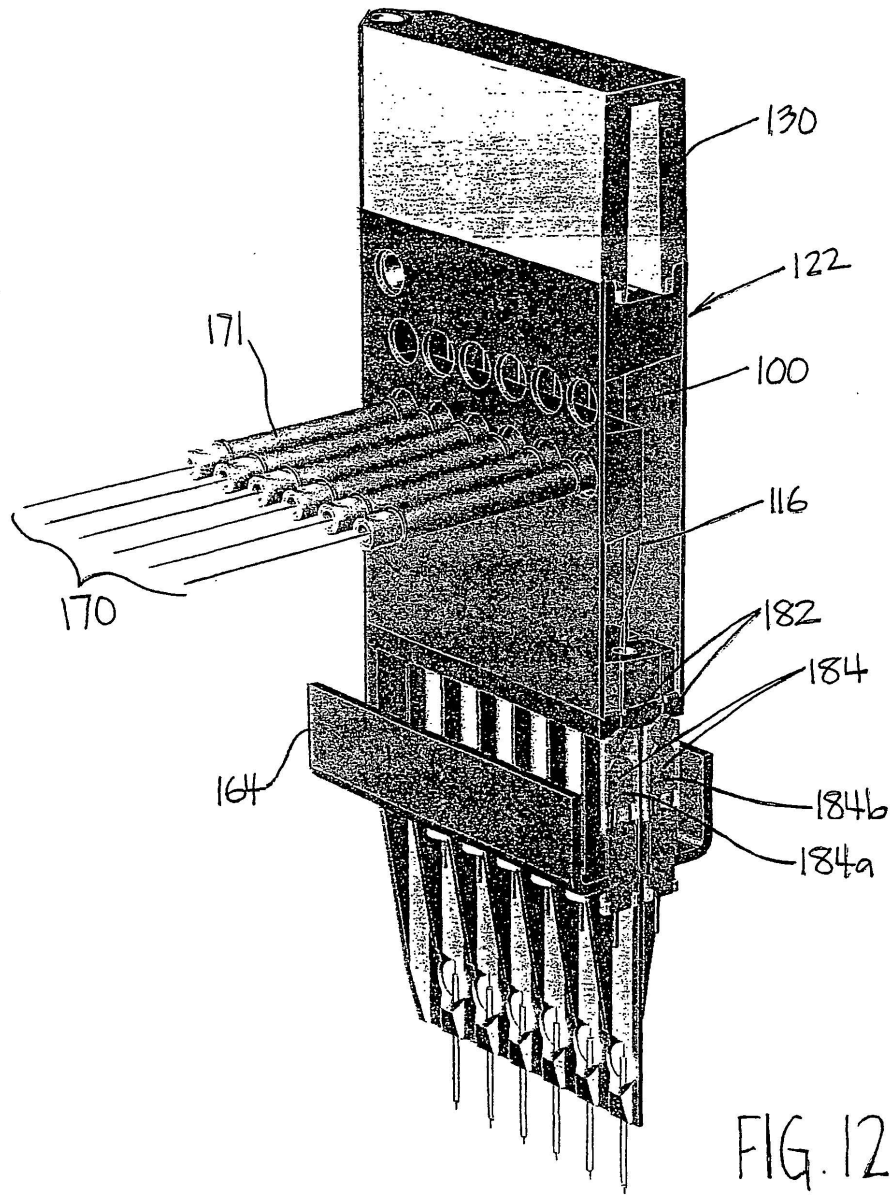


FIG. 11



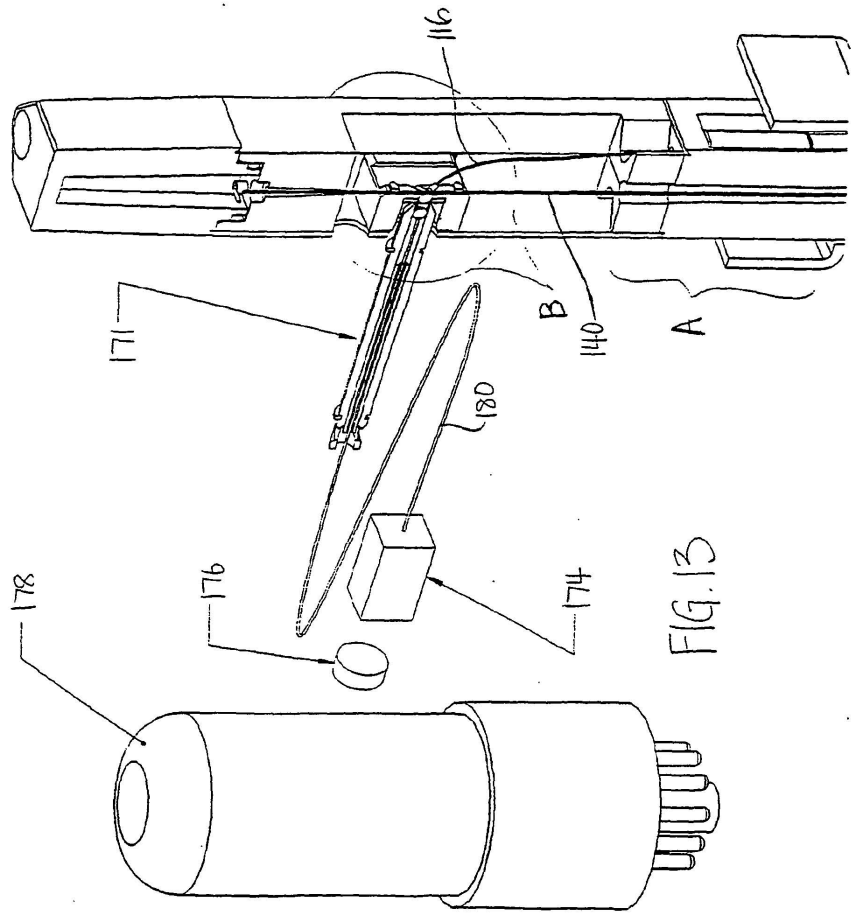
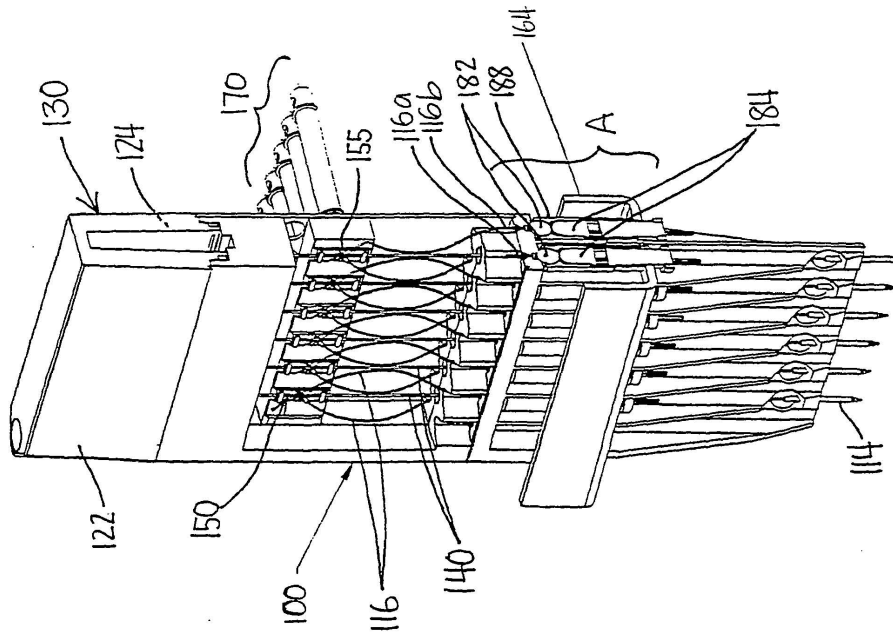


FIG. 14



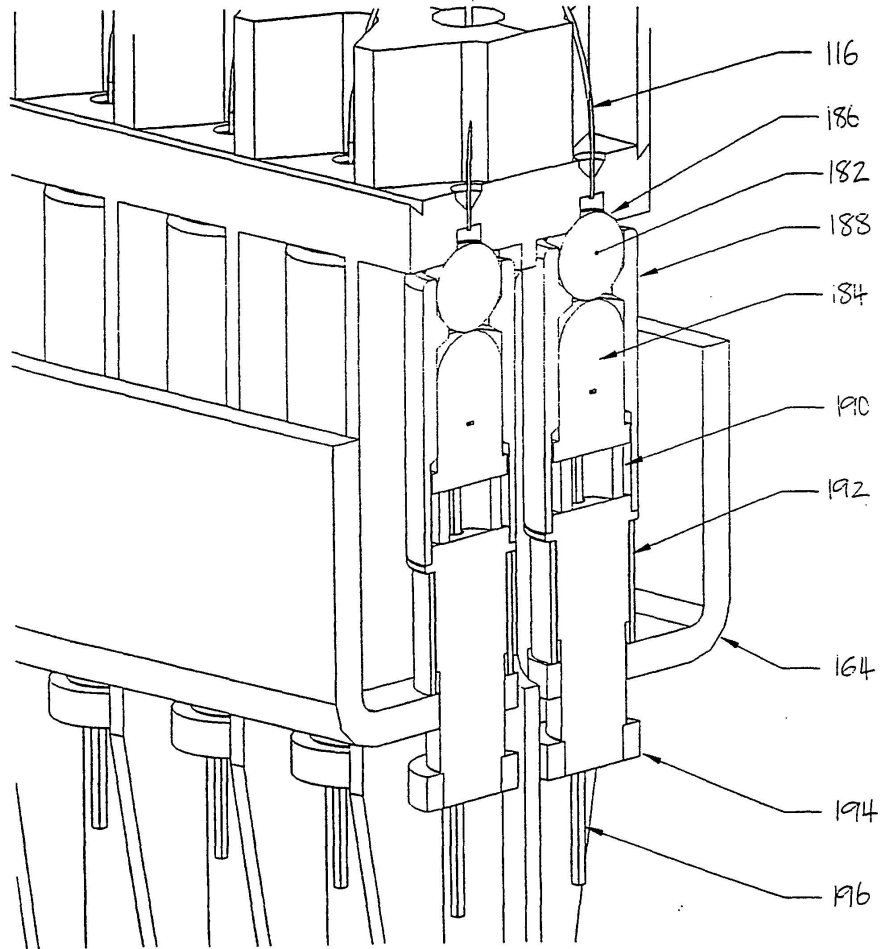
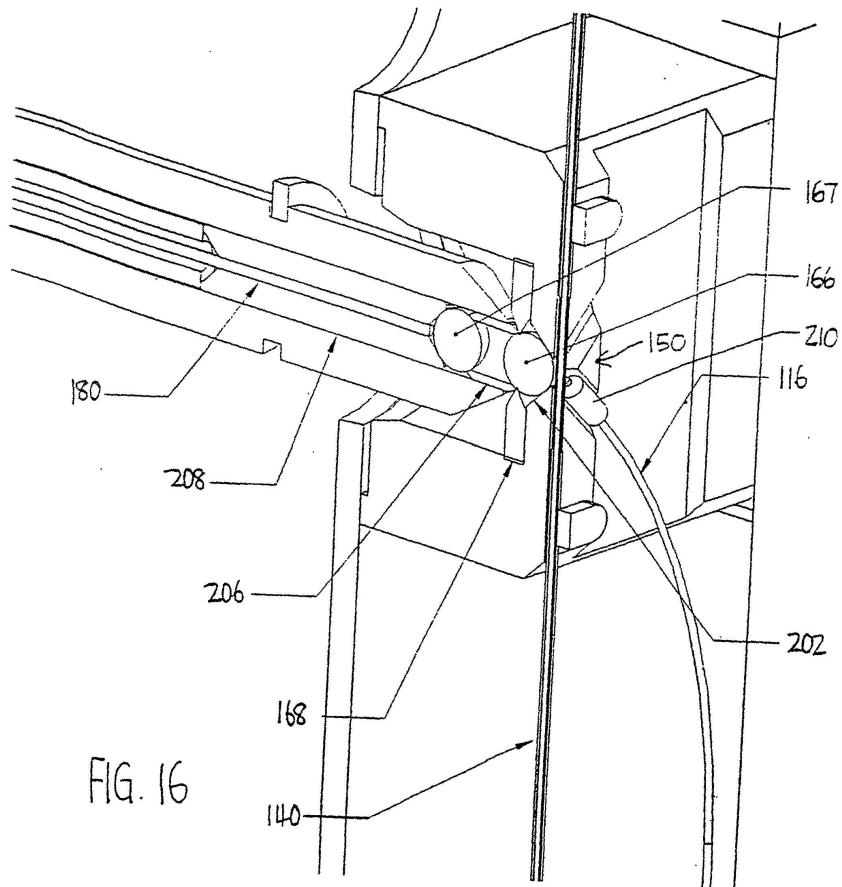


FIG. 15



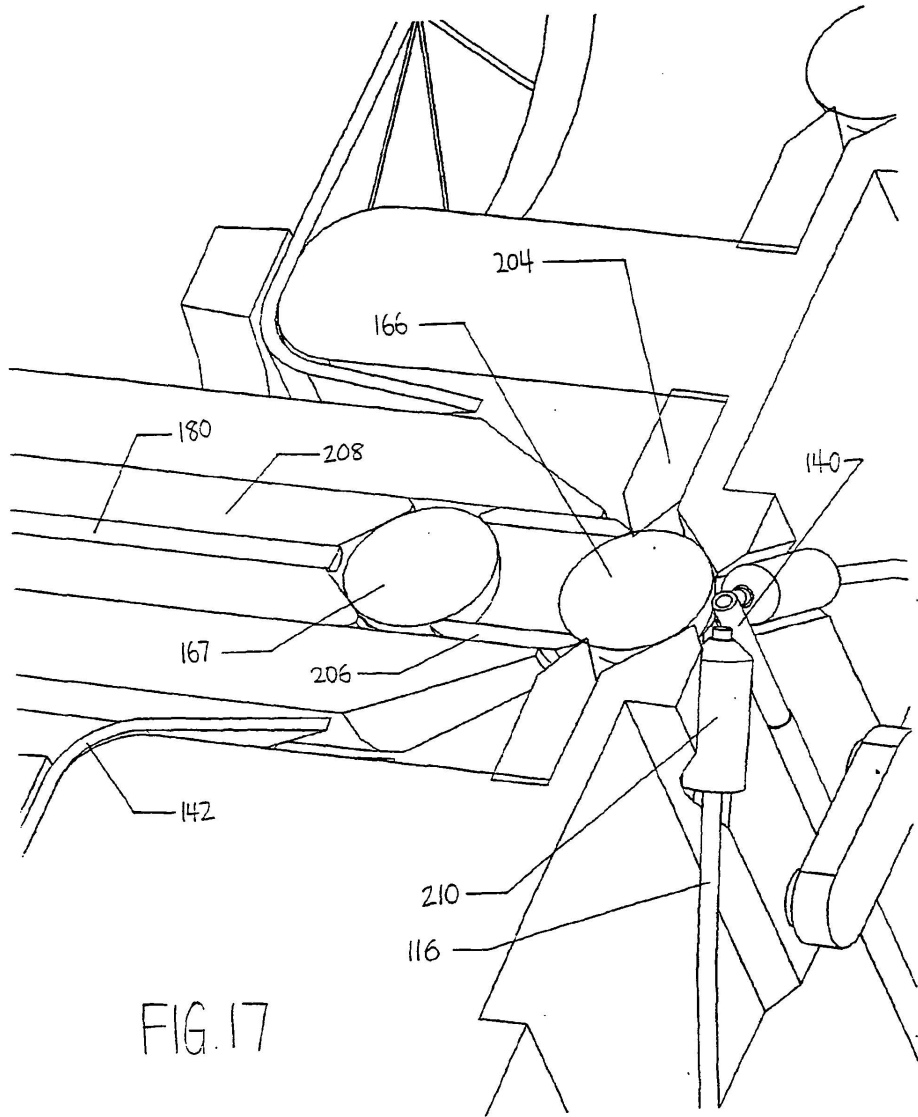


FIG. 17