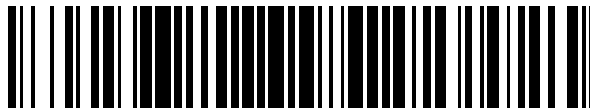


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 865**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **00908258 .7**
- 96 Fecha de presentación: **11.01.2000**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1151290**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.11.2001**

54 Título: **Aparatos y procedimientos para la separación de alta resolución de componentes de muestras en dispositivos de canales microfabricados**

30 Prioridad:
11.02.1999 US 249274

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.11.2012

73 Titular/es:
**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
300 LAKESIDE DRIVE, 22ND FLOOR OAKLAND
CALIFORNIA 94612-3550, US**

72 Inventor/es:
**MATHIES, RICHARD, A.;
PAEGEL, BRIAN;
SIMPSON, PETER, C. y
HUTT, LESTER**

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

ES 2 390 865 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

Aparatos y procedimientos para la separación de alta resolución de componentes de muestras en dispositivos de canales microfabricados

Referencia a solicitudes de patente relacionadas

- 5 La presente solicitud se refiere a la solicitud de EE. UU. N.º de serie 08/965.738, presentada el 7 de noviembre de 1997 y titulada "Microfabricated Array Electrophoresis Device and Method" (Dispositivo de electroforesis con matriz capilar microfabricado y procedimiento de uso).

Declaración referente a investigación financiada con fondos federales

- 10 La presente invención se realizó con el respaldo del gobierno mediante la subvención N.º FG0391ER61125, que fue concedida por el Departamento de Energía de EE. UU. y la subvención N.º HG01399, que fue concedida por el Instituto Nacional de Salud. El gobierno tiene determinados derechos en la invención.

Antecedentes de la invención

- 15 La invención se refiere a aparatos y procedimientos para separar componentes de muestras, tales como aparatos y procedimientos para la separación de alta resolución de componentes de muestras en dispositivos de canales microfabricados.

- 20 Pueden usarse técnicas de separación de componentes de muestras (p. ej., electroforesis capilar) en muchos procedimientos de diagnóstico y de identificación de genes, tales como el mapeo de genes, la detección de polimorfismos, la secuenciación génica y el diagnóstico de enfermedades, para separar ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), proteínas, u otros analitos moleculares pequeños en función de sus propiedades físicas y químicas. De acuerdo con la técnica de separación de componentes de muestras de electroforesis capilar, se transportan las moléculas en un capilar (o canal) que está conectado a un depósito lleno de tampón. También pueden formarse estos capilares mediante técnicas de microfabricación sobre sustratos planos (normalmente vidrio). Se aplica un campo eléctrico entre los extremos del canal para hacer que migren las moléculas. Normalmente, las muestras se introducen en un extremo de potencial alto y, bajo la influencia del campo eléctrico, se mueven hacia un extremo de potencial bajo del canal. Después de migrar a través del canal, se detectan los componentes de la muestra separados mediante un detector adecuado.

- 25 En un primer aspecto de la presente invención se proporciona un aparato de separación de componentes de muestras que comprende un canal de separación que tiene al menos una porción recta y al menos una porción de giro, caracterizado porque:

- 30 la porción de giro tiene una anchura de canal eficaz que es menor que la anchura de canal eficaz de la porción recta, para aumentar la longitud de un tapón de muestra que pasa a través de la porción de giro para reducir el ensanchamiento de banda provocado por el paso del tapón de muestra a través de la porción de giro.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un procedimiento de separación de una muestra que comprende:

- 35 depositar una muestra en un depósito de muestra en un sustrato

inyectar una porción de la muestra en una porción de un canal de separación del sustrato; y

- 40 aplicar un voltaje entre un depósito de cátodo y un depósito de ánodo del sustrato con el fin de conducir la muestra a lo largo del canal de separación que se define en el sustrato, entre el depósito de cátodo y el depósito de ánodo, teniendo una trayectoria de transporte de muestras una porción recta y al menos una porción de giro, caracterizado porque:

la porción de giro tiene una anchura de canal eficaz menor que la anchura de canal eficaz de la porción recta, para aumentar la longitud de un tapón de muestra que pasa a través de la porción de giro para reducir el ensanchamiento de banda provocado por el paso del tapón de muestra a través de la porción de giro.

Sumario de la invención

- 45 Las realizaciones pueden incluir una o más de las características siguientes.

- 50 Puede configurarse el canal de separación para realizar una separación electroforética. La porción de giro puede tener una anchura de canal eficaz en el plano de giro que es menor que la anchura de canal eficaz de la porción sustancialmente recta. Puede proporcionarse una porción de transición ahusada para acoplar la porción sustancialmente recta del canal, más ancha, a la porción de giro, más estrecha. También puede proporcionarse una región de transición que tenga una anchura de canal eficaz que aumente desde la porción de giro más estrecha hasta la porción sustancialmente recta más ancha. El aumento de la anchura de canal eficaz de la porción transición

puede ser sustancialmente lineal, escalonado o curvo. La porción de transición puede definir una trayectoria curva.

La porción de giro tiene una pared interior y una pared exterior. La velocidad de un componente de muestra cerca de la pared interior de la porción de giro puede ser inferior a la velocidad de un componente distinto de la misma muestra cerca de la pared exterior de la porción de giro. La porción de giro puede incluir una o más barreras para el transporte de muestras. Pueden disponerse las barreras para el transporte de muestras para retrasar el transporte de moléculas de muestra cerca de la pared interior de la porción de giro con respecto al transporte de moléculas cerca de la pared exterior de la porción de giro. Pueden disponerse una pluralidad de barreras para el transporte de muestras en la porción de giro del canal de separación con una densidad que es mayor en regiones cercanas de la pared interior que en regiones cercanas a la pared exterior. Preferentemente, la densidad de barreras para el transporte de muestras aumenta a lo largo de una dirección desde la pared exterior hacia la pared interior.

En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento de fabricación de un aparato de separación de componentes de muestras, que comprende; formar un depósito de cátodo en un sustrato; formar un depósito de ánodo en el sustrato; y formar en el sustrato un canal de separación que define, entre el depósito de cátodo y el depósito de ánodo, una trayectoria de transporte de muestras que tiene una porción sustancialmente recta y al menos una porción de giro con una característica de transporte de muestras que es diferente de la característica de transporte de muestras de la porción sustancialmente recta de la trayectoria de transporte de muestras.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de separación de una muestra por electroforesis, que comprende: depositar una muestra en un depósito de muestra de sustrato de electroforesis de matriz capilar; inyectar una porción de la muestra en una porción de un canal de separación definido en el sustrato; y aplicar un voltaje de funcionamiento entre un depósito de cátodo y un depósito de ánodo en el sustrato con el fin de conducir la muestra a lo largo del canal de separación que se define en el sustrato, entre el depósito de cátodo y el depósito de ánodo, teniendo una trayectoria de transporte de muestras una porción sustancialmente recta y al menos una porción de giro con una característica de transporte de muestras que es diferente de la característica de transporte de muestras de la porción sustancialmente recta de la trayectoria de transporte de muestras.

Entre las ventajas de la invención se encuentran las siguientes.

Mediante la reducción del ensanchamiento de bandas provocado por el paso de una muestra a través de los giros de un canal de separación, la invención proporciona un aparato de separación de alta resolución de componentes de muestras con un tamaño global pequeño. Por ejemplo, pueden proporcionarse canales de separación largos, que proporcionan separaciones de alta resolución, en un sustrato relativamente pequeño. Esta característica es particularmente ventajoso para la secuenciación de ADN, que es una técnica que pueden requerir longitudes de canal de separación de 10 cm o más. Además, la invención permite optimizar la disposición de canales y depósitos en una zona pequeña. La invención también permite la disposición conveniente de múltiples capilares microfabricados sobre un sólo sustrato.

Puede aplicarse la invención a todos los tipos de dispositivos de separación microfabricados, incluidos aquellos que realizan electroforesis capilar, electroforesis en zona libre, cromatografía electrocinética micelar, electrocromatografía convencional y enfoque isoeléctrico. Las aplicaciones posibles de la invención incluyen secuenciación de ADN, separación de proteínas, separación de aminoácidos, determinación del tamaño de fragmentos de ADN, determinación del tamaño de fragmentos por PCR, inmunoensayo, tipaje de PNS, mapeo de la expresión génica u otros analitos que se han separado por electroforesis o cromatografía capilar o electrocromatografía capilar en la literatura. Cualquier dispositivo de naturaleza orientada a la separación se beneficiará de la longitud aumentada de los canales que permite ahora la invención.

Otras características y ventajas resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción, incluidos los dibujos y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 es una vista diagramática en perspectiva de un aparato de separación de componentes de muestras.

La fig. 2 es una vista diagramática superior y de una disposición de canales y depósitos para un aparato de separación de componentes de muestras con dos giros y tres secciones rectas.

La fig. 3A es una vista diagramática superior y de una disposición de canales y depósitos para otro aparato de separación de componentes de muestras con geometrías de giro diferentes.

La fig. 3B es una vista diagramática superior de una porción de giro del canal de separación indicado de la realización de la fig. 3A.

Las fig. 4A-4C son vistas diagramáticas superiores de un canal de separación que tiene porciones rectas y una porción de giro con anchuras de canal eficaces sustancialmente iguales, mostrado en diferentes momentos durante un ciclo de separación de los componentes de una muestra.

La fig. 5 es una vista diagramática superior de parte de una porción de giro de un canal de separación.

Las fig. 6A-6C son vistas diagramáticas superiores de un canal de separación que tiene una porción recta y una porción de giro con una anchura de canal eficaz que es menor que las anchuras de canal eficaces de las porciones rectas, mostrado en diferentes momentos durante un ciclo de separación de los componentes de una muestra.

5 Las fig. 7A-7F son vistas diagramáticas superiores de diferentes porciones de giro de canales de separación.

Descripción de las realizaciones preferidas

En referencia a la fig. 1, como se describe en Simpson et al., "High-Throughput Genetic Analysis Using Microfabricated 96-sample Capillary Array Electrophoresis Microplates" Proc. Natl. Acad. Sci., EE. UU., vol. 95, párrafos 2256-2261 (marzo de 1998), un aparato de separación de componentes de muestras 10 (p. ej., un dispositivo de electroforesis capilar) incluye un sistema de separación 12 y un sistema de detección 14. El sistema de separación 12 incluye un sustrato 16 con uno o más canales de separación y un sistema de electrodos 18 para desviar los uno o más canales de separación. Una realización del sistema de detección 14 incluye una fuente de luz 20 (p. ej., un láser de iones de argón de onda continua que funciona a una longitud de onda de 488 nm, o un láser de Nd:YAG de frecuencia duplicada que funciona a una frecuencia de 532 nm) para producir un haz de luz 22 que se selecciona para que induzca la emisión fluorescente en muestras que migran a través del sistema de separación 12. El haz de luz 22 pasa a través de un filtro de excitación 24 hasta un espejo 26, que dirige el haz de luz 22 a un expansor de haz 28. Un divisor de haz dicróico 30 dirige el haz de luz 22 hacia un galvo escáner 32, que escanea el haz a través de la abertura de un montaje de lentes confocal 34. Se enfoca el haz sobre el sistema separación 12 con un tamaño de mancha de, p. ej., aproximadamente 5 micrómetros, y se escanea a través de los canales de separación del sistema de separación 12. La luz fluorescente emitida desde las muestras que migran a través de sistema de separación 12 se recoge por el montaje de lentes confocal 34 y se dirige hacia el divisor de haz dicróico 30, que es sustancialmente transparente a las longitudes de onda de la luz fluorescente recogida. Un filtro de emisión 36, que funciona, p. ej., en el intervalo de aproximadamente 545-620 nm, dirige la luz fluorescente recogida hacia una lente 38 que enfoca la luz fluorescente a través de una abertura de orificio pequeño 40 antes de que la luz se detecte mediante un detector 42 (p. ej., un tubo fotomultiplicador).

En referencia a la fig. 2, en una realización, el sistema de separación 12 incluye un canal de separación 50 que está acoplado entre un depósito de cátodo 52 y un depósito de ánodo 54. El canal de separación 50 tiene una primera porción de giro 56, que está acoplada entre las porciones rectas 58, 60, y una segunda porción de giro 62, que está acoplada entre las porciones rectas 60, 64. Un depósito de muestra 66 y un depósito de desechos 68 están acoplados al canal de separación 50 mediante un canal de inyección 70, que se cruza con el canal de separación 50 en una intersección 72. En funcionamiento, el sistema de electrodos 18 aplica un voltaje de inyección (p. ej., 300 voltios) a través del depósito de muestra 66 y del depósito de desechos 68. Durante este tiempo, el sistema de electrodos 18 aplica un voltaje de desvío (p. ej., 100 voltios) a través del depósito de cátodo 52 y del depósito de ánodo 54 para reducir la difusión de la mezcla al interior del canal de separación 50. Una vez que el fluido del depósito de muestra 66 alcanza la intersección 72, el sistema de electrodos 18 aplica un voltaje de separación (p. ej., 1.000 voltios) entre el depósito de cátodo 52 y el depósito de ánodo 54 para dirigir una muestra hacia el interior del canal de separación 50. Una vez se ha dirigido una muestra (tapón de inyección) de tamaño adecuado (p. ej., 100 micrómetros de longitud) hacia el interior del canal de separación 50, el sistema de electrodos 18 aplica de nuevo un voltaje de desviación (p. ej., 200 voltios) a través del depósito de muestra 66 y del depósito de desechos 68 para eliminar el exceso de muestra de la intersección 72. En esta realización, el sistema de detección 14 puede escanear el haz de luz 22 a través del canal de separación 50 a lo largo de una línea de barrido 74 que cruza el canal de separación 50 en tres ubicaciones (A, B y C) a lo largo de la trayectoria de transporte de la muestra.

En referencia a la fig. 3A, en otra realización, el sistema de separación 12 incluye una pluralidad de canales de separación 80-94 que están acoplados entre los depósitos de cátodo 96-110 correspondientes y un depósito de ánodo común 112. Cada canal de separación 80-94 incluye una primera y una segunda porción de giro acopladas entre porciones rectas. El canal de separación 84 incluye porciones de giro bruscas de 90°, mientras que cada uno de los otros canales de separación 80, 82 y 86-94 incluyen porciones de giro curvas. Obsérvese también que el radio de curvatura de las porciones de giro del canal de separación 88 es mayor que los radios de curvatura de las porciones de giro de los otros canales de separación, y que el radio de curvatura de las porciones de giro del canal de separación 90 es menor que los radios de curvatura de las porciones de giro de los otros canales de separación. Cada canal de separación 80-94 está acoplado a un depósito de muestra 114-128 correspondiente y a un depósito de desechos 130-144 correspondiente. Pueden inyectarse las muestras en los canales de separación 80-94 usando la técnica de desviación descrita anteriormente con relación a la realización de la fig. 2. En esta realización, un sistema de detección confocal rotatorio descrito en la patente de EE. UU. N.º de serie 09/015.198, presentada el 29 de enero de 1998 y titulada "Rotary Confocal Scanner for Detection of Capillary Arrays" (Escáner confocal rotatorio para la detección de matrices capilares), puede escanear un haz de luz 22 a lo largo de una trayectoria de barrido circular 146 (p. ej., con un radio de aproximadamente 1 cm y a una velocidad de barrido de aproximadamente 10 Hz) centrada en el depósito de ánodo 112. Debido a que la trayectoria de barrido 146 atraviesa cada canal de separación 80-94 en tres ubicaciones diferentes, el sistema de detección 14 puede recoger tres puntos de datos a partir de cada canal durante cada ciclo de barrido.

En las realizaciones descritas anteriormente, se transportan muestras a lo largo de canales de separación como consecuencia de un voltaje de separación aplicado por el sistema de electrodos 18. A medida que las muestras migran a lo largo de los canales de separación, los componentes de las muestras llegan a separarse físicamente en función de las diferencias en sus propiedades físicas y químicas. La cantidad de separación y, en consecuencia, la resolución del aparato, aumenta con la distancia que recorre la muestra a lo largo del canal de separación. Se usan porciones de giro para aumentar la trayectoria de transporte de muestras, al mismo tiempo que se mantiene un tamaño global relativamente pequeño para el sistema de separación 12. El uso de porciones de giro también proporciona flexibilidad para optimizar la disposición del canal de separación y los diversos depósitos. Como se explica en detalle a continuación, las porciones de giro están configuradas para reducir el ensanchamiento de banda provocado por el paso de una muestra a través de estas porciones de giro.

Como se usa en el presente documento, el término "porción de giro" se refiere en general a una porción de un canal de separación que define una trayectoria de transporte de muestras a lo largo de una dirección que es diferente de la dirección desde la que la muestra se estaba desplazando a través de una "porción recta" justo antes de que la muestra entrara en la porción del canal de separación en cuestión. Una porción de giro puede definir una trayectoria de transporte de muestras general que corresponde a un cambio de dirección de x° , donde $0^\circ < x < 360^\circ$. La trayectoria de transporte de muestras definida por una porción de giro puede corresponder a un cambio brusco de dirección (p. ej., las porciones de giro de 90° del canal de separación 84) o, de forma alternativa, puede corresponder a un cambio gradual de dirección (p. ej., las porciones de giro de 180° de los canales de separación 80, 82 y 86-90). Cada porción de giro se caracteriza por una pared interior y una pared exterior, donde la trayectoria de transporte de muestras a lo largo de la pared exterior es mayor que la trayectoria de transporte de muestras a lo largo de la pared interior, medida entre ubicaciones que se encuentran a lo largo de líneas que son ortogonales a las paredes interior y exterior en los extremos de la porción de giro. Por ejemplo, como se muestra en la fig. 3B, una pared interior 148 de una porción de giro de 90° del canal de separación 84 tiene una longitud infinitesimalmente corta, mientras que la pared exterior 150 correspondiente tiene una longitud igual a las longitudes de los segmentos 152 y 153. De forma similar, para la porción de giro de 180° 154 del canal de separación 88, la pared interior, que está más cerca del ánodo 112, corresponde a una trayectoria de transporte de muestras que es más corta que la trayectoria de transporte de muestras correspondiente a la pared exterior, que está más cerca de cátodo 104. Son posibles otras porciones de giro. Por ejemplo, en referencia a la fig. 7D (analizada a continuación), las porciones de giro 229 y 230 pueden tener paredes interiores y exteriores curvas que, conjuntamente, definen una trayectoria de transporte de muestras curva. De forma alternativa, como se muestra en la fig. 7E (analizada a continuación), la porción de giro 231 puede tener una pared interior 233 sustancialmente recta y una pared exterior 235 curva, en la que la dirección de la trayectoria de transporte de muestras definida a lo largo de la pared exterior 235 es diferente de la dirección desde la que se desplazaba la muestra a través de la porción recta 237. Por tanto, la trayectoria de transporte de muestras definida a lo largo de la pared exterior 235 es mayor que la trayectoria de transporte de muestras definida a lo largo de la pared interior 233.

Como se menciona anteriormente y se describe en detalle a continuación, las porciones de giro de los canales de separación están configurados para reducir el ensanchamiento de banda provocado por el paso de una muestra a través de la porción de giro. El ensanchamiento de banda es consecuencia, al menos en parte, de la diferencia en las trayectorias de separación definidas a lo largo de las paredes interior y exterior de la porción de giro. Suponiendo que las moléculas de una muestra se desplazan a través de una porción de giro a la misma velocidad, las moléculas próximas a la pared interior de la porción de giro completarán el giro más rápidamente que las moléculas próximas a la pared exterior. Existen también inhomogeneidades del campo eléctrico que son consecuencia de la diferencia de las longitudes de giro atravesadas por las moléculas de una banda de muestra. La velocidad (v) de una banda es el producto de su movilidad (μ_E), que es sustancialmente constante para una banda dada, y la magnitud del campo eléctrico (E) en el interior de la porción de giro:

$$v = \mu_E E \quad (1)$$

El gradiente de fuerza del campo eléctrico perpendicular al eje de la porción de giro también contribuye al efecto de ensanchamiento de banda debido a que el campo eléctrico es mayor cerca de la pared interior que cerca de la pared exterior. Por tanto, las moléculas próximas a la pared interior no sólo tienen una distancia más corta que recorrer a través de la porción de giro, sino que también se mueven más rápidamente a través de la porción de giro. Además, para electrocromatografía capilar u otras técnicas de separación a base de cromatografía, donde se induce el flujo de fluido en el canal, la trayectoria a lo largo de la pared interior de la porción de giro tiene una resistencia de flujo menor que la trayectoria a lo largo de la pared exterior.

Como se muestra en las fig. 4A-4C, el resultado neto de estos factores es que las bandas de muestra emergen de una porción de giro con una orientación inclinada que aparece en el sistema de detección 14 como una banda ensanchada, especialmente después de la difusión lateral. A medida que un tapón de inyección 160 migra a través de una porción recta 162 de un canal de separación, las moléculas que constituyen el tapón de inyección 160 se separan en bandas 164-166, que se detectan mediante el sistema de detección 14 en el tiempo como tres picos de fluorescencia diferenciados 167-169 (fig. 4A). A medida que las bandas 164-166 se desplazan a través de la porción recta 162, permanecen sustancialmente ortogonales a las paredes del canal de separación. En referencia a la fig. 4B, por los motivos expuestos anteriormente, las bandas 164-166 se inclinan con respecto a las direcciones radiales características de la porción de giro 174 (es decir, cada banda cruza las paredes de la porción de giro con ángulos

agudos en lugar de con ángulos rectos). Cuando las bandas 164-166 emergen de la porción de giro 174 y entran en una porción recta 176 (fig. 4C), están significativamente inclinadas. Después de producirse la difusión a través del canal se ensanchan y se fusionan los picos 167-169, disminuyendo de este modo la resolución del aparato de separación de componentes de muestras 10.

5 En referencia a la fig. 5, puede describirse el cambio de la anchura de banda resultante del paso de una banda a través de una porción de giro en términos de varios parámetros que pueden caracterizan una porción de giro dada. Para el propósito del siguiente análisis, una porción de giro circular 180 tiene una anchura de canal ($2r$) característica, un radio de curvatura (R) característico, una pared interior 182 con un radio (R_i) característico y una pared exterior 184 con un radio (R_o) característico. Las longitudes de la trayectoria de transporte de muestras a lo largo de la pared interior ($L_{interior}$) y la pared exterior ($L_{exterior}$) vienen dadas por:

$$L_{interior} = \theta (R_i) = \theta (R - r) \quad (2)$$

$$L_{exterior} = \theta (R_o) = \theta (R + r) \quad (3)$$

15 donde θ es el ángulo de la porción de giro expresado en radianes. Con base en la ecuación (1) y el hecho de que la magnitud del campo eléctrico (E) viene dada por el cociente entre el voltaje aplicado (V) y la longitud de la trayectoria de la muestra (L), las velocidades de la banda de muestra a lo largo de la pared interior 182 ($v_{interior}$) y de la pared exterior 184 ($v_{exterior}$) vienen dadas, en la interpretación más sencilla, por:

$$v_{interior} = \frac{\mu_E V}{L_{interior}} \quad (4)$$

$$v_{exterior} = \frac{\mu_E V}{L_{exterior}} \quad (5)$$

20 El periodo de tiempo necesario para que una banda de muestra se desplace a través de la porción de giro 180 viene dada por el cociente entre la longitud de la trayectoria y velocidad de la banda. Por tanto, con base en las ecuaciones (4) y (5), el tiempo necesario para atravesar una trayectoria a lo largo de la pared interior 182 ($t_{interior}$) y el tiempo necesario para atravesar una trayectoria a lo largo de la pared exterior ($t_{exterior}$) vienen dados por:

$$t_{interior} = \frac{L_{interior}}{v_{interior}} = \frac{\theta^2 (R - r)^2}{\mu_E V} \quad (6)$$

$$t_{exterior} = \frac{L_{exterior}}{v_{exterior}} = \frac{\theta^2 (R + r)^2}{\mu_E V} \quad (7)$$

25 Con base en la ecuaciones (6) y (7), la diferencia de tiempo (Δt) para que la banda de muestra atraviese la pared interior 182 y la pared exterior 184 vienen dada por:

$$\Delta t = t_{exterior} - t_{interior} = \frac{\theta^2 4Rr}{\mu_E V} \quad (8)$$

30 Finalmente, el cambio de la anchura de banda (Δw) provocado por el paso de la muestra a través del giro viene dado por el producto de Δt (dado por la ecuación (8)) y la velocidad promedio de la banda ($v_{promedio}$), que se supone que corresponde a los componentes de la banda que se desplazan a lo largo de un trayectoria a través del dentro de la porción de giro 180:

$$\Delta w = v_{promedio} \Delta t = \frac{\mu_E V}{\theta R} \cdot \frac{\theta^2 4Rr}{\mu_E V} = 4\theta r \quad (9)$$

Por tanto, para un ángulo de giro θ dado, puede reducirse el ensanchamiento de banda consecuencia del paso de

una muestra a través de una porción de giro disminuyendo la anchura de canal eficaz (2r) a través la porción de giro.

Por tanto, para reducir el ensanchamiento de banda provocado por el paso de una muestra a través de una porción de giro, puede construirse y disponerse la porción de giro para que tenga una característica de transporte de muestras que es diferente de la característica de transporte de muestras correspondiente de la porción recta. Por ejemplo; puede configurarse la porción de giro con una anchura de canal eficaz que es menor que las anchuras de canal eficaces de las porciones rectas del canal de separación. Puede reducirse la anchura de canal real de la porción de giro colocando una o más barreras para el transporte de muestras en la porción de giro del canal. Pueden configurarse las barreras de transporte de muestras de forma que los componentes de la muestra de una banda dada se desplacen a través de la porción de giro sustancialmente a la misma velocidad, mediante lo cual la orientación de la banda permanece sustancialmente alineada a lo largo de direcciones radiales características de la porción de giro.

También puede reducirse el ensanchamiento de banda inducido por un giro si se introduce un segundo giro de dirección contraria inmediatamente después del primer giro, como se muestra en la realización de la fig. 2. Sin embargo, la utilidad de esta configuración depende de la constante de difusión del analito y del tamaño de la banda. En particular, si la banda inicial es muy grande en relación con el volumen del giro, es probable que esta configuración muestre poco ensanchamiento de banda. Si el volumen de la banda es pequeño en relación con el volumen del giro y la difusión lateral es significativa durante el paso a través de la sección final entre los giros, el segundo giro no reducirá significativamente el efecto de ensanchamiento de banda. Por otra parte, si el volumen de la banda es pequeño en relación con el volumen del giro y la difusión lateral es insignificante durante el paso a través de la sección recta intermedia, el segundo giro tenderá a reducir el ensanchamiento de banda inducido por el primer giro.

Como se muestra en las fig. 6A-6G, este enfoque novedoso puede llevarse a cabo proporcionando un canal de separación 188 con una porción de giro 190 que tiene una anchura de canal que es menor que la anchura de las porciones rectas 192, 194. A medida que un tapón de inyección 196 migra a través de una porción recta 192 del canal de separación 188, las moléculas que constituyen el tapón de inyección 196 se separan en bandas 198-200, que se detectan mediante el sistema de detección 14 en el tiempo como tres picos de fluorescencia diferenciados 202-204 (fig. 6A). A medida que las bandas 198-200 se desplazan a través de la porción recta 192, sus orientaciones permanecen sustancialmente ortogonales a las paredes del canal de separación. En referencia a la fig. 6B, aunque las bandas 198-200 se inclinan ligeramente con respecto a la pared interior y la pared exterior de la porción de giro 190 (es decir, cada banda cruza las paredes de la porción de giro con un ángulo agudo), el grado de inclinación es significativamente menor que el grado de inclinación provocado por el paso a través de la porción de giro 174 (fig. 4A-4C), que tiene una anchura de canal más ancha. Cuando las bandas 198-200 emergen de la porción de giro 190 y entran en una porción recta 194 (fig. 6C), no están significativamente inclinadas. El resultado es que los picos de fluorescencia 202-204 detectados por el sistema de detección 14 sólo están ligeramente ensanchados. De hecho, la resolución de los picos 202-204 es mayor de la resolución antes de que las bandas 198-200 entraran en la porción de giro 190 debido a la distancia de migración añadida atravesada por las bandas a través de la porción de giro y debido a que el nuevo diseño del giro no ha degradado la resolución. Por tanto, el uso de porciones de giro con anchuras de canal estrechas da lugar a un aparato de separación de componentes de muestras 10 con una resolución mejorada.

En la realización de las fig. 6A-6C, las porciones rectas 192, 194 pueden tener una anchura de canal de aproximadamente 138 micrómetros (antes de las porciones ahusadas 210, 212) y la porción de giro 190 puede tener una anchura de canal de aproximadamente 33 micrómetros (después de las porciones ahusadas 210, 212). Las porciones ahusadas 210, 212 pueden tener una longitud de aproximadamente 200 micrómetros.

Otra ventaja de las porciones de giro con anchuras de canal estrechas se refiere a un efecto de apilamiento de bandas. Tras entrar en un giro estrechado, aumentará la longitud de las bandas y las distancias entre bandas. A medida que una banda se desplaza a lo largo de una porción de giro, la banda experimentará cierto ensanchamiento por difusión simple. Sin embargo, tras salir de porción de giro se reducirá la banda a su anchura original y también se reducirá el ensanchamiento provocado por el paso de la banda a través de la porción de giro. Para los propósitos del presente análisis, el subíndice "s" se refiere a los parámetros de un tapón de inyección en una porción recta de un canal de separación y el subíndice "t" se refiere a los parámetros del tapón de inyección en la porción de giro. El volumen del tapón en la porción recta es el mismo que el volumen del tapón en la porción de giro. En consecuencia:

$$w_s l_s h = w_t l_t h \quad (10)$$

Se supone que la altura (h) del canal de separación la misma en la porción recta y en la porción de giro, aunque no se trata de una suposición limitante que sea necesaria para la presente invención. Suponiendo que la anchura (w_t) de la porción de giro se reduce a una fracción (δ ; $0 < \delta < 1$) de la anchura (w_s) de la porción recta (es decir, $w_t = \delta w_s$), la longitud del tapón aumentará proporcionalmente:

$$l_t = \frac{1}{\delta} l_s \quad (11)$$

A medida que el tapón se desplaza a través de la porción de giro, también se alarga (Δl) como consecuencia de los efectos de ensanchamiento analizados anteriormente durante el paso a través del giro. Por tanto, la longitud total (l_{total}) del tapón en el giro viene dada por:

$$l_{total} = l_t + \Delta l = \frac{1}{\delta} \cdot l_s + \Delta l \quad (12)$$

5 Después de atravesar la porción de giro, el tapón puede entrar en otra porción recta con una anchura de canal w_s . Debido a que se conservan el volumen del tapón, la longitud del tapón disminuirá en la misma fracción (δ). Por tanto, la longitud del tapón (l_s') en la segunda porción recta viene dada por:

$$l_s' = \delta(l_t + \Delta l) = \delta\left(\frac{1}{\delta} \cdot l_s + \Delta l\right) = l_s + \delta \Delta l \quad (13)$$

10 Por lo tanto, el alargamiento adicional (Δl) provocado por el paso del tapón a través de la porción de giro se reduce en la misma fracción (δ) que se reduce la anchura de canal de la porción de giro con relación a la anchura de canal de las porciones rectas del canal de separación. Esto es, de este modo, el uso de porciones de giro de anchura estrecha reduce adicionalmente el ensanchamiento de banda provocado por el paso de la muestra a través de la porción de giro.

15 En referencia de nuevo a las fig. 6A-6C y a la fig. 7A, la porción de giro 195 está acoplada a las porciones rectas 192, 194 mediante las porciones de transición 210, 212, que se caracterizan por una reducción lineal de la anchura de canal desde la porción recta hasta la porción de giro del canal de separación. En este diseño, se reduce la anchura de canal antes de la entrada en el giro y se ensancha el canal después del giro. Esta modificación se logra ahusando el canal de forma gradual en un modo con forma de embudo en lugar de cambiando la anchura de forma brusca.

20 Como se muestra en las fig. 7B-7D, también son posibles otras transiciones desde la porción de giro hacia las porciones rectas. La realización de la fig. 7B emplea una transición brusca entre una porción de giro 220 y las porciones rectas 222, 224 (es decir, no existe una porción de transición). Se observa que la distorsión del patrón de migración de la muestra provocada por la transición brusca en esta realización podría inducir remolinos y otras características que disminuyen la resolución. En referencia a la fig. 7C, en otra realización, las porciones de transición 226, 228 son sustancialmente escalonadas. Como se muestra en la fig. 7D, las porciones de transición 229, 230 pueden ser curvas y tener paredes interiores y exteriores que definen trayectorias curvas que forman las porciones de giro. En referencia a la fig. 7E, en una realización alternativa, puede formarse una porción de giro 231 a partir de una pared interior 233 sustancialmente recta y una pared exterior 235. La anchura de la porción de giro 231 se estrecha para reducir el ensanchamiento de banda provocado por el paso de una muestra a través de la porción de giro 231.

35 En referencia a la fig. 7F, en otra realización más, se dispone un conjunto de puestos 232 (barreras para el transporte de muestras) en una porción de giro 234 de forma que la velocidad de la muestra cerca de la pared interior del giro 236 es inferior que la velocidad de la muestra cerca de la pared exterior 238. Tal como se muestra, la densidad de barreras para el transporte de muestras aumenta a lo largo de una dirección radial 240 desde la pared exterior 238 hacia la pared interior 236. Pueden colocarse los puestos 232 dentro de la porción de giro 234 con el fin de compensar las diferencias dependientes del radio en la longitud total de la trayectoria y la fuerza del campo eléctrico. Por ejemplo, pueden colocarse los puestos 232 de forma que una banda de muestra que atraviesa la porción de giro 234 permanece orientada con respecto a la pared exterior 238 y la pared interior 236 a lo largo de direcciones radiales características de la porción de giro 238, con la consecuencia de que la banda de muestra emerge de la porción de giro 234 con una orientación que es sustancialmente ortogonal a la porción recta acoplada al extremo de la porción de giro 234. En efecto, los puestos 232 reducen la movilidad de la muestra a lo largo de la pared interior 236, de forma que los componentes de la banda se desplazan a lo largo de la pared interior 236 sustancialmente a la misma velocidad radial que los componentes de la banda que se desplazan a lo largo de la pared exterior 238. En el caso de la electroforesis, la idea es instalar puestos de forma que la longitud de la trayectoria y la resistencia para trayectorias de radio pequeño y largo alrededor del giro sean iguales. En el caso de la cromatografía, la idea es mantener iguales la resistencia al flujo de fluido para trayectorias de radio pequeño y largo.

50 Pueden formarse los canales de separación descritos anteriormente en el sustrato 16 de acuerdo con los procedimientos de fabricación descritos en la solicitud de EE. UU N.º de serie 08/965.738, presentada el 7 de noviembre de 1997, que se ha incorporado en el presente documento por referencia. Por ejemplo, en una realización, puede grabarse químicamente una placa de vidrio Borofloat triturada de 1 mm de espesor y 98,4 mm ($3\frac{7}{8}$ pulgadas) de diámetro, con HF al 49 % durante dos minutos para producir canales de separación con una profundidad de 14 micrómetros. El patrón para grabado húmedo se logró usando técnicas fotolitográficas estándar. Después, se une una placa superior a la placa grabada para formar los canales. Se practican orificios en la placa

5 superior para proporcionar acceso de fluidos. Pueden fabricarse o moldearse de forma equivalente estos dispositivos en plástico u otras estructuras poliméricas adecuadas para electroforesis de muestras. También podrían formarse estos dispositivos a partir de obleas de silicio u otros materiales usados en la fabricación de semiconductores, seguidos de recubrimientos o tratamientos dieléctricos o poliméricos adecuados de las superficies para hacerlas adecuadas para electroforesis.

Existen otras realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones.

Por ejemplo, puede aplicarse el enfoque de giro novedoso descrito en el presente documento a cualquiera de las realizaciones de electroforesis con matriz capilar (CAE) descrita en la solicitud de EE. UU. N.º de serie 08/965.738.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato de separación de componentes de muestras (12), que comprende un canal de separación (50, 188) que tiene al menos una porción recta (58, 192) y al menos una porción de giro (56, 190, 220, 234), caracterizado porque:
- 5 la porción de giro tiene una anchura de canal eficaz que es menor que la anchura de canal eficaz de la porción recta, para aumentar la longitud de un tapón de muestra (196) que pasa a través de la porción de giro para reducir el ensanchamiento de banda provocado por el paso del tapón de muestra a través de la porción de giro.
2. El aparato de la reivindicación 1, en el que el canal de separación está configurado para realizar una separación electroforética.
- 10 3. El aparato de la reivindicación 1, en el que la porción de giro incluye una o más barreras para el transporte de muestras (232).
4. El aparato de la reivindicación 1, en el que la porción de giro tiene una anchura de canal que es menor que la anchura de canal de la porción recta.
- 15 5. El aparato de la reivindicación 1, que además comprende una porción de transición que acopla la porción recta y la porción de giro, teniendo la porción de transición una anchura que aumenta desde la porción de giro más estrecha (195) hacia la porción recta más ancha.
6. El aparato de la reivindicación 5, en el que el aumento de la anchura del canal de la porción de transición (210, 212) es lineal.
- 20 7. El aparato de la reivindicación 5, en el que el aumento de la anchura del canal de la porción de transición (226, 228) es escalonado.
8. El aparato de la reivindicación 5, en el que la porción de transición (229, 230) define una trayectoria curva.
9. El aparato de la reivindicación 1, en el que la porción de giro tiene una pared interior (236) y una pared exterior (238), y la velocidad de un componente de muestra cerca de la pared interior de la porción de giro es menor que la velocidad de un componente diferente de la misma muestra cerca de la pared exterior de la porción de giro.
- 25 10. El aparato de la reivindicación 1, en el que la porción de giro tiene una pared interior (236) y una pared exterior (238), y además comprende una pluralidad de barreras para el transporte de muestras dispuestas en la porción de giro del canal de separación con una densidad que es mayor en regiones próximas a la pared interior que en regiones próximas a la pared exterior.
- 30 11. El aparato de la reivindicación 10, en el que la densidad de barreras para el transporte de muestras aumenta a lo largo de una dirección (240) desde la pared exterior hacia la pared interior.
12. El aparato de la reivindicación 1, que además incluye:
un depósito de cátodo (52, 96-110);
un depósito de ánodo (54, 112); y
en el que el canal de separación define una trayectoria de transporte de muestras entre el depósito de cátodo y el
35 depósito de ánodo.
13. El aparato de la reivindicación 12, en el que la porción de giro tiene una pared interior (236) y una pared exterior (238), y la porción de giro incluye una o más barreras para el transporte de muestras (232) dispuestas para retrasar el transporta de moléculas de muestras cerca de la pared interior de la porción de giro con relación al transporte de moléculas de muestra cerca de la pared exterior de la porción de giro.
- 40 14. El aparato de la reivindicación 12, que además comprende una pluralidad de canales de separación (80-94), definiendo cada uno, entre un depósito de cátodo asociado y el depósito de ánodo, una trayectoria de transporte de muestras que tiene al menos una porción de giro.
15. El aparato de separación de componentes de muestras de la reivindicación 1, que además incluye:
un depósito de muestras (66, 114-128) acoplado al canal de separación; y
45 un depósito de desechos (68, 130-144) acoplado al canal de separación.
16. Un procedimiento de separación de una muestra que comprende:
depositar una muestra en un depósito de muestras (66, 114, 128) en un sustrato (16);

inyectar una porción de la muestra en una porción de un canal de separación (50, 188) del sustrato; y

aplicar un voltaje entre un depósito de cátodo (52, 96-101) y un depósito de ánodo (54, 112) del sustrato con el fin de conducir la muestra a lo largo del canal de separación que se define en el sustrato, entre el depósito de cátodo y el depósito de ánodo, teniendo una trayectoria de transporte de muestras una porción recta (58, 192) y al menos una porción de giro (56, 190 220, 234), caracterizado porque:

- 5
- la porción de giro tiene una anchura de canal eficaz que es menor que la anchura de canal eficaz de la porción recta, para aumentar la longitud de un tapón de muestra (196) que pasa a través de la porción de giro para reducir el ensanchamiento de banda provocado por el paso del tapón de muestra a través de la porción de giro.
- 10
17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que la porción de giro tiene una anchura de canal que es menor que la anchura de canal de la porción recta.
18. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que la porción de giro tiene una pared interior (236) y una pared exterior (238), y la porción de giro incluye barreras para el transporte de muestras (232) dispuestas para retrasar el transporte de moléculas de muestras cerca de la pared interior de la porción de giro con relación al transporte de moléculas de muestra cerca de la pared exterior de la porción de giro.
- 15
19. El procedimiento de la reivindicación 16, que además comprende una pluralidad de canales de separación (80-94), definiendo cada uno, entre un depósito de cátodo asociado y el depósito de ánodo, una trayectoria de transporte de muestras que tiene al menos una porción de giro.
20. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que la porción de giro incluye una o más barreras para el transporte de muestras (232).

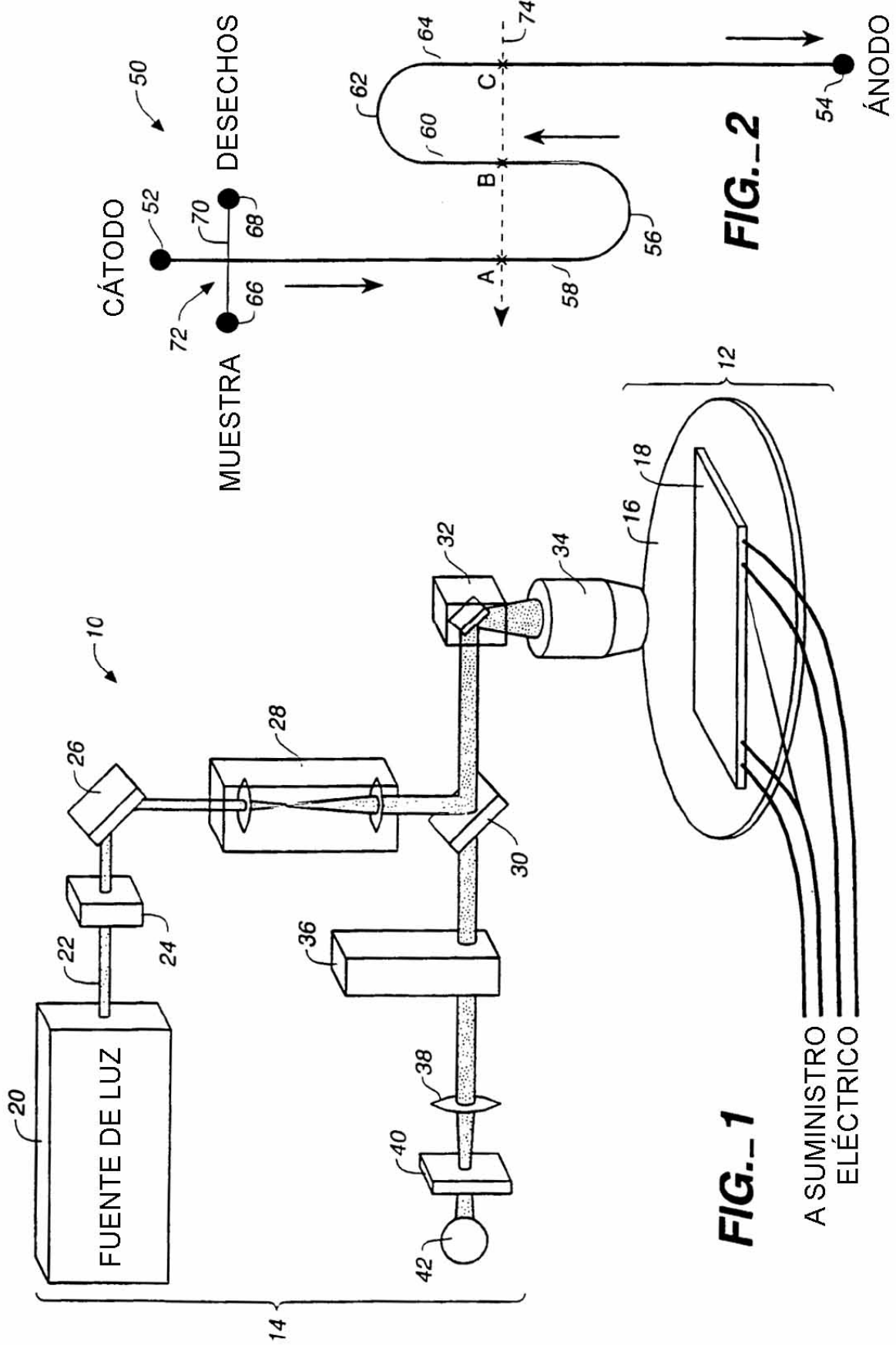
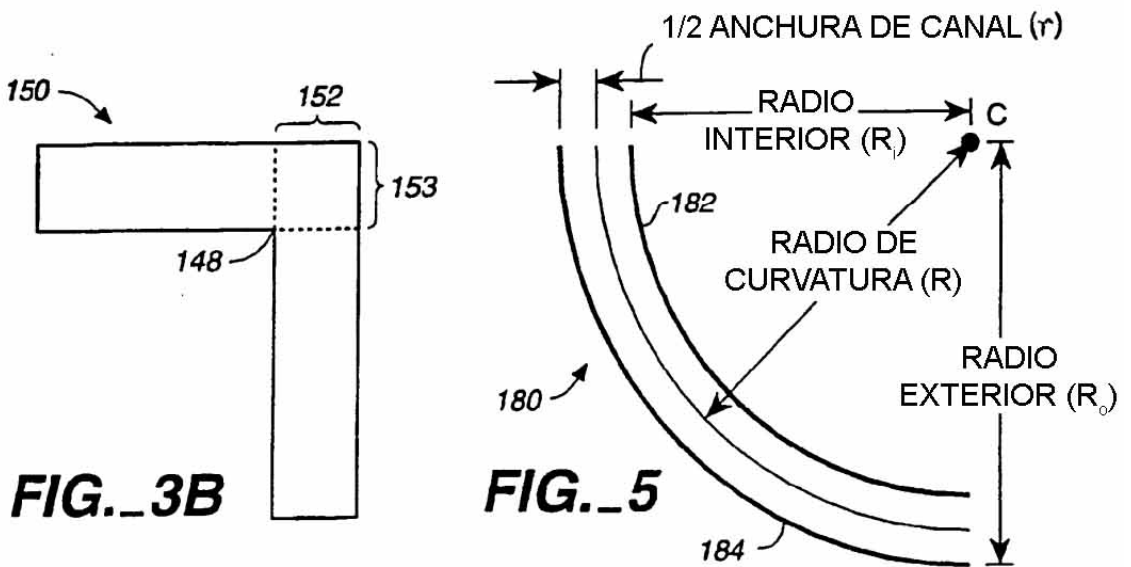
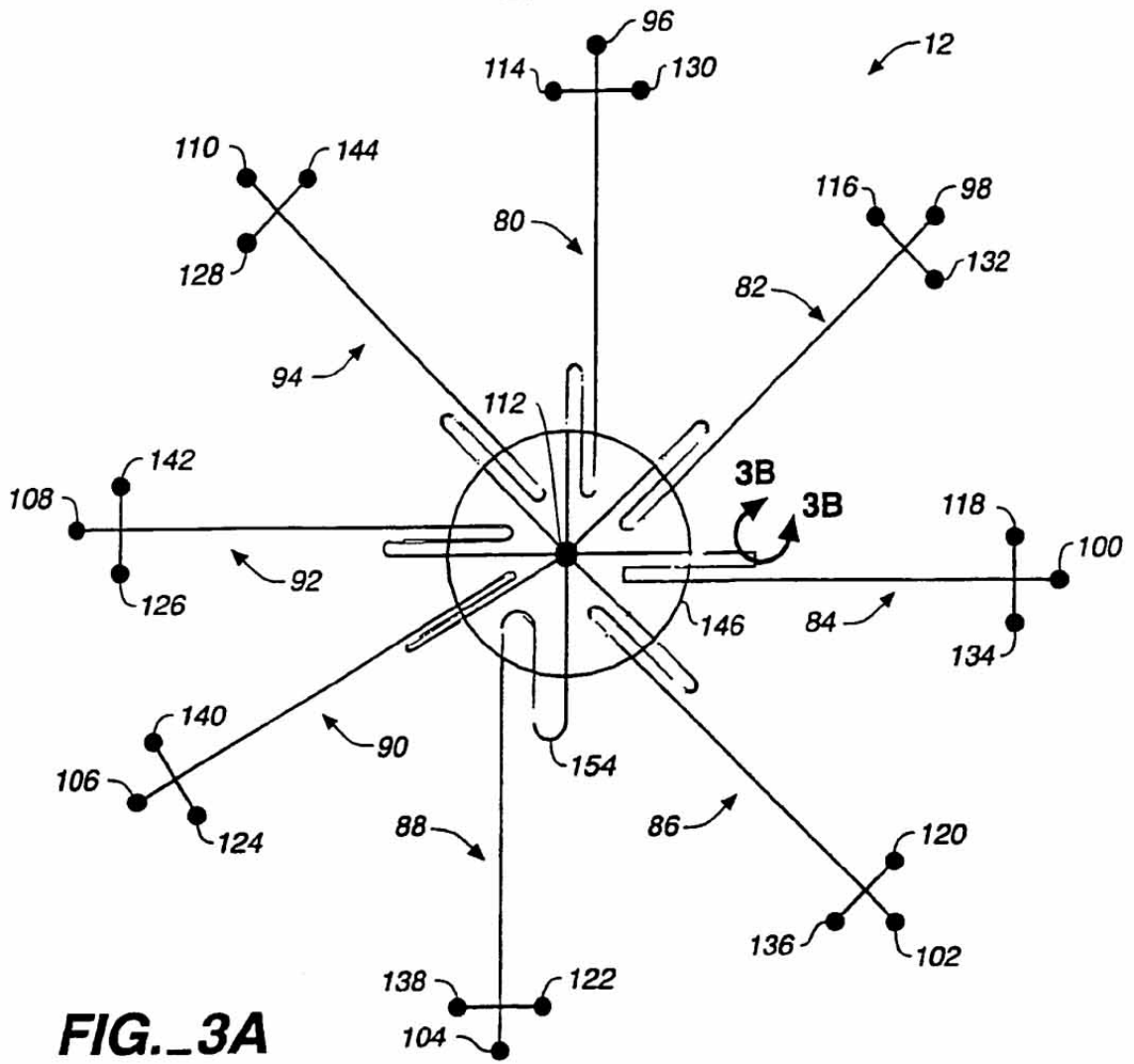


FIG.- 1

FIG.- 2



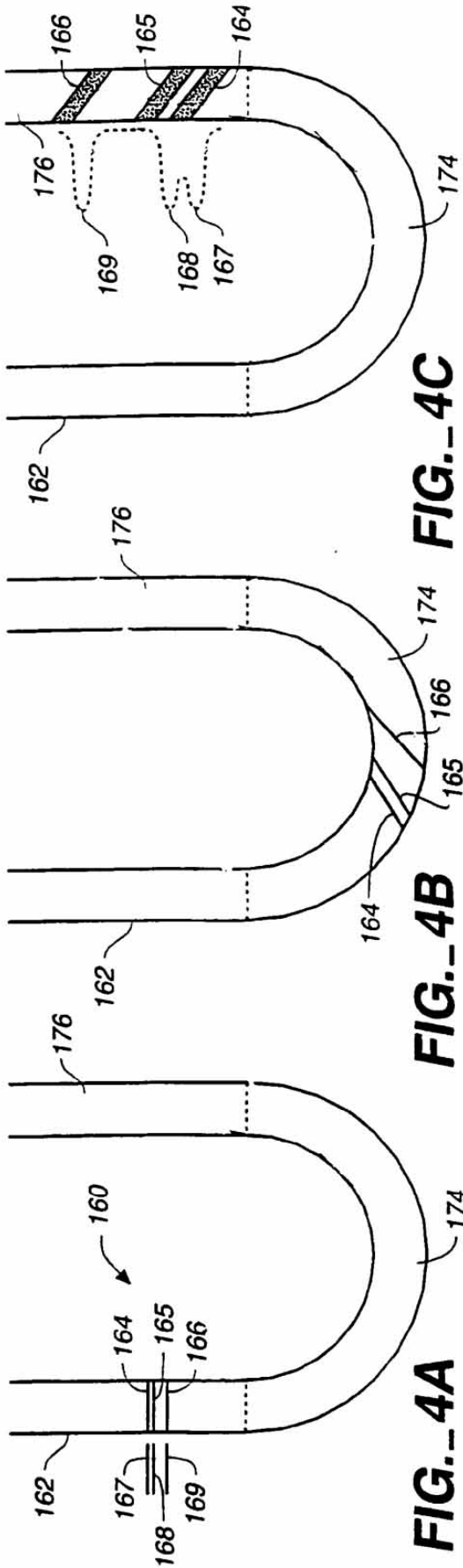


FIG. 4C

FIG. 4B

FIG. 4A

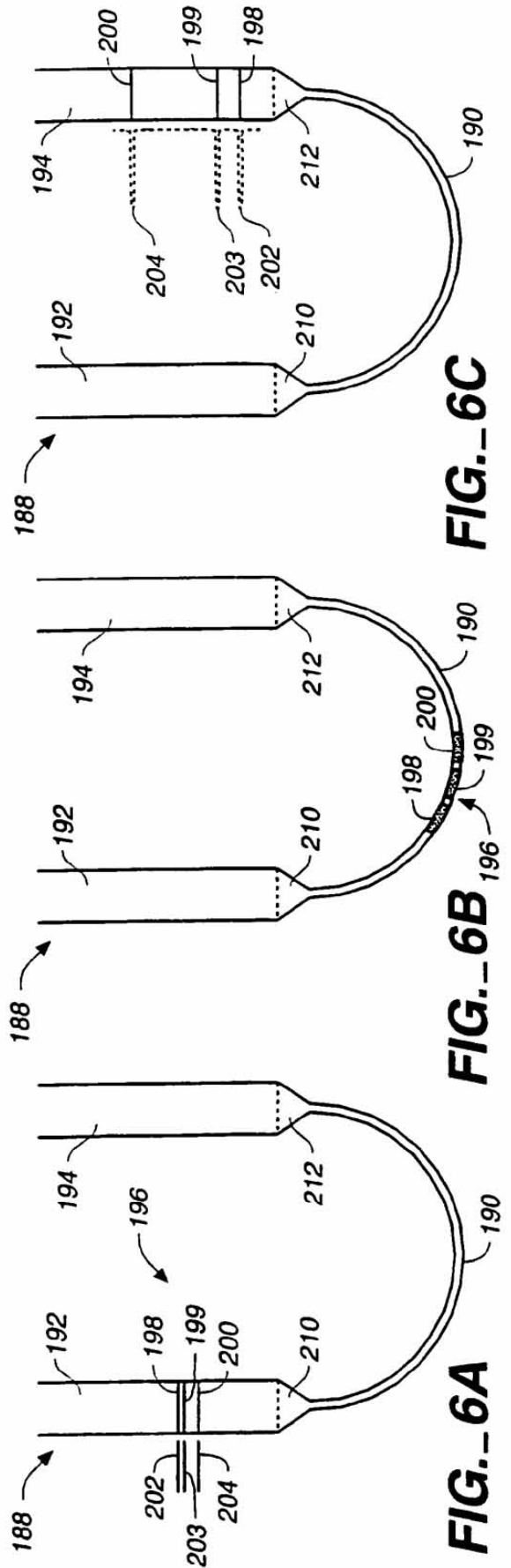


FIG. 6C

FIG. 6B

FIG. 6A

