

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 331**

51 Int. Cl.:
G01N 27/447 (2006.01)
B01L 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05820978 .4**
96 Fecha de presentación: **22.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1836485**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.09.2007**

54 Título: **MÉTODO DE ELECTROFORESIS Y DISPOSITIVO PARA SEPARAR OBJETOS.**

30 Prioridad:
31.12.2004 GB 0428548

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.03.2012

73 Titular/es:
DIMITRIOS SIDERIS
SHELLEY APARTMENT 198 SHEEN ROAD
RICHMOND TW10 5AL, GB

72 Inventor/es:
Sideris, Dimitrios

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 376 331 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 de electroforesis y dispositivo para separar objetos.

Esta invención se refiere a un método y dispositivo para llevar a cabo la separación electroforética de objetos en un fluido. La técnica descrita elimina la difusión de bandas y consigue una separación rápida, de alta resolución.

5 La electroforesis se refiere al movimiento de objetos cargados a través de un fluido bajo la influencia de un campo eléctrico. Este fenómeno se puede usar para separar objetos según sus propiedades eléctricas e hidrodinámicas, y están en uso generalizado varias técnicas para explotar esto. Los objetos a ser separados, comúnmente proteínas u otras biomoléculas, se suspenden típicamente en un fluido tal como una disolución amortiguadora o un gel. Una pequeña sección de la disolución que contiene los objetos se coloca en el principio de un canal de separación que
10 contiene un fluido o gel y posteriormente se genera un campo eléctrico constante a lo largo del canal. Bajo la influencia de este campo, dichos objetos empiezan a moverse hacia el extremo opuesto del canal. Mientras migran a través del fluido, experimentan una fuerza hidrodinámica diferencial que depende de su forma y tamaño. Debido a esta diferente fuerza hidrodinámica aplicada a ellos, los objetos se mueven con diferente velocidad terminal dependiendo de sus características individuales, y por tanto se separan y forman "bandas". Debido a sus diferentes
15 velocidades terminales, la distancia entre las bandas aumenta con el tiempo.

Una banda es esencialmente un grupo de objetos que tienen propiedades eléctricas e hidrodinámicas similares. Una de las desventajas clave de la electroforesis es el hecho de que las bandas, mientras se mueven a su velocidad terminal, sufren difusión térmica. Esto hace que las bandas se ensanchen con el tiempo, reduciendo la resolución de la separación.

20 Se revisan diversas implementaciones conocidas de la electroforesis en "Cyclic electrophoretic and chromatographic separation methods", Eijkel et al, Electrophoresis 2004, 25, 243-252.

El documento US-A-5126022 describe un dispositivo de electroforesis en el que se aplica una pluralidad de campos eléctricos para mover moléculas cargadas a través de un medio. Mezclas de moléculas cargadas son arrastradas a través del gel por la fuerza de los campos eléctricos. Los campos se activan preferiblemente de manera simultánea o secuencial uno después de otro a diversas velocidades, para crear distribuciones de fuerza complejas u ondas de campo en movimiento a lo largo del medio de separación. Las moléculas cargadas capaces de moverse rápidamente a través del gel serán movidas a lo largo por las ondas de campo en movimiento más rápidas y serán separadas de moléculas en movimiento más lentas.
25

Hay también un número de variantes al método de electroforesis convencional que intentan limitar la difusión térmica.
30

Un método tal es el Enfoque Isoeléctrico (IEF, por sus siglas en inglés) que emplea un gradiente de pH en el canal de separación. Mientras los objetos se mueven a través del fluido bajo la influencia de un campo eléctrico constante, su carga aparente cambia debido al pH cambiante a lo largo del canal. Cada objeto, dependiendo de sus características de carga, se mueve hasta un punto donde su carga aparente es cero. Esto se llama el "punto isoelectrico". En ese punto el objeto deja de moverse, ya que alcanza una posición de equilibrio. Cada objeto con diferentes características de carga se detiene en un punto diferente a lo largo del canal, y por tanto tiene lugar una separación de los objetos. Las bandas de los objetos pueden ser entonces detectadas e investigadas, por ejemplo por generación de imágenes.
35

La ventaja de este método es la eliminación de la difusión térmica, y la desventaja es la limitada precisión del gradiente de pH. Otra desventaja son los tiempos de separación aumentados (típicamente muchas horas).
40

Se describe otra variante de electroforesis en el documento US-A-2002/0043462. Las partículas son separadas aplicando una primera fuerza que resulta del flujo del fluido amortiguador a través de la cámara, al que se opone un gradiente de campo eléctrico. La forma del campo eléctrico estático es tal que las partículas se separan en bandas a lo largo de la cámara. Las bandas representan posiciones de equilibrio en las que la fuerza neta sobre cada molécula es cero. Una vez que se forman las bandas, el campo eléctrico aplicado puede ser modificado para manipular las bandas, por ejemplo moviendo una banda de interés hasta un punto de salida. Sin embargo, como en el caso de otros sistemas conocidos, el dispositivo depende de un flujo constante de amortiguador a través de la cámara para imponer la fuerza hidrodinámica apropiada sobre cada partícula y conseguir por tanto una separación exitosa. Esto conduce a varios problemas.
45

50 En primer lugar, el equipo de bombeo y monitorización requerido para conseguir el altamente preciso flujo de líquido a través del canal conduce a una infraestructura potencialmente cara y complicada. Como resultado, los sistemas son típicamente costosos y pueden no ser fiables, comprendiendo varios componentes mecánicos complejos. La precisión del flujo de amortiguador es esencial para la precisión y resolución del dispositivo.

55 En segundo lugar, un problema común asociado al uso de líquidos que fluyen, y que se experimenta mucho en procedimientos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que usan flujo impulsado por presión, es que el líquido interactúa con las paredes del canal. Como resultado, el líquido no fluye con una velocidad constante a

- través de la sección transversal del canal, sino que más bien se mueve lentamente en la parte adyacente a las paredes y más rápido hacia el centro del canal. Esto crea un frente de velocidad parabólico, lo que afecta directamente a la forma de las bandas de las moléculas separadas. Cuanto mayor es la desviación desde un frente de velocidad constante, más anchas se hacen las bandas, reduciéndose así la resolución en el dispositivo. El proceso de separación puede ser acelerado aumentando el caudal del amortiguador. Esto es porque el tiempo empleado por las moléculas para alcanzar su posición de equilibrio se acorta, y de ahí que la separación se complete más rápidamente. En un primer método, aumentar el caudal también debe estrechar las bandas estacionarias, porque las fuerzas hidrodinámicas y eléctricas ejercidas son más grandes. Esto daría como resultado una resolución mejorada.
- 5 Sin embargo, mientras el caudal es aumentado, el perfil de flujo parabólico se hace más acentuado, tendiendo a suprimir la mejora en resolución esperada.
- La electroforesis convencional implica a menudo el uso de geles como fluido de separación. La relativamente alta viscosidad reduce la difusión y por tanto mejora la resolución. Sin embargo, es difícil, si no imposible, usar geles con técnicas que requieren flujo de amortiguadores (tales como los dos métodos mencionados anteriormente) porque los geles, de manera general, no fluyen fácilmente.
- 15 Lo que se necesita es una técnica que controle de manera eficaz la difusión térmica y que elimine la necesidad de un flujo constante del fluido de separación a través del aparato. Tal método debe conseguir una rápida separación y una alta resolución.
- De acuerdo con la presente invención, un método de electroforesis para separar objetos en un fluido contenido en un canal de separación comprende los rasgos de la reivindicación 1.
- 20 Además, de acuerdo con la presente invención, un dispositivo de electroforesis para separar objetos comprende los rasgos de la reivindicación 27.
- Se apreciará que el término "fluido" se usa aquí para describir cualquier medio de separación apropiado. Por ejemplo, el fluido podría ser un líquido o un gel capaz de generar fuerzas friccionales o hidrodinámicas sobre un objeto en movimiento.
- 25 Variando el campo eléctrico aplicado en relación al canal de separación desde sustancialmente el comienzo del proceso de separación (a diferencia de después de que se formen las bandas), los objetos pueden ser separados en bandas sin necesidad de un flujo de fluido a través del canal de separación. El campo eléctrico aplicado establece un perfil de campo variante en el tiempo, lo que consigue la separación electroforética forzando a las partículas a moverse a través del fluido, que puede ser por tanto estacionario en sí mismo. Se debe hacer notar que el campo eléctrico no es constante (con respecto al canal) a lo largo de al menos una parte del perfil del campo. En otras palabras, se aplica un gradiente de campo eléctrico variante en el tiempo (distinto de cero). Como resultado, los objetos se separan en bandas en movimiento que no se ensanchan con el tiempo.
- 30 Esto acaba con la necesidad de equipos de bombeo caros y complicados, y elimina los problemas asociados con el frente de velocidad parabólico encontrado en los sistemas convencionales. Además, la técnica se presta bien al uso de un gel como fluido de separación, dado que no se requiere flujo de fluido. El campo eléctrico particular y su variación dependerán de los tipos de objetos a ser separados y del fluido usado como medio de separación. Preferiblemente, sin embargo, el campo eléctrico es variado de tal manera que el perfil del campo se mueve en relación al canal de separación.
- 35 El perfil del campo podría cambiar en forma y/o intensidad mientras se mueve, pero más preferiblemente, el perfil del campo permanece sin cambios mientras se mueve en relación al canal de separación (es decir, mantiene su forma e intensidad). Por regla general, es conveniente que las bandas sean separadas a lo largo del canal, y por tanto es preferible que el campo eléctrico sea variado de una manera tal que el perfil del campo eléctrico se traslade a lo largo del canal de separación.
- 40 Como ya se describió, es ventajoso que el flujo de fluido pueda ser eliminado, y por lo tanto el fluido y el canal de separación sean sustancialmente estacionarios uno con respecto al otro.
- La forma particular del campo eléctrico aplicado será seleccionada según el rendimiento deseado del dispositivo. Según la invención, el perfil del campo eléctrico está conformado de tal modo que la fuerza neta experimentada por cada objeto, que resulta de la combinación de la fuerza eléctrica ejercida por el campo y la fuerza hidrodinámica ejercida por el fluido, es tal que la anchura de cada banda separada permanece sustancialmente constante con el tiempo.
- 50 El perfil del campo es tal que las bandas adquieren una anchura finita (típicamente a lo largo del canal de separación), y la difusión de los objetos en cada banda es limitada o confinada de tal modo que la anchura de las bandas no cambia con el tiempo, siempre y cuando las condiciones experimentales permanezcan iguales. En adelante, esto se denomina "difusión limitada".
- 55

Una vez que los objetos son separados en bandas, el campo eléctrico podría ser retirado. Sin embargo, es ventajoso continuar la aplicación del campo y variarlo de tal modo que, una vez que los objetos se han separado en bandas, cada banda se mueva con una velocidad terminal distinta de cero en relación al canal de separación. Esto mantiene una alta resolución, dado que las bandas continuamente en movimiento no se difunden a lo largo del tiempo.

- 5 En las separaciones electroforéticas convencionales, las bandas diferentes se mueven con velocidades terminales diferentes. En otras palabras, mientras se mueven a través del amortiguador o el gel, se separan más y más unas de otras. Suponiendo que el aumento en la distancia relativa es más rápido que el ensanchamiento de las bandas debido a la difusión, la resolución de la electroforesis aumenta, con longitudes de separación más grandes (es decir, canales de separación más largo). Sin embargo, las señales se debilitan con el tiempo debido a la difusión, y los canales de separación muy largos no son prácticos. Por lo tanto, en la práctica se puede producir “pérdida de bandas” cuando las bandas alcanzan el extremo del canal. En contraste, en la presente invención, es preferible que las bandas se muevan con una velocidad terminal sustancialmente igual. Por lo tanto la eficacia de separación no depende de la longitud del canal de separación, sino por el contrario de las características del campo eléctrico variante en el tiempo aplicado y las características del amortiguador de separación. Preferiblemente, la velocidad terminal de cada banda es esencialmente la misma, y por tanto el espaciado entre cada una es mantenido. Más preferiblemente, la velocidad terminal es constante a lo largo del tiempo.

El campo eléctrico aplicado es de la forma

$$E(x,t) = E((x - kt)^n)$$

- 20 donde x es una coordenada espacial, típicamente a lo largo del canal de separación, t es una coordenada temporal, n y k son cada uno números reales y n no es cero. En otras palabras, E(x, t) puede ser cualquier función de x-kt, incluyendo lineal, exponencial o un polinomio a la enésima potencia. Además, es ventajoso que al menos una parte del campo eléctrico sea monótonico con respecto a la distancia a lo largo del canal (x). Esto facilita la separación de moléculas de la muestra y el confinamiento de la difusión de bandas.

- 25 Convenientemente, el método comprende además las etapas de mezclar los objetos a ser separados con el fluido y colocar la mezcla en el canal de separación. Alternativamente, se podría colocar el fluido en el canal de separación y después insertar la muestra, comprendiendo la muestra al menos objetos a ser separados. La muestra podría comprender además fluido, que puede o no ser el mismo que el fluido ya contenido en el canal de separación. Estas etapas podrían tener lugar antes de la aplicación del campo eléctrico o una vez que el campo es establecido. En algunos aspectos de la carga de muestras, la muestra puede ser introducida en el canal mientras el campo está conectado. Esto es especialmente útil para separaciones en bucle cerrado. Por ejemplo, en secuenciación de ADN, tienen lugar cuatro inyecciones independientes en un único experimento de separación. Las inyecciones secuenciales pueden ser útiles en muchas aplicaciones, y aquéllas se producirían, de manera general, con el campo eléctrico conectado de antemano.

- 35 Preferiblemente, el método comprende además la etapa de detectar las bandas. Por regla general, se generan imágenes de las bandas. La generación de imágenes o la detección puede tener lugar después de haberse completado la separación o durante todo el proceso de separación. De hecho, pueden extraerse conclusiones útiles de los “perfiles crecientes” de las bandas como una función del tiempo. En particular, los perfiles crecientes de bandas en relación a las inyecciones secuenciales pueden ser muy útiles para correlacionar esas bandas con una inyección dada, por ejemplo en secuenciación de ADN.

- 40 Ventajosamente, el método comprende además la etapa de modificar el campo eléctrico, después de que los objetos se han separado en bandas, para ajustar el espaciado entre las bandas, el posicionamiento de las bandas o la resolución de las bandas. Esto se puede conseguir cambiando la forma del perfil del campo eléctrico, su intensidad o su posición a lo largo del canal de separación, por ejemplo. Esto se puede usar para ver un intervalo de bandas diferente, mover una banda a un punto particular a lo largo del canal de separación o ajustar el número de bandas que son resolubles, por ejemplo. En particular, el campo eléctrico puede ser modificado por cambios en su dependencia del tiempo y/o su intensidad.

Algunas aplicaciones implican retirar ciertos objetos separados de la mezcla de la muestra. En tales casos, es preferible que el método comprenda además la etapa de extraer una banda de interés del canal de separación después de que los objetos se han separado.

- 50 Ventajosamente, el método comprende además la etapa de hacer oscilar el campo eléctrico, causando que el movimiento de las bandas se invierta en dirección, moviéndose así las bandas hacia delante y hacia atrás a lo largo del canal de separación. Esto permite que se genere una imagen de cada banda o se detecte de otro modo repetidamente, y por tanto puede aumentar la sensibilidad del dispositivo para componentes en baja concentración. Esto se puede conseguir también causando que las bandas viajen en circuitos alrededor de un canal de separación de bucle cerrado.

- En otras realizaciones, el canal de separación es un bucle cerrado, y en este caso es preferible que el campo eléctrico aplicado sea periódico alrededor del bucle. En todas las realizaciones, los medios para aplicar el campo eléctrico podrían comprender cualquier aparato conformador de campos conocido, por ejemplo una resistencia variable a lo largo del canal. Preferiblemente, sin embargo, los medios para aplicar un campo eléctrico comprenden una pluralidad de electrodos espaciados a lo largo del canal de separación. Esta técnica permite una conformación precisa y elaborada del campo eléctrico, y se controla convenientemente variando el voltaje aplicado a cada electrodo individualmente. Es preferible que los electrodos estén espaciados del interior del canal de separación de tal modo que no conduzca corriente entre los electrodos y el fluido. Esto evita el flujo de corriente a través del fluido de separación, y por tanto impide un excesivo calentamiento de Joule, el cual puede conducir a un comportamiento errático en el sistema. Convenientemente, los electrodos comprenden tinta conductora impresa en o adyacente al canal de separación.
- Ventajosamente, al menos algunos de la pluralidad de electrodos están espaciados del interior del canal de separación por una capa de un material eléctricamente resistivo. De esta manera, el campo eléctrico establecido dentro del canal es más suave, menos distorsionado por los efectos locales de los electrodos. El material resistivo es preferiblemente un semiconductor o semiconductor dopado, lo más preferiblemente silicio dopado.
- Preferiblemente, el canal de separación es un capilar. Tales dimensiones permiten que el campo eléctrico sea controlado de manera precisa a través de la sección transversal del canal, y conducen a bandas bien definidas incluso con muestras de concentración baja. En una realización preferida, el canal de separación es rectilíneo. Alternativamente, el canal de separación podría estar en la forma de un bucle cerrado. Este podría ser sustancialmente circular o, preferiblemente, tener secciones lineales.
- Convenientemente, el canal de separación es grabado en un sustrato tal como una placa de vidrio. Esto proporciona una manera conveniente de implementar el dispositivo en una escala muy pequeña. Preferiblemente, el dispositivo es un dispositivo microfluídico.
- Ventajosamente, el dispositivo comprende una pluralidad de canales de separación, estando cada canal de separación provisto de medios para aplicar el campo eléctrico, y un controlador. El campo eléctrico aplicado a cada canal de separación podría ser elegido individualmente según los objetos a ser separados en cada canal. Preferiblemente, sin embargo, el campo eléctrico aplicado a cada canal de separación es controlado por el mismo controlador. Preferiblemente, los objetos a ser separados comprenden biomoléculas, proteínas, polímeros, ADN, ARN o células biológicas.
- Un ejemplo de un dispositivo y método de electroforesis de acuerdo con la presente invención será descrito ahora con referencia a las siguientes figuras.
- La Figura 1 es una representación esquemática de un dispositivo de electroforesis;
- Las Figuras 2a, b y c son gráficos que representan perfiles de campo eléctrico ejemplares y su variación con el tiempo;
- Las Figuras 3a y 3b son gráficos que ilustran las fuerzas a las que la partícula es sometida;
- La Figura 4 muestra la convergencia de la velocidad con el tiempo de una molécula ejemplar que sufre separación;
- La Figura 5 es un gráfico que ilustra la co-migración de partículas idénticas;
- La Figura 6 representa una primera realización de una parte de un dispositivo electroforético para separar objetos;
- La Figura 7 representa una segunda realización de una parte de un dispositivo electroforético para separar objetos;
- La Figura 8 representa una tercera realización de una parte de un dispositivo electroforético para separar objetos;
- La Figura 9 muestra la configuración de un canal de separación para una cuarta realización de un dispositivo electroforético para separar objetos;
- La Figura 10 ilustra la separación de bandas en un canal curvo sin corrección de velocidad;
- La Figura 11 ilustra la separación de bandas en un canal curvo con corrección de velocidad;
- La Figura 12 es un gráfico que ilustra un gradiente de campo eléctrico dual;
- La Figura 13 muestra una primera configuración de electrodos ejemplar;
- La Figura 14 muestra una segunda configuración de electrodos ejemplar;
- La Figura 15 muestra una tercera configuración de electrodos ejemplar;

- La Figura 16 muestra una cuarta configuración de electrodos ejemplar;
- La Figura 17 es una vista en sección transversal de la configuración ejemplar mostrada en la Figura 16, tomada a lo largo de la línea Q-Q’;
- 5 La Figura 18A representa esquemáticamente una parte de una quinta configuración de electrodos ejemplar en vista en planta;
- La Figura 18B muestra las líneas de campo eléctrico calculadas para la quinta configuración de electrodos;
- La Figura 18C es un gráfico que muestra la distribución de voltaje a lo largo del centro del canal representado en la Figura 18A;
- 10 La Figura 18D es un gráfico que muestra la distribución del campo eléctrico a lo largo del centro del canal representado en la Figura 18A;
- La Figura 19A representa esquemáticamente una parte de una sexta configuración de electrodos ejemplar en vista en planta;
- La Figura 19B muestra las líneas de campo eléctrico calculadas para la sexta configuración de electrodos;
- 15 La Figura 19C es un gráfico que muestra la distribución de voltaje a lo largo del centro del canal representado en la Figura 19A; y
- La Figura 19D es un gráfico que muestra la distribución del voltaje a lo largo del centro del canal representado en la Figura 19A;
- La Figura 20 muestra una primera realización de un detector para el uso con un dispositivo electroforético para separar objetos;
- 20 La Figura 21 muestra una segunda realización de un detector para el uso con un dispositivo electroforético para separar objetos;
- La Figura 22 representa esquemáticamente la etapa de introducir una muestra en un canal de separación usando técnicas convencionales;
- 25 Las Figuras 23 y 24 muestran dos métodos de introducción de una muestra en un canal de separación que se pueden emplear en el uso de un dispositivo electroforético como el descrito en la presente memoria;
- Las Figuras 25 a 28 son gráficos que ilustran la secuenciación de una cadena de ADN ejemplar;
- Las Figuras 29a, b y c son gráficos que representan dos bandas de ADN separadas bajo condiciones de electroforesis capilar convencional;
- 30 Las Figuras 30a, b y c son gráficos que representan dos bandas de ADN separadas bajo condiciones similares usando un dispositivo como el descrito en la presente memoria; y
- Las Figuras 31a, b y c representan dos bandas de ADN, que representan moléculas más largas, separadas bajo condiciones similares usando un dispositivo como el descrito en la presente memoria.
- 35 El dispositivo 1 electroforético comprende un canal 2 de separación, que podría ser implementado en un chip capilar o microfluidico por ejemplo, medios 3 para aplicar un campo eléctrico a lo largo del canal 2 de separación y un controlador 4 para controlar al menos el campo eléctrico. El canal 2 de separación contiene un fluido 9 que puede ser un amortiguador de elección o un gel, por ejemplo. Los objetos 10 a ser separados se suspenden dentro del fluido 9 en el canal 2 de separación. El dispositivo 1 puede estar provisto además de un detector 6, que puede comunicarse con el controlador 4, y orificios 7 y 8 de entrada y salida respectivamente, que también pueden ser controlador por el controlador 4. El controlador 4 a su vez genera una salida 5.
- 40 Como se describirá en más detalle más adelante, el canal 2 de separación podría tomar cualquier forma, incluyendo lineal o curvada. En algunas realizaciones, el canal de separación puede formar un bucle cerrado. Los medios 3 de aplicación del campo eléctrico podrían comprender electrodos conformadores de campo o una resistencia variable a lo largo del canal 2, por ejemplo. Los objetos a ser separados incluyen, de manera general, al menos algunos cuerpos cargados, y típicamente comprenden polímeros tales como proteínas, moléculas de ADN o moléculas de ARN u otros tipos de biomoléculas, tal como células biológicas. El fluido 9 de separación particular seleccionado dependerá de los objetos 10 a ser separados. Por ejemplo, el fluido podría ser un líquido tal como un amortiguador. Alternativamente, el fluido podría ser un gel. La fuerza friccional es similar a, pero no la misma que, la fuerza hidrodinámica, ya que obedece diferentes leyes. De hecho, se podría seleccionar cualquier matriz de fluido o de gel que pudiera generar fuerzas friccionales o hidrodinámicas sobre un objeto en migración (p.ej., una macromolécula).
- 45 Ventajosamente, se puede emplear un gel como medio de separación, lo que reduce la difusión no deseada de los
- 50

objetos separados aún más debido a su viscosidad aumentada. Esto, de manera general, no es posible en los sistemas convencionales que requieren un flujo de fluido constante.

5 En el funcionamiento, un campo eléctrico E es aplicado por los medios 3 conformadores de campo a lo largo del canal 2 de separación. El controlador 4 incluye un módulo 4a que controla los medios 3 de aplicación del campo eléctrico para inducir un campo eléctrico variante en el tiempo sobre el canal 2 de separación y su contenido. El campo eléctrico ejerce una fuerza F_e sobre cada objeto 10 que es proporcional a su carga q . Esto causa que el objeto 10 se mueva en relación al fluido 9, que induce una fuerza hidrodinámica (friccional) F_T sobre el objeto. Por ejemplo, tres objetos tales y las fuerzas sobre cada uno se muestran esquemáticamente en la Figura 1.

10 La variación en el tiempo del campo eléctrico se calcula para forzar a los objetos 10 en el canal 2 de separación a que empiecen a moverse y converger en bandas que se mueven a lo largo del canal 2 de separación y que no se difunden (ensanchan). Se pueden generar imágenes de las bandas en movimiento, o ser detectadas de otro modo, mediante un detector 6 que se comunica con otro módulo 4b de control. Si se desea, se pueden extraer bandas seleccionadas de interés del canal 2 de separación por medio de un orificio 8 de salida, también controlado por un módulo 4c del controlador 4.

15 La forma y características particulares del campo eléctrico se seleccionarán según el tipo de objetos 10 a ser separados y las propiedades del fluido 9 de separación. Sin embargo, en todos los casos, el campo eléctrico tendrá un perfil de campo. En otras palabras, el valor del campo eléctrico varía a lo largo de al menos una parte de la longitud del canal de separación, es decir, se emplea un gradiente de campo eléctrico variante en el tiempo. El campo eléctrico E variante en el tiempo aplicado al canal 2 es de la forma:

$$(1.1) \quad E(x,t) = E((x-kt)^n), n \in \mathfrak{R} \text{ y } n \neq 0, k \in \mathfrak{R}$$

25 donde x es la coordenada espacial (típicamente la distancia a lo largo del canal 2 de separación), t es el tiempo y n y k son números reales constantes (\mathfrak{R}).

30 Se entenderá que el campo eléctrico podría ser lineal o un polinomio de n -ésima potencia. Se muestran ejemplos esquemáticos de perfiles de campo lineales y no lineales en las Figuras 2a, 2b y 2c. El perfil del campo es monotónico, esto es, su primera derivada (con respecto a la distancia a lo largo del canal) no cambia de signo. Esto facilita la separación de moléculas de la muestra y el confinamiento de la difusión de bandas. El perfil debe tener el signo correcto en relación al parámetro k . El campo eléctrico es continuo a lo largo del perfil del campo, es decir, no hay saltos repentinos en el campo. Se debe hacer notar además que el perfil del campo puede moverse en cualquier dirección ($+x$ o $-x$) a lo largo del canal de separación.

35 Sólo a modo de ejemplo, los autores de la invención examinarán el caso más simple de un perfil de campo lineal donde $n=1$ (α y c se introducen como constantes):

$$(1.2) \quad E(x,t) = \alpha(x-kt+c), \alpha \in \mathfrak{R}, c \in \mathfrak{R}$$

40 Esta forma de campo se representa esquemáticamente en la Figura 2a para una serie de tiempos crecientes t_1, t_2 y t_3 . Nótese que el perfil de campo se mueve de manera efectiva a lo largo del eje x .

Para una partícula u objeto 10 con carga q , la fuerza eléctrica F_e es:

$$(1.3) \quad F_e(x,t) = qE(x,t)$$

45 En la presente invención, la partícula 10 se moverá dentro del fluido 9 y por lo tanto habrá una fuerza friccional (hidrodinámica) F_T , que se opone a su movimiento. Esta fuerza, en el caso simplificado general, será de la forma:

$$(1.4) \quad F_T(x,t) = fv(x,t), f > 0 \text{ y } f \in \mathfrak{R}$$

50 donde $v(x,t)$ es la velocidad de la partícula 10 y f es un coeficiente que describe la intensidad de la fricción y que

5 depende de la forma y tamaño de la partícula 10. Cuando es sometido a estas dos fuerzas, cada objeto 10 intentará migrar a su posición de equilibrio (energía más baja), en la cual $F_e - F_f = 0$. Esto se identifica como X^* en la Figura 3a, y se mueve con velocidad k . Por ejemplo, supongamos que dos partículas idénticas empiezan en las posiciones x_1 y x_2 (Figura 3b). En x_1 , la fuerza eléctrica es mayor que la fuerza eléctrica en X^* , que a su vez es mayor que la fuerza eléctrica en x_2 . Esto da como resultado velocidades separadas que son $v_1 > k > v_2$.

10 Por lo tanto, el objeto que empezó en x_1 se mueve más rápido que k y alcanza al punto en movimiento X^* (que se mueve con velocidad k). Mientras el objeto está alcanzando a X^* , se mueve relativamente al perfil de fuerza eléctrica hacia valores más bajos, y por lo tanto se decelera hasta que alcanza la velocidad k . Entonces su posición relativa al perfil de fuerza permanece constante y por lo tanto se mueve con velocidad terminal constante k desde entonces en adelante.

La Figura 3b muestra cómo dos partículas idénticas adquirirán velocidades adaptadas para co-migrar finalmente con velocidad k .

15 El objetivo ahora es calcular la velocidad $v(x,t)$ (relativa al canal de separación). Para un conjunto dado de condiciones iniciales de la partícula 10, sólo una coordenada es independiente, es decir, t . Por lo tanto, necesitamos calcular $v(t)$ y $x(t)$. La aceleración del objeto 10 depende de la fuerza neta que resulta de las influencias combinadas de la fuerza eléctrica y la fuerza friccional, las cuales se oponen típicamente una a la otra (véase la Figura 1). Esto da:

20 (1.5)
$$m \frac{dv(t)}{dt} = F_e(x,t) - F_f(x,t)$$

donde m es la masa de la partícula 10. Por sustitución, lo anterior se convierte en:

(1.6)
$$m \frac{dv(t)}{dt} = q\alpha(x - kt + c) - fv(t)$$

25 Diferenciando la ecuación anterior para t (y cambiando la notación) obtenemos:

(1.7)
$$mv''(t) = q\alpha[x'(t) - k] - fv'(t)$$

donde $x'(t) = v(t)$. Por tanto, lo anterior se convierte en una ecuación diferencial lineal de segundo orden:

30 (1.8)
$$mv''(t) + fv'(t) - q\alpha v(t) + q\alpha k = 0$$

que tiene la siguiente solución:

35 (1.9)
$$v(t) = k + Ae^{\frac{(-f + \sqrt{f^2 + 4q\alpha m})t}{2m}} + Be^{\frac{(f + \sqrt{f^2 + 4q\alpha m})t}{2m}}$$

donde A y B son constantes que dependen de las condiciones iniciales. El primer término puede ser potencialmente divergente para $t \rightarrow \infty$. Sin embargo, si se satisface la siguiente condición:

40 (1.10)
$$\begin{aligned} -f + \sqrt{f^2 + 4q\alpha m} &< 0 \\ \Rightarrow f^2 + 4q\alpha m &< f^2 \\ \Rightarrow q\alpha &< 0 \end{aligned}$$

el término izquierdo de (1.9) desaparece para $t \rightarrow \infty$.

Para $t=0$ podemos elegir la velocidad a ser v_0 :

(1.11)

$$v(0) = v_0$$

$$\therefore k + A + B = v_0$$

$$\Rightarrow B = v_0 - k - A$$

Necesitamos una condición inicial adicional para determinar A. Diferenciando la ec. (1.9) para $t=0$ obtenemos:

(1.12)

$$v'(0) = \frac{A(-f + \sqrt{f^2 + 4q\alpha m})}{2m} - \frac{B(f + \sqrt{f^2 + 4q\alpha m})}{2m}$$

Para $t=0$ por definición $x=x_0$ y la ec. (1.6) da:

(1.13)

$$v'(0) = \frac{q\alpha x_0 + q\alpha c - v_0 f}{m}$$

Equiparando (1.12) y (1.13) podemos solucionar para A:

(1.14)

$$A = \frac{Bf + 2c\alpha q + B\sqrt{f^2 + 4\alpha m q} - 2fv_0 + 2\alpha qx_0}{-f + \sqrt{f^2 + 4\alpha m q}}$$

Sustituyendo en la ec. (1.11) obtenemos la solución final para B:

(1.15)

$$B = \frac{-2c - fk + k\sqrt{f^2 + 4\alpha m q} + 2fv_0 - 2kx_0}{2\sqrt{f^2 + 4\alpha m q}}$$

Ahora hemos calculado ambos parámetros A y B en términos de las condiciones iniciales $\{t=0, x=x_0 \text{ y } v=v_0\}$ y por tanto ahora conocemos la velocidad $v(t)$ de la ec. (1.9).

Suponiendo que la condición (1.10) se mantiene, vemos que:

(1.16)

$$\lim_{t \rightarrow \infty} v(t) = k$$

por lo tanto la velocidad de la partícula 10 converge a una velocidad terminal que es igual al parámetro del campo k . Además, a partir de la ec. (1.16) observamos que la velocidad convergerá a k sin importar los valores de f, α, q y m . En otras palabras, todas las partículas de todas las formas, tamaños y carga eléctrica (a condición de que el signo de la carga esté alineado correctamente con el campo eléctrico como requiere la condición (1.10)) convergerán a la misma velocidad terminal k .

La Figura 4 muestra la aplicación de las ecuaciones de movimiento a una molécula con características arbitrarias. La velocidad converge a una meseta, que es la velocidad terminal.

A fin de diferenciar entre bandas, las partículas con diferentes características de forma y carga deben separarse físicamente unas de otras y formar bandas distinguidas. Convenientemente, todos los objetos 10 (y por tanto las bandas) deben alcanzar la misma velocidad terminal, que debe ser constante. Si todas las partículas 10 alcanzaran la misma velocidad terminal y co-migraran de un modo sobrepuesto, entonces el dispositivo no sería eficaz. La posición espacial de una partícula 10 es:

(1.17)
$$dx = v(t)dt$$

Sustituyendo la ec. (1.9) a lo anterior e integrando, obtenemos:

5

(1.18)
$$\int_{x_0}^x dx = \int_0^t \left(k + Ae^{\frac{(-f + \sqrt{f^2 + 4q\alpha m})t}{2m}} + Be^{-\frac{(f + \sqrt{f^2 + 4q\alpha m})t}{2m}} \right) dt$$

y así:

10

(1.19)
$$x(t) = x_0 + \frac{2Am \left(-1 + e^{\frac{(-f + \sqrt{f^2 + 4q\alpha m})t}{2m}} \right)}{-f + \sqrt{f^2 + 4q\alpha m}} + \frac{2Bm \left(1 - e^{-\frac{(f + \sqrt{f^2 + 4q\alpha m})t}{2m}} \right)}{f + \sqrt{f^2 + 4q\alpha m}} + kt$$

15

Una vez que la partícula 10 ha alcanzado la velocidad terminal, los términos exponenciales son muy pequeños, y la ec. (1.19) se convierte en:

(1.20)
$$x(t) = x_0 + \frac{-2Am}{-f + \sqrt{f^2 + 4q\alpha m}} + \frac{2Bm}{f + \sqrt{f^2 + 4q\alpha m}} + kt$$

20

Esto significa que cada partícula 10 se moverá una distancia determinada por su velocidad terminal más una cantidad fija que dependerá de las características de carga, masa y fricción de la partícula. Por lo tanto, las partículas diferentes migrarán con la misma velocidad pero a una distancia fija unas de otras.

Las partículas idénticas incluso co-migran si su origen x_0 es diferente. Esto se puede demostrar considerando dos partículas idénticas que parten de dos posiciones diferentes x_1, x_2 . Sustrayendo la ec. (1.20) para ambas partículas obtenemos:

25

(1.21)
$$x_1(t, m, q, f, x_1) - x_2(t, m, q, f, x_2) = 0, t \rightarrow +\infty$$

30

Por lo tanto, las partículas idénticas co-migrarán incluso si parten de un origen diferente a lo largo del canal de separación. La Figura 5 demuestra esto usando dos pares de partículas idénticas. Las partículas (1) y (4) comparten características eléctricas e hidrodinámicas similares, como lo hacen los objetos (2) y (3). Cada partícula en el par parte en una posición diferente a lo largo del eje x. Aplicando un campo variante en el tiempo apropiado, las partículas siguen trayectorias que hacen a las partículas idénticas co-migrar. Los pares diferentes se mueven con la misma velocidad pero a una distancia unos de otros. Controlando el parámetro de campo k y la intensidad α , la resolución (es decir, la anchura de las bandas y/o el espaciado a lo largo del eje x) del dispositivo puede ser ajustada. También el intervalo dinámico (el intervalo de características de carga, masa y fricción que serán resueltas) del dispositivo puede ser ajustado para una longitud dada del canal 2 de separación.

35

40

Se debe hacer notar que el escenario descrito anteriormente, incluyendo la naturaleza del campo eléctrico aplicado y la de la fuerza hidrodinámica sobre el objeto 10, es meramente ejemplar y pretende ilustrar los principios de la invención sin limitación. En la práctica, la forma del perfil del campo eléctrico se seleccionará según sea apropiado para las partículas 10 a ser separadas. Dependiendo de esta forma, el intervalo dinámico (en términos de carga y coeficiente de fricción) de los objetos que se separan con una resolución dada en una longitud de canal dada puede ser especificado.

45

Por ejemplo, si una muestra contiene objetos que ocupan los tamaños grandes (fricción y carga grandes) más escasamente comparado con los tamaños pequeños (fricción y carga pequeñas), entonces seleccionar un perfil de campo "cóncavo hacia abajo" tal como el mostrado en la Figura 2b "comprimirá" los tamaños más grandes más estrechamente, mientras que los tamaños más pequeños, más densamente poblados, serán puestos más

apartados. Esto consigue una resolución más alta en la región más densa donde se requiere, permitiendo al usuario "aumentar el enfoque" en una sección particular del tren de bandas. Qué secciones son comprimidas y cuáles son expandidas depende del signo de la curvatura del perfil del campo.

5 Común a todas las realizaciones, no obstante, es el uso de un perfil de campo eléctrico que, a lo largo del tiempo, se ajusta en relación al canal 2 de separación. Esto conduce a que los objetos 10 cargados son sometidos continuamente a una fuerza eléctrica que les comunica movimiento en relación al fluido 9. Como resultado, una fuerza hidrodinámica es aplicada continuamente por el fluido. Es una combinación de estas fuerzas la que conduce a una separación eficaz y, de manera importante, a bandas que no se difunden con el tiempo.

10 En la realización, no hay flujo del fluido 9 a través del canal 2. Esto elimina los problemas asociados con un frente de velocidad parabólico discutido previamente, y permite al dispositivo conseguir una resolución mucho más alta. La necesidad de una red de bombeo cara también es eliminada.

15 Dicho esto, el flujo del fluido puede ser establecido (intencionada o no intencionadamente) en el canal por flujo electroosmótico ("EOF", por sus siglas en inglés). Este es un fenómeno causado por la combinación del campo eléctrico aplicado con las propiedades eléctricas del fluido y las de la superficie interna del canal de separación. Como en los sistemas de electroforesis convencionales, el EOF es detenido o controlado hasta un valor óptimo (que puede ser cero) por la selección de una química de superficies apropiada. Las interacciones entre las paredes del canal y el fluido son controladas químicamente tratando las paredes del canal. La configuración del campo eléctrico también puede ser modificada para tener en cuenta el EOF.

20 Las Figuras 6, 7 y 8 muestran tres implementaciones preferidas. El canal 2 de separación puede estar provisto en varias formas diferentes, aunque en cada caso es preferible que esté dispuesto sustancialmente en horizontal (es decir, el canal 2 debe yacer en un plano horizontal). Esto evita las fuerzas gravitacionales que interfieren con los procesos fluídicos. En la realización de la Figura 6, el canal 2 de separación es un tubo capilar que, en el uso, contiene el fluido 9 y una muestra que incluye los objetos 10 a ser separados. Una sección del canal 2 de separación está rodeada por una serie de electrodos 3a a 3e anulares, que proporcionan los medios 3 para aplicar un campo eléctrico a lo largo del canal 2. El voltaje en cada electrodo 3a a 3e es controlado por el controlador 4 (Figura 1). Se debe hacer notar que el número de electrodos representado en las Figuras es meramente ejemplar.

25 La Figura 7 muestra una segunda realización en la que está dispuesto un canal 2 de separación microfluídico en la forma de un canal grabado en un sustrato 12. El sustrato 12 podría ser una placa de vidrio, cuarzo o polidimetilsiloxano (PDMS) o un chip semiconductor por ejemplo. Una matriz de electrodos 3a, 3b, 3c, etc. está dispuesta a lo largo del canal 2 de separación, y forma los medios 3 para aplicar un campo eléctrico a lo largo de al menos una sección del canal 2 de separación. Los pocillos 7 y 8 proporcionan orificios de entrada y salida para introducir la muestra en el canal 2 de separación y/o extraer partes de ella del canal 2. Esto será descrito en más detalle más adelante.

30 Los electrodos 3a, 3b, 3c, etc. son controlados por un controlador 4 para proporcionar un campo eléctrico dependiente del tiempo. Los objetos que están dentro del canal de separación se separan para formar bandas dentro del canal de separación moviéndose con una velocidad (preferiblemente) constante. En las implementaciones lineales descritas anteriormente, se puede hacer que el campo eléctrico oscile de tal modo que las bandas se muevan hacia delante y hacia atrás a lo largo del canal 2, permitiendo la detección múltiple de la misma banda. Esto puede aumentar la sensibilidad para componentes en baja concentración.

35 Como una alternativa a las implementaciones lineales, el canal 2 de separación podría ser provisto en la forma de un bucle cerrado, un ejemplo del cual se muestra en la figura 8. El bucle podría ser circular (es decir, tener una vista en planta circular como se muestra en la Figura 8), pero puede de hecho ser beneficioso que el canal 2 tenga secciones rectas, especialmente en la región de detección. Los electrodos 3a, 3b, 3c...3p están provistos a intervalos alrededor del canal 2 para constituir los medios 3 generadores del campo. De manera general, los electrodos están colocados de una manera simétrica, como se muestra en la Figura 8. El voltaje aplicado también puede ser simétrico, como indican los valores V_0 a V_8 mostrados en la Figura 8.

40 Cuando un campo eléctrico variante en el tiempo es aplicado, los objetos 10 (suponiendo que tienen carga del mismo signo) se separan bien en el semicírculo izquierdo o bien en el derecho, moviéndose bien en el sentido de las agujas del reloj o bien en sentido contrario a las agujas del reloj. Las moléculas en el semicírculo opuesto no se separan sino se mueven de una manera errática hasta que entran en el otro semicírculo. Esto es porque las moléculas en un semicírculo experimentarán un gradiente de campo eléctrico que está incorrectamente alineado con el vector k dependiente del tiempo. Un conjunto dado de parámetros de campo eléctrico sólo permitirá separar un intervalo de valores de carga y fricción en una longitud de separación dada. Cuando las moléculas en migración que caen dentro de este intervalo han completado un círculo completo, todas estas moléculas se mueven en sincronía y son separadas en bandas. El tren de bandas resultante gira continuamente alrededor del canal 2 y puede ser detectado repetidamente.

El canal 2 de separación puede ser recto o curvo o una combinación de ambos. Los mismos principios se aplican a cada configuración, aparte de una corrección de velocidad que se necesita para canales curvados (véase más

adelante). La Figura 9 muestra una red ejemplar de una realización que tiene canales tanto rectos como curvados. En este ejemplo, la separación tiene lugar en los canales 13, 14 circulares. Una estrategia de separación podría ser que haya muchos círculos concéntricos (o muchos canales lineales paralelos) que estén conectados fluidicamente en varios puntos. Los parámetros de campo en el círculo 13 exterior (o primer canal lineal) se ajustan para condiciones iniciales dadas, para conseguir una separación inicial en este canal que quizá muestra el dibujo grande (espacio fricción-carga ancho). Después, ventanas individuales de este espacio son cortadas mientras pasan junto a los canales 15 de transporte (véase la Figura 9) y son transportadas a un canal 13' de separación vecino con diferentes ajustes para el campo eléctrico para enfocar la separación a este ventana seleccionada de fricción-carga. De esta manera se pueden seleccionar muchas ventanas y transportar a diferentes canales de separación con ajustes de campos que optimizan la separación de esta parte específica de la muestra. La secuenciación de ADN, por ejemplo, puede ser dividida automáticamente en intervalos de pares de bases y secuenciada por separado hasta una lectura de pares de bases muy alta.

Pueden estar implicadas otras estrategias con diferentes macromoléculas. Por ejemplo algunos anillos 16 pueden ser marcados como anillos de almacenamiento en los que las proteínas separadas son transportadas y almacenadas en un entorno amortiguador deseable. Se podrían usar otros anillos 17 como canales de mezcla. También puede haber "anillos de reacción" (o canales), en los que las macromoléculas transportadas son expuestas a productos químicos deseados, donde reaccionan mientras se mueven a lo largo del canal de separación. El producto de la reacción química puede ser separado automáticamente de la molécula parental mediante el principio de separación estándar, y visualizado en tiempo real mientras la reacción está ocurriendo.

Además, la temperatura y otros parámetros ambientales pueden ser controlados en cada anillo (canal) a fin de tener reacciones controladas. Por ejemplo, el plegado de proteínas puede ser monitorizado aumentando la temperatura gradualmente en un canal donde se separan proteínas. A una temperatura dada, las proteínas se desplegarán, y este evento será observado mediante la alteración de las características electrocinéticas de esas proteínas mientras se mueven a lo largo del canal de separación.

Los pocillos de recogida e inyección de muestra pueden estar situados en posiciones seleccionadas a lo largo de los canales o anillos de separación para los siguientes propósitos (entre otros): llenado del canal con gel o amortiguador, lavado del canal con productos químicos, inyección de muestra, recogida de muestra y otros.

En canales de separación curvados (por ejemplo circulares), las moléculas que se mueven en el perímetro exterior del canal deben moverse más rápido que las moléculas que se mueven en el perímetro interior para permanecer en fase y que se formen bandas coherentes. Si no se aplica tal corrección de velocidad, las moléculas que se mueven cerca del perímetro exterior llegan a estar fuera de fase con aquellas en el perímetro interior, y las bandas forman un patrón espiral que se expande (Fig.10). Esto puede ser impedido empleando electrodos en cada lado del canal circular. Los medios 3 de aplicación del campo eléctrico se controlan de tal modo que los electrodos exteriores implementarán el campo variante en el tiempo con un parámetro ligeramente más alto k_{exterior} comparado con k_{interior} que es producido por los electrodos interiores. En la mayoría de los casos, es suficiente que los electrodos interiores y exteriores en la misma posición angular estén en fase, es decir, lleven el mismo voltaje en cualquier caso. Cuando se aplican diferentes voltajes a los electrodos interiores y exteriores, debido a la pequeña distancia entre los electrodos exteriores e interiores, los ligeramente diferentes campos se interpolan entre los dos electrodos creando valores de campo intermedios para la ubicaciones entre el perímetro exterior e interior, dando como resultado bandas coherentes como se muestra en la Figura 11.

Se debe hacer notar que si los electrodos se extienden radialmente (es decir, cada electrodo está dispuesto para intersecar el perímetro interior y exterior del canal de separación, y puntos hacia el centro de curvatura), también se puede conseguir una corrección automática de k . Esto es porque el tren de voltajes en los electrodos completará un ciclo entero en un periodo de tiempo dado, sin importar la posición radial.

Se apreciará que se requiere una distribución de voltaje no lineal para establecer un perfil de campo eléctrico (como se describe anteriormente) dentro del canal de separación. A fin de implementar esto en cada una de las realizaciones anteriores, se propone que el perfil de campo eléctrico variante en el tiempo sea aplicado a lo largo del canal de separación por una matriz de electrodos 3a, 3b, 3c etc. Los electrodos pueden estar en contacto no eléctrico con el amortiguador de separación, pero muy cerca de él. Tal matriz de electrodos generaría un campo eléctrico estático dentro del canal de separación. La ventaja de esta configuración es que, en primer lugar, el consumo de energía de la fuente de alimentación es muy bajo, ya que no fluye corriente eléctrica entre los electrodos. En segundo lugar, los electrodos pueden ser colocados a una (pequeña) distancia del canal de separación a fin de suavizar los efectos locales sobre el campo causados por la naturaleza discreta de una matriz de electrodos. De hecho, cuanto más lejos estén los electrodos del canal de separación, más suave es el campo eléctrico dentro del canal.

Sin embargo, hay una desventaja con esta configuración. La aplicación de un campo estático sobre un dieléctrico polar, como un amortiguador acuoso, es atenuada por el coeficiente dieléctrico, que para disoluciones acuosas es usualmente alrededor de 80. Para una generación eficaz del campo dentro del fluido, se tiene que tener en cuenta la velocidad de cambio del campo, la constante dieléctrica y la conductividad del medio. Por regla general, el campo eléctrico que es generado dentro del agua es 80 veces más pequeño que el campo que se habría generado en el

aire (coeficiente dieléctrico 1) por la misma carga eléctrica. Esto significa que en algunas configuraciones del dispositivo, se necesitaría aplicar un voltaje muy alto. Esto requeriría suministros AV especiales y una cuidadosa consideración del material dieléctrico donde se implantarían los electrodos, para evitar la ruptura dieléctrica y la formación de chispas entre los electrodos. Este problema puede ser evitado mediante el uso de electrodos que estén en contacto eléctrico con el amortiguador de separación. Es mucho más fácil generar campos eléctricos altos generando una corriente eléctrica en un amortiguador de separación conductor.

A fin de mejorar la generación del campo, se puede emplear una combinación de electrodos externos (sin contacto) e internos. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 12, en la mayoría de los casos el gradiente de campo a lo largo de un canal en cualquier instante de tiempo consiste en una parte constante y una parte variante. El campo constante E_0 (que en la mayoría de los casos será el más grande por mucho) se puede alcanzar mediante la aplicación de un voltaje entre dos electrodos, 3_x y 3_y , en los extremos opuestos del canal de separación. Después se puede añadir el gradiente E_n mediante una matriz de electrodos externos a lo largo del canal de separación mostrado en las Figuras 13 y 14. En la Figura 14 los electrodos, 3_a , 3_b , 3_c etc son externos, es decir, cercanos pero no en contacto con el fluido, y los electrodos $3'a$, $3'b$, $3'c$ etc son internos, es decir, en contacto eléctrico con el fluido.

En el caso de un canal circular, no está claro cuales son los “extremos” de la separación. De hecho, los dos electrodos internos opuestos tienen que girar alrededor del canal en fase con la separación. Por lo tanto se necesita una matriz de electrodos internos en este caso. Nótese que, en principio y en cada instante de tiempo, sólo dos de los electrodos internos llevarán voltaje. Esos dos electrodos pueden estar en posiciones diametralmente opuestas. La Figura 15 muestra tal configuración de electrodos internos y externos alternantes. Los electrodos externos generan un gradiente de campo estático que es dependiente del tiempo y crea el principio de separación especial del dispositivo. El campo estático se añade al campo constante creado por los electrodos internos.

La Figura 14 muestra una disposición de electrodos internos y externos alternantes a lo largo de un canal microfluídico. Nótese que ambos electrodos internos y externos pueden estar dispuestos a lo largo de cada lado de un canal de separación, o pueden rodearlo herméticamente para conseguir el campo eléctrico más suave posible a lo largo del canal.

Es posible crear el campo eléctrico únicamente mediante una matriz de electrodos internos. Sin embargo, se espera que los electrodos que estén en contacto eléctrico con el amortiguador de separación creen distorsiones significativas en el campo eléctrico en el lugar de cada electrodo a lo largo del canal. Las moléculas en separación pasarían a una proximidad muy cercana (contacto) de los electrodos, “sintiendo” las distorsiones del campo. Esto degradaría la resolución. En el caso de generar sólo un campo constante usando sólo dos electrodos en cada extremo del canal (electroforesis convencional), el mismo problema no existe, porque las moléculas se separan entre los electrodos y no están nunca en cercana proximidad a ellos.

De hecho, dado que las variaciones del campo eléctrico a lo largo del canal son muy sutiles, en algunos casos las distorsiones causadas por una matriz de electrodos internos pueden tener un impacto significativo sobre el principio de separación del sistema descrito en la presente memoria. Además, el tamaño longitudinal de los electrodos puede jugar un importante papel. Por ejemplo, si suponemos electrodos planos de aproximadamente 100 μm de longitud (a lo largo del canal), el campo eléctrico entre dos electrodos opuestos con el mismo voltaje será cero. Esto es porque el voltaje no está variando longitudinalmente (a lo largo del canal) en el espacio entre electrodos opuestos, y por lo tanto el campo eléctrico tiende a caer a cero en ese área. Esto exacerba la distorsión local causada por los electrodos internos.

Sin embargo, como se discutió anteriormente, el uso de electrodos internos tiene una ventaja significativa en el sentido de que requiere una electrónica mucho más simple y voltajes más bajos.

Una manera de reducir las distorsiones locales causadas por los electrodos internos es emplear un medio resistivo entre los electrodos y el gel en el canal de separación. Por lo tanto, en un ejemplo adicional, se podrían disponer múltiples puntos de electrodo a lo largo del canal, conectados con un material que tuviera una resistencia eléctrica. Se aplica una matriz de voltajes en cada punto, y la resistencia entre los puntos interpola los campos entre dos puntos, creando un campo más suave. La Figura 16 muestra un ejemplo de tal configuración en la que se usan dos capas 11 semiconductoras para sustituir las paredes laterales del canal 2. Los electrodos $3''a1$, $3''a2$, $3''b1$, $3''b2$ etc están posicionados en el exterior de estas capas 11 resistivas, las cuales tienen el efecto de suavizar el campo eléctrico generado dentro del canal 2 de separación. El material 11 resistivo podría ser silicio dopado o cualquier otro medio que tuviera las propiedades deseadas en términos de resistividad y constante dieléctrica. Los semiconductores dopados son atractivos porque la resistividad puede ser controlada sobre muchos órdenes de magnitud. Además, tales materiales tienden usualmente a ser biocompatibles (es decir, químicamente inertes), y para el silicio especialmente, las tecnologías disponibles para crear microestructuras son baratas y ampliamente disponibles.

La Figura 17 muestra una sección transversal de la configuración ilustrada en la Figura 16 a lo largo de la línea Q-Q'. El canal 2 de separación, que contiene el medio 9 de separación, se muestra en el centro de la sección transversal, con una capa de material 11 resistivo dispuesta en cada lado. Los electrodos interiores y exteriores $3''a1$ y $3''a2$

están situados en los lados exteriores de las capas 11 resistivas, de tal modo que el material resistivo está entre los electrodos 3''a1, 3''a2 y el canal 2 de separación.

5 Los autores de la invención han usado un algoritmo de elementos finitos para calcular la forma del campo y su suavidad con y sin las capas 11 resistivas. En un primer ejemplo, se pusieron electrodos de platino en las paredes laterales del canal 2 de separación, sin capas 11 resistivas. La distancia entre los electrodos fue 1 mm y su tamaño longitudinal (dirección z) fue 100 μm. La Figura 18A muestra esta disposición en una vista en planta, que ilustra el canal 2 de separación lleno de gel y tres pares de electrodos 3''a1, 3''a2 etc. en contacto eléctrico con el gel 9. La Figura 18B muestra los vectores del campo eléctrico dentro de una sección del canal 2 de separación calculados por el algoritmo de elementos finitos. Es evidente que en las proximidades de los electrodos hay una desviación significativa del campo de la dirección longitudinal.

10 La Figura 18C muestra la distribución de voltaje a lo largo del centro del canal 2 (a lo largo de la línea que está colocada en el centro de la sección transversal del canal 2 y corre paralela a la dirección x). El intervalo de voltaje es consistente con el intervalo de valores unidos a los electrodos (0 a 700 V). La forma de la línea sigue la ecuación

15 (2.1)
$$V = \frac{1}{2} kx^2 + cx$$

lo que da un campo lineal

20 (2.2)
$$E = -kx - c$$

Sin embargo, la Figura 18D, que representa la correspondiente distribución del campo eléctrico longitudinal a lo largo del canal, muestra que las distorsiones del campo eléctrico en la vecindad de los electrodos son muy evidentes.

25 En un segundo ejemplo, mostrado en vista en planta en la Figura 19A, están colocadas capas 11 resistivas de 1 mm de grosor en los lados del canal 2 de separación, que esencialmente forman las paredes del canal 2. La resistividad del material en este ejemplo es 80 Ωm. Los electrodos 3''a1, 3''a2 son de 20 μm de ancho (a lo largo de la dirección z), y están colocados en intervalos de 1 mm a lo largo de la pared exterior del material 11 resistivo. La Figura 19B muestra los vectores del campo eléctrico calculados para esta configuración. Se puede ver que las distorsiones del campo están confinadas dentro de las capas 11 resistivas, y los vectores del campo eléctrico dentro del canal 2 de separación están apuntando predominantemente a lo largo de la dirección z. La Figura 19C muestra la distribución de voltaje a lo largo de una línea en el centro del canal 2 que corre paralela a la dirección x. De nuevo, el intervalo de voltaje es consistente con el voltaje de los electrodos, y la distribución de voltaje sigue una ley de potencia de segundo orden. La Figura 19D muestra la forma del campo eléctrico, que está ahora libre de las intensas oscilaciones generadas con la configuración mostrada en la Figura 18.

35 También se pueden colocar electrodos internos en posiciones estratégicas cerca de canales de transporte para desplazar bandas de proteínas o ADN fuera del canal de separación y transportarlas a canales vecinos de anillos de separación. Por ejemplo, en la configuración mostrada en la Figura 15, se puede usar la misma matriz de electrodos internos para el doble propósito de aplicar el campo constante y para desplazar bandas desde el anillo de separación hasta el canal de transporte en el camino a otro anillo o pocillo de recogida.

40 Los medios 3 de aplicación del campo eléctrico pueden consistir en cables conductores fijados a lo largo del canal 2 de separación (o las capas 11 resistivas). Alternativamente, los electrodos pueden ser producidos usando métodos de grabado similares a placas electrónicas PCB o usando tinta conductora. Este último método es especialmente atractivo, ya que se pueden imprimir electrodos muy finos en configuraciones complejas. El campo eléctrico también podría ser aplicado por medio de una resistencia variante a lo largo del canal. También sería posible proveer una matriz móvil de electrodos, u otros medios generadores de campos, que podrían ser controlados para moverse en relación al canal 2 de separación.

45 En cada una de las realizaciones descritas anteriormente, el dispositivo de electroforesis puede estar provisto de un detector 6 para detectar las bandas de objetos separados una vez que se han formado. Por regla general, el detector 6 genera una imagen de las bandas separadas. Puede haber una variedad de sistemas generadores de imágenes que son más adecuados para requerimientos diferentes, p.ej. coste, precisión, y muestras diferentes. La posibilidad de ejecutar muestras exentas de marcas (sin teñir) es, de manera general, la opción más atractiva, ya que deja a las muestras sin modificar hasta cierto punto. Además, el uso de tinciones es indeseable, dado que las sustancias que se unen a ADN o proteínas también se adherirán, de manera general, a un usuario. Además, los costes son más bajos, dado que se elimina una etapa de preparación. También, el tiempo de preparación se reduce

por la misma razón.

Se describirán ahora dos métodos para la detección exenta de marcas. Las Figuras 20 y 21 muestran implementaciones ejemplares de técnicas de absorción UV y Fluorescencia Inducida por Láser (LIF, por sus siglas en inglés) respectivamente. Se debe hacer notar que también se pueden emplear para la generación de imágenes otras configuraciones que impliquen detección por fluorescencia para muestras teñidas. En general, los patrones de luz, ya sean de absorción o fluorescencia, pueden ser detectados por un fotodiodo, detector de píxeles (CCD, por ejemplo) o fotomultiplicador (PMT).

La Figura 20 muestra una configuración de absorbancia UV. Una fuente 20 de luz UV emite luz que pasa a través de la lente 21 condensadora, la lente 23 de enfoque y la lente 25 generadora de imágenes. La luz es filtrada por el filtro 22 de interferencia y enfocada en el canal 24 microfluídico. La imagen de absorción es detectada por un fotodiodo o detector 26 de píxeles y digitalizada por un PC 27.

La Figura 21 muestra una configuración de fluorescencia inducida por láser (LIF). Un láser 30 emite longitudes de onda UV a 30' en el canal 34 microfluídico y causa que las macromoléculas en las bandas que se están separando fluezcan a una longitud de onda. El filtro 32 de interferencia es sintonizado a esta ventana de longitud de onda. El fotodiodo 31 está colocado en un ángulo en relación con la línea del láser. La óptica 33 permite al fotodiodo detectar una sección cónica de la luz de fluorescencia. La señal de emisión es digitalizada por un PC 35.

En cada caso, la señal es transferida a un ordenador 27 o 35 que contiene un Convertidor Analógico a Digital (ADC, por sus siglas en inglés) que es responsable de la digitalización de la señal. Un software de control analiza las imágenes en tiempo real.

En la electroforesis convencional, como se menciona anteriormente, la distancia relativa entre las bandas aumenta con el tiempo, porque se mueven con diferentes velocidades terminales. Por lo tanto, es lógico generar imágenes de sólo la última sección de la separación, donde las bandas han alcanzado su distancia relativa máxima. En contraste, el método propuesto consigue la separación muy pronto, por lo tanto la generación de imágenes puede tener lugar en cualquier punto a lo largo del canal de separación o incluso, se pueden generar imágenes de muchos puntos a lo largo del canal de separación usando un detector de píxeles dispuesto longitudinalmente a lo largo del canal de separación. El detector puede ser interrogado por la electrónica de lectura (que puede estar incorporado en el controlador 4) muchas veces por segundo, dando así una matriz de fotogramas que describen con exactitud el movimiento de las bandas a lo largo del canal. Tener una multitud de píxeles a lo largo del canal de separación no es necesario en la mayoría de las realizaciones, sin embargo en algunas ocasiones puede ser ventajoso tener una imagen dinámica de la separación en curso. En otras realizaciones, se puede usar un CCD para generar imágenes de un área más grande de un sistema microfluídico o capilar multicanal. El detector y la óptica generadora de imágenes pueden ser dispuestos de una manera tal que se generen imágenes simultáneamente de una multitud de canales de separación en los que están teniendo lugar ejecuciones simultáneas. Esto hace más fácil realizar análisis comparativos entre los diferentes canales, en tiempo real o después de que se hayan completado las ejecuciones de separación. Una ventaja adicional de usar tal disposición de óptica y detector es que puede estar implicado sólo un circuito de lectura, ayudando a reducir el ruido sistemático inducido en la generación de imágenes por circuitos múltiples.

Los orificios 7 de entrada están provistos típicamente en la forma de pocillos, dispuestos para la recepción de una muestra inyectada. Los orificios 8 de salida comprenden típicamente pocillos equipados con electrodos que pueden ser activados por el controlador 4 a fin de extraer los componentes deseados fuera del canal de separación y hacia el orificio de salida cuando la parte seleccionada de la muestra pase delante del punto de salida.

Está previsto además que el dispositivo pueda estar provisto de más que un canal 2 de separación. En este caso, cada canal estaría provisto de medios 3 para aplicar un campo eléctrico a lo largo de ese canal y un controlador para controlar el campo. Convenientemente, un controlador podría controlar varios (o todos) de los canales y también puede ser posible compartir los medios de aplicación del campo entre canales. Cada canal podría estar provisto de un detector y orificios de entrada y salida como se describió previamente.

Cada canal podría ser controlado para experimentar la misma variación de campo eléctrico. Sin embargo, si el contenido de cada canal es diferente, puede ser beneficioso controlar el campo aplicado a cada canal individualmente.

Se describirá ahora el funcionamiento del dispositivo electroforético, según cualquiera de las realizaciones anteriores. En la siguiente descripción, el término "muestra" se usa para describir una mezcla de los objetos 10 a ser separados con un volumen del fluido 9 de separación. Por regla general, la muestra se prepara mezclando los objetos a ser separados con el fluido, y este se usa después para llenar el canal 2 de separación. Los objetos típicos a ser separados incluyen macromoléculas, biomoléculas o polímeros tales como proteínas, moléculas de ADN o células biológicas. El fluido de separación puede ser un amortiguador (composición de ejemplo: Tricina, albúmina de suero bovino y n-octilglucósido) o un gel tal como poliacrilamida.

Una ventaja adicional de este dispositivo sobre las técnicas electroforéticas o cromatográficas estándar es el hecho de que no se requiere un tapón de inyección de muestras. En la electroforesis capilar convencional por ejemplo,

- cuando tiene lugar la inyección de muestra, entonces, en primer lugar, un extremo del capilar es sumergido en un recipiente que contiene una disolución de ADN o proteínas. Después se sumergen también los electrodos en el recipiente de la muestra y el recipiente de desecho para formar un circuito cerrado a través del capilar. El campo eléctrico que se forma arrastra una cantidad de ADN o proteína hacia el capilar. La aplicación del voltaje se detiene, y el recipiente de muestra se sustituye por un recipiente que sólo contiene una disolución salina. Se vuelve aplicar el voltaje y el pequeño tapón 40 de muestra (Fig. 22) que se había formado en la entrada del capilar empieza a moverse y a separarse. Este es el método estándar para la inyección de muestras. Nótese que las bandas 41 separadas están directamente influenciadas por la anchura inicial del tapón de muestra. Esta anchura es aumentada adicionalmente por difusión térmica.
- El presente dispositivo sin embargo no necesita un tapón de muestra como tal. La muestra de ADN o proteína puede ser mezclada con el gel o amortiguador antes de su introducción en el capilar (Figura 23). Alternativamente, el canal 2 de separación podría ser llenado previamente con el fluido 9, y los objetos 10 o muestra a ser separados introducidos en una etapa posterior antes del comienzo del proceso de separación. Una gota 43 de muestra puede ser introducida aleatoriamente en cualquier parte a lo largo del canal de separación (Figura 24). La gota 43 de muestra se difunde en el fluido 9 sobre un área 44. El campo variante en el tiempo “recogerá” todas las moléculas de la muestra y las distribuirá en bandas 42 a lo largo del canal con alta resolución. Tal inyección “aleatoria-incoherente” es ineficaz en los procesos cromatográficos o electroforéticos estándar. La razón es que no hay un mecanismo para hacer una banda coherente si se parte de una incoherente. De hecho el tamaño del tapón de inyección es un asunto crucial, ya que afecta directamente a la resolución.
- Por ejemplo, los dispositivos comerciales actuales emplean inyección electrocinética (como se describe anteriormente, Figura 22) o inyección por presión (en lugar de usar voltaje para arrastrar el tapón, se usa presión). La razón por la que se usan dos métodos diferentes es precisamente porque cada método da una resolución ligeramente mejor en configuraciones diferentes.
- El dispositivo descrito en la presente memoria no es dependiente de ningún tapón de inyección tal. Esto es porque permite métodos de inyección alternativos comparado con la tecnología estándar. La muestra puede ser cargada en el canal de separación bien mezclándola de antemano con el amortiguador (o gel) de separación, o inyectándola por presión a través de un pocillo de entrada. Alternativamente, la muestra puede ser colocada dentro de un pocillo o recipiente e inyectada en el canal de separación usando inyección electrocinética estándar. Esto significa que un electrodo se sumerge en el pocillo que contiene la muestra, y existe un electrodo en el otro extremo del canal de transporte. Aplicando un voltaje apropiado entre los electrodos, la muestra es atraída eléctricamente fuera del pocillo, a través del canal de transporte y hacia el canal de separación.
- Un método de inyección alternativo aprovecharía la ventaja de la naturaleza especial del dispositivo, que no requiere un tapón de inyección coherente. Simplemente se coloca una gota de muestra mediante un instrumento similar a una jeringa en cualquier punto a lo largo del canal de separación, simplemente en la superficie del amortiguador o gel (véase la Figura 24). Posteriormente, la gota se difundirá incoherentemente en la región 44 del amortiguador cercana al punto de inyección. Una vez que la gota se colocó en el amortiguador, mientras se difunde a través de él el campo eléctrico variante afectará inmediatamente a las moléculas y el proceso de separación habrá sido iniciado.
- El instrumento de tipo jeringa puede ser transferido a una parte expuesta del canal de separación, bien a mano o bien automáticamente mediante un brazo robótico que es controlado por un software especial.
- Un campo eléctrico que tiene un perfil de campo de forma e intensidad apropiadas es aplicado por los medios 3 de generación de campo a lo largo del canal 2 de separación. El campo eléctrico es variado por el controlador 4 para producir una dependencia del tiempo que ajusta el campo en relación al canal de separación y causa así que las moléculas se separen en bandas como se describió previamente. Entonces se pueden generar imágenes de las bandas, o detectarse de otro modo, mediante el detector 6, y el dispositivo genera una salida 5 correspondiente. La detección o generación de imágenes podría tener lugar después de la formación de bandas o durante la separación. La evolución de la señal con el tiempo da información extra, un ejemplo de la cual es el “tiempo de reacción”. Por ejemplo, si se añade una muestra polimérica a un entorno amortiguador en el que tiene lugar una reacción química y se forman bandas adicionales, entonces el “tiempo de aparición” de la banda adicional (producto de reacción) puede dar información acerca de las características de esta reacción. También el “plegado de proteínas” es un evento dependiente del tiempo, y podría por tanto ser monitorizado de manera útil mientras tiene lugar.
- Una vez que los objetos 10 son separados en bandas, las propias bandas pueden ser manipuladas mediante un ajuste adicional del campo eléctrico. Ajustando la dependencia del tiempo y la intensidad del campo, así como la forma del perfil del campo, la resolución y espaciado de las bandas pueden ser ajustados como se desee. Las bandas también pueden ser reposicionadas, por ejemplo para permitir que una banda particular de interés sea extraída en uno de los orificios de salida.
- En algunas aplicaciones, es útil controlar el campo eléctrico aplicado de un modo tal que las bandas (u objetos en separación) se muevan repetidamente pasado el detector. Un inconveniente adicional de los métodos de electroforesis o cromatografía convencionales es que sólo se pueden generar imágenes de las bandas en el único momento en que pasan por delante de un detector dado. En esta técnica, sin embargo, se pueden generar

imágenes de la misma banda una multitud de veces aumentando de manera efectiva el “camino óptico” para la generación de imágenes de absorción. La generación de imágenes de absorción es muy conveniente, porque las moléculas en las bandas no necesitan ser teñidas con una marca fluorescente. El método es también barato, ya que una fuente de luz UV común tal como una lámpara de D2 o una lámpara de mercurio son muy rentables. Sin embargo, la generación de imágenes de absorción adolece críticamente de sensibilidad. Esto es porque, para reducir el calentamiento de Joule, el canal de separación debe tener una pequeña sección transversal que logre una mejor disipación del calor. Sin embargo, una sección transversal pequeña implica un camino óptico corto, y por tanto una pequeña absorción por parte de cada banda. En el presente dispositivo, la limitación del camino óptico puede ser eliminada por generación repetitiva de imágenes de cada banda. Por el contrario, cada ciclo añade una cantidad al camino óptico. Esto se podría conseguir haciendo oscilar el campo aplicado de tal modo que los objetos se muevan hacia delante y hacia atrás, o haciendo circular los objetos varias veces alrededor de un canal de separación en bucle cerrado, por ejemplo.

En una realización adicional, el dispositivo podría ser adaptado para la recepción continua o semicontinua de una muestra a través del orificio 7 de entrada. El campo eléctrico aplicado se controla para separar los objetos en bandas y mover una o más bandas de interés a o pasado uno o más orificios 8 de salida. Los orificios de salida pueden ser activados cada vez que llega una banda, de tal modo que los componentes de interés puedan ser extraídos del canal de separación casi continuamente. De esta manera, el dispositivo puede funcionar como sistema de purificación.

Como se ha descrito, los autores de la invención proporcionan un dispositivo y método de electroforesis del que se predice que consigue una separación de objetos rápida, eficaz, y una alta resolución. La tecnología puede ser combinada o interconectada ventajosamente con tecnología microfluídica para conseguir dispositivos de separación ultrarresolutivos, ultrarrápidos de miniaturización. Debe ser barato de producir, ya que no se requieren piezas adicionales costosas. El dispositivo descrito no requiere flujo de fluido, y por lo tanto no se necesita una cara red de bombeo. La resolución es muy mejorada, dado que puede ser controlada cambiando el campo eléctrico y por ello puede ser aumentada arbitrariamente (dentro de un límite de sobrecalentamiento). La difusión de partículas dependiente del tiempo es eliminada, la cual limita la resolución de los dispositivos convencionales. Esta mejora en resolución también permite al dispositivo rendir bien a corrientes aplicadas más bajas que las requeridas en los sistemas conocidos, reduciendo así los efectos del calentamiento de Joule.

Se describirá ahora una aplicación ejemplar del dispositivo. Específicamente, se describe un método para realizar una secuenciación de ADN. Las primeras etapas de extraer el ADN de un organismo, la posible amplificación por PCR y la digestión como prescribe el método de Sanger o similares, no se describirán aquí. El procedimiento de secuenciación es iniciado desde el punto en el que las cuatro reacciones (A, T, G y C) están disponibles. En primer lugar, la reacción A es colocada en el canal de separación que contiene gel de tamizado (por ejemplo poliacrilamida), según los métodos de carga descritos previamente. Después, el campo eléctrico dependiente del tiempo es iniciado y la separación de las moléculas de ADN tiene lugar. Se generan imágenes de las bandas moleculares y el resultado tendrá el aspecto de una serie de picos como se muestra en la Figura 25. Posteriormente, se inyecta la reacción T y los picos T aparecen como se muestra en la Figura 26. Posteriormente (y mientras las reacciones A y T han sido separadas y se están moviendo a lo largo del canal) se inyectan las reacciones G y C en serie (Figuras 27 y 28).

En los procedimientos de secuenciación normales, las cuatro reacciones necesitan ser teñidas químicamente con diferentes colores a fin de que las cuatro reacciones sean separadas simultáneamente en el mismo canal. Sin embargo, el dispositivo descrito en la presente memoria vence esto inyectando cada reacción con un retardo de tiempo desde la anterior, en el mismo canal de separación y sin usar tinciones químicas (exento de marcas).

Realizando estas inyecciones secuenciales, los “picos” de imágenes correspondientes a las bandas de ADN se forman en una serie temporal. En primer lugar aparecen los picos de la reacción “A” y son registrados automáticamente por el software generador de imágenes. Después, aparecen gradualmente los picos “T”. De manera similar, aparecen los picos G y C con retardos de tiempo adicionales. La medición del tiempo de los picos es un buen indicador de qué pico pertenece a qué reacción, y por lo tanto la secuenciación puede tener lugar en un único canal microfluídico y sin el uso de tinción para las moléculas de ADN.

Se puede obtener más información observando la formación de las bandas. Por ejemplo, si la segunda inyección ha tenido lugar, las bandas que se forman debido a esta segunda inyección se formarán gradualmente entre las bandas de la primera inyección. Este perfil creciente puede ser muy útil. Alternativamente, la generación de imágenes podría tener lugar una vez que las bandas de la segunda inyección se han formado totalmente, y después se podría hacer una comparación con el patrón de separación previo donde sólo había una inyección en el canal. De cualquier modo, los perfiles crecientes pueden ser una herramienta muy útil para eliminar errores sistemáticos en la generación de imágenes y cuantificación de una banda dada. Por ejemplo, representando gráficamente la fuerza de la señal frente al tiempo para una banda dada, se podría obtener una medida más fiable del tamaño verdadero de la señal.

El método de inyección secuencial de diversas muestras se puede usar como herramienta para diseñar protocolos de separación de muestras complejas o múltiples. Las reacciones químicas entre los componentes de la muestra o

entre los componentes y el amortiguador pueden ser tenidas en cuenta en la consideración del orden de inyección. Además, otros parámetros, como la temperatura, el pH variante del amortiguador, pueden ser parte del protocolo de ejecución. Las bandas pueden ser extraídas de un canal de separación y transportadas a otro en el que se aplican diferentes condiciones químicas o ambientales. Pueden ser inyectadas moléculas adicionales externamente y secuencialmente en el nuevo canal de separación.

A fin de evaluar la resolución esperada del dispositivo, los autores de la invención usan las movilidades medidas experimentalmente de bandas de ADN en electroforesis capilar estándar en geles lineales de poliacrilamida, y aplican la ecuación de Lamm para obtener la resolución esperada para la invención propuesta. No se proporcionará aquí un análisis detallado, pero la técnica permite una comparación de la resolución esperada con la conseguida por las técnicas convencionales.

Los autores de la invención han estudiado la movilidad del ADN en electroforesis capilar en gel (CGE, por sus siglas en inglés) estándar de la bibliografía. Las condiciones suponen un gel de poliacrilamida lineal al 6% y un campo eléctrico dependiente del tiempo. Las Figuras 29a a c muestran la resolución esperada de un experimento CGE estándar con dos bandas de ADN, una de 1000 pb y una de 1001 pb de largo. La Figura 29a muestra las formas de banda esperadas (forma de campana) en el punto de detección (30 cm de longitud de separación). Como podemos ver, las bandas están muy juntas. La Figura 29b muestra la suma de las dos señales y en este caso la suma apenas muestra la existencia de dos bandas distintas. Esto es lo que se espera para esta longitud de ADN y resolución conocida para la separación por CGE de ADN en geles de Poliacrilamida.

Podemos predecir la resolución del dispositivo descrito en la presente memoria para las mismas bandas de ADN (1000 + 1001 pb). La Figura 30a muestra las dos bandas. Es claro que en unidades de FWHM (anchura a media altura, por sus siglas en inglés) están más separadas comparado con la CGE estándar (Figuras 29a a c). La Figura 30b muestra la suma de las dos señales, que están resueltas claramente, y la Figura 30c muestra el campo eléctrico dependiente del tiempo que está a aproximadamente 250 V/cm. Este valor es muy realista para tales geles. Para la CGE estándar, el valor óptimo está por debajo de 50 V/cm para conseguir la mejor resolución. Campos eléctricos más altos causan una disminución de la resolución porque, por diversas razones, la dispersión de las bandas de ADN aumenta. Sin embargo, para el dispositivo propuesto, la misma regla no se aplica, dado que la dispersión es contenida por las especiales condiciones de separación. Por lo tanto es perfectamente razonable aumentar la resolución aplicando campos más altos.

Los autores de la invención han usado los mismos datos para dos fragmentos de ADN más largos a 8000 y 8001 pb. La Figura 31a muestra la resolución predicha. Las dos bandas están claramente resueltas, lo que significa que el dispositivo propuesto podría resolver hasta una resolución sin precedentes de > 8000 pares de bases de ADN, lo que tiene enormes implicaciones para la industria y la investigación.

Para un canal de separación dado, la resolución puede ser optimizada para un intervalo dado de parámetros de fricción-carga. En términos prácticos, esto significaría para el ADN, por ejemplo, que en un canal el parámetro " α " del campo puede ser disminuido. El efecto de esto es que la pendiente del gradiente del campo en x se reduce, pero la anchura real de las bandas no aumenta proporcionalmente. Esto a su vez causa que las bandas en el intervalo dinámico dado se muevan distanciándose más unas de otras, pero el ensanchamiento de las bandas no suprime el aumento en distancia. Esto significa que efectivamente la resolución es aumentada, y dado que α puede ser reducido, la resolución para un intervalo dinámico dado puede ser ajustada fácilmente. La razón para esto es porque en el análisis de Lamm, el término que contiene f depende linealmente de x pero el término que contiene α depende de x^2 . Sin embargo, f es inversamente proporcional al coeficiente de difusión D y por lo tanto a la anchura de una banda dada. Debido a esta dependencia diferencial de f y α de x, la resolución puede ser ajustada de manera eficaz.

Un factor útil adicional para ajustar la resolución es el parámetro k. Aumentando este factor la resolución aumenta drásticamente. Sin embargo esto tiene su coste. El intervalo de campo eléctrico donde la separación se produce aumenta con k y por lo tanto hay una limitación en cómo de grande se puede generar un campo eléctrico de manera realista en el canal de separación para un suministro de AV (coste) dado, y las características de ruptura de voltaje del dieléctrico del material del chip.

REIVINDICACIONES

1. Un método de electroforesis para separar objetos (10) en un fluido (9) contenido en un canal (2) de separación, comprendiendo el método:
- 5 aplicar un campo eléctrico (E) a lo largo del canal (2) de separación, teniendo el campo eléctrico un perfil de campo, y causando de este modo que al menos alguno de los objetos (10) se muevan en relación al fluido (9);
- 10 variar el campo eléctrico (E) aplicado para ajustar el perfil de campo en relación al canal (2) de separación, causando de este modo que los objetos (10) se separen en bandas bajo las influencias combinadas de una fuerza eléctrica (Fe) debida al campo eléctrico y una fuerza hidrodinámica (Fh) debida al fluido;
- caracterizado porque el perfil del campo eléctrico es conformado de tal modo que la fuerza neta experimentada por cada objeto (10), que resulta de la combinación de la fuerza eléctrica ejercida por el campo y la fuerza hidrodinámica ejercida por el fluido, es tal que la anchura de cada banda separada permanece sustancialmente constante con el tiempo; y
- en el que el fluido (9) y el canal (2) de separación están sustancialmente estacionarios uno con respecto al otro.
- 15 2. Un método de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 1, en el que el campo eléctrico varía con respecto al canal (2) de separación a lo largo del perfil del campo.
3. Un método de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el perfil del campo eléctrico tiene un gradiente que es distinto de cero.
4. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el campo eléctrico es variado de tal manera que el perfil del campo se mueve en relación al canal (2) de separación.
- 20 5. Un método de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 4, en el que el perfil del campo permanece por lo demás sin cambios mientras se mueve en relación al canal (2) de separación.
6. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el campo eléctrico es variado de tal manera que el perfil del campo eléctrico se traslada a lo largo del canal (2) de separación.
- 25 7. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el campo eléctrico aplicado es variado de tal modo que, una vez que los objetos (10) se han separado en bandas, cada banda se mueve con una velocidad terminal distinta de cero en relación al canal (2) de separación.
8. Un método de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 7, en el que la velocidad terminal de cada banda es sustancialmente la misma.
- 30 9. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el campo eléctrico aplicado es de la forma

$$E(x,t) = E((x - kt)^n)$$

- donde x es una coordenada espacial, típicamente a lo largo del canal de separación, t es una coordenada temporal, n y k son cada uno números reales y n no es cero.
- 35 10. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el perfil del campo eléctrico es monotónico con respecto a la distancia a lo largo del canal.
11. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además las etapas de mezclar los objetos (10) a ser separados con el fluido (9) y colocar la mezcla en el canal (2) de separación.
- 40 12. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además las etapas de colocar el fluido en el canal de separación e insertar una muestra en el canal de separación, comprendiendo la muestra al menos objetos (10) a ser separados.
13. Un método de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 12, en el que la muestra comprende además el fluido (9).
- 45 14. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además la etapa de detectar las bandas.
15. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que

comprende además la etapa de modificar el campo eléctrico, después de que los objetos (10) se han separado en bandas, para ajustar el espaciado entre las bandas, el posicionamiento de las bandas o la resolución de las bandas.

16. Un método de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 15, en el que el campo eléctrico es modificado por cambios en su dependencia del tiempo y/o su intensidad.

5 17. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además la etapa de extraer una banda de interés del canal (2) de separación después de que los objetos (10) se han separado.

10 18. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además la etapa de hacer oscilar el campo eléctrico, causando que el movimiento de las bandas se invierta en dirección, moviéndose así las bandas hacia delante y hacia atrás a lo largo del canal (2) de separación.

19. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el canal (2) de separación es un bucle cerrado y el campo eléctrico aplicado es periódico alrededor del bucle.

15 20. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el campo eléctrico es aplicado por medio de una pluralidad de electrodos (3) dispuestos a lo largo del canal (2) de separación.

21. Un método de electroforesis según la reivindicación 20, en el que al menos algunos de la pluralidad de electrodos (3) están espaciados del interior del canal de separación por una capa de material (11) eléctricamente resistivo.

20 22. Un método de electroforesis según la reivindicación 21, en el que el material (11) eléctricamente resistivo es un semiconductor.

23. Un método de electroforesis según la reivindicación 22, en el que el semiconductor es un semiconductor dopado.

24. Un método de electroforesis según la reivindicación 23, en el que el material eléctricamente resistivo es silicio dopado.

25 25. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, en el que la pluralidad de electrodos (3) están espaciados del interior del canal de separación de tal modo que no conduce corriente entre los electrodos y el fluido.

26. Un método de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los objetos (10) a ser separados comprenden biomoléculas, proteínas, polímeros, ADN, ARN o células biológicas.

30 27. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos, comprendiendo el dispositivo:

un canal (2) de separación que, en el uso, contiene un fluido (9) y los objetos (10) a ser separados;

medios para aplicar un campo eléctrico (E) a lo largo del canal (2) de separación, teniendo el campo eléctrico un perfil de campo por el cual se causa que los objetos (10) en el canal (2) de separación se muevan en relación al fluido;

35 un controlador (4) adaptado en el uso para aplicar y variar el campo eléctrico aplicado, para ajustar el perfil del campo eléctrico en relación al canal (2) de separación, por lo cual se causa que los objetos en el canal de separación se separen en bandas bajo las influencias combinadas de una fuerza eléctrica (Fe) debida al campo eléctrico y una fuerza hidrodinámica (Fh) debida al fluido;

40 caracterizado porque el controlador (4) está adaptado además para aplicar un perfil de campo eléctrico conformado de tal modo que la fuerza neta experimentada por cada objeto, que resulta de la combinación de la fuerza eléctrica ejercida por el campo y la fuerza hidrodinámica ejercida por el fluido, es tal que cada banda separada sufre una difusión espacial sustancialmente cero; y

en el que, en el uso, el fluido contenido en el canal de separación es sustancialmente estacionario en relación al canal de separación.

45 28. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 27, en el que el campo eléctrico varía con respecto al canal (2) de separación a lo largo del perfil del campo.

29. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 27 o la reivindicación 28, donde el perfil del campo eléctrico tiene un gradiente que es distinto de cero.

50 30. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29, en el que el controlador está adaptado además para mover el perfil del campo eléctrico en relación al canal (2) de separación.

31. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 30, en el que el controlador está adaptado además para mantener el perfil del campo sin cambios mientras se mueve en relación al canal (2) de separación.
- 5 32. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 30 o la reivindicación 31, en el que el controlador está adaptado además para trasladar el perfil del campo eléctrico a lo largo del canal (2) de separación.
33. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 32, en el que el controlador está adaptado además para variar el campo eléctrico aplicado de tal modo que, una vez que los objetos (10) se han separado en bandas, cada banda se mueve con una velocidad terminal distinta de cero en relación al canal (2) de separación.
- 10 34. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 33, en el que la velocidad terminal de cada banda es sustancialmente la misma.
35. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 34, en el que el campo eléctrico aplicado es de la forma
- 15
$$E(x,t) = E((x - kt)^n)$$
- donde x es una coordenada espacial, típicamente a lo largo del canal de separación, t es una coordenada temporal, n y k son cada uno números reales y n no es cero.
36. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 35, en el que el perfil del campo eléctrico es monótonico con respecto a la distancia a lo largo del canal.
- 20 37. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 36, en el que los medios para aplicar un campo eléctrico comprenden una pluralidad de electrodos (3) dispuestos a lo largo del canal (2) de separación.
38. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 37, en el que al menos algunos de la pluralidad de electrodos (3) están espaciados del interior del canal de separación por una capa de material (11) eléctricamente resistivo.
- 25 39. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 38, en el que el material eléctricamente resistivo es un semiconductor.
40. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 39, en el que el material eléctricamente resistivo es un semiconductor dopado.
- 30 41. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 40, en el que el material resistivo es silicio dopado.
42. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según las reivindicaciones 37 a 41, en el que los electrodos (3) están espaciados del interior del canal de separación de tal modo que no conduce corriente entre los electrodos y el fluido (9).
- 35 43. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 42, en el que los electrodos (3) comprenden tinta conductora impresa en o adyacente al canal de separación o material resistivo.
44. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 43, en el que canal (2) de separación es un capilar.
- 40 45. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 44, en el que canal (2) de separación es rectilíneo.
46. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 45, en el que el canal (2) de separación está en la forma de un bucle cerrado.
47. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 46, en el que el canal (2) de separación es circular.
- 45 48. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 47, en el que el canal (2) de separación está grabado en un sustrato.
49. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 48, en el que el dispositivo es un dispositivo microfluídico.

50. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 49, que comprende además un detector (6) adaptado para detectar bandas en el canal de separación.
51. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 50, en el que el detector (6) está adaptado para generar imágenes de bandas en el canal de separación.
- 5 52. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 51, en el que el canal de separación está provisto de al menos un orificio (7) de entrada para la inserción de una muestra en el canal de separación, comprendiendo la muestra al menos objetos a ser separados.
- 10 53. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 52, en el que el canal de separación está provisto de al menos un orificio (8) de salida para la extracción de bandas de objetos del canal de separación.
54. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 53, que comprende una pluralidad de canales (2) de separación, estando provisto cada canal de separación de medios para aplicar un campo eléctrico y un controlador.
- 15 55. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 54, en el que el campo eléctrico aplicado a cada canal de separación es el mismo.
56. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según la reivindicación 54 o la reivindicación 55, en el que el campo eléctrico aplicado a cada canal de separación es controlado por el mismo controlador.
57. Un dispositivo de electroforesis para separar objetos según cualquiera de las reivindicaciones 28 a 56, en el que los objetos a ser separados comprenden biomoléculas, proteínas, polímeros, ADN, ARN o células biológicas.

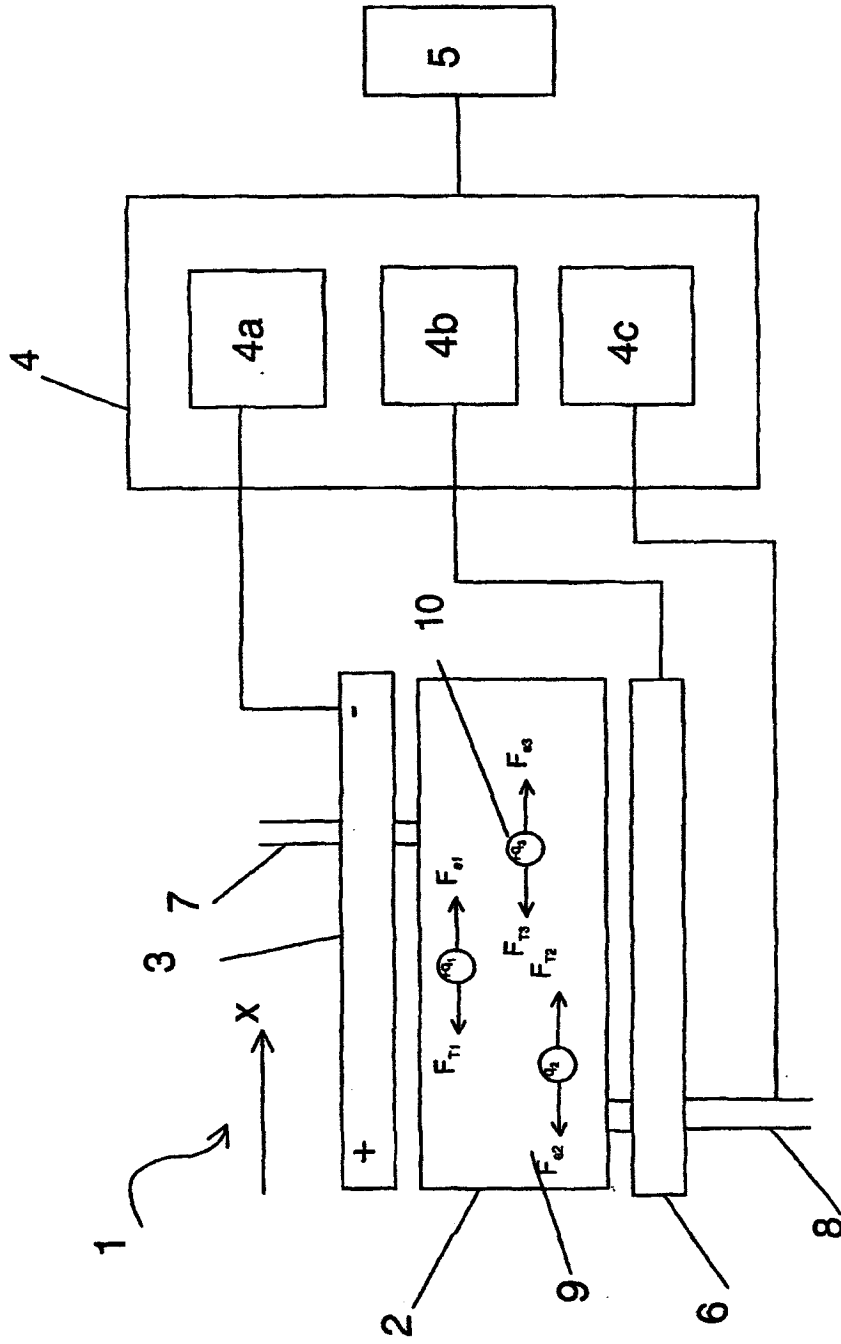
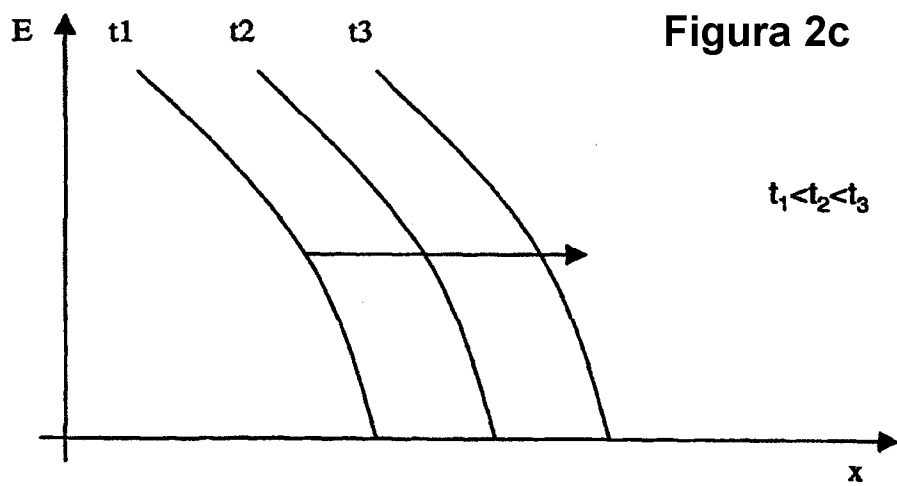
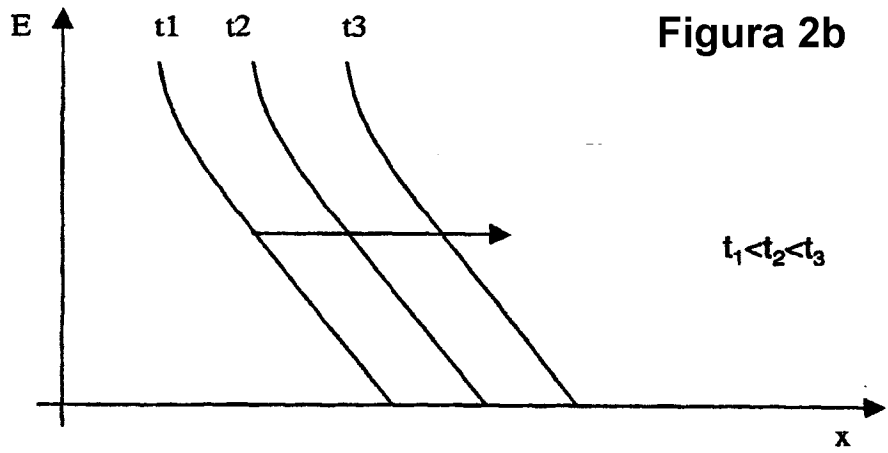
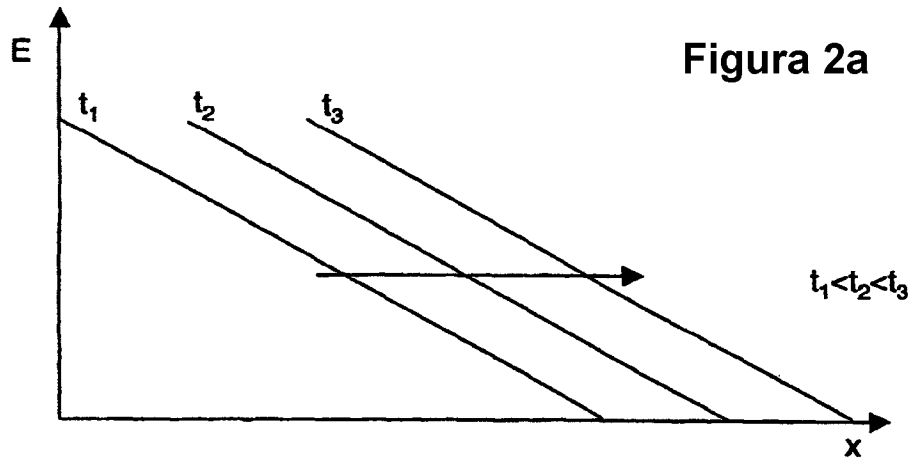


Figura 1



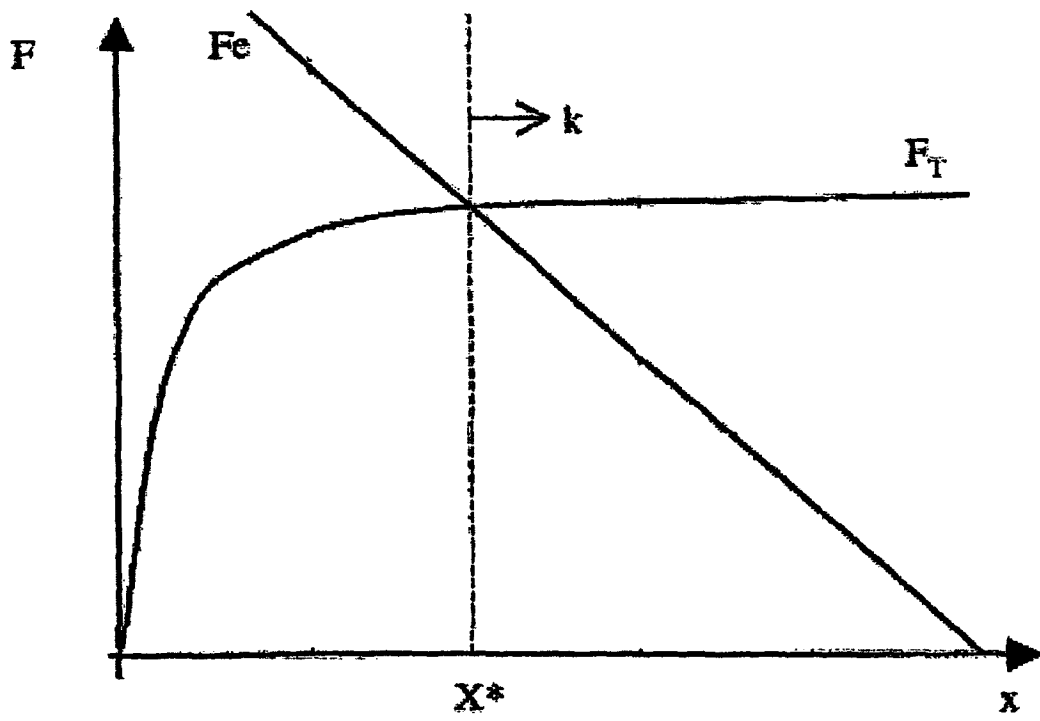


FIG. 3a

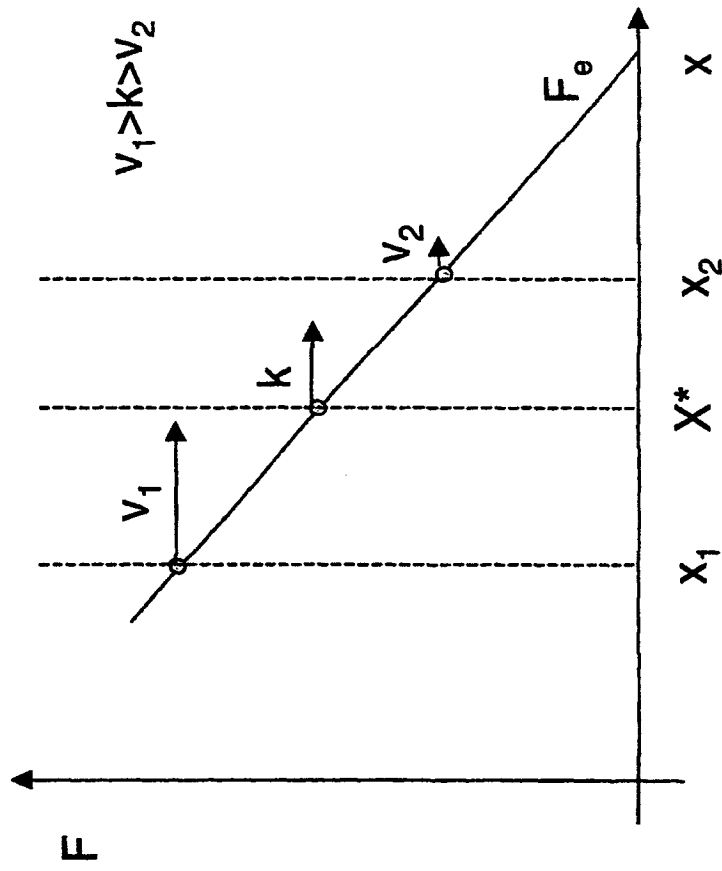


FIG. 3b

Figura 4

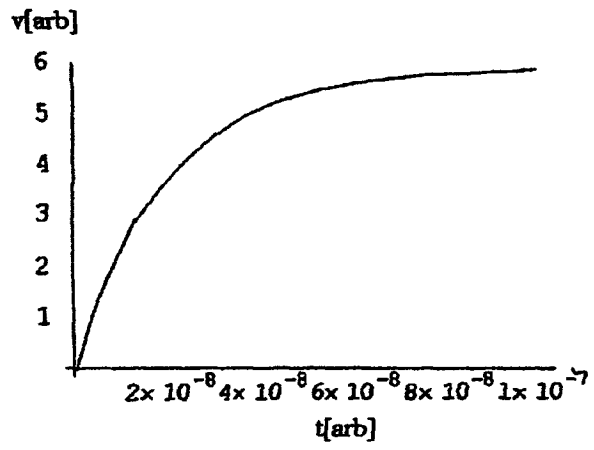


Figura 5

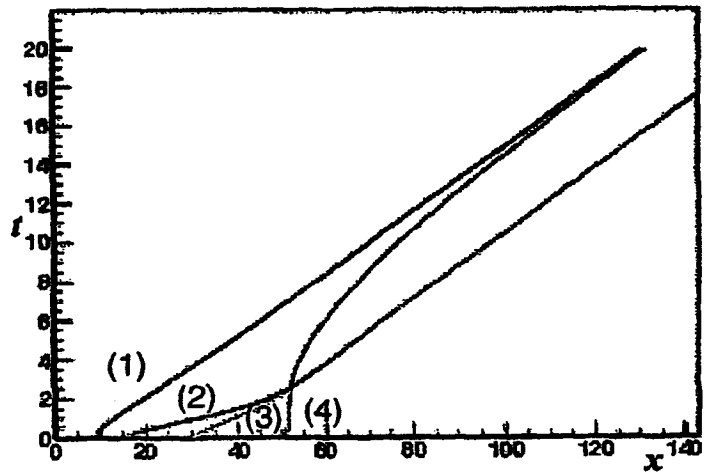


Figura 6

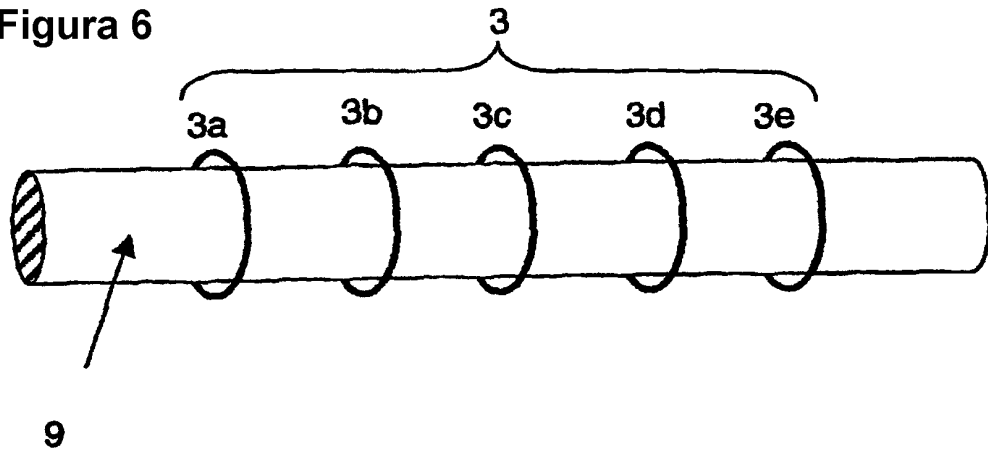
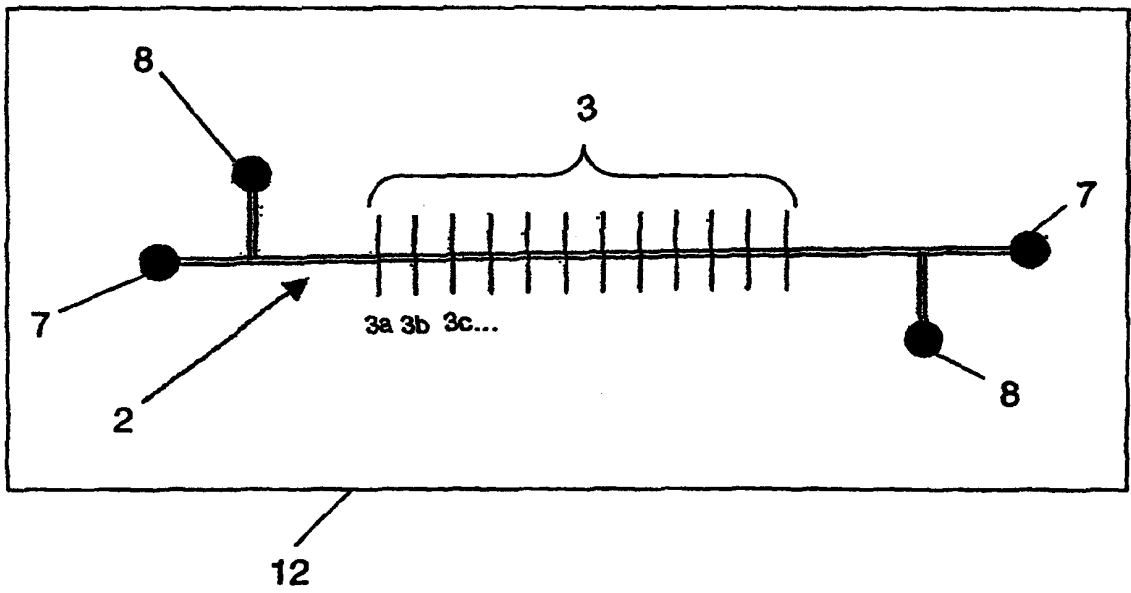


Figura 7



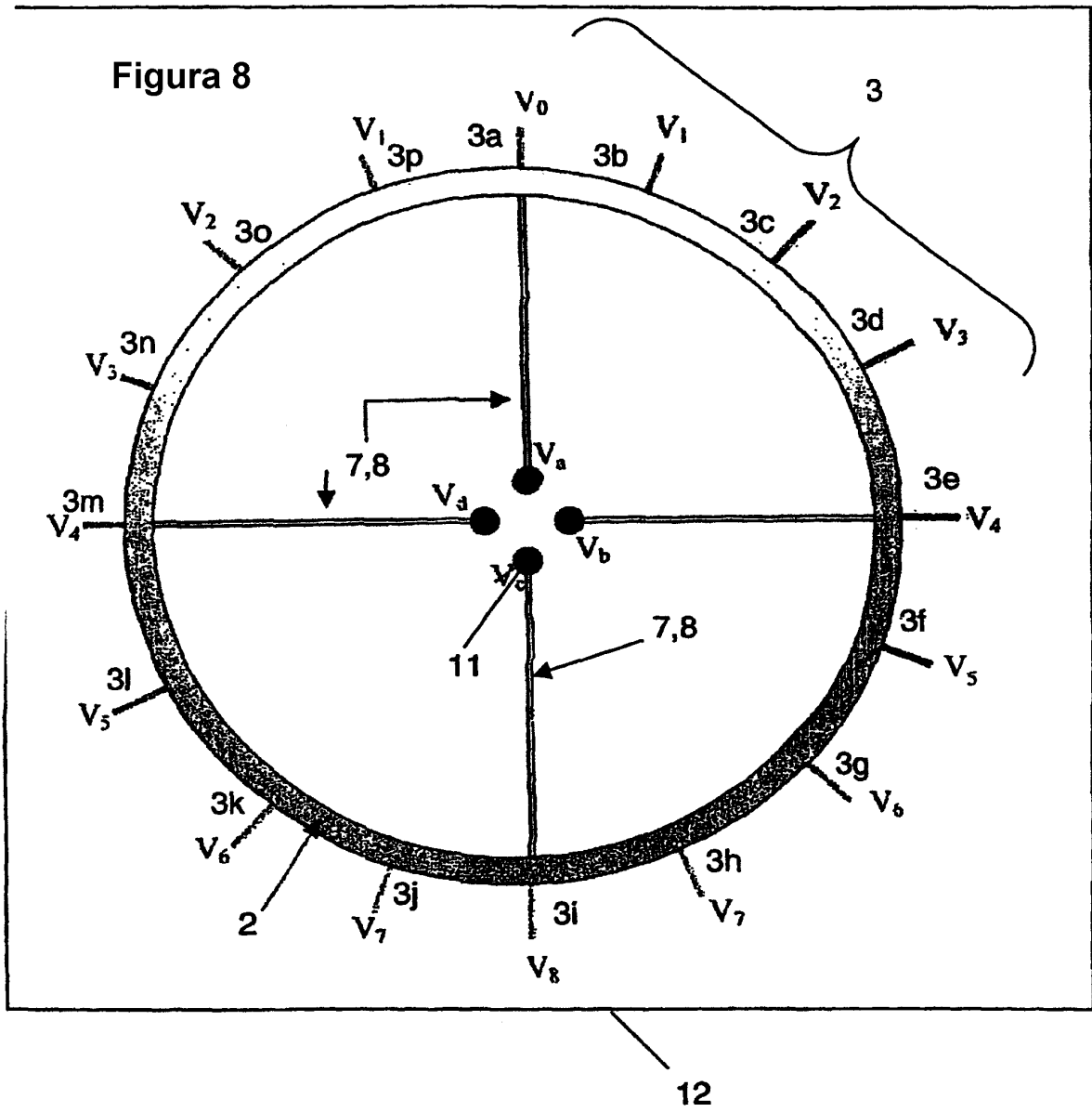


Figura 9

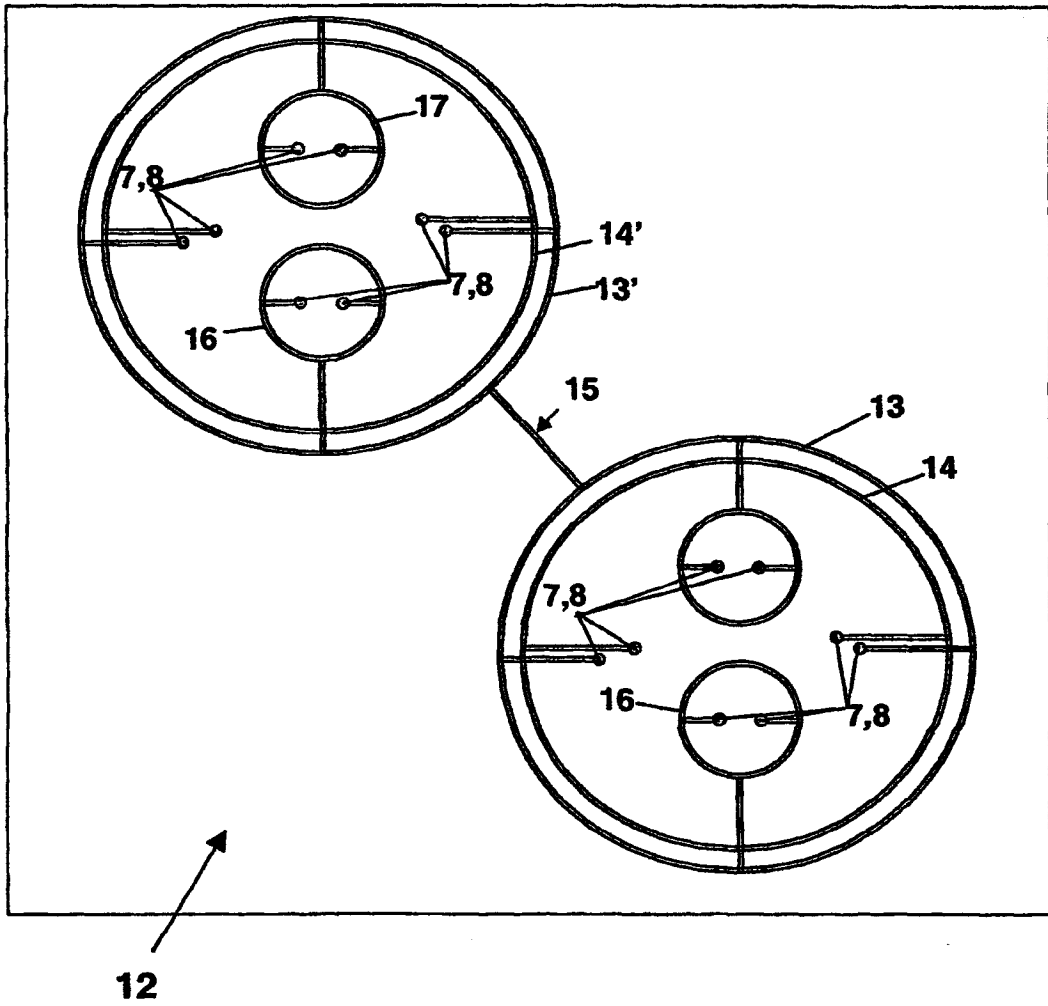


Figura 10

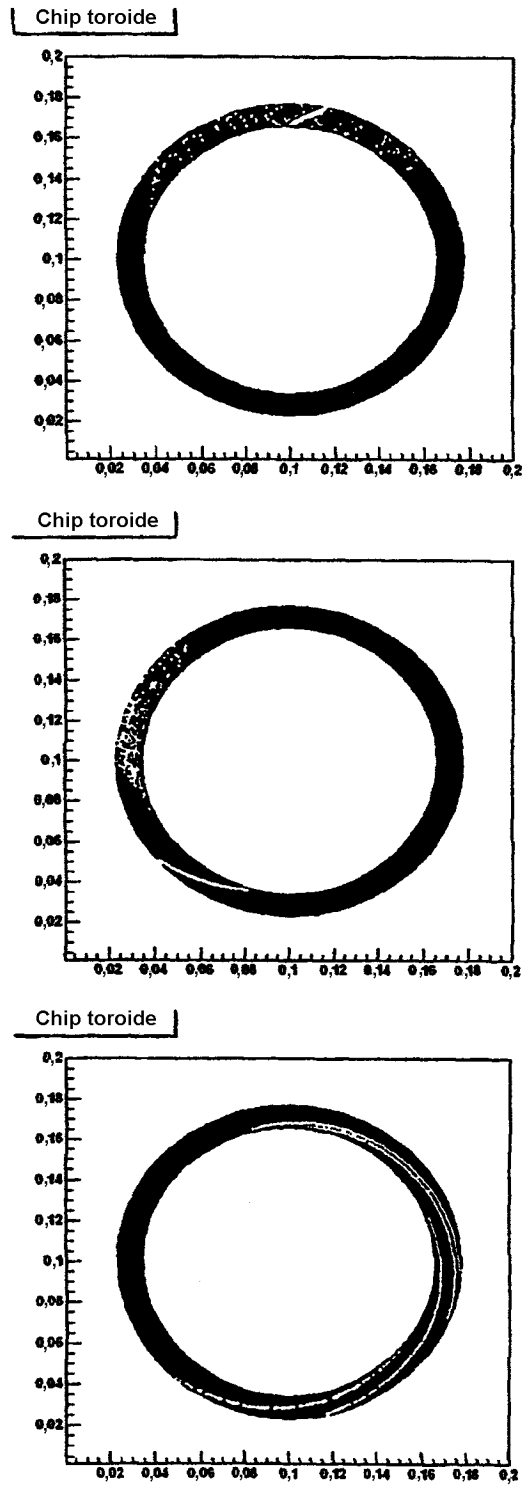
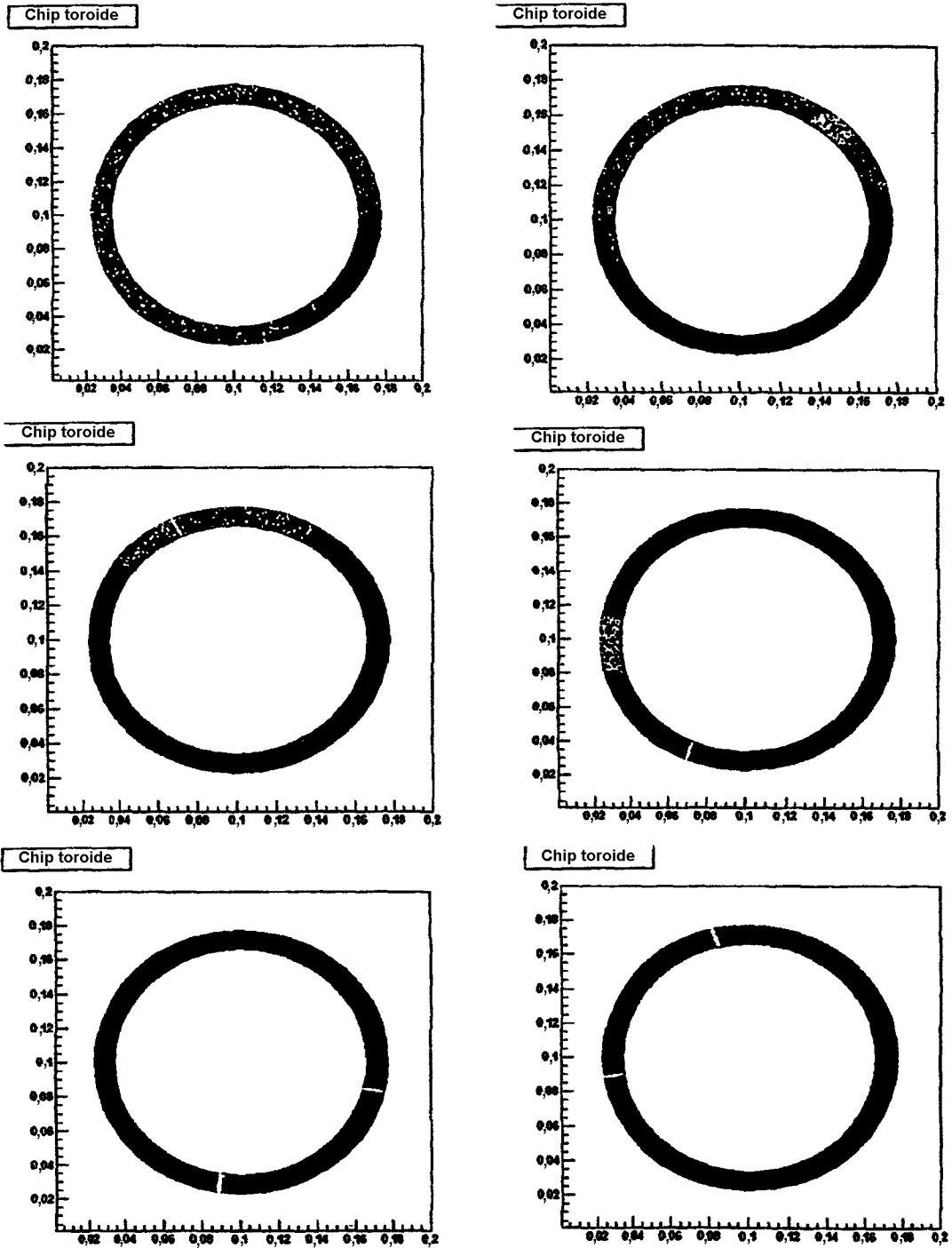


Figura 11



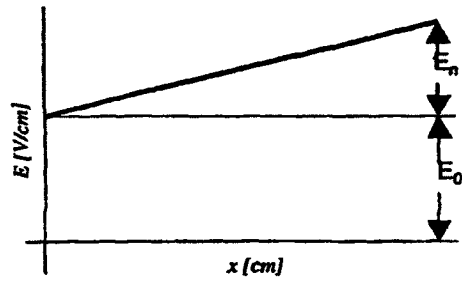


Figura 12

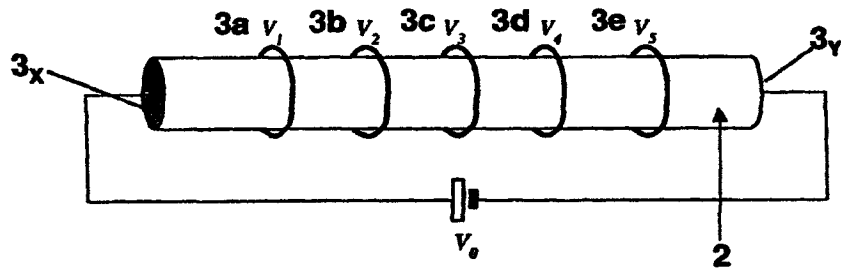


Figura 13

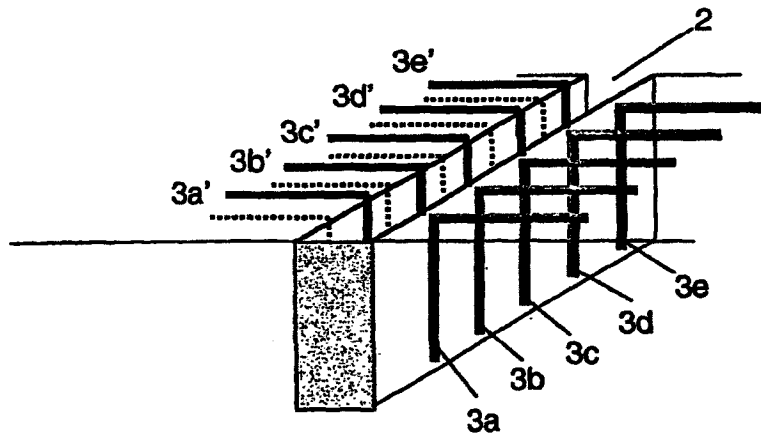


Figura 14

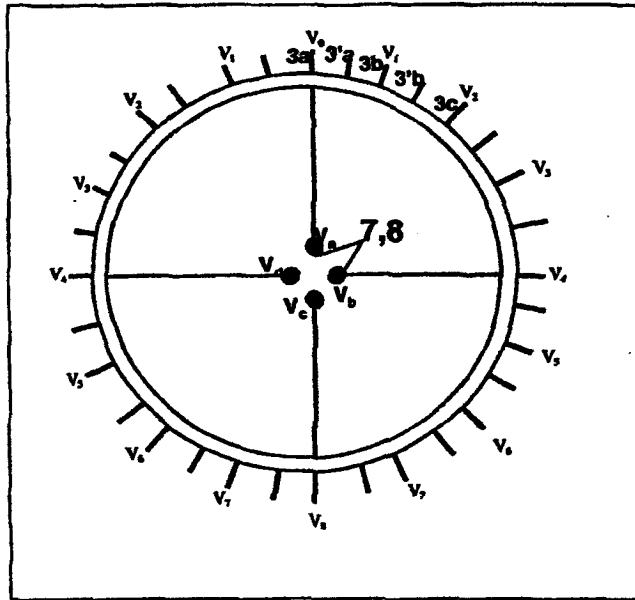


Figura 15

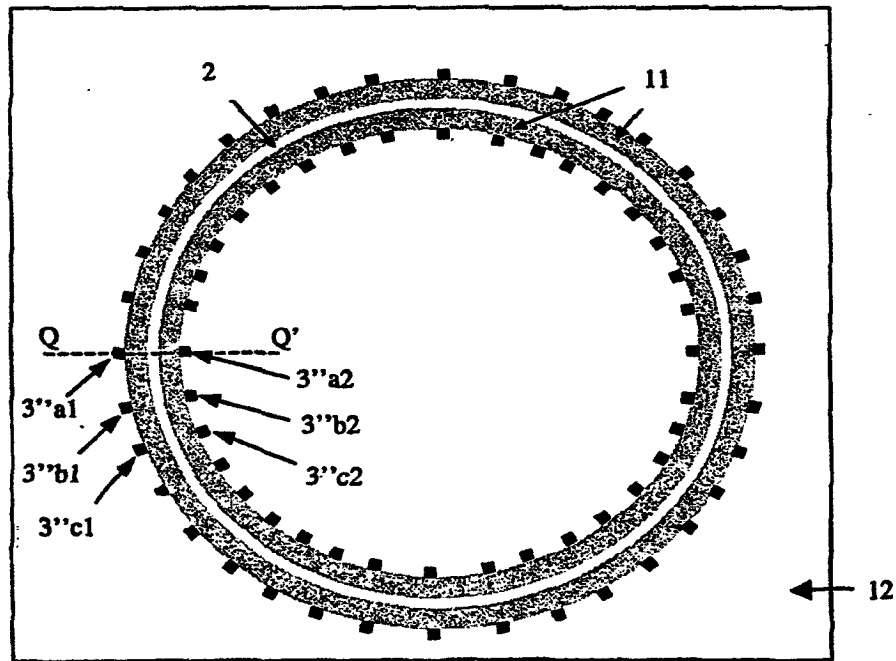


Figura 16

Figura 17

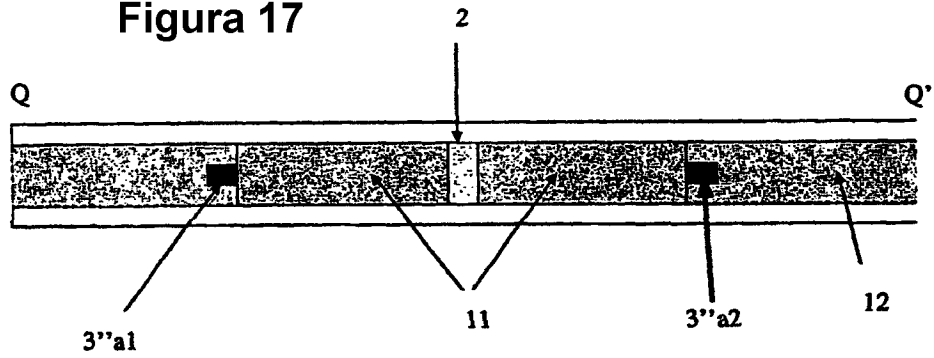


Figura 18a

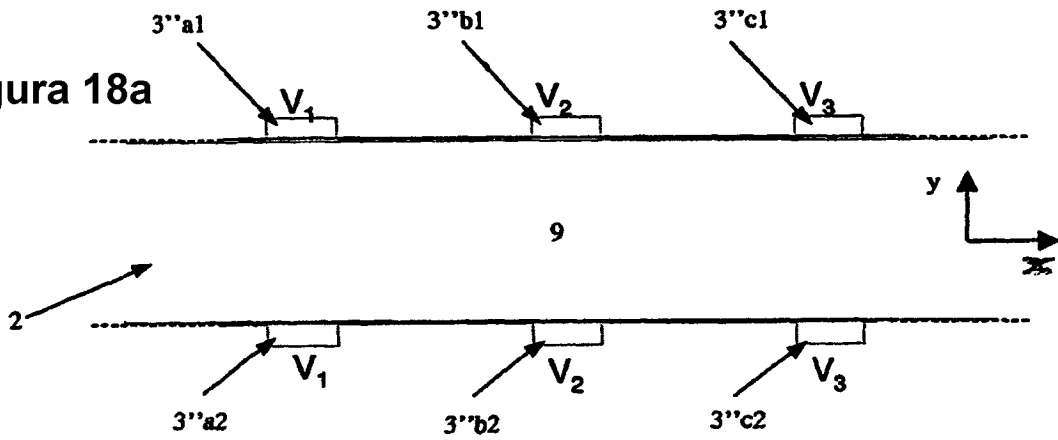
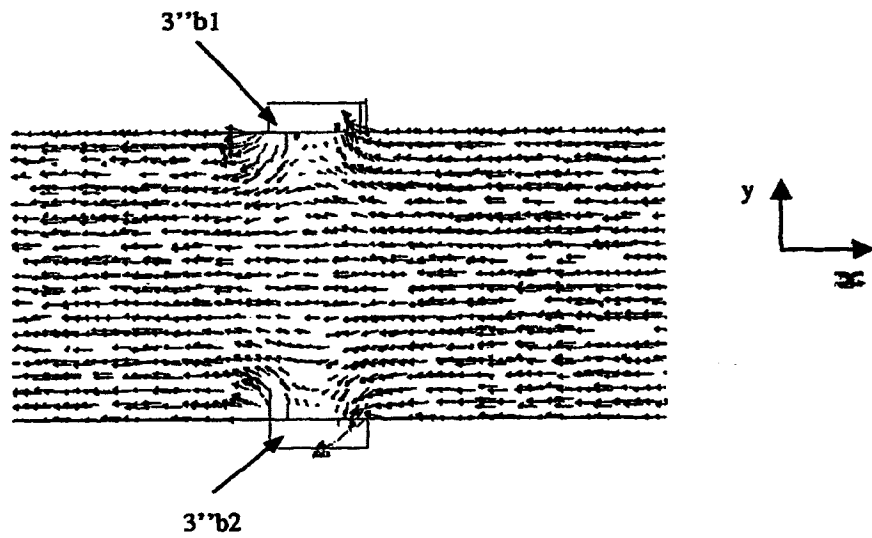


Figura 18b



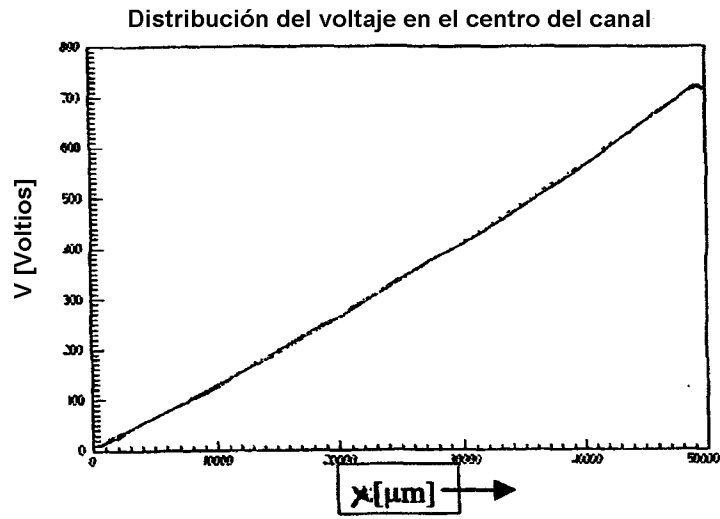


Figura 18c

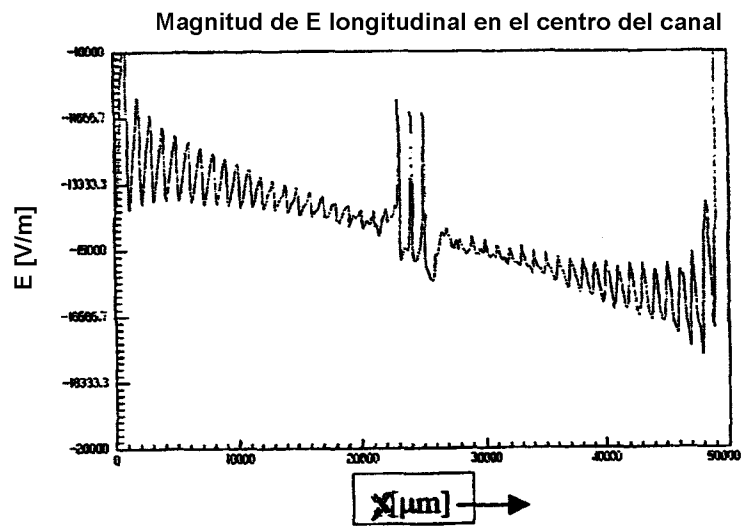


Figura 18d

Figura 19a

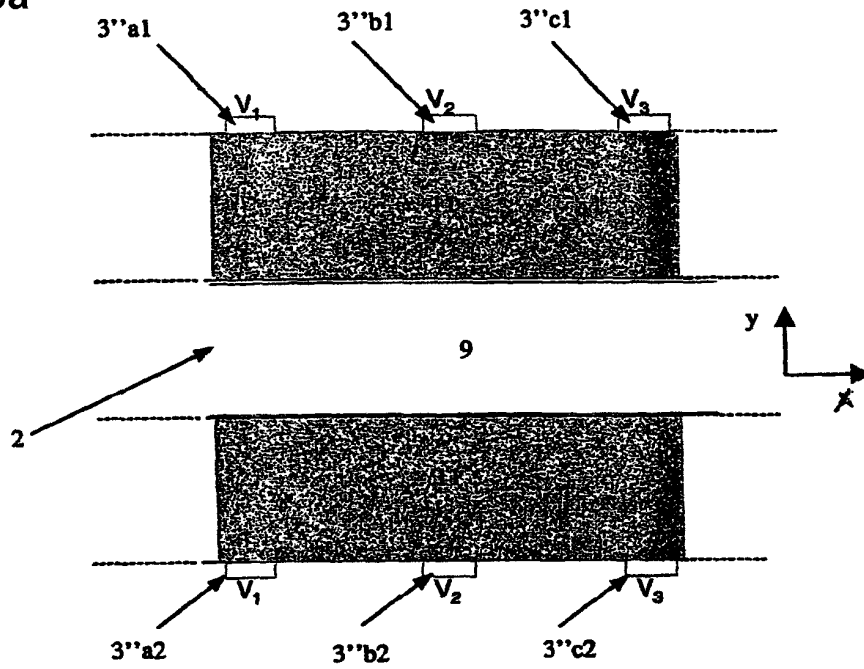


Figura 19b

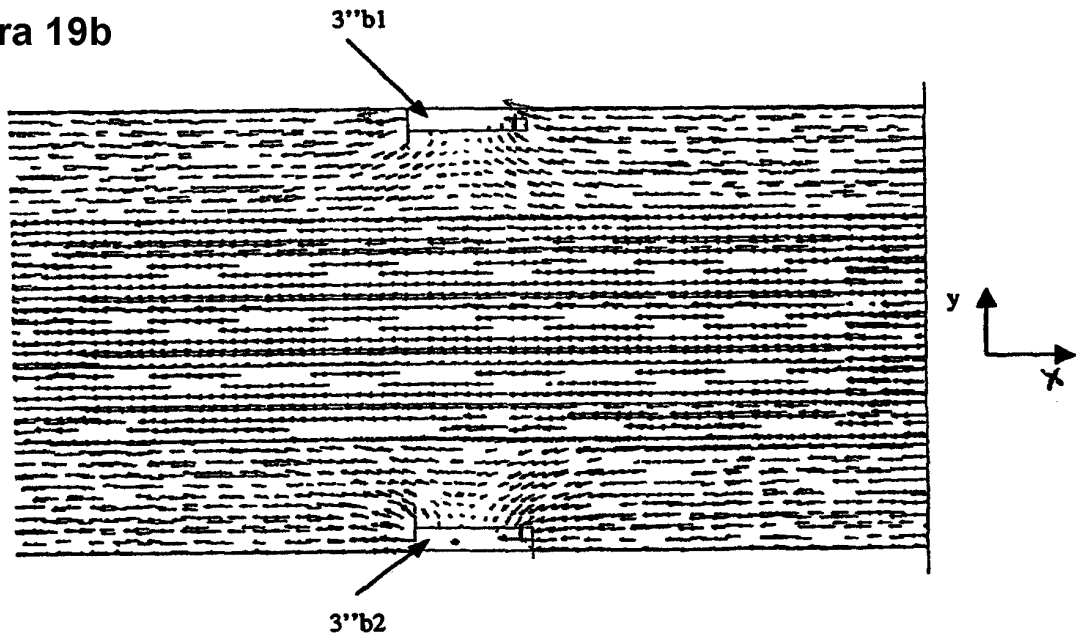


Figura 19c

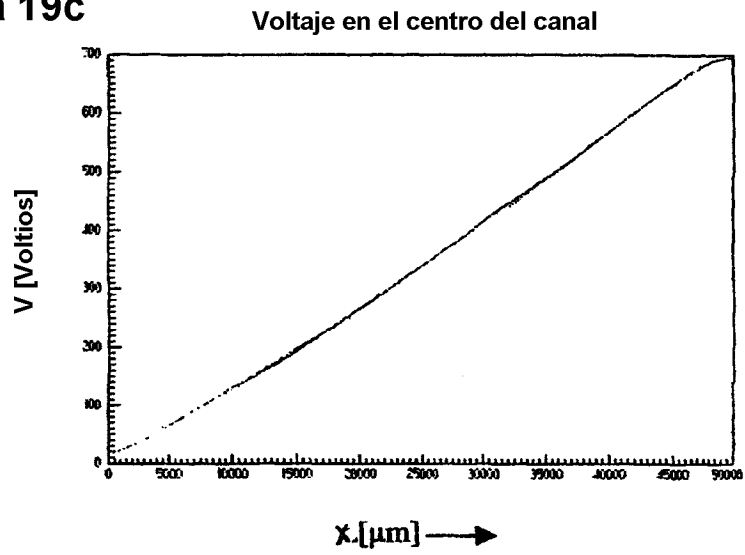
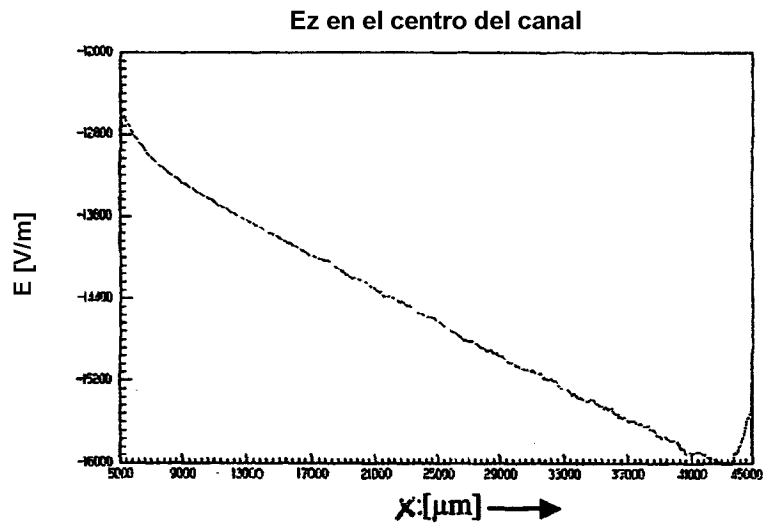


Figura 19d



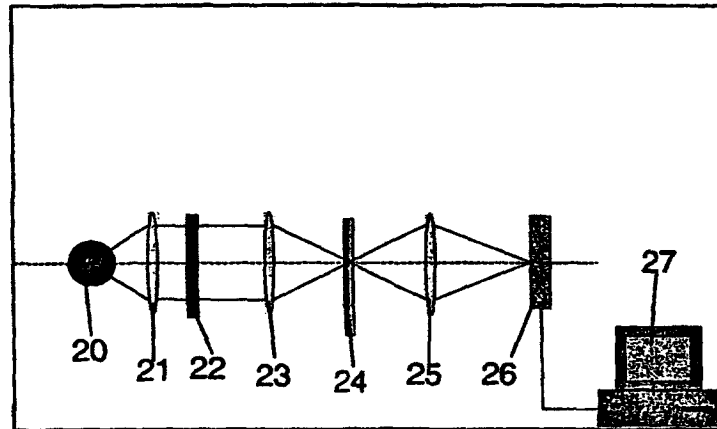


Figura 20

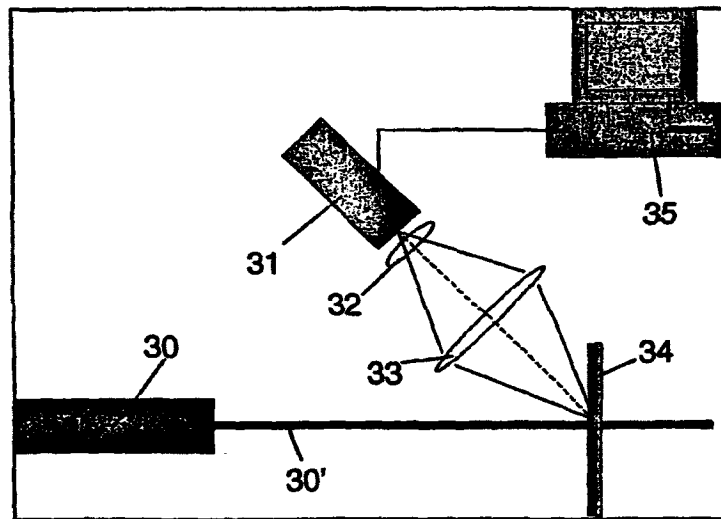


Figura 21

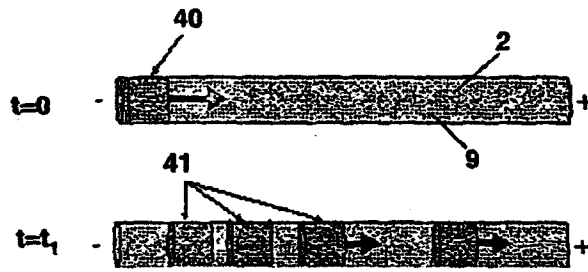


Figura 22

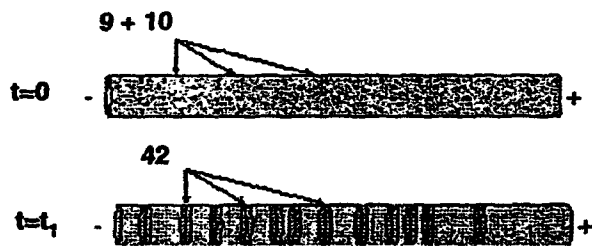


Figura 23

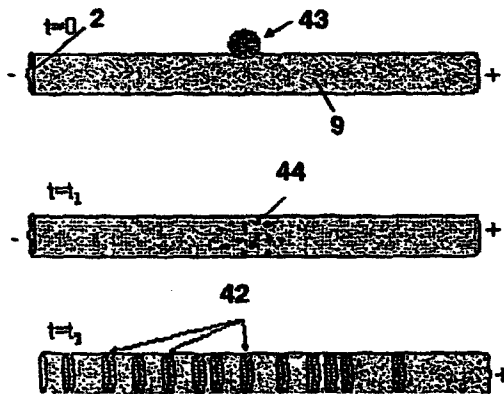


Figura 24

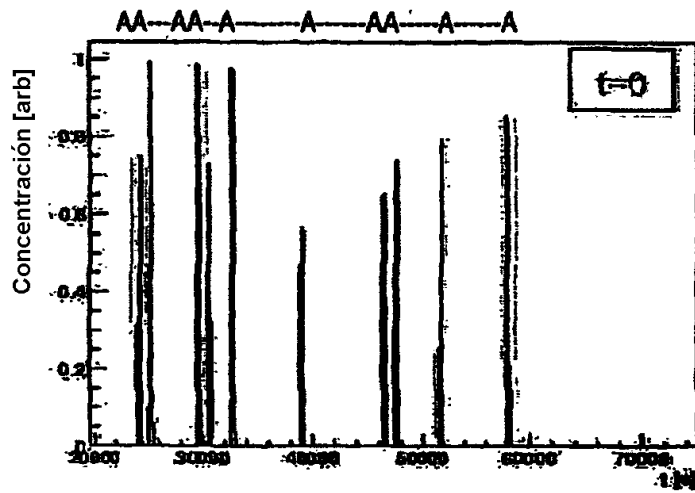


Figura 25

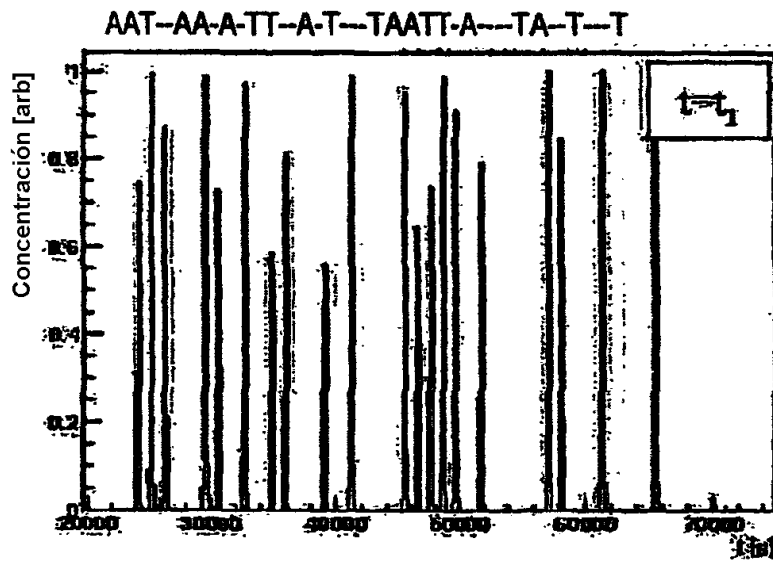


Figura 26

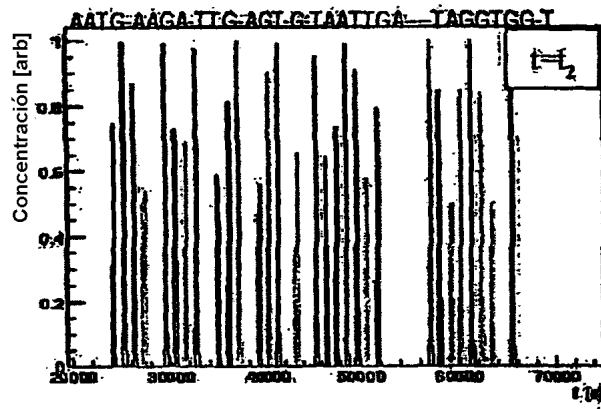


Figura 27

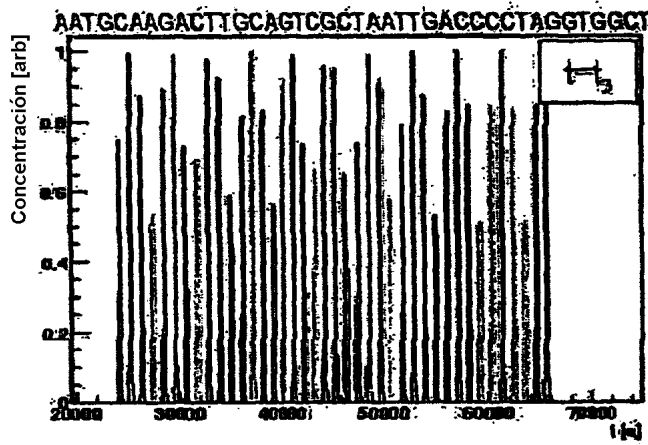


Figura 28

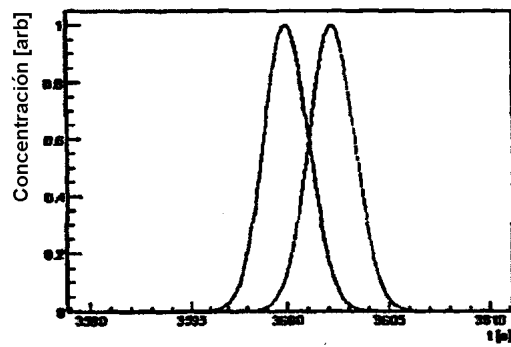


Figura 29a

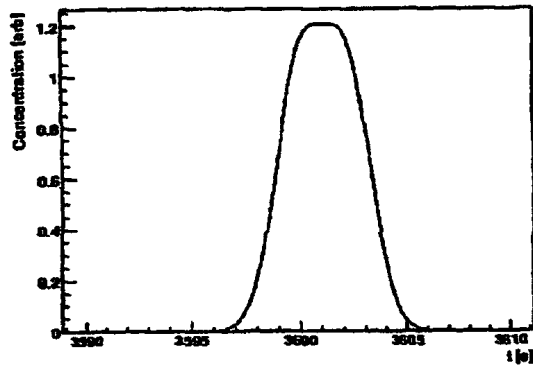


Figura 29b

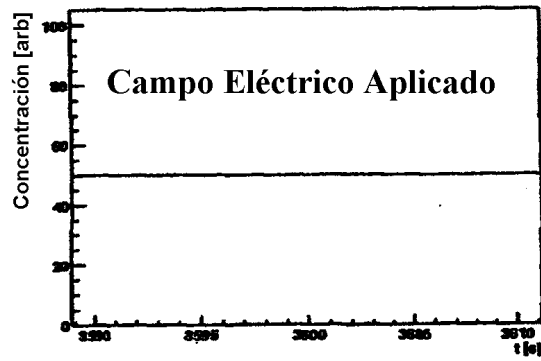


Figura 29c

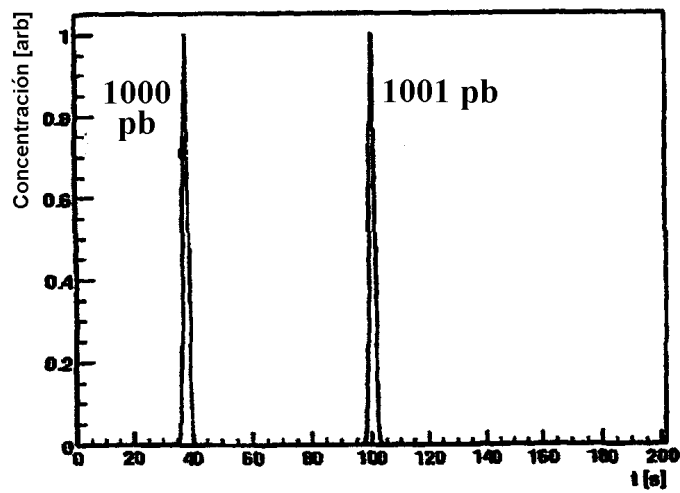


Figura 30a

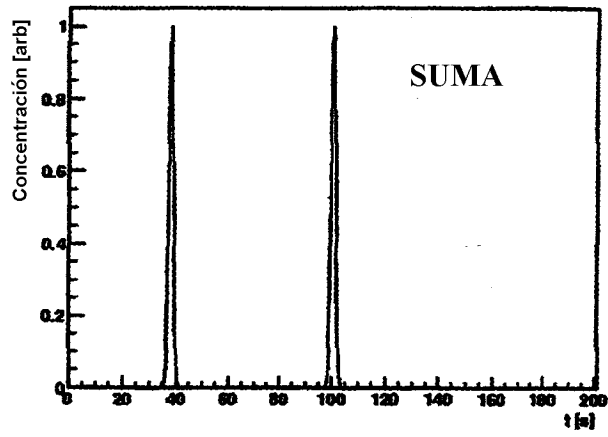


Figura 30b

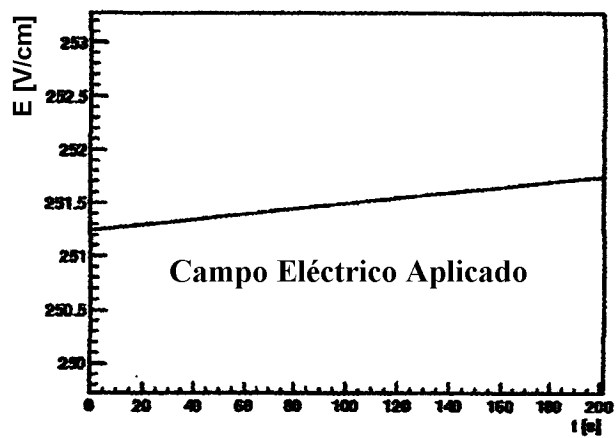


Figura 30c

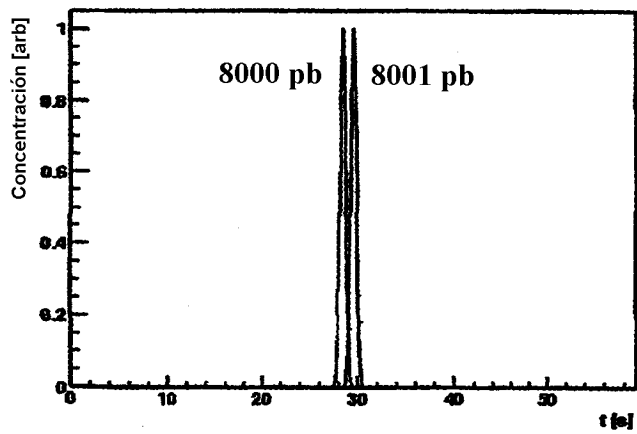


Figura 31a

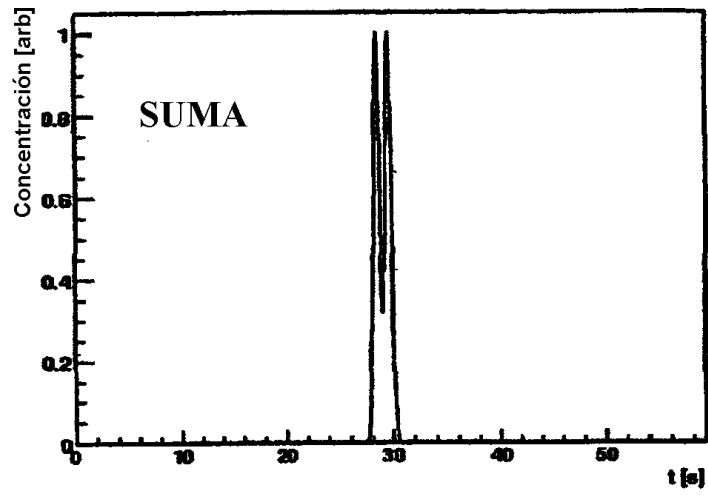


Figura 31b

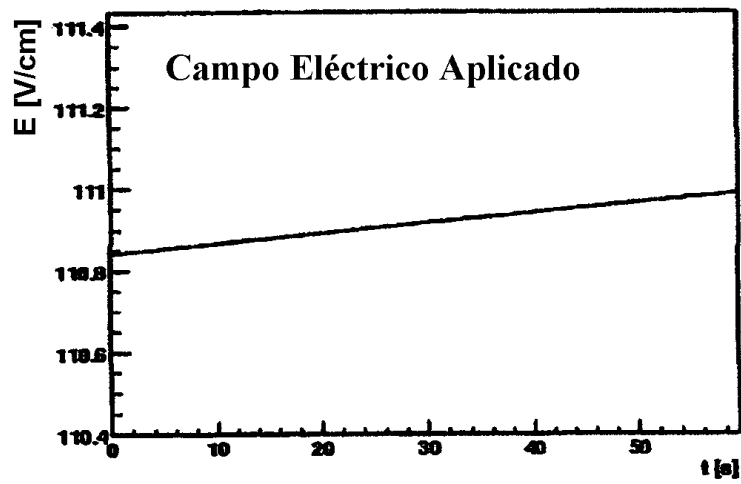


Figura 31c