

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 944**

51 Int. Cl.:

G01N 21/03 (2006.01)
G01N 21/05 (2006.01)
G01N 21/69 (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01)
B01J 19/00 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
B01L 7/00 (2006.01)
B01L 3/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.1997 E 97954135 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2013 EP 0948408**

54 Título: **Reactor químico microfabricado**

30 Prioridad:

11.12.1996 US 763465

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

10.10.2013

73 Titular/es:

**LAWRENCE LIVERMORE NATIONAL SECURITY,
LLC (100.0%)
2300 First Street, Suite 204
Livermore, CA 94550, US**

72 Inventor/es:

NORTHRUP, M. ALLEN

74 Agente/Representante:

GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro

ES 2 424 944 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

Reactor químico microfabricado

5 El Gobierno de los Estados Unidos tiene derechos en la presente invención de acuerdo con el N° de Contrato W-7405-ENG-48 entre el Departamento de Energía de los Estados Unidos y la Universidad de California para la operación de Lawrence Livermore National Laboratory.

Antecedentes de la invención

10

La presente invención se refiere a instrumentos para el control de la reacción química y la detección de los reaccionantes que participan y los productos resultantes, en particular a instrumentos microfabricados integrados para llevar a cabo reacciones químicas de microescala que implican el control preciso de parámetros de las reacciones y más particularmente a dispositivos de manguitos basados en silicio o no basados en silicio como

15 cámaras de reacción para reacciones químicas y que se pueden utilizar en matrices grandes de cámaras individuales para una unidad de microrreacción de alto rendimiento.

20

Generalmente, los instrumentos actuales para llevar a cabo la síntesis química a través del control térmico y el ciclado son muy grandes e ineficaces (sobre mesa), y con frecuencia trabajan por medio de calentamiento y enfriamiento de una gran masa térmica (por ejemplo, un bloque de aluminio). En los últimos años, los esfuerzos se han dirigido a la miniaturización de estos instrumentos por medio del diseño y la construcción de cámaras de reacción de materiales de silicio y basados en silicio (por ejemplo, silicio, nitruro, silicio policristalino) que tienen calentadores integrados y enfriamiento por medio de convección a través del silicio.

25

Actualmente se conocen bien las tecnologías de microfabricación e incluyen metalizado por bombardeo, deposición de electrodos, deposición de vapor de baja presión, fotolitografía y grabado al aguafuerte. Se pueden aplicar estos y procesos similares a la fabricación de cámaras de reacción y sus elementos de control tales como calentadores, termopares, detectores, sensores, electrodos y otros dispositivos que se pueden usar para detectar y controlar los parámetros de reacción. Ejemplos incluyen películas magnéticas, películas termoeléctricas y películas electroactivas para la manipulación de reactivos. Las técnicas de fabricación adicionales incluyen evaporación, extrusión, moldeo, sinterización, inyección, conformación, extracción, laminado, etc. y se pueden usar para microfabricar las cámaras de reacción a partir de una variedad de materiales apropiados. Los dispositivos microfabricados están formados, por ejemplo, por sustratos cristalinos, tales como silicio y arseniuro de galio, pero pueden estar formados por materiales no cristalinos, tales como vidrio, cerámica, metales o determinados polímeros. Se puede controlar de forma precisa la forma de los dispositivos de silicio cristalino, por ejemplo, ya que las superficies sometidas a grabado al aguafuerte son generalmente planos de cristal, y los materiales cristalinos se pueden unir por medio de procesos tales como fusión a temperaturas elevadas, unión anódica, o métodos asistidos por campo.

30

35

La tecnología de microfabricación monolítica ahora permite la producción de dispositivos eléctricos, mecánicos, electromecánicos, ópticos, químicos y térmicos, incluyendo bombas, válvulas, calentadores, mezcladores y detectores para cantidades de microlitro y nanolitro de gases, líquidos y sólidos. De igual forma, ahora se pueden producir sondas ópticas de guía de ondas y sensores de ondas flexurales de ultrasonidos en una microescala. La integración de estos dispositivos microfabricados para dar lugar a un sistema individual permite la producción por lotes de instrumentos analíticos basados en reactores de microescala. Dichos microinstrumentos integrados se

40 pueden aplicar a reacciones bioquímicas, químicas inorgánicas u orgánicas para llevar a cabo diagnósticos biomédicos y ambientales, así como el procesado biotecnológico y la detección.

45

50

La operación de dichos microinstrumentos integrados se automatiza de manera sencilla, y debido a que el análisis se puede llevar a cabo in situ, la contaminación es muy reducida. Debido a los tamaños inherentemente pequeños de dichos dispositivos, el calentamiento y el enfriamiento puede ser extremadamente rápido. Estos dispositivos tienen un requisito de alimentación eléctrica muy bajo y pueden ser alimentados por medio de baterías o por medio de acoplamiento electromagnético, capacitivo, inductivo u óptico.

55

Los volúmenes pequeños y las relaciones elevadas de área superficial con respecto a volumen de los instrumentos de reacción microfabricados proporcionan un elevado nivel de control de los parámetros de la reacción. Los calentadores pueden producir el ciclado o el aumento de temperaturas; mientras que se pueden producir cambios sonoquímicos y sonofísicos en las estructuras de conformación por medio de transductores de ultrasonidos; y las polimerizaciones se pueden generar por medio de la radiación óptica incidente.

60

Las reacciones de síntesis, y especialmente las reacciones en cadena de síntesis tales como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), se adaptan particularmente bien a los instrumentos de reacción de microfabricación. PCR puede ampliar selectivamente una molécula individual de ADN (o ARN) de un organismo por medio de un factor de 10^6 a 10^9 . Este procedimiento bien establecido requiere la repetición de ciclos de calentamiento (desnaturalización) y enfriamiento (atemperado) en presencia de una molécula diana de ADN original, primeros de AND específicos,

trifosfatos de desoxinucleótidos y enzimas de ADN polimerasa y cofactores. Cada ciclo produce el doblado de la secuencia de ADN diana, lo que conduce a una acumulación exponencial de la secuencia diana.

5 El procedimiento de PCR incluye: 1) procesar la muestra para liberar las moléculas de ADN diana en el interior de un extracto bruto; 2) adición de una disolución acuosa que contiene enzimas, tampones de trifosfatos de desoxiribonucleótido (dNTPS) y primeros de oligonucleótido; 3) ciclado térmico de la mezcla de reacción entre dos o tres temperaturas (por ejemplo, 90-96, 72 y 37-55 °C); y 4) detección del ADN ampliado. Se pueden incorporar en el procedimiento PCR etapas intermedias, tales como la purificación de los productos de reacción y la incorporación de primeros de plegado de superficie, por ejemplo.

10 Un problema con las técnicas de laboratorio PCR normalizadas es que las reacciones de PCR se pueden contaminar o pueden verse inhibidas por la introducción de una molécula individual extraña de contaminante de ADN, tal como a partir de los experimentos previos, u otros contaminantes, durante las transferencias de reactivos de un recipiente a otro. De igual forma, normalmente los volúmenes de reacción PCR usados en las técnicas de laboratorio normalizadas son del orden de 50 microlitros. Un ciclo térmico consiste normalmente en cuatro etapas: calentamiento de una muestra hasta una primera temperatura, mantenimiento de la muestra a la primera temperatura, enfriamiento de la muestra hasta una segunda temperatura más baja y mantenimiento de la temperatura a esa temperatura más baja. Normalmente, cada una de estas etapas de un ciclo térmico requiere aproximadamente un minuto, y de este modo para completar cuarenta ciclos, por ejemplo, se requieren aproximadamente tres horas. De este modo, debido al volumen normalmente usado en los procedimientos de laboratorio normalizados, el tiempo implicado, así como a las posibilidades de contaminación durante las transferencias de reactivos de un recipiente a otro, existe claramente la necesidad de microinstrumentos capaces de llevar a cabo el procedimiento e PCR.

25 Recientemente, se ha reducido el tiempo de ciclado para llevar a cabo la reacción PCR llevando a cabo la reacción PCR en tubos capilares y usando un calentador de aire forzado para calentar los tubos. También, se ha desarrollado recientemente un reactor microfabricado integrado para reacciones químicas in situ, que es especialmente ventajoso para reacciones bioquímicas que requieren un ciclado térmico de alta precisión, en particular manipulaciones basadas en ADN tales como PCR, ya que las dimensiones pequeñas de microinstrumentación favorecen tiempos de ciclado rápidos. Este reactor microfabricado se describe y reivindica en la Solicitud relacionada de EE.UU. N° de Serie 07/938.106, presentada el 31 de agosto, 1992, titulada "Reactor Microfabricado", cedida al mismo cesionario. De igual forma, se ha desarrollado una cámara de micro-reacción ópticamente integrada y ópticamente calentada, que se puede utilizar, por ejemplo, en el reactor microfabricado integrado de la Solicitud relacionada N° de Serie 07/938.106, para su uso en reactores químicos y se describe y reivindica en la Solicitud relacionada de N° de Serie 30 08/489.819, presentada el 13 de junio de 1995, titulada "Diode Laser Heated Micro-Reaction Chamber With Sample Detection Means", cedida al mismo cesionario.

40 En el documento WO-A-97/00726 se desvela un reactor químico microfabricado, que comprende una cámara de reacción de manguitos basados en silicio. En el documento US-A-5.304.487, se desvela un dispositivo para analizar una muestra fluida que contiene células. En el documento US-A-5.252.294 se desvela una microestructura con cavidades, recipientes, aberturas, canales, depresiones, salientes o similares para el examen de sustancias de muestra.

45 La presente invención va destinada a una geometría particular de micro-reactores basados en silicio y no basados en silicio que se ha comprobado que son muy eficaces en términos de potencia y uniformidad de temperatura. El micro-reactor de esta invención, que es ampliamente considerado como dispositivo de manguitos basados en silicio o no basado en silicio para reacciones químicas, se puede utilizar eficazmente en cualquiera de los sistemas de reacción de la solicitud relacionada anteriormente referenciada. La presente invención utiliza, por ejemplo, polisilicio dopado para el calentamiento y silicio en masa para el enfriamiento convectivo. La presente invención permite el multi-parámetro, la modificación simultánea del tamaño de la ventana de detección, la detección in situ, volúmenes de reacción, uniformidad térmica y tasas de calentamiento y enfriamiento. Además, permite el uso de grandes conjuntos de cámaras de reacción individuales para una unidad de micro-reacción de alto rendimiento.

55 Sumario de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar una cámara de reacción química mejorada.

Otro objeto de la invención es proporcionar un reactor químico de tipo manguitos basados en silicio o no basado en silicio.

60 Otro objeto de la invención es proporcionar un reactor microfabricado que usa una combinación de materiales.

Otro objeto de la invención es proporcionar una cámara de reacción química que combine el uso de polisilicio dopado y silicio en masa.

65 Otro objeto de la invención es proporcionar un reactor químico microfabricado que tenga una cámara de reacción de

manguitos con una ranura en el mismo para introducir fluidos de reacción, bien directamente o por medio de un tubo.

Otro objeto de la invención es proporcionar manguitos de reacción de silicio o que no son de silicio que combinen una relación crítica de materiales para proporcionar las características térmicas apropiadas.

5

Otro objeto de la invención es proporcionar manguitos de reacción de silicio o que no sean de silicio que combinen una relación crítica de materiales para proporcionar control de los reactivos y productos.

10

Otro objeto de la invención es proporcionar manguitos de reacción de silicio o que no sean de silicio que combinen una relación crítica de materiales para proporcionar la respuesta térmica apropiada.

Otro objeto de la invención es proporcionar cámaras de reacción química que combinen, por ejemplo, el uso de polisilicio dopado y silicio en masa para proporcionar flexibilidad en las propiedades térmicas y ópticas permitiendo la implementación en instrumentos grandes y pequeños.

15

Otro objeto de la invención es proporcionar series interconectadas o conjuntos de manguitos de reacción de silicio o que no son de silicio proporcionando de este modo un sistema de reacción de flujo continuo.

20

Otro objeto de la invención es proporcionar un manguito de reacción basado en silicio que combine una relación crítica de silicio y nitruro de silicio con respecto al volumen del material objeto de calentamiento (por ejemplo, un líquido) con el fin de proporcionar un calentamiento uniforme, con un requisito energético menor.

Otro objeto de la invención es proporcionar una cámara de reacción de manguitos que permita la introducción de un inserto (por ejemplo, plástico) en el interior del manguito de reacción que contenga la mezcla de reacción, mitigando de este modo cualesquiera cuestiones de incompatibilidad del material.

25

Otro objeto de la invención es proporcionar una serie interconectada de conjunto de manguitos de reacción de silicio o que no son de silicio conectados por medio de tubos de polímeros, metal, vidrios y materiales cerámicos, similares a "secuencias de perlas" en cuanto a aspecto.

30

Otro objeto de la invención es proporcionar un conjunto de cámaras de reacción individuales para una unidad de micro-reacción de alto rendimiento.

Otro objeto de la invención es proporcionar un instrumento de accionamiento manual que usa cámaras de reacción de tipo manguitos con calentadores integrados.

35

Otro objeto de la invención es proporcionar una cámara de reacción con detección automática y control de retro-alimentación.

Otro objeto de la invención es proporcionar un control de inteligencia artificial de las reacciones en una cámara de reacción.

40

Otro objeto de la invención es proporcionar modulación de anchura por pulsos como control de retro-alimentación para la cámara de reacción.

45

Otro objeto de la invención es proporcionar control de reacción con películas magnéticas, películas termoeléctricas o películas electroactivas, tal como electrodos.

Otro objeto de la invención es proporcionar una combinación de módulos de detección, tal como electroquimioluminiscencia, ópticos, eléctricos y capacitivos.

50

Otro objeto de la invención es proporcionar una cámara de reacción combinada con canales de microelectroforesis.

Otro objeto de la invención es proporcionar una cámara de reacción fabricada a partir de silicio o a partir de un material que no es silicio directamente acoplado con un canal de microelectroforesis fabricado de silicio o de un material que no es silicio.

55

Otro objeto de la invención es proporcionar una cámara de reacción de tipo manguitos con un canal de microelectroforesis acoplado por medio de un revestimiento interno.

60

Otro objeto de la invención es proporcionar una sistema de detección de microelectroforesis basado en dispositivos ópticos, eléctricos o magnéticos.

Otro objeto de la invención es proporcionar un sistema de detección de microelectroforesis basado en diodos que emiten luz y fotodiodos.

65

Otros objetos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente memoria descriptiva y los dibujos adjuntos. Básicamente, la invención es un manguito de silicio o no basado en silicio para reacciones químicas. La invención engloba una cámara de reacción química que combina, por ejemplo, el uso de polisilicio para el calentamiento y silicio en masa para enfriamiento convectivo. La cámara de reacción puede combinar una relación crítica de materiales que no son de silicio y materiales basados en silicio para proporcionar las propiedades térmicas deseadas. Por ejemplo, el manguito de reacción basado en silicio, puede combinar una relación crítica de silicio y nitruro de silicio con respecto al volumen de material objeto de calentamiento con el fin de proporcionar un calentamiento uniforme, con requisitos energéticos reducidos. El manguito de reacción de la presente invención también permite la introducción, en su interior, de un tubo secundario o inserto que contiene la mezcla de reacción, mitigando de este modo cualesquiera cuestiones potenciales de incompatibilidad del material. La presente invención es una ampliación del reactor microfabricado integrado anteriormente referenciado de la Solicitud relacionada N° de Serie 07/938.106 y de la cámara de micro-reacción ópticamente integrada anteriormente referenciada de la Solicitud relacionada de N° de Serie 08/489.819. La cámara de reacción de manguitos se puede utilizar en sistemas de reacción química para la síntesis o el procesado de reacciones orgánicas, inorgánicas o bioquímicas, tales como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y/o otras reacciones de ADN (tales como la reacción en cadena de ligasa) u otras reacciones sintéticas, basadas en ciclado térmico.

Breve descripción de los dibujos

- 20 La Figura 1 muestra una vista en perspectiva transversal parcial de un instrumento de reacción química microfabricado en un aparato de control/fuente de alimentación eléctrica.
 La Figura 2 es un esquema del instrumento de reacción de la Figura 1.
 La Figura 3 ilustra esquemáticamente una configuración de detección y calentamiento para una cámara de reacción microfabricada.
- 25 La Figura 4 ilustra una realización de una cámara de reacción de manguitos basados en silicio microfabricada preparada de acuerdo con la presente invención.
 La Figura 5 es un conjunto de cámaras de reacción de manguitos de la Figura 4 conectadas operativamente a un conjunto de microelectroforesis.
 La Figura 6 es una vista ampliada y frontal de otra realización de una cámara de micro-reacción de manguitos similar a la de la Figura 4.
- 30 La Figura 7 ilustra una realización de corte transversal de una sección ampliada de la Figura 6 que usa un calentador aislado versión de ventaja fija.
 La Figura 8 ilustra otro corte transversal de una realización de la misma sección ampliada de la Figura 6 que usa un versión de calentador no aislado versión ventana variable.
- 35 La Figura 9 es una vista de un instrumento de accionamiento manual (PCR man) que utiliza las cámaras de reacción de la Figura 6 como insertos para modificar reacciones.
 Las Figuras 10A y 10B ilustran un instrumento de ciclado térmico que utiliza varios cientos de cámaras de micro-reacción basadas en silicio y controladas individualmente.
- 40 La Figura 11 ilustra una representación esquemática de un sistema de ampliación de ADN de alto rendimiento, de manipulación de muestra y electroforesis.
 La Figura 12 es una realización de un inserto/revestimiento para una cámara de reacción con ventana óptica, con la parte superior/cubierta abierta.
 La Figura 13 ilustra el relleno externo de un inserto de cámara de reacción/revestimiento.
- 45 La Figura 14 ilustra reactivos/sondas para la detección de productos específicos inmovilizados directamente sobre ventanas o dentro del fluido de reacción como "tira de ensayo" y detectados ópticamente en el instrumento de accionamiento manual (PCR man) de la Figura 9.
 Las Figuras 15 y 16 ilustran esquemáticamente sistemas de detección ópticos para su uso en las cámaras de micro-reacción de la Figura 6.
- 50 La Figura 17 ilustra esquemáticamente el uso de una detección integrada de un sistema inteligente artificial de retroalimentación.
 La Figura 18 es un diagrama que muestra reacciones de oxidación electroquímicas y de reducción química de tris(2,2'-bipiridil)rutenio (II) (TBR) y tripoliamina (TPA).
 La Figura 19 ilustra un método para marcar y separar ADN para la detección y cuantificación por medio de electroquimioluminiscencia (ECL).
- 55 La Figura 20 ilustra un voltaje de célula e intensidad de ECL frente a tiempo, con el voltaje aumentado, y a continuación disminuido.
 La Figura 21 ilustra una realización de una célula de ECL sometida a micro-maquinizado con un ánodo de película fina, y un detector de fotiodo asociado.
 La Figura 22 es una vista ampliada en corte transversal de la célula de ECL de la Figura 21 con las conducciones eléctricas.
- 60 Las Figuras 23-30 ilustran el proceso de fabricación para producir una célula ECL, como viene ilustrado en la Figura 21.
 La Figura 31 ilustra una realización que usa A1 sobre ITO sobre vidrio que reduce la resistencia del electrodo de ITO.
- 65 Las Figuras 32A y 32B muestran series múltiples lineales y paralelas de cámaras de reacción de tipo manguitos a lo largo de series de tubos de interconexión con unidades lógicas de control de reacción,

detección y retroalimentación.

Las Figuras 33A y 33B muestran realizaciones de una unidad de control de reacción que utiliza una película magnética sometida a micromaquinizado (es decir, depositada por metalizado por bombardeo) para controlar las partículas magnéticas de la cámara de reacción.

5 La Figura 34 ilustra la integración de un elemento de control de reacción en un sistema de flujo continuo monolítico.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

10 La presente invención es una cámara de reacción química de manguitos micro-fabricada. Una realización basada en silicio combina características tales como polisilicio dopado para calentamiento y silicio en masa para enfriamiento convectivo, por ejemplo. Las cámaras de micro-reacción, fabricadas a partir de materiales de silicio o que no son de silicio se pueden usar en un conjunto para una unidad de micro-reacción de alto rendimiento, o en una unidad de accionamiento manual. La cámara de reacción puede combinar relaciones críticas de materiales que no son de silicio o materiales basados en silicio para proporcionar las propiedades térmicas deseadas. La realización posterior
15 basada en silicio descrita combina, por ejemplo, una relación crítica de silicio y nitruro de silicio con respecto al volumen de material objeto de calentamiento (por ejemplo, líquido) con el fin de proporcionar un calentamiento uniforme, con requisitos energéticos reducidos. La invención también permitirá la introducción de un inserto o tubo secundario (por ejemplo, plástico) en el interior del manguito de reacción que contiene la mezcla de reacción, mitigando de este modo cualesquiera cuestiones potenciales de incompatibilidad del material. La realización descrita
20 a continuación de la presente invención utiliza una geometría particular de micro-reactores basados en silicio que se ha comprobado que es muy eficaz en términos de potencia y uniformidad de temperatura. La realización particular del reactor microfabricado descrito se ha usado experimentalmente como instrumento de ciclado térmico para su uso en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y otras reacciones químicas, y se ha comprobado que es superior a los instrumentos comerciales en los reactores químicos de accionamiento térmico. La cámara de reacción de manguitos basada en silicio o no basada en silicio de la presente invención se puede utilizar en lugar de la cámara de reacción del sistema microfabricado de la solicitud relacionada de N° de Serie 07/938.106 anteriormente referenciada; y se puede utilizar con el calentador integrado y la configuración de detección de la Solicitud relacionada de N° Serie 08/489.819 anteriormente referenciada, y de este modo constituye una extensión de los
30 sistemas de reacción química microfabricados en estas solicitudes relacionadas.

Para proporcionar una compresión del instrumento de reacción química microfabricado y de la configuración de detección/calentamiento integrada, antes de la descripción de la realización de la cámara de reacción de manguitos basada en silicio preparada de acuerdo con la presente invención, se explica una descripción de un reactor químico
35 microfabricado y una configuración de detección/calentamiento integrada de las dos solicitudes relacionadas referenciadas. Aunque se describe posteriormente la cámara de reacción de manguitos de manera que está construida a partir de materiales basados en silicio, se puede utilizar un material no basado en silicio para determinadas aplicaciones en las que los materiales sean compatibles con los fluidos de reacción y/o sean químicamente inertes.

40 La Figura 1 ilustra una realización de un instrumento de reacción química micro-fabricado indicado generalmente en 10, mostrado por encima de su sección rebajada, indicado generalmente en 11, en un sistema de control/fuente de alimentación eléctrica de un instrumento de reacción microfabricado, generalmente indicado en 12. Se muestra una aguja hipodérmica 13 que se inserta en una muestra a través de una ventana 14 de caucho de silicona en el interior del instrumento de reacción 10. La reacción se controla y está alimentada energéticamente por medio de:
45 acoplamiento de inducción, tal como entra la bobina L_{CL} del instrumento 10 y una bobina magnética 15; por medio de acoplamiento capacitivo, tal como entre las placas del condensador C_3 y las placas 16 y 17; y por medio de acoplamiento electromagnético entre un circuito de resonancia, véase la Figura 2, del instrumento 10 y una antena 18 de radio frecuencia.

50 La Figura 2 muestra un esquema del instrumento 10 de la Figura 1 y comprende tres cámaras de reactivo 19, 20 y 21 que, por ejemplo, pueden contener primeros de ADN, polimerasa, y los nucleótidos y cualesquiera moléculas de marcaje de detección, tales como perlas magnéticas. Se coloca la molécula de ADN diana en la cámara de reactivo 19 por medio de inserción de una aguja hipodérmica 13 (Figura 1) o similar a través de un caucho de silicona u otro tipo de ventana material 14. Se conectan las cámaras de reaccionantes 19, 20 y 21 respectivamente por medio de los canales 22, 23 y 24, que tienen secciones medias estrechas, no mostradas, a una cámara de reacción 25. Concretamente, las cámaras 19-21 y 25 tienen un volumen que varía desde microlitros a nanolitros. Los canales 22-24 están equipados con bombas de ondas-lambda LW_1 , LW_2 y LW_3 , respectivamente, para bombear los reaccionantes al interior de las cámaras 19-21 a través de los canales 22-24 en la dirección de las flechas hacia el interior de la cámara 25. Las bombas de ondas-lambda pueden estar colocadas sobre cualquier pared, o sobre paredes múltiples, de los canales 22-24. Las bombas de onda-lambda LW_1 , LW_2 y LW_3 están conectadas respectivamente a los condensadores C_1 , C_2 y C_3 . La tensión superficial a través de las secciones medias de las flechas de los canales 22-24 evita que los reactivos de las cámaras 19-21 fluyan al interior de la cámara de reacción 25 hasta que se inicie el bombeo. Se pueden tratar las superficies internas de los canales 22-24 para aumentar la
60 tensión superficial, inhibiendo de este modo adicionalmente el flujo de reactivos cuando las bombas de onda-lambda no están activadas.
65

La cámara de reacción 25 puede estar equipada con un transductor de ondas-lambda LW_C y un calentador HC. El transductor de ondas-lambda LW_C está conectado a un inductor L_{CL} (también mostrado en la Figura 1). El calentador HC está conectado a un circuito resonante que consiste en un inductor L_{CH} y un condensador C_{CH} . El transductor de ondas-lambda LW_C actúa como agitador, mezclador o inductor sonoquímico, como viene indicado por las flechas conectadas 26 de la cámara 25.

Un canal 27 conecta la cámara de reacción 25 a una cámara de detección 28. El canal 27 está equipado con una bomba de ondas-lambda LW_{DP} , que está conectada a un circuito resonante que consiste en un inductor L_{DP} y un condensador C_{DP} . La cámara de detección 28 está equipada con un sensor de ondas-lambda LW_D , que está conectado a un condensador C_D .

Los transductores de onda-lambda tienen valor Q mecánico y por tanto pueden estar alimentados energéticamente únicamente por un intervalo estrecho de frecuencias de voltaje alternantes. Las bombas de onda-lambda (LW_1 , LW_2 , LW_3) y el sensor de ondas-lambda (LW_D) están alimentados de forma capacitiva por medio de la generación de un campo eléctrico entre las placas (tal como las placas 16 y 17 de la Figura 1 por ejemplo) a las frecuencias resonantes de los transductores de ondas-lambda (LW_1 , LW_2 , LW_3 y LW_D). Pero, debido a que los transductores tienen valores de Q elevados, únicamente cuando la frecuencia del campo impuesto está cerca de la frecuencia resonante de un transductor se produce la vibración del transductor con cualquier magnitud sustancial. Similarmente, el transductor de la cámara de mezcla de ondas-lambda LW_C está provisto de un campo magnético de frecuencia alternante generado por medio de la bobina (15 en la Figura 1) a la frecuencia resonante mecánica del transductor LW_C . El calentador H_C y la bomba LW_{DP} de ondas lambda se activan dirigiendo una onda electromagnética desde la antena (18 en la Figura 1) hasta el circuito resonante C_{CH} y L_{CH} , y el circuito resonante C_{DP} y L_{DP} , respectivamente. La frecuencia de la radiación electromagnética incidente debe corresponder a la frecuencia resonante mecánica del transductor LW_{DP} , para activar la bomba LW_{DP} . La frecuencia de la radiación electromagnética incidente debe corresponder a la frecuencia resonante de los elementos eléctricos CH , LCH y H_C para activar el calentador H_C .

Se inicia una reacción de PCR, por ejemplo, por medio de bombeo de los reactivos en las cámaras 19, 20 y 21 a lo largo de las direcciones de las flechas a través de los respectivos canales 22, 23 y 24 hasta la cámara de reacción 25 por medio de la bomba de activación LW_1 , LW_2 y LW_3 . Posteriormente, se inicia una serie de aproximadamente veinte a cuarenta ciclos térmicos, por ejemplo, y durante cada ciclo la temperatura de los reaccionantes de la cámara de reacción 25 va desde 55 °C hasta 96 °C, y de nuevo hasta 55 °C, por ejemplo. La temperatura de la cámara de reacción 25 viene determinada por la potencia de la señal electromagnética incidente a la frecuencia correspondiente a la frecuencia resonante del circuito formado por el condensador C_{CH} y el inductor L_{CH} , junto con el calentador H_C . El dispositivo de ondas lambda LW_C de la cámara de reacción 25 actúa como agitador o mezclador, como viene indicado por las flechas 26, para mezclar los reactivos y favorecer la reacción.

Cuando el ciclado térmico es completo, se bombean los contenidos de la cámara de reacción 25 por medio de la bomba LW_{DP} de ondas lambda a través del canal 27 en la dirección de la flecha hasta la cámara de detección 38, que utiliza el sensor LW_D de ondas lambda. Alternativamente, la cámara de detección 28 puede estar provista de una ventana óptica y el ensayo se puede llevar a cabo por medio de espectroscopia óptica basada en fluorescencia o basada en absorción.

La Figura 3 ilustra una configuración de calentamiento/detección que se puede incorporar al interior del reactor microfabricado de las Figuras 1 y 2. Como se muestra en la Figura 3, se ilustra en corte transversal, una cámara de reacción química, tal como una cámara PCR, de un instrumento microfabricado y miniaturizado, generalmente indicado como 30, estando la cámara 31 formada en un alojamiento 32, construida de Pyrex por ejemplo, y que tiene insertos de silicio 33 y 34 en el interior, con una entrada 35 y una salida 36. La alimentación eléctrica procedente de dos fuentes de alimentación eléctrica (luz) diferentes se dirige sobre el alojamiento 32, siendo la fuente 37 una fuente de infrarrojos (IR), y siendo la segunda fuente 38 una fuente de ultravioleta (UV). La fuente IR 37 aplica calor más uniformemente a través de la masa de la disolución de la cámara 31. La fuente UV 38 induce fluorescencia de los productos de reacción en el espectro visible (Vis), lo que puede ser detectado por medio de un detector visible 39 (Vis) ubicado en la parte externa del alojamiento 32 que define la cámara de reacción 31. El alojamiento 32 debe estar construido de un material transparente a UV y/o el espectro visible. Por medio de la incorporación de una excitación integrada (calentamiento) y un sistema de detección en la propia cámara de reacción, también se puede constatar la confirmación de la presencia de una muestra en la cámara de reacción, y se pueden consolidar la reacción dual y las cámaras de detección 25 y 28 del reactor microfabricado de la Figura 2, reduciendo de este modo los costes de fabricación por medio de la reducción de componentes.

La presente invención, una de cuyas realizaciones se ilustra generalmente en las Figuras 4 y 5 implica un reactor microfabricado generalmente indicado por 40 que incluye un manguito basado en silicio como cámara de reacción química, generalmente indicada por 41, construido por dos partes de silicio unidas, y que utiliza polisilicio dopado para el calentamiento y silicio en masa para el enfriamiento convectivo, como se describe con más detalle a continuación. El manguito 41 incluye una ranura o abertura 42 a través de la cual se introduce un fluido de reacción, indicado como 43, desde la jeringa hipodérmica 44 en el interior de la cámara de reacción, o en cuyo interior se puede insertar un tubo secundario 45 que contiene una mezcla de reacción 46. El tubo 45 está construido de

plástico, por ejemplo, u otro material que sea inerte con respecto a la mezcla de reacción, mitigando de este modo cualesquiera cuestiones potenciales de incompatibilidad del material. El manguito también puede estar provisto de una abertura 47 en la cual se ubica una ventana óptica 48, hecha, por ejemplo, de nitruro de silicio, dióxido de silicio o polímeros. La cámara 14 de reacción de manguitos de silicio incluye polisilicio dopado para el calentamiento y silicio en masa para el enfriamiento convectivo, y combina una relación crítica de silicio y nitruro de silicio con respecto al volumen de material objeto de calentamiento (por ejemplo líquido) con el fin de proporcionar un calentamiento uniforme, con requisitos energéticos reducidos.

La Figura 6 es una vista ampliada de una cámara de micro-reacción, similar a la de la realización de la Figura 4, pero que utiliza dos ventanas. La cámara de reacción de la Figura 6, generalmente indicada por 50, está formada por dos obleas de silicio o sustratos 51 y 52 unidas juntas como viene indicado por 53, y configurada para definir una ranura o abertura 54 en su interior. Cada una de las obleas 41 y 52 incluye una capa de nitruro de silicio 51' y 52' que definen una ventana, indicada generalmente por 55 y 56, respectivamente. La ventana 55 de la oblea 51, construida a partir de nitruro de silicio, está provista de un calentador 57 que tiene conducciones eléctricas 58 y contactos 59 que se extienden a lo largo de los bordes del calentador 57 para proporcionar un calentamiento uniforme. La ventana 56 de la oblea 52 tiene un calentador no mostrado en la Figura 6, pero que está fijado por contactos metálicos 60 y 61 como viene ilustrado en cualquiera de las Figuras 7 y 8. Las capas de nitruro de silicio 51' y 52' son muy finas (aproximadamente 1 μm) y están depositadas por medio de vapor sobre las obleas 51 y 52 de silicio en masa. El nitruro de silicio únicamente se convierte en ventana, como viene indicado por medio de 55 y 56, cuando se someten las obleas 51 y 52 de silicio en masa a grabado al aguafuerte para formar la abertura o ranura 54. El calentador 57 es transparente a la alimentación eléctrica que pasa a través de la ventana 55, por ejemplo.

La Figura 7 es una vista muy ampliada de una realización de una sección de una oblea de silicio 52 y una ventana 56, como viene indicado por el círculo 62. Como puede verse en la Figura 7, la sección de la oblea de silicio 52, indicada como 63, está formada por silicio en masa o silicio cristalino individual y está en contacto con una membrana de nitruro de silicio de baja tensión (de 100 a 500 MPa) o ventana 64 (52' en la Figura 6) que, a su vez, está en contacto con un calentador 65 de polisilicio dopado y metal de contacto 60 y 61. La realización de la Figura 7 comprende un calentador aislado versión ventana fija.

La Figura 8 es una vista muy ampliada de otra realización de una sección de oblea de silicio 52 y ventana 56, como viene indicado por el círculo 62. Como se puede ver en la Figura 8, las secciones de sustrato de silicio 52, indicadas como 66, están formadas por silicio en masa o silicio cristalino individual. Como en la realización de la Figura 7, un miembro de nitruro de silicio de baja tensión (de 100 a 500 MPa) o ventana 69 (52' en la Figura 6) está en contacto con la sección de silicio 66, un calentador de polisilicio dopado 70 está en contacto con la membrana de ventana 69 y se montan contactos de metal 71 en el calentador 70. La realización de la Figura 8 comprende una versión de calentador no aislado. El tamaño de ventana relativo a la cámara se puede variar para garantizar la uniformidad térmica y el acceso óptico a la cámara de reacción.

A modo de ejemplo, las obleas de silicio o sustratos 51 y 52 pueden tener una longitud de 5 a 50 mm, una anchura de 2 a 10 mm, un espesor de 0,1 a 1,0 mm, teniendo la ranura 54 un área de corte transversal de 5 a 500 mm^2 . La ranura 54, que se observa que tiene una configuración de seis lados, puede ser redonda, oblonga, cuadrada, rectangular o con otra configuración. Las ventanas 55 y 56 pueden tener una longitud de 0,1 a 1 mm, una anchura de 0,1 a 50 μm , un espesor de 0,1 a 10 μm , y además de nitruro de silicio, pueden estar formadas por dióxido de silicio, silicio o polímeros. El calentador 65 de polisilicio dopado de la Figura 7 puede tener un espesor de 0,05 a 5 μm , teniendo el calentador 70 de la Figura 8 un espesor de 0,05 a 5 μm . Los contactos metálicos 60-61 y 61' de las Figuras 6 y 7 pueden estar formados por oro o aluminio, con un espesor de 0,01 a 5 μm , teniendo el contacto metálico 71 de la Figura 8 un espesor de 0,01 a 5 μm y estando formado por oro o aluminio. El calentador 57 de la oblea de silicio o el sustrato 51 está formado por polisilicio dopado que tiene un espesor de 0,05 a 5 μm , estando las perlas eléctricas y los contactos 58 y 59 formadas por oro o aluminio.

El uso de silicio en masa, polisilicio, nitruro de silicio permite flexibilidad de diseño para las propiedades térmicas y ópticas de cada cámara. Esto permite cámaras de reacción aisladas térmicamente y controladas individualmente en un instrumento pequeño (Figura 9) o en un instrumento grande (Figura 10).

La Figura 9 es una realización de un instrumento con retroalimentación controlada, de bajo consumo eléctrico, de accionamiento manual, operado por una batería, de ciclado térmico y en miniatura para PCR, que usa cámaras de reacción basadas en silicio microfabricadas, tales como las de las Figuras 4 y 6, cuyo desarrollo está destinado a la uniformidad térmica y la precisión de temperatura de las cámaras de reacción, tasas de rampa de temperatura de las cámaras, y biocompatibilidad de los materiales en contacto con los reactivos.

Como se muestra en la Figura 9, el instrumento operado por batería y de accionamiento manual, denominado "PCR man", generalmente indicado como 75, comprende un compartimiento de controlador de contacto eléctrico de ajuste de presión, o alojamiento 76, que por ejemplo puede tener 3 x 5 pulgadas, que tienen una placa 77 de cara de control con varios indicadores sobre la misma, incluyendo una ventana 78 de "estado". El alojamiento 76 está provisto de un circuito de control de retroalimentación de temperatura basado en termopar, dispositivos electrónicos

de calentador, interfaz de ordenador y conector de fuente de alimentación eléctrica, como se describe con más detalle a continuación. El alojamiento 76 está provisto de baterías, indicadas como 79, tal como cuatro baterías de nueve voltios, y la parte superior está provista de ranuras 80 para la inserción de cámaras de reacción en el interior del compartimento (tres ranuras mostradas) y en cuyo interior se introducen las cámaras 81, 82, 83, y 84 de reacción basadas en silicio, con los calentadores integrados (como se muestra en la Figura 6), como viene indicado por medio de la flecha 85. Cuando se construyen, las cámaras de reacción 81-84 pueden tener diferentes reactivos o sustancias químicas, y se pueden insertar selectivamente en el interior del instrumento 75 de accionamiento manual por medio de las ranuras 80 del compartimento o controlador 76.

Este instrumento se puede usar para proporcionar rápida y repetitivamente ciclos térmicos controlados a la mezcla de reacción. Las propiedades de conductividad térmica del silicio o del sustrato semiconductor similar, por ejemplo, contribuyen a acelerar el aumento térmico y los tiempos de caída, y permiten una operación de baja potencia. Aunque el silicio es único en cuanto a propiedades térmicas, es decir, conductividad térmica elevada, una combinación de silicio, nitruro de silicio, dióxido de silicio, polímeros y otros materiales proporcionaría una combinación de conductividad térmica y aislamiento que permitiría la uniformidad térmica y una operación de baja potencia.

Mientras que se prefiere el material de silicio o basado en silicio, se pueden usar otros materiales, incluyendo: polímeros, materiales cerámicos (cristalinos y no cristalinos, silicato y materiales no basados en silicato), metales o combinaciones de metales (aleaciones), materiales compuestos y una combinación de materiales (tales como polímeros compuestos que contienen dopantes (por ejemplo, óxido de aluminio) que aumentan la conductividad térmica, por ejemplo, con el fin de lograr las propiedades térmicas deseadas (conductividad, resistencia, calor específico, expansión, etc.), masa térmica, u otras capacidades de detección y de control. También es necesario considerar la compatibilidad de dichos materiales, especialmente en lo que respecta a su reactividad superficial o naturaleza inerte. Se deben seleccionar los materiales en base a la capacidad para integrar elementos de control sobre ellos o en posición adyacente a ellos. En caso de usar revestimientos, la compatibilidad química de menos importancia, pero otras características tales como conductividad, etc., puede todavía ser de importancia crítica. Por ejemplo, es posible fabricar una cámara de reacción a partir del material apropiado (altamente conductor) tal como silicio o metal (es decir, cobre) que puede no ser compatible con la reacción, y usar un proceso de deposición química o de vapor o un proceso de evaporación para depositar una capa de pasivación ultrafina (tal como teflón o polipropileno) sobre las paredes para conseguir una superficie compatible que esté mínimamente comprometida en términos de conductividad térmica.

Es el uso de dichas tecnologías de microfabricación el que permite dichas capacidades únicas. Sin ellas, sería difícil fabricar cámaras de reacción con óptimas capacidades de control de reacción. Los procesos de película fina y de deposición de vapor, por ejemplo, permiten revestimientos de materiales extremadamente finos e uniformes sobre otros materiales, al tiempo que el grabado al aguafuerte y la fabricación por lotes permiten la producción en masa.

La integración de los elementos de control sobre esta variedad de materiales, que puede incluir deposición (u otro método de microfabricación), es ahora posible de una forma u otra. Por ejemplo, se pueden depositar los calentadores metálicos de película fina sobre dispositivos poliméricos o cerámicos, como pueden ser electrodos, elementos de detección, circuitos, etc. La formación de aparatos electrónicos de tipo-IC y elementos de control se puede depositar sobre muchos de los materiales disponibles en la actualidad. Únicamente es necesario que la selección de los materiales y el método de microfabricación estén basados en las necesidades de aplicación, ya que existe una amplia variedad de opciones. Las cámaras de reacción son un ejemplo principal de una aplicación que se beneficia de la amplitud de disponibilidad. El medio de calentamiento y/o enfriamiento de la cámara de reacción puede estar formado por una película termo eléctrica, por ejemplo.

Se puede usar la integración de películas activas magnéticamente microfabricadas, por ejemplo, con cámaras de reacción o series de cámaras de reacción, para controlar los reactivos de reacción y los productos. Esto se puede conseguir por medio del uso de partículas magnéticas o paramagnéticas en el fluido de reacción que sean capaces de unirse selectivamente a reactivos específicos. A través del uso de fuerzas de atracción magnética y repulsión que se pueden crear entre la película y las partículas, se podrían atraer o repeler selectivamente los reactivos deseados, al tiempo que se podrían transportar los reactivos restantes por medio del sistema de flujo continuo.

Se podría usar la incorporación de películas o calentadores termoelectrónicos microfabricados, como otro ejemplo, para controlar la temperatura de las reacciones en las cámaras de reacción de tipo manguitos. Se pueden conseguir tanto el calentamiento como el enfriamiento con dichas películas permitiendo que los reactivos experimenten regímenes térmicos elevados y por debajo de temperatura ambiente. Las series de zonas de temperatura o zonas de presión de accionamiento mecánico generarán condiciones de flujo de fluido para el rendimiento dirigido.

Se pueden incorporar otros dispositivos o películas activas sometidas a micromaquinizado con el fin de ejercer un efecto sobre la velocidad de reacción, mezcla, flujo o transporte dentro del sistema. Ejemplos incluyen accionadores microfabricados tales como películas de memoria con forma (es decir, NiTiCu), accionadores electrostáticos tales como poliimida, accionadores biomorfos térmicos tales como poliimiditas u otros materiales con diferentes coeficientes de expansión térmica, y otras estructuras sometidas a micromaquinizado.

Se puede usar la realización particular, tal como la Figura 6, de un reactor microfabricado descrito como instrumentación de ciclado térmico para su uso en PCR y otras reacciones químicas, procesos bioquímicos, procesos microbiológicos e incubadores. Como se muestra en la presente memoria a continuación, la cámara de reacción de la presente invención es superior para estar presente en instrumentos comerciales usados en reacciones químicas accionados térmicamente.

Durante la verificación experimental del instrumento de la Figura 9 y las cámaras de microrreacción para su uso en la presente memoria, tal como las ilustradas en las Figuras 4 y 6, se fabricaron varios tamaños diferentes de diseños de cámara de reacción de PCR usando etapas de procesado de silicio de tipo-(IC) de circuito integrado. El proceso de fabricación generalizado fue: se procesaron obleas de silicio de cristal individual (SCS) de 0,5 mm de espesor y redondas de tres pulgadas (7,62 cm) de la siguiente manera: se depositó por medio de vapor químico de baja presión (LPCVD) nitruro de silicio (Si_xN_y) de baja tensión (200-300 MPa) sobre toda la oblea (1,0-2,0 μm de espesor). Se tomaron patrones fotolitográficos para la cámara de reacción y las etapas de procesado posteriores en el siguiente orden: 1) se sometió el nitruro de silicio a grabado al aguafuerte por medio de ión reactivo (RIE) sobre el área de la cámara de reacción, 2) se sometió el SCS a grabado al aguafuerte sobre la parte trasera de nitruro de silicio que define el volumen de la cámara, 3) se elaboró un patrón sobre la oblea y se sometió a desgrabado químico al aguafuerte el nitruro de silicio por todas partes excepto sobre la membrana de nitruro o se deja sobre toda la superficie, dependiendo del diseño de la cámara de reacción, 4) se depositó por medio de LPCVD la membrana de nitruro de silicio restante (lado opuesto de la cámara) con silicio policristalino (polisilicio) hasta un espesor de 3000 angstroms, 5) posteriormente se dopó el polisilicio a temperatura elevada con boro hasta obtener una resistividad de 50-200 ohmios por cuadrado, y 6) se depositaron los contactos metálicos de película fina de oro o aluminio que definen la geometría del calentador.

Cada oblea contiene potencialmente muchas cámaras de reacción, dependiendo de la geometría y volumen deseados. La depresión sometida a grabado al aguafuerte de cada oblea constituye la mitad de una cámara de reacción de calentador dual. Posteriormente, se unen las obleas formando una cámara encerrada con calentadores en ambos lados.

Se pueden unir las cámaras de reacción por medio de deposición directa de una película de poliimida de curado a baja temperatura entre dos obleas u otras técnicas de unión tal como unión metálica eutéctica. Se usó una sierra de silicio controlada por ordenador de alta precisión en cada diseño para cortar cada cámara de calentador dual. Posteriormente, se lavaron repetidamente las cámaras con agua desionizada y se secaron antes del tratamiento con disolución salina.

Se insertaron las cámaras de reacción en el interior de un receptáculo de contacto eléctrico por ajuste de presión que fue parte del forro de plexiglás de los componentes electrónicos que forman el controlador. Los aparatos electrónicos de controlador podrían ser bien analógicos o bien digitales y podrían usar procesos tal como modulación de anchura por pulsos como mecanismo de control de la retroalimentación. El forro tiene 3 pulgadas (7,62 cm) por 5 pulgadas (12,70cm) y consistió en un circuito de control de retroalimentación por temperatura basado en termopar, dispositivos electrónicos de calentador, interfaz de ordenador y conector de fuente de alimentación eléctrica. Se diseñó el circuito para trabajar de 8 a 32 voltios. Se consiguió la calibración térmica correlacionando la temperatura del fluido con la del termopar de Tipo K de medición de silicio. Una vez calibrado, el instrumento fue capaz de operar por ciclado térmico, con retroalimentación controlada y de forma automatizada sin medición directa del fluido de reacción. La salida del dispositivo de ciclado térmico es a un ordenador Apple Centris 650 que muestra el ciclado térmico en tiempo real junto con el almacenamiento de los perfiles acumulados. Cuatro pilas de nueve voltios fueron capaces de hacer funcionar todo el instrumento continuamente durante 2,5 horas.

Se ajustaron los PCR típicos en forma de mezclas maestras de escalado, para garantizar la uniformidad entre las alícuotas termocicladas en diferentes condiciones. Las cantidades de reactivos estaban basadas en las que resultaron ideales para reacciones de 50 μl . En general, las mezclas maestras contenían: 50 nM de KCl , 10 mM de Tris-CH1 de pH 8,3, 1,5-3,0 mM de MgCl_2 , 200 μM de cada desoxinucleótido o 800 μM de dNTP total, 0,5 μM de cada uno de los dos primeros de oligonucleótido, 25 unidades/ml de ADN polimerasa AmpliTaq® y una matriz diana a un número específico de copias por cada 50 μl de reacción. Se añadió la matriz para determinados PCR de β -globina en forma de ADN de hebra individual a partir de un clon bacteriófago M13 de una parte del gen de β -globina humano. La matriz CF fue ADN humano, genómico de doble hebra, procedente de cepas celulares cultivadas, HL60, GM07460 o GM08345. Se tomó una alícuota de cada mezcla de reacción a partir de la misma mezcla maestra y se sometió a termociclado en el instrumento de la presente invención y un Dispositivo de Ciclado Térmico Perkin-Elmer GeneAmp® 9600. Se separaron las reacciones termocicladas a partir de los dispositivos de ciclado térmico sobre NuSeive de 3 %, agarosa de Seakem de 1 % (FMC Corp.) usando un tampón de tris-borato. Se tiñeron los geles con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo iluminación con luz UV de 302 nm.

Aunque concebido inicialmente como cámara de reacción desechable de uso individual, la naturaleza robusta y las propiedades estables permitieron el uso repetido de las cámaras de reacción.

Se ha sometido a ensayo el instrumento basado en ciclado térmico (MEMS) de la presente invención con una variedad de sistemas de PCR, incluyendo, matrices víricas, bacterianas y genómicas humanas. También, se ha implementado y evaluado varios cambios tanto en el diseño de la cámara de reacción como en la instrumentación del controlador. Se ha preparado una pantalla en tiempo real de salida del controlador de un ciclo térmico a partir del dispositivo de ciclado térmico microfabricado, y se ha observado que con una entrada de 15 voltios (media de 1,2 watos) se obtienen tasas de calentamiento de alrededor de 5 °C/s. El enfriamiento es ligeramente menor (2,5 °C/s), en su mayoría debido al hecho de que se mantiene la cámara de reacción en el interior del panel de instrumentación de plexiglás. Se mantiene la precisión de +/- 0,5 °C en las temperaturas diana. Se han conseguido tasas más elevadas de calentamiento y enfriamiento.

Los inventores han llevado a cabo experimentos que muestran la naturaleza cuantitativa del proceso de PCR tanto en los instrumentos de la Figura 9 como en los instrumentos comerciales. Estos experimentos consistieron en retirar alícuotas de 5 µl a partir de 105 copias de partida, PCR de β-globina a partir del instrumento en 23, 25, 27, 29 y 31 ciclos. Posteriormente, se procesaron estas alícuotas sobre un gel de electroforesis de agarosa. Los resultados de ambos instrumentos fueron casi idénticos. Se llevaron a cabo los mismos resultados de series de electroforesis de gel cuantitativa a partir de la amplificación de la diana 268-bp de β-globina directamente a partir de ADN genómico humano (HL60).

Se considera que PCR de multiplex es una de las técnicas de amplificación de ADN analíticamente más potentes y recientes. Requiere el control de temperatura uniforme y preciso en el interior de la cámara de reacción. Los inventores han logrado esto con el instrumento de la presente invención.

Se puede identificar la detección post-PCR de las mutaciones específicas asociadas a la enfermedad de fibrosis quística (CF), por ejemplo, con tiras de ensayo simples basadas en nailon, usando una tecnología de transferencia puntual inversa. La tira de ensayo tiene sondas de ADN inmovilizadas específicas que contienen la secuencia de mutación de interés. Se ponen los productos de amplificación PCR de multiplex en un reactivo simple durante todo el ensayo. Si tiene lugar la unión y el ADN queda retenido tras una etapa de lavado, el complejo ADN-biotina-estreptavidina-enzima cambiará de color tras el tratamiento con el sustrato. Los resultados de PCR amplificados por el instrumento comercial y de la Figura 9 se siguieron por medio de ensayo de transferencia puntual inversa para la CF preparada.

A partir de los resultados de los experimentos anteriormente referenciados y de los resultados anteriores, relativos a las solicitudes relacionadas identificadas anteriormente, con calentadores de lados individuales, las cámaras de reacción basadas en silicio de varios tamaños y configuraciones son capaces de llevar a cabo reacciones químicas, tales como PCR, con requisitos reducidos de alimentación eléctrica.

La importancia de los resultados experimentales anteriormente referenciados es que por primera vez, se puede llevar a cabo la amplificación de PCR, de accionamiento manual, operada con pilas y la detección dirigida, basada en reactivos simples de sustancias biológicas complejas y enfermedades, en un instrumento tal como en que se ilustra en la Figura 9.

Ahora el ciclado térmico rápido y la uniformidad térmica de una cámara de microrreacción basada en silicio compatible pueden proporcionar una nueva percepción con respecto a la hibridación y la cinética enzimáticas. Por ejemplo, la importancia de la temperatura es primordial en el proceso de PCR, especialmente cuando se tienen que amplificar los sistemas complejos (por ejemplo, ADN genómico humano, amplificaciones de multiplex). También se debe equilibrar el control preciso de la temperatura así como la uniformidad térmica. Para miniaturizar verdaderamente el instrumento o aprovechar la ventaja de cámaras de reacción microfabricadas con el fin de construir un instrumento de alto rendimiento, tal como el que se ilustra en las Figuras 10A, 10B y 11, es preciso integrar los elementos de control en una escala de unidad a unidad. También se deben equilibrar las propiedades térmicas de varios metales usados para combinar el control eficiente con la aptitud térmica. Los materiales basados en silicio permiten las propiedades térmicas de requisito, la capacidad para integrar calentadores y control de la retroalimentación, y su fabricación aprovecha la ventaja del procesado por lotes, automatizado y altamente paralelo.

Las Figuras 10A-10B y 11 ilustran un enfoque de sistema, que combina un instrumento de dispositivo de ciclado térmico de alta eficiencia y elevado rendimiento, manipulación de muestra y un módulo de electroforesis. También se podría maquinizar el módulo de electroforesis en vidrio o silicio. El instrumento podría ser de naturaleza híbrida; es decir, una cámara de reacción basada en silicio y un mini módulo de electroforesis de vidrio que aprovecha la ventaja de ambos sustratos o miembros, como en la realización de la Figura 5. La ventaja de disponer de una detección en tiempo real de la producción de ADN es que permite que el operador conozca aproximadamente la eficiencia de PCR durante la reacción, en lugar de esperar a ver los resultados sobre un gel. Esto contribuye significativamente a la productividad de secuenciación de ADN eliminando el tiempo perdido llevando a cabo electroforesis de gel sobre las muestras que no han sido amplificadas.

Las Figuras 10A y 10B ilustran un instrumento de ciclado térmico, generalmente indicado por 90, que tiene un alojamiento 91 con una placa frontal 92 con varios indicadores sobre la misma, incluyendo una ventana de "estado" 93, similar a la placa frontal del instrumento de accionamiento manual de la Figura 9. El alojamiento incluye una

parte superior 94 abatible, bajo la cual está ubicada una agrupación 95 (véase la Figura 10B) de cámaras de microrreacción 96 basadas en silicio y controladas individualmente, que pueden, por ejemplo, ser del tipo ilustrado en las Figuras 4 y 6. El instrumento 90 está diseñado para 384 cámaras de microrreacción 95, aunque la agrupación 95 que se muestra en la Figura 10B únicamente incluye 100 cámaras para simplificar la ilustración.

La Figura 11 es una representación esquemática de una aplicación de ADN de alto rendimiento, manipulación de muestra y electrosistema que utiliza el instrumento de las Figuras 10A-10B y los correspondientes números de referencia indican los correspondientes componentes. Una agrupación 95 de 384 cámaras reacción 96 PCR controladas individualmente (únicamente se muestran cinco) está conectada operativamente a un conjunto de entrada/salida de muestra automatizado, generalmente indicado por 97 que usa dos grupos de microinyectores, generalmente indicados por 98 y 99. La función de entrada/salida de muestra entre el conjunto de microinyectores 98 del conjunto 97 y de la configuración 95 viene indicado por la flecha doble 100, mientras que la función entre los conjuntos de microinyectores 98 y 99 viene indicado por medio de la flecha doble 101. El conjunto de microinyector 99 está unido operativamente a una agrupación 102 de canales 103 de microelectroforesis individuales. Este sistema de entrada/salida de inyector cargará las muestras de reactivo desde las cámaras de reacción 96 con vacío o alimentación electrocinética; se moverá automática o robóticamente hasta los canales de electroforesis 103; y descargará los reactivos por medio de presión o inyección electrocinética de campo inverso al interior de aquellos canales para la separación electroforética. También se puede micromaquinizar el módulo de electroforesis. El silicio es bueno para las cámaras de reacción, el vidrio para la electroforesis.

Los canales de electroforesis 103, formados en un sustrato de vidrio están conectados cada uno directamente a una cámara de reacción de silicio del tipo que se muestra en la Figura 4, para producir una configuración 95 de cámaras de reacción 96 conectadas directamente a la configuración 102 de canales de electroforesis 103, como se muestra en la Figura 5.

Por medio del uso de material además de silicio y del material basado en silicio descrito anteriormente con respecto a las Figuras 5 y 11, se puede ampliar la capacidad de electroforesis/PCR. Por ejemplo, la cámara de reacción puede ser silicio, metal, material cerámico como anteriormente para las consideraciones térmicas, el revestimiento puede ser un polímero, vidrio u otro apropiado para la compatibilidad y podría tener capas micromaquinizadas (CVD o evaporadas), y los canales de electroforesis podrían ser de vidrio, polímero, material cerámico para aislamiento electrónico o dispositivos electrónicos en consideraciones generales (éstos también podrían tener capas depositadas por CVD etc para compatibilidad y para el control del flujo electroosmótico o el potencial zeta). Todos los mismos conceptos se basan en lo anterior (es decir, la integración de tipo IC de elementos de control). Por ejemplo, se podría fabricar una serie de electrodos y detectores ópticos directamente sobre el sustrato. En ese caso, el revestimiento actúa directamente de interfaz para los microcanales de electroforesis.

Los insertos/revestimientos desprendibles/permanentes de las cámaras de reacción de un material conocido que sea compatible con las reacciones apropiadas, tal como se muestra en la Figura 12, en algunas aplicaciones, reducirán el coste total, ya que estos revestimientos/insertos pueden ser desechables. También se consideran los agentes de derivación para las superficies de la cámara de reacción basada en silicio con el fin de mejorar la unión covalente y/o de otro tipo a los revestimientos. Ejemplos son los silanos reactivos/orgánicos, poliimidias, teflones, polietileno y otros polímeros.

La Figura 12 ilustra una realización de un inserto/revestimiento, generalmente indicado por 105, para una cámara de reacción con una ventana óptica 106 en el mismo. El inserto/revestimiento 105 incluye un alojamiento 107 de seis lados y una parte superior/cubierta 108. El alojamiento 107 de seis lados está configurado, por ejemplo, para que se pueda insertar en el interior de la abertura 54 de la cámara de reacción 50 de la realización de la Figura 6, de manera que esta ventana 106 se alinee con una de las ventanas 55 ó 56 de la Figura 6. El alojamiento 107 puede estar construido de plástico u otro material compatible explicado anteriormente. La ventana 106 del inserto/revestimiento 105 incluye una tira de ensayo 109, descrita posteriormente con respecto a la Figura 14.

La Figura 13 ilustra el llenado externo del inserto/revestimiento 105 de la cámara de reacción de la Figura 12 por medio de una conexión interfluidica, generalmente indicada por 110. Ejemplos de conexiones fluidicas incluyen: agujas de jeringa, puntas de pipeta y capilares de sílice fundida o vidrio o tubos poliméricos.

Se puede proporcionar la inmovilización superficial de las ventanas (o tira de ensayo) con sondas para la detección óptica u otra detección (otras detecciones microbasadas) o generación de producto y específicamente, como se muestra en la Figura 14, que es una vista ampliada de la tira de ensayo 109 de la Figura 12. Se puede incluir dicha tira de ensayo en las ventanas de las cámaras de reacción de las Figuras 4 ó 6. El instrumento de accionamiento manual de PCR de la Figura 9, por medio del uso de la tira de ensayo 109, puede detectar ópticamente sondas/reactivos inmovilizados para la detección de productos específicos directamente sobre la ventana, tal como 106 de la Figura 12, o dentro del fluido de reacción del revestimiento/inserto 105 de la cámara de reacción de la Figura 12. Se podría usar la superficie interna actual de la ventana como superficie de inmovilización para sondas específicas de detección de producto o de diana, o se podría usar la ventana para observar la superficie de detección/inmovilización dentro de la cámara.

Las Figuras 15 y 16 ilustran esquemáticamente dos configuraciones de detección óptica. La configuración de la Figura 15 es una versión de láser/ccd, mientras que la configuración de la Figura 16 permitirá una operación de baja alimentación eléctrica para la implementación en el instrumento de accionamiento manual de PCR de la Figura 9.

5 Como se muestra en la Figura 15, esta configuración de detección óptica para una cámara de reacción 120 con una ventana 121 y dispositivos electrónicos 122 incluye un filtro óptico 123, tal como un filtro de interferencias o un filtro de paso de banda para hacer pasar la longitud de onda de detección de interés, CCD 124, una imagen digitalizada generalmente indicada por 125, ópticas de enfoque 126, reflector/divisor 127 y un láser 128 de ión de Argón. La operación es como se muestra a continuación: el láser excita el colorante indicador fluorescente asociado a la
10 detección del producto. Se controla la señal fluorescente por medio de CCD 124. De manera similar, se podría usar espectroscopia de absorción.

La Figura 16 es un sistema de detector óptico miniaturizado para la cámara de reacción 120 que tiene una ventana 121 y los dispositivos 122 electrónicos de control están formados por dos filtros 130 y 131, un detector 132 de estado sólido y un LED Azul 133. Los filtros 130 y 131 son por un lado de paso de banda o paso largo para seleccionar la emisión (es decir, paso largo de 600 nm) y por otro, de paso de banda para seleccionar la longitud de onda de excitación de interés, tal como 488 nm \pm 10 nm. Se puede usar la excitación de paso de banda para escoger entre la emisión normalmente ancha de un LED, por ejemplo. La operación del sistema de detección de la
15 Figura 16 es como se muestra a continuación: se filtra el LED hasta 488 \pm 10 nm como fuente de excitación (o absorción) para el colorante indicador fluorescente. También se filtra el detector de estado sólido para recibir únicamente las longitudes de onda de detección (> 600 nm) o como detector de absorción.

La inteligencia artificial es una forma de producir ADN y determinar cuanto ciclos son necesarios, cuando se completa, si funciona, el ajuste de los parámetros para mejorar la producción, etc. Usando sistemas de detección en tiempo real tal como los que se ilustran esquemáticamente en la Figura 17, se puede proporcionar un sistema de retroalimentación de inteligencia artificial que usa detección integrada. El sistema de la Figura 17 comprende una cámara de reacción 135 que tiene una ventana 136, un detector 137 para detección *in situ* de la producción de ADN, un control de instrumento 138 para la cámara de reacción 135, y un sistema 139 de lectura de datos, que recibe los datos del detector 137, como viene indicado por medio de la flecha 140, y suministra los datos de control al controlador 138, como viene indicado por medio de la flecha 141. El sistema 139 de lectura de datos proporciona información tal como cuanto ADN se prepara, número de copias de partida, reacción completa, etc. Cuantificando la producción de ADN por medio del sistema de control óptico, que se conoce bien, el sistema podría ajustar su tiempo de ciclado y número de ciclos para producir el número mínimo de ciclos necesario para la detección, acelerando de este modo el proceso. También por medio de la determinación del número de ciclos necesario para detectar una señal fluorescente dada, o la concentración de producto, el sistema sería capaz de calcular un número de copias de partida o concentración de la muestra de partida desconocida. Esto permitiría cálculos de concentración automatizados. La información cuantitativa en tiempo real puede permitir que el sistema ajuste los parámetros de reacción tal como las temperaturas diana, los tiempos de mantenimiento y las tasas de rampa.

40 Posteriormente se describe una célula de electroquimioluminiscencia microfabricada para la detección de ADN amplificado, con respecto a las Figuras 18-31, y que explica su diseño, fabricación y ensayo. La microcélula se diseña para que sea la unidad de detección de un instrumento de PCR, tal como el descrito anteriormente y que se ilustra en la Figura 9. La células es un conjunto vertical de silicio micromaquinizado y vidrio y contienen electrodos de película fina, como se muestra en las Figuras.

45 La detección de ADN por medio de electroquimioluminiscencia comienza con la amplificación de ADN por medio de PCR, para aumentar la concentración de los niveles detectables. Posteriormente, se marca con tri (2,2'-bipiridil) rutenio (II) (TBR). TBR oxidado experimenta luminiscencia (naranja) tras la reducción. La oxidación ocurre electroquímicamente en una superficie de electrodo, además la emisión de luz es denominada electroquimioluminiscencia (ECL). TBR requiere un potencial de oxidación relativamente bajo (unos pocos voltios) y tiene una eficiencia de ECL elevada en el visible (620 nm). Esto lo convierte en atractivo para aplicaciones de microsensores, ya que la emisión visible se detecta fácilmente con fotodiodos de silicio, que se podrían integrar en el interior de una célula de silicio micromaquinizada. La reducción puede ocurrir electroquímicamente o químicamente; en cualquier caso, se emite luz. Por ejemplo, la tripropilamina oxidada (TPA) transfiere fácilmente un electrón a TBR oxidado, después de lo cual TBR experimenta quimioluminiscencia. Debido a que pueden ocurrir ambas oxidaciones en el mismo electrodo, se pueden producir concentraciones relativamente grandes de ambas especies en estrecha proximidad, lo que tiene como resultado una intensidad de luz más elevada para una concentración dada de TBR, que en el caso de que TBR esté presente solo en la disolución. Las reacciones de oxidación electroquímica y reducción química para TBR que ocurren en el ánodo se muestran esquemáticamente en forma de diagrama en la
50 Figura 18. La reducción electroquímica de TBR también ocurre en el cátodo. Con el fin de oxidar únicamente el ADN marcado con TBR y no el TBR libre, se requiere una separación de los dos. Una forma de lograrlo es por medio del uso de unión altamente específica de inmunoproteínas (anticuerpo-antígeno).

60 La Figura 19 muestra un ejemplo, en el que se prepara una imprimación de biotina en un extremo 5' de una hebra del ADN diana y se marca el TBR en el extremo 5' de la hebra complementaria. Durante el proceso de PCR se producen hebras dobles de ADN con biotina y TBR marcados sobre sus extremos. Posteriormente, se puede introducir el ADN
65

5 marcado con biotina en el interior de una célula electroquímica con un ánodo cuya superficie está revestida con avidina, el anticuerpo para biotina. Tendrá lugar la unión selectiva, después de la cual se lava abundantemente la disolución de la célula para retirar cualquier TBR "libre". Ahora el TBR, unido al ADN, que a su vez está unido al ánodo por medio de la unión anticuerpo-antígeno, se puede oxidar junto con TPA añadido, y la posterior intensidad de luminiscencia dependerá de la cantidad de ADN presente.

10 La microcélula ECL, como se describe con más detalle a continuación con respecto a las Figuras 21-31, es un conjunto de multicapas de silicio micromaquinizado y vidrio. Se han diseñado y fabricado en silicio células con una capacidad de disolución que varía desde 35 μl a 85 μl . Una película fina, de oro, depositada por medio de haz de electrones, forma el cátodo de la célula. El ánodo también es una película fina. Se han llevado a cabo experimentos tanto con óxido de estaño e indio (ITO) como con platino. ITO es transparente a la luz visible, de manera que cuando se deposita sobre vidrio, puede formar la capa superior del conjunto, a través de la cual la luz emitida puede ser captada por un fotodetector (véase la Figura 21). El conjunto también contiene puertos de llenado de fluido maquinizados (véase Figura 22). Se conectaron las capas y se unieron (véase Figuras 29-30) usando una poliimida de curado a baja temperatura, tal como Epotek 400.

15 Se han llevado a cabo experimentos de ECL en la microcélula con TBR libre, es decir, sin ADN. Se llenaron las células con una disolución de TPA + TBR y se colocó un tubo de fotomultiplicador (PMT) en estrecha proximidad con la capa de vidrio superior de la célula para detectar la emisión. La quimioluminiscencia producida por medio de la reacción de TPA oxidado y TBR depende de la concentración de ambas sustancias químicas. En estos experimentos, se mantuvo constante la concentración de TPA (50 mM) y se varió TBR. Se prepararon las disoluciones como se muestra a continuación: se disolvió 1 g de cloruro de TBR hexahidratado en 50 mL de TPA para preparar 5 mM de TBR, que posteriormente se diluyó con 50 mL de TPA adicionales para producir un conjunto de disoluciones de ensayo, cuyas concentraciones de TBR variaron desde 0,1 mM hasta 5 mM. Se usó un potencióstato EG&G, modelo PARC 273, para producir los voltamogramas de disolución de TBR + TPA, tanto en la microcélula con ITO y electrodos de película fina de oro, como en una célula electroquímica más convencional con electrodos de alambre de platino. A partir del voltamograma, se determinó el potencial de oxidación, al cual tiene lugar ECL, y posteriormente se aplicó como polarización dc entre el cátodo de película fina y el ánodo. Se midió la luz emitida con un Hamamatsu M, modelo R928, polarizado a 600 voltios. La Figura 20 muestra la relación entre la intensidad de luz medida y el voltaje de electrodo para una concentración de TBR de 1 mM, en la que se muestran el voltaje celular y la intensidad ECL frente a tiempo. El voltaje, como viene indicado por medio de la línea punto-línea-punto, aumenta y posteriormente disminuye. En ambas direcciones, el voltaje pasa a través del potencial de oxidación de TBR, en el que la intensidad de ECL es máxima. En los ensayos llevados a cabo hasta el momento, la concentración de TBR más baja que se había medido usando la microcélula con una película de ITO como material de ánodo fue de 1 μM . Con un ánodo de platino, las concentraciones de TBR medidas fueron tan bajas como 1 nM. Se piensa que la resistencia relativamente elevada de la película de ITO es limitante de la corriente de oxidación para TPA y por tanto reduce la sensibilidad. Se ha determinado que se puede mejorar la sensibilidad por medio de deposición de una película fina de material, tal como aluminio sobre la película de ITO, como se describe posteriormente con respecto a la Figura 31. De igual forma, se han llevado a cabo esfuerzos para integrar el fotodiodo de silicio en la microcélula, en lugar de separarlo de la misma como en la realización de la Figura 21.

20 La Figura 21 ilustra una realización de una célula de ECL micromaquinizada con ánodo de película fina, generalmente indicada por 140, y un fotodiodo de silicio (Si) 141 ubicado adyacente a la célula ECL 140. La célula ECL 140 se muestra en el corte transversal ampliado de la Figura 22. La célula 140 comprende un par de miembros de silicio 142 y 143, entre los cuales está ubicado un electrodo 144, que puede estar formado por oro (Au), platino (Pt) o plata (Ag), una capa ITO 145, y una capa de vidrio o portaobjetos 146. El miembro de silicio 142 incluye una cámara de reacción 147, y el miembro 143 incluye una parte de puertos de llenado 148 (véase la Figura 22), por medio de los cuales se dirige un analito, como viene indicado por la leyenda, al interior de la cámara 147 y se extrae a partir de la misma por medio de tubos o tuberías 149 y 150, como viene indicado por medio de las flechas 151 y 152. Como se puede ver en la Figura 22, una sección central 153 de miembro de silicio 143 ubicada entre los puertos de llenado 148, junto con la capa de ITO 145 y el portaobjetos de vidrio 146, definen una ventana por medio de la cual se puede detectar reacción dentro de la cámara 147, como viene indicado por los fotones 154 que pasan a través de la misma sobre el fotodiodo 141. Las conexiones eléctricas 155 y 156 están conectadas desde una fuente de alimentación eléctrica al electrodo 144 y a la capa de ITO 145, respectivamente, mientras que el fotodiodo 141 está conectado eléctricamente a una fuente de alimentación eléctrica por medio de las conexiones 157 y 158.

25 Las Figuras 23-30 ilustran la fabricación de una realización de una célula ECL similar a la de las Figuras 21 y 22. El proceso de fabricación se lleva a cabo como se muestra a continuación:

- 30 1. Se reviste un bloque 160 de silicio para formar una capa 161 de nitruro de silicio (véase Figura 23).
2. Se deposita una capa 162 de material fotorresistente sobre la capa 161 (véase Figura 24).
3. Se somete a formación de patrón la capa 162 y se procesa fotolitográficamente para formar una abertura 163 en la misma (véase Figura 25).
4. Se retira la sección 161 de la capa de nitruro de silicio 161 por debajo de la abertura 163 por medio de grabado al aguafuerte de RIE (véase Figura 26).
- 65 5. Se retira una sección de bloque de silicio 160 por medio de grabado al aguafuerte con KOH para formar

una cámara de reacción 164, y se retira el material 162 fotorresistente restante (véase Figura 27).

6. Se deposita una capa de oro, por ejemplo, por medio de evaporación de película fina sobre la superficie superior del bloque 160 y la cámara 164 para formar un electrodo 165 (véase Figura 28).

7. Se reviste un segundo bloque de silicio 166 con una capa 167 de nitruro de silicio y se forman las aberturas 168 y 169 en la misma por medio de grabado al agua fuerte de RIE, y se forman una parte de puertos de llenado 170 y 171, por medio de micromaquinizado, en bloque, 166, y se une un bloque 166 revestido con nitruro de silicio al electrodo 165 (véase la Figura 29).

8. Se deposita una capa de ITO que forma un electrodo 172 sobre una capa o portaobjetos de vidrio 173, y posteriormente se une a la capa 167 de nitruro de silicio (véase la Figura 29).

9. Se fijan las conexiones eléctricas 174 y 175 al electrodo de oro 165 y al electrodo de ITO 172, se une un detector 176, tal como el fotodiodo de la Figura 21, que tiene conexiones eléctricas 177 y 178, a la capa de vidrio 173, y se coloca el bloque 160 de silicio revestido con nitruro de silicio sobre un imán 179 que tiene conexiones eléctricas 180 y 181 (véase Figura 30).

Para reducir la resistencia del electrodo de ITO 172 se puede depositar una película 182 fina de aluminio (véase la Figura 31) sobre la capa de ITO o electrodo 172 antes de unir el mismo al bloque 166 de silicio revestido con nitruro de silicio.

La Figura 32A ilustra una serie múltiple lineal de cámaras 40' de reacción de tipo manguitos interconectadas por medio de tubos 190 que se extienden desde un extremo de una cámara hasta un extremo de la cámara siguiente, y que tienen un acoplador de energía 191 ilustrado únicamente sobre una de las cámaras de reacción 40' para formar, un flujo de un "cordón de perlas" a través del sistema de reacción. Durante la operación, el acoplador de energía 191 se colocaría en la cámara de reacción 40'. La Figura 32B ilustra una serie múltiple lineal y paralela de cámaras de reacción 40' de tipo manguitos con tubos 190' de interconexión de extremo a extremo como en la Figura 32A y tubos de interconexión 192 que se extienden entre las aberturas 193 en los lados de las cámaras de reacción 40'. En la Figura 32B las cámaras de reacción están conectadas a un control, tal como un ordenador 194 y a un detector 195 para proporcionar la retroalimentación lógica como viene indicado por medio de la flecha 196, para producir una red de control electrónico de reacción indicada como 197, estando indicado el flujo neto por medio de las flechas 198, 199, 200 y 201. Este flujo de "cordón de perlas" a través del sistema de reacción está formado por elementos intercambiables de cámara de reacción, sobre el sistema de tubos de flujo continuo.

Las Figuras 33A y 33B ilustran una realización de unidades de control de reacción que utilizan una película magnética micromaquinizada (es decir, depositada por medio de metalizado por bombardeo) para controlar las partículas magnéticas en la cámara de reacción de manguitos. Otros ejemplos de elementos micromaquinizados son: películas electroactivas tal como calentadores, electrodos, películas finas termoeléctricas y mecánicas (es decir, memoria de forma), fotodiodos, etc. Las cámaras de reacción con el control de reacción integrado o el elemento de detección están acopladas a una fuente alimentación eléctrica externa. La Figura 33A ilustra una realización de una cámara 240 de reacción de tipo manguitos formada por dos miembros 241 y 242 que tiene una abertura o ranura 243 de configuración de seis lados, con película 244 de control microfabricada depositada sobre la misma. Un revestimiento de cámara de reacción está conectado a un conector 245 en la ranura 243, y se muestra un acoplador de energía 246 en relación espaciada para la película de control 244, pero en operación estaría ubicado sobre la película de control 244. La realización de la Figura 33B difiere de la de la Figura 33A en que la cámara 240' de reacción de manguitos está formada por un miembro individual y provista de una ranura circular 243', de manera que el conector de tubo 245' es cilíndrico. De igual forma, en la realización de la Figura 33B, un accionador microfabricado 247 está ubicado en posición intermedia entre la cámara de reacción 240' y un acoplador de energía 246. A modo de ejemplo, el acoplador de energía de las Figuras 32A, 33A y 33B puede ser un contacto de electrodo, una fuente de radio frecuencia, o un contacto eléctrico a una fuente de alimentación eléctrica DC. De este modo, las cámaras 240 de reacción individuales se pueden ensartar juntas en forma de serie de funcionalidades diferentes. Por ejemplo, la serie de módulos podría ser una cámara de reacción calentada, seguida de una cámara accionada magnéticamente, seguida de un módulo de bombeo electrostático o de memoria de forma. De este modo, el acoplador de energía también podría ser una forma de conectar a una serie de fuentes de energía. En el ejemplo anterior que podría ser un contacto eléctrico a una fuente de DC para el calentamiento resistivo; una bobina magnética para accionamiento magnético y posteriormente una fuente de RF para accionar el mecanismo de bombeo.

La Figura 34 ilustra la integración de un elemento de reacción en un sistema de flujo continuo monolítico. En esta realización, se coloca el elemento micromaquinizado dentro o en posición adyacente al bloque de material en el que se fabrican los canales de flujo. Como se puede ver, el bloque de material 250, construido por ejemplo de silicio, metal o polímero está provisto de aberturas interconectadas o conductos 251 y 252 con un elemento 253 de control intercalado, tal como un calentador de película fina resistivo; una bobina o película magnética; o un accionador tal como una bomba electrostática, válvula, o mezclador, ubicado en la intersección de los conductos 251 y 252. Un par de elementos de control 254 y 255 están intercalados en una superficie externa del bloque 250 y conectados operativamente al elemento 253 de control intercalado, con las conexiones de control 256 y 257 que se extienden desde el bloque 250, para la conexión a las fuentes de control, tal como el calentador de película fina resistivo; una bobina o película magnética; o un accionador tal como una bomba electrostática, válvula o mezclador. Un par de interconexiones de fluido 258 y 259 están conectadas a los conductos o aberturas 251 y 252.

De este modo, se ha mostrado que la presente invención proporciona una cámara de microrreacción basada en silicio o no basada en silicio que se puede usar en un instrumento de accionamiento manual o un instrumento de alto rendimiento de gran tamaño. La cámara de reacción de manguitos puede estar formada por varios materiales compatibles o combinaciones de estos materiales. Además, la invención proporciona insertos/revestimientos, tiras de ensayo, detección óptica, y control automático para la cámara de microrreacción. De este modo, la presente invención fomenta sustancialmente el estado de la técnica de PCR y otras reacciones químicas.

Una realización de la invención es un reactor químico microfabricado que comprende: una cámara de reacción de manguitos construida de materiales basados en silicio o no basados en silicio; incluyendo dicha cámara de reacción de manguitos una ranura en la misma para la inserción del fluido de reacción. La ranura puede estar construida para la inserción de un fluido de reacción directamente en el interior de dicha cámara de reacción de manguitos, por medio de un tubo, o por medio de un inserto que contiene el fluido de reacción. La cámara de reacción de manguitos puede estar seleccionada entre el grupo que consiste en silicio, vidrio, materiales cerámicos, metal, aleaciones metálicas, materiales poliméricos, materiales compuestos y sus combinaciones. El material puede estar seleccionado entre el grupo que consiste en materiales cerámicos cristalinos, no cristalinos basados en silicato y no basados en silicato. El material polimérico puede comprender al menos un polímero que contiene un dopante para aumentar la conducción térmica. La cámara de reacción de manguitos puede estar provista de al menos una ventana óptica. El reactor químico microfabricado puede incluir al menos una vía, canal u orificio en dicha cámara de reacción para la colocación de una modalidad de detección. El reactor químico microfabricado puede incluir al menos una lente óptica integrada ubicada en dicha al menos una vía, canal u orificio para proporcionar acceso a los revestimientos de la cámara de reacción. La cámara de reacción de manguitos puede estar formada por una pluralidad de miembros unidos. Los miembros unidos pueden estar contruidos de polisilicio y silicio en masa. La cámara de reacción de manguitos puede estar formada por un primer material y puede incluir un revestimiento construido de un segundo material. La cámara de reacción de manguitos puede estar formada por un material escogido entre el grupo que consiste en silicio y metal, en el que dicho revestimiento puede estar formado por una capa de pasivación de polímero. La capa de pasivación de polímero puede estar formada por teflón o polipropileno. Esta cámara de reacción de manguitos puede estar formada por un material seleccionado entre el grupo que consiste en silicio, metal y material cerámico, en el que dicho revestimiento puede estar formado por un material seleccionado entre el grupo que consiste en polímero, vidrio y metal. La cámara de reacción de manguitos puede estar construida por un primer material y puede incluir un medio de calentamiento formado por un segundo material. El reactor químico microfabricado puede incluir un medio de calentamiento y de enfriamiento formado por una película eléctrica térmica. El reactor químico microfabricado puede incluir películas electroactivas para el control eléctrico de reactivos eléctricamente activos. El reactor químico microfabricado puede incluir películas magnéticas para controlar los reactivos magnéticos y paramagnéticos.

La cámara de reacción de manguitos puede incluir una pluralidad de ventanas y medios de calentamiento ubicados en posición adyacente a cada ventana. La cámara de reacción puede estar formada por materiales seleccionados entre el grupo de silicio, polímero y material cerámico; y dicho medio de calentamiento puede estar formado por polisilicio o un metal. El reactor químico microfabricado puede incluir un inserto adaptado para insertarse en el interior de dicha ranura, conteniendo dicho inserto fluidos de reacción. La cámara de reacción de manguitos puede estar provista de una pluralidad de ranuras en la misma, teniendo cada ranura al menos una ventana. Al menos una de dichas ventanas puede estar provista de una tira de ensayo. El reactor químico microfabricado puede incluir un inserto adaptado para insertarse en el interior de al menos una de dichas ranuras, en el que dicho al menos un inserto puede incluir al menos una ventana en el mismo. La cámara de reacción de manguitos puede estar construida para insertarse en el interior del instrumento operado con pilas de accionamiento manual. La cámara de reacción de manguitos puede estar construida para insertarse en el interior de un instrumento construido para contener una agrupación de dichas cámaras de reacción. La agrupación de cámaras de reacción puede estar operativamente conectada, por medio de una agrupación de microinyectores, a una agrupación de microelectroforesis. La agrupación de cámaras de reacción puede estar conectada directamente a la agrupación de microelectroforesis. La agrupación de las cámaras de reacción puede estar construida de silicio, metales y material cerámico; y dicha agrupación de microelectroforesis puede estar construida de vidrio, polímero y material cerámico. El reactor químico microfabricado puede incluir un detector óptico ubicado en posición adyacente a dicha ventana óptica. El reactor químico microfabricado puede incluir un sistema de lectura de datos conectado operativamente a dicho detector óptico, y un controlador de instrumento conectado operativamente a dicho sistema de lectura de datos y dicha cámara de reacción. Las cámaras de reacción pueden incluir un revestimiento formado por polímero, vidrio u otro material compatible. El reactor químico microfabricado puede incluir modalidades de detección múltiples. El reactor químico microfabricado puede incluir al menos una modalidad de detección. Al menos una modalidad de detección puede estar seleccionada entre el grupo que consiste en óptica, electroquímica, electroqueminiscencia, magnética y capacitiva. El reactor químico microfabricado puede incluir elementos microfabricados para proporcionar la detección. El reactor químico microfabricado puede comprender una agrupación de dichas cámaras de reacción de manguitos interconectadas por medio de tuberías a una agrupación de cámaras de reacción, y elementos de control que proporcionan un sistema de reacción de flujo continuo. El reactor químico microfabricado puede comprender una agrupación de dichas cámaras de reacción de manguitos que contienen una agrupación de modalidades de detección adyacentes, proporcionando dichas modalidades de detección control de la retroalimentación de un proceso de reacción en dichas cámaras.

REIVINDICACIONES

1. Un reactor químico microfabricado, que comprende:

- 5 una cámara de reacción de manguitos (42; 240) construida de:
- un material seleccionado entre el grupo que consiste en materiales cerámicos, metales, aleaciones metálicas, materiales compuestos y sus combinaciones; o uno o más materiales no basados en silicio, con la condición de que los materiales no sean polímeros;
- 10 incluyendo dicha cámara de reacción de manguitos (41, 240) una ranura (42; 243) en la misma para recibir un inserto (105) o un tubo (45; 245) que contiene una mezcla de reacción (46) y al menos un calentador (57; 65; 70; 246) acoplado con dicha cámara de reacción de manguitos para calentar la mezcla de reacción.
- 15 2. El reactor químico microfabricado de la reivindicación 1, en el que la cámara de reacción de manguitos está construida de uno o más materiales no basados en silicio y en el que los materiales no basados en silicio están seleccionados entre el grupo que consiste en materiales cerámicos, metales, aleaciones metálicas, materiales compuestos y sus combinaciones.
- 20 3. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha cámara de reacción de manguitos comprende un material cerámico, y el calentador comprende un metal acoplado al material cerámico.
- 25 4. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el calentador comprende al menos una película termoeléctrica.
- 30 5. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que además comprende al menos una película electroactiva acoplada a dicha cámara de reacción de manguitos para controlar los reactivos eléctricamente activos de la mezcla de reacción.
- 35 6. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende al menos una película magnética acoplada a dicha cámara de reacción de manguitos para controlar los reactivos magnéticos y paramagnéticos de la mezcla de reacción.
- 40 7. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha cámara de reacción de manguitos incluye al menos una ventana óptica (55, 56, 136).
8. El reactor químico microfabricado de la reivindicación 7, que además comprende un detector óptico (137) para detectar un producto de la mezcla de reacción a través de la ventana (136).
- 45 9. El reactor químico microfabricado de la reivindicación 8, que además comprende:
- (a) un sistema de lectura de datos (139) conectado al detector (137); y
- (b) un controlador de instrumento conectado al sistema de lectura de datos.
- 50 10. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que además comprende al menos una modalidad de detector (137) ubicada en posición adyacente a dicha cámara de reacción de manguitos, en el que la modalidad de detector está seleccionada entre el grupo que consiste en modalidades de detección óptica, electroquímica, electroqueminiscencia, magnética y capacitiva.
- 55 11. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que además comprende al menos un elemento microfabricado adyacente a dicha cámara de reacción de manguitos para detectar un producto en la mezcla de reacción.
- 60 12. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que además comprende una agrupación de cámaras de reacción de manguitos y una agrupación de modalidades de detección adyacentes para proporcionar el control de retroalimentación de un proceso de reacción en dichas cámaras de reacción de manguitos.
13. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la cámara de reacción de manguitos está construida para recibir directamente la mezcla de reacción por medio de un tubo (45) o por medio de un inserto (105) que contiene la mezcla de reacción.

14. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que además comprende un tubo o inserto (105) para albergar la mezcla de reacción, en el que el inserto (105) está construido para introducirse en el interior de dicha cámara de reacción manguitos (50).
- 5 15. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicha cámara de reacción de manguitos (50) incluye una primer ventana óptica (55, 56) y en el que el inserto (105) incluye una segunda ventana óptica (106) que está alineada con la primera ventana cuando el inserto se coloca en la cámara de reacción de manguitos.
- 10 16. El reactor químico microfabricado de la reivindicación 15, en el que la segunda ventana está provista de una tira de ensayo.
17. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicación 13 a 16, en el que el inserto comprende un polímero o vidrio.
- 15 18. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que tiene un manguito de reacción y un revestimiento o un inserto.
- 20 19. El reactor químico microfabricado de la reivindicación 18, que comprende un revestimiento (105) en el interior de dicha cámara de reacción de manguitos, en el que el revestimiento comprende un polímero o vidrio.
20. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, que además comprende una agrupación de dichas cámaras de reacción de manguitos interconectadas por medio de una tubería para proporcionar un sistema de reacción de flujo continuo.
- 25 21. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reacciones 1 a 19, en el que el manguito de reacción está construido para insertarse en el interior de un instrumento (90) construido para albergar una agrupación de dichas cámaras de reacción de manguitos.
- 30 22. El reactor químico microfabricado de la reivindicación 20 o 21, en el que la agrupación de cámaras de reacción de manguitos está conectada a una agrupación de microelectroforesis.
- 35 23. El reactor químico microfabricado de la reivindicación 22, que además comprende una agrupación de microinyectores que conectan la agrupación de las cámaras de reacción de manguitos con la agrupación de microelectroforesis.
- 40 24. El reactor químico microfabricado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que dicha cámara de reacción de manguitos comprende al menos dos sustratos y en el que cada uno de los dos sustratos tiene un espesor dentro del intervalo de 0,1 a 1,0.
- 45 25. El reactor químico microfabricado de la reivindicación 24, en el que cada uno de los sustratos tiene una longitud dentro del intervalo de 5 a 50 mm y una anchura dentro del intervalo de 2 a 10 mm.
26. Un aparato para controlar la temperatura de una mezcla de reacción presente en un tubo (45) o inserto (105), comprendiendo el aparato una mejora como se cita en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en el que:
- 50 a) la cámara de reacción de manguitos es un manguito de reacción (50) que comprende al menos dos sustratos (51, 52) que definen una ranura (54) entre ellos para recibir el tubo o inserto, en el que los sustratos está construidos a partir de un material seleccionado entre el grupo que consiste en materiales cerámicos, metales, aleaciones metálicas, materiales compuestos, o sus combinaciones; y
b) al menos un calentador es un calentador resistivo depositado sobre al menos uno de los sustratos.
- 55 27. El aparato de la reivindicación 26, en el que al menos uno de los sustratos comprende un material cerámico, y en el que el calentador comprende una película depositada sobre el material cerámico.
28. El aparato de la reivindicación 26 ó 27, en el que cada uno de los sustratos comprende un material cerámico, y en el que el aparato incluye al menos un calentador depositado sobre cada uno de los sustratos cerámicos.
- 60 29. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que cada uno de los sustratos tiene un espesor dentro del intervalo de 0,1 a 1,0 mm.
30. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, que además comprende:
- 65 a) un sistema (139) de lectura de datos conectado al detector (132); y
b) un controlador de instrumento (138) conectado al sistema de lectura de datos.

31. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30, en el que cada uno de los sustratos comprende un material cerámico, y en el que el aparato incluye al menos un calentador depositado sobre cada uno de los sustratos cerámicos.
- 5 32. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 31, que además comprende una agrupación de dichos manguitos de reacción y un instrumento para albergar los manguitos, en el que el instrumento incluye elementos de control para controlar individualmente la operación de cada manguito.
- 10 33. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, que además comprende una agrupación de dichos manguitos de reacción y una agrupación de detectores adyacentes para proporcionar el control de retroalimentación de un proceso de reacción en los manguitos.

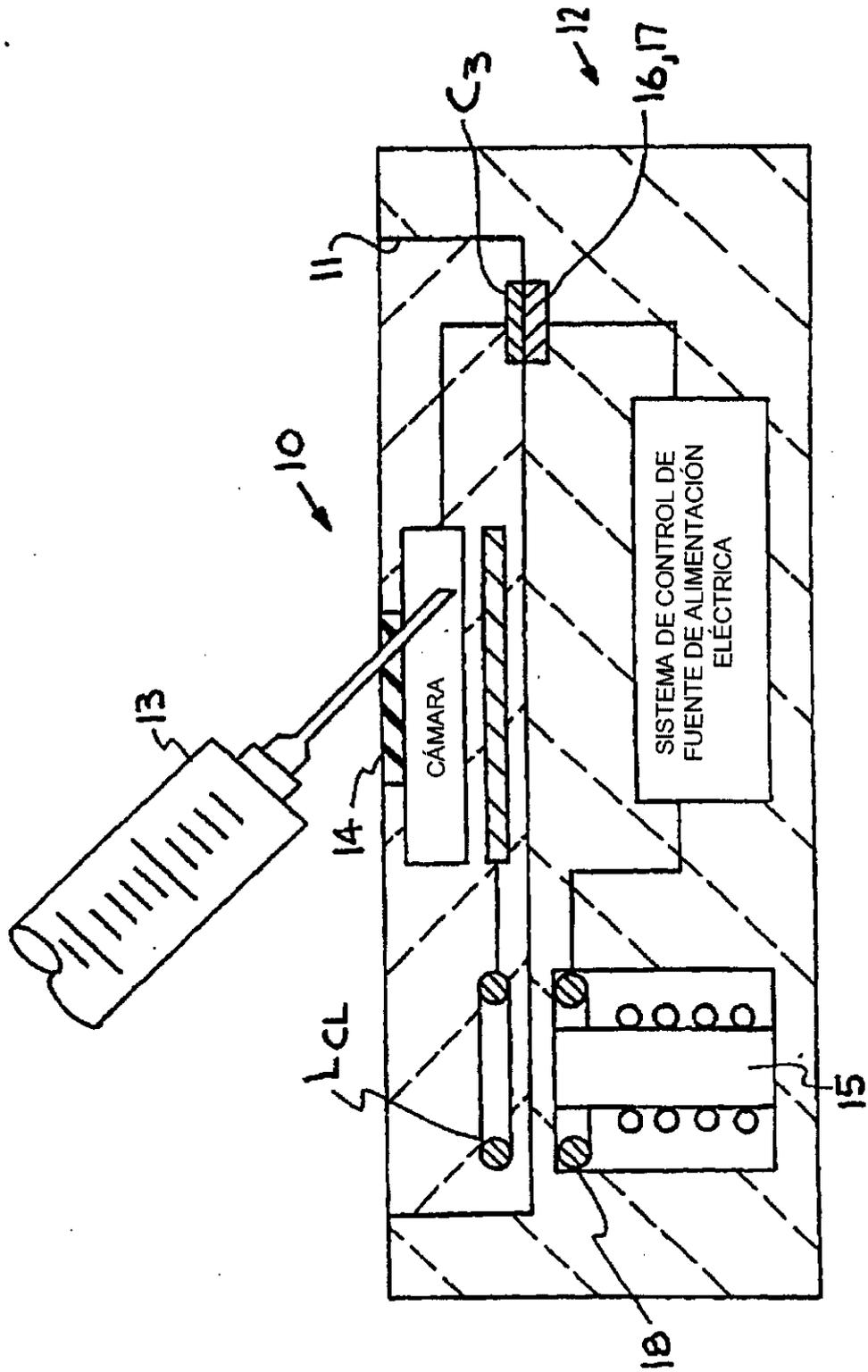


FIG. 1

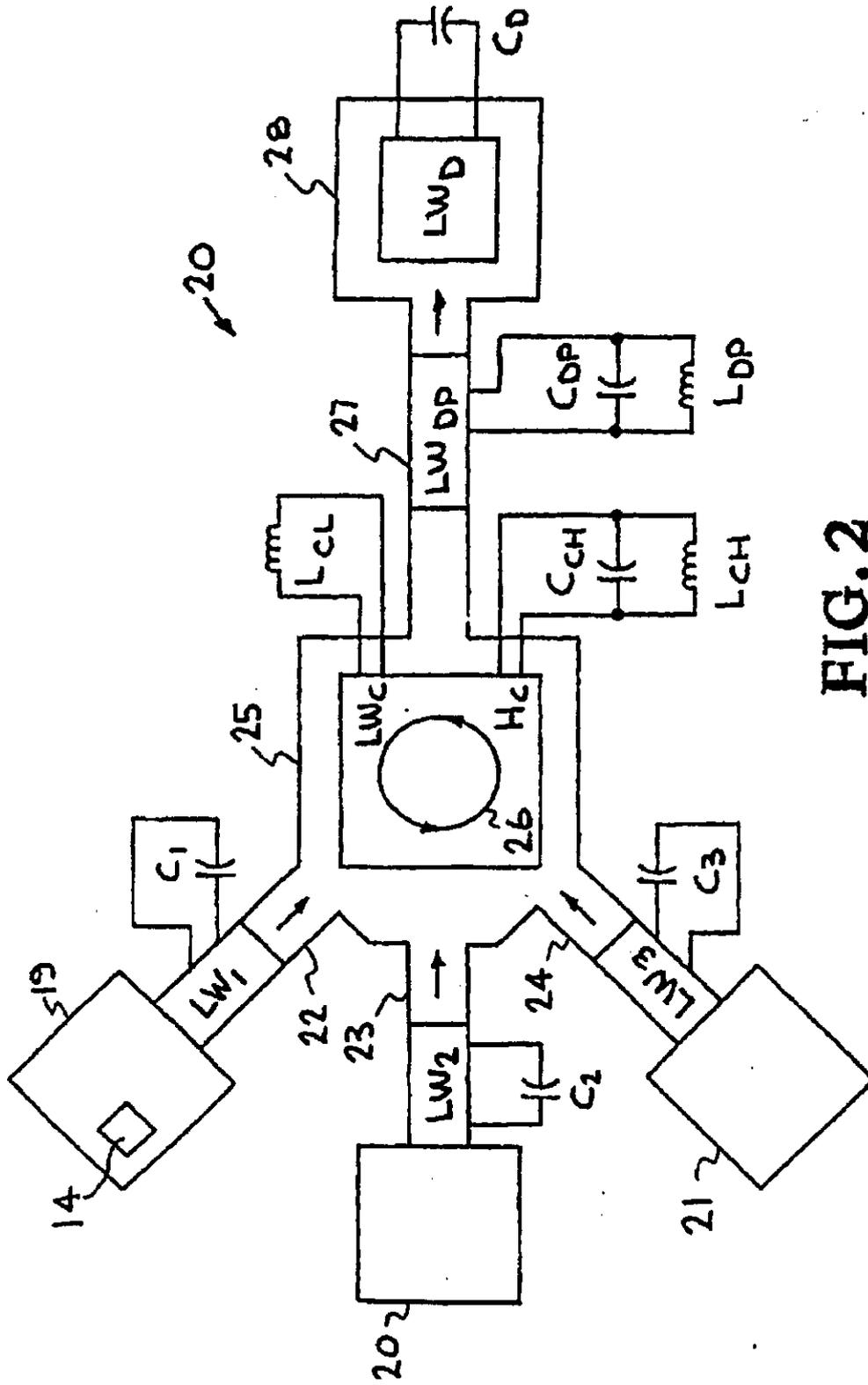


FIG. 2

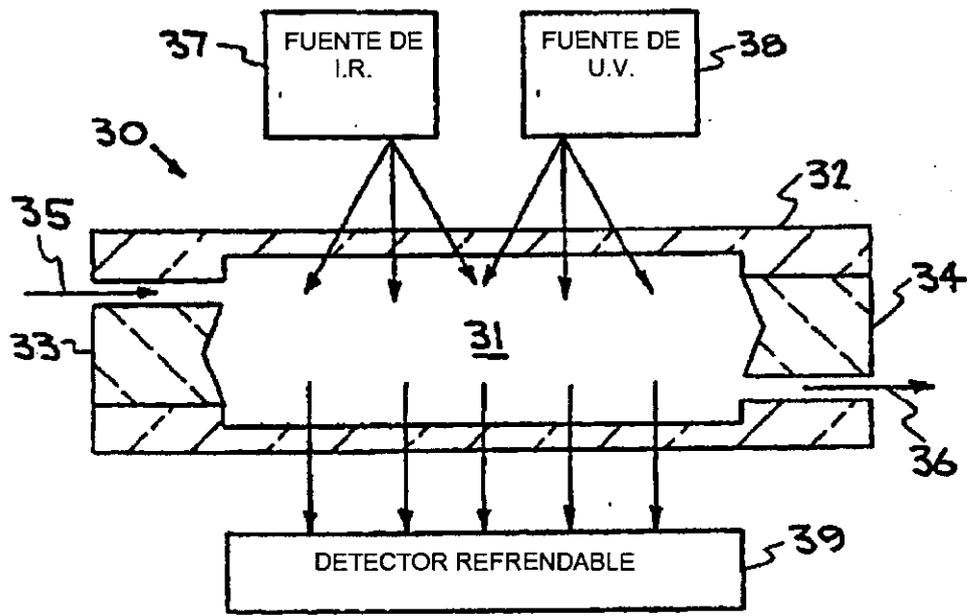


FIG. 3

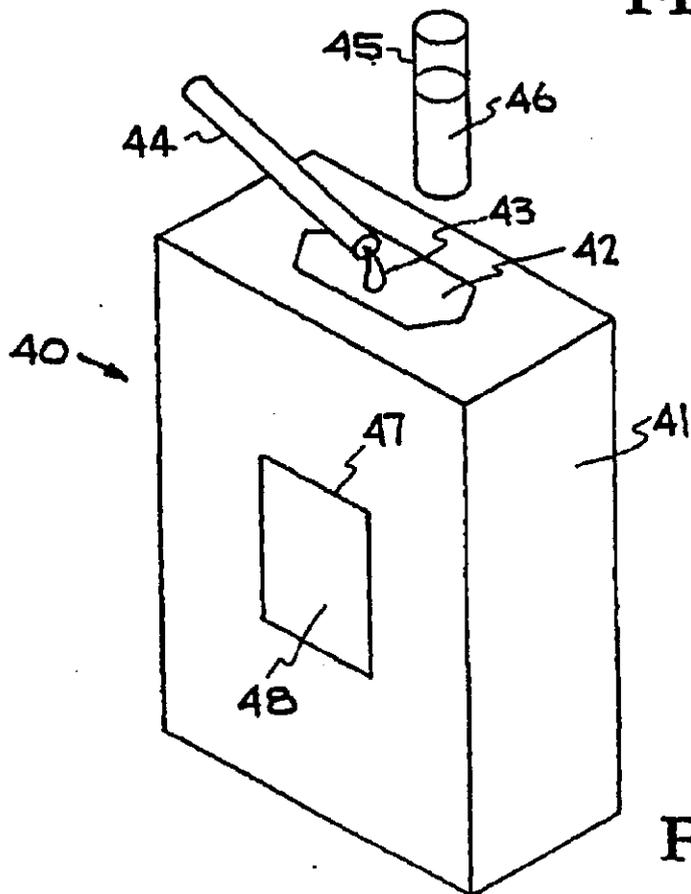
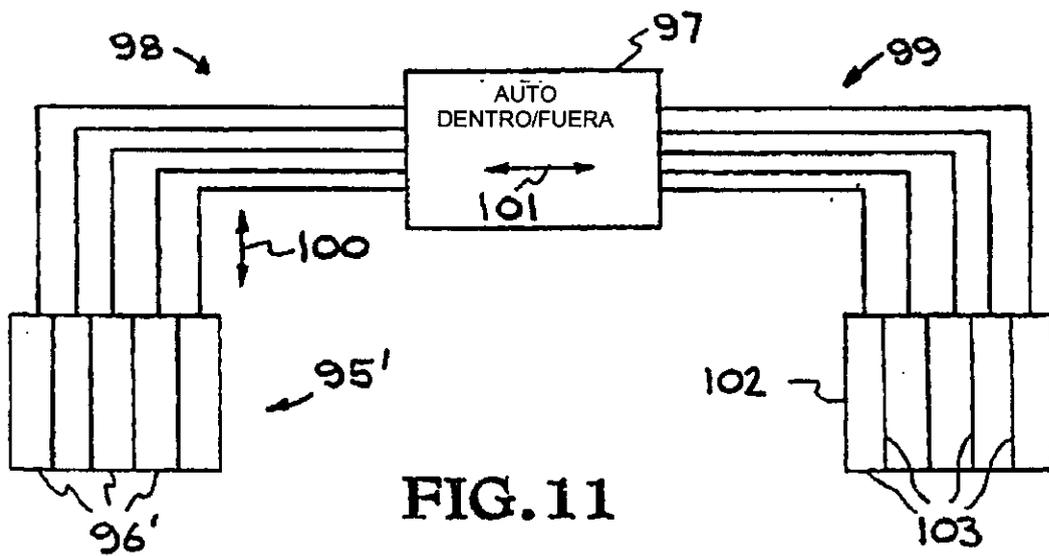
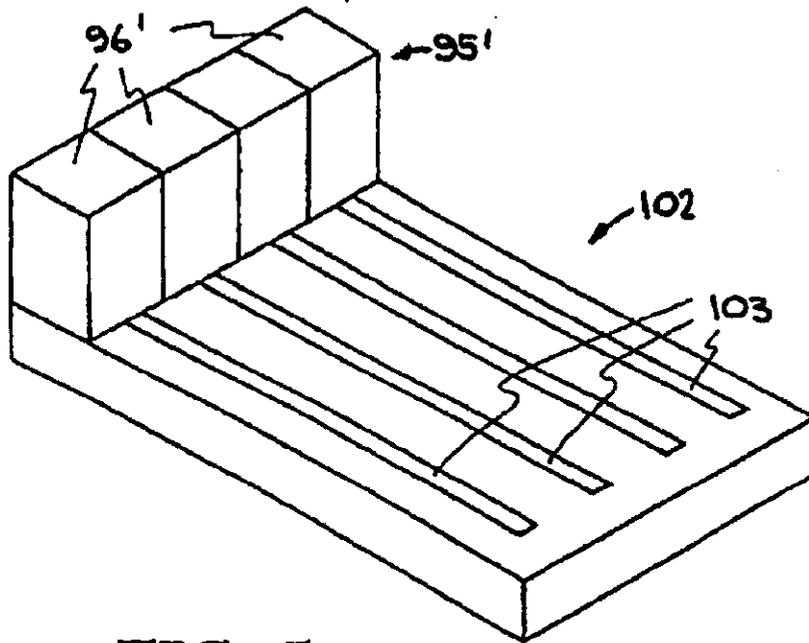


FIG. 4



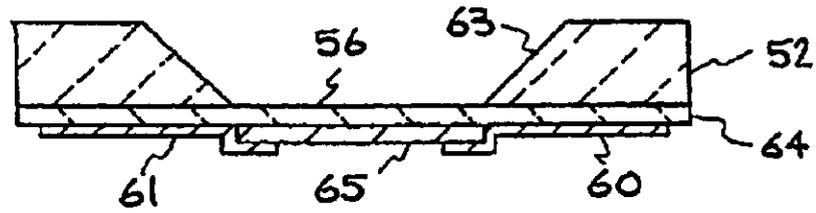
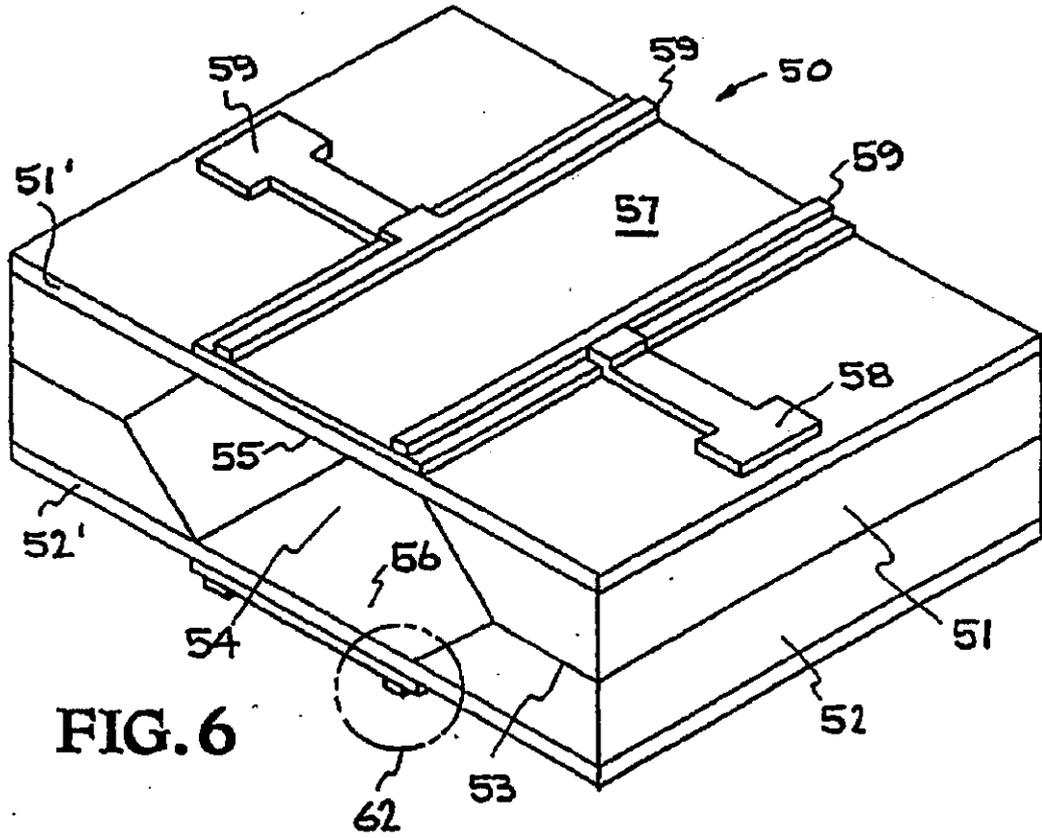


FIG. 7

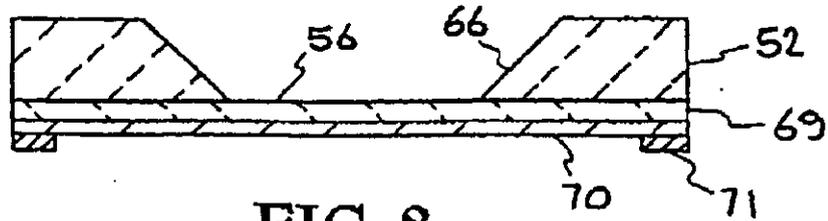


FIG. 8

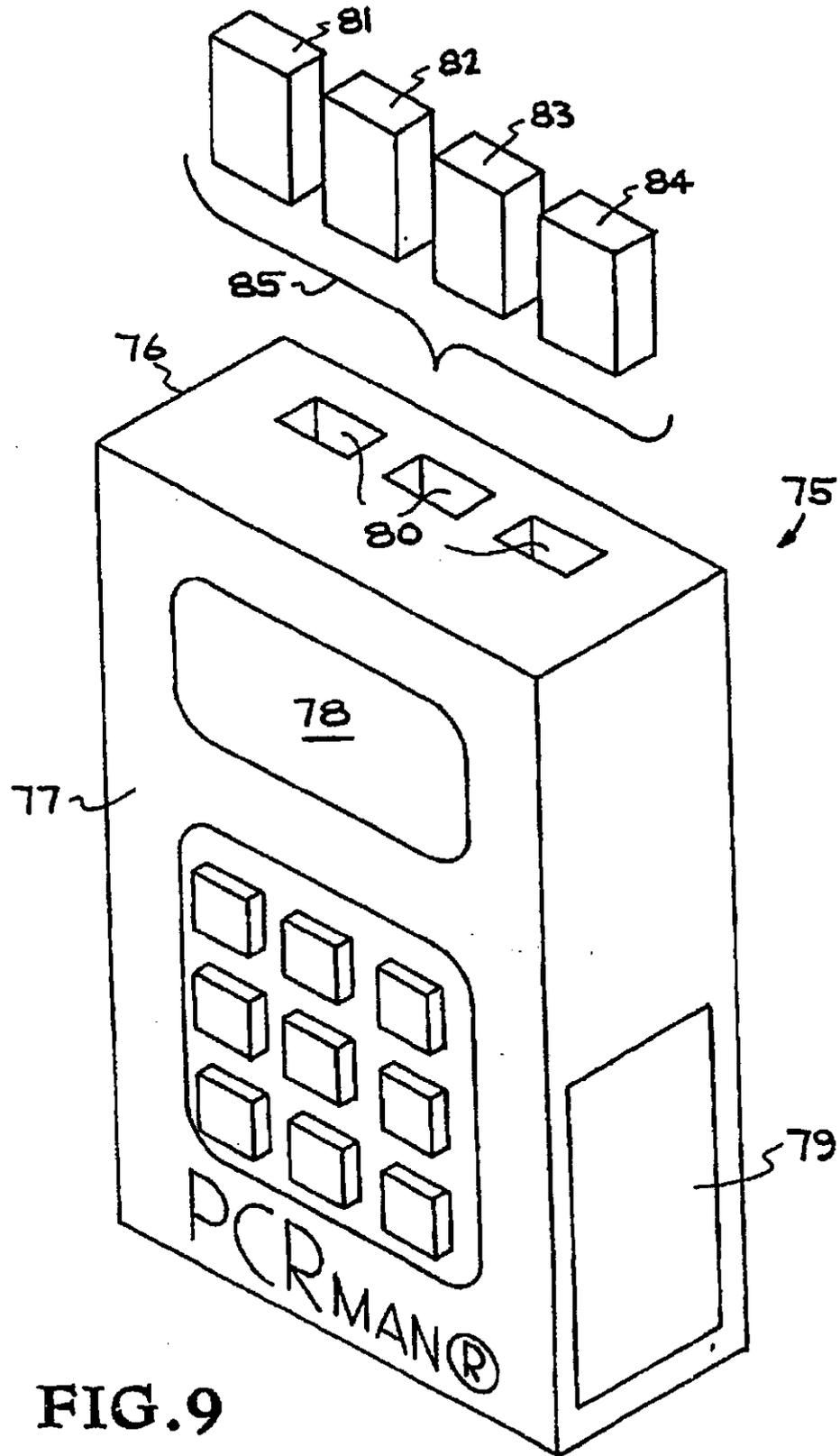


FIG. 9

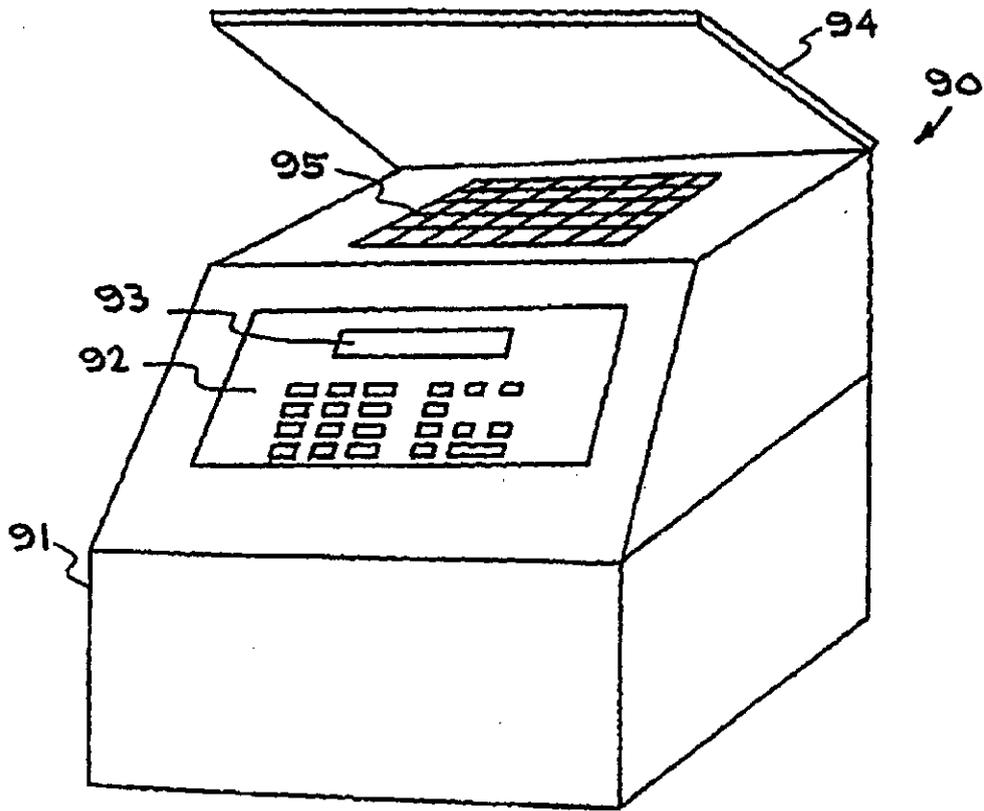


FIG. 10A

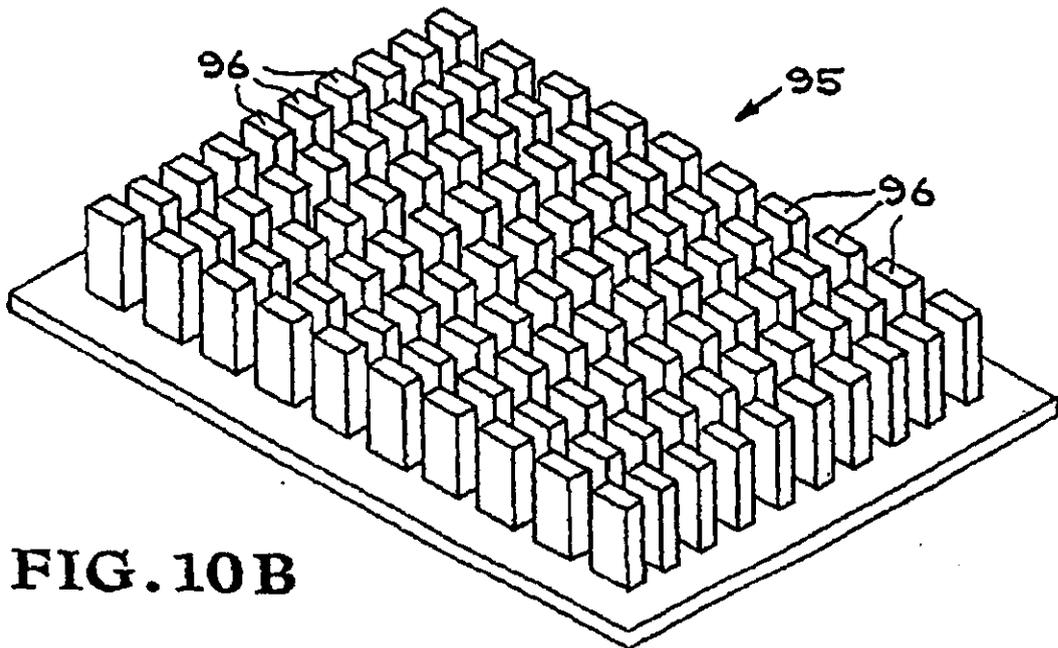


FIG. 10B

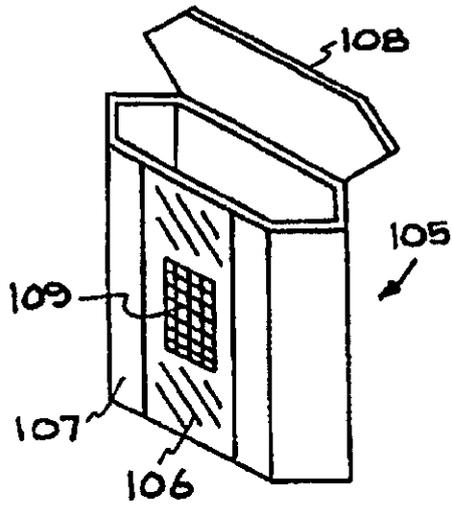


FIG. 12

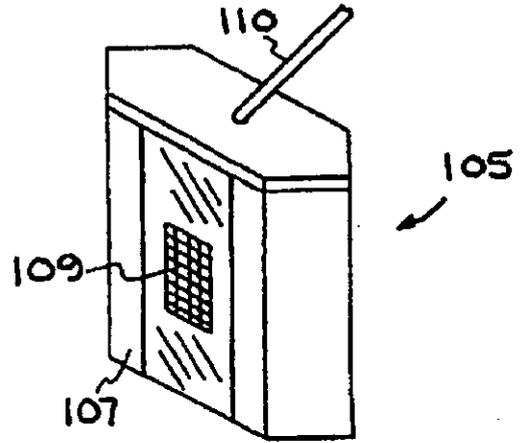


FIG. 13

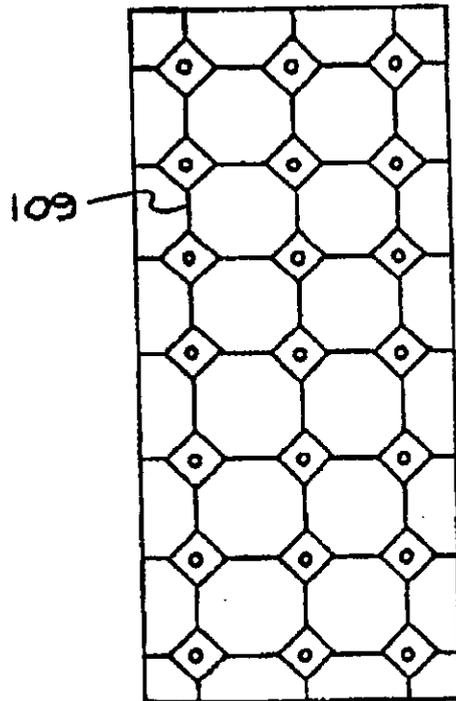


FIG. 14

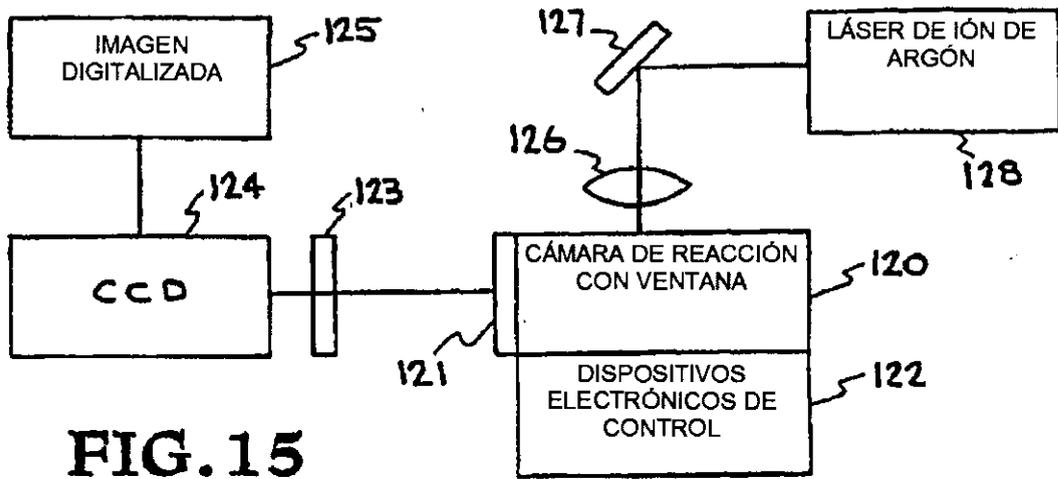


FIG. 15

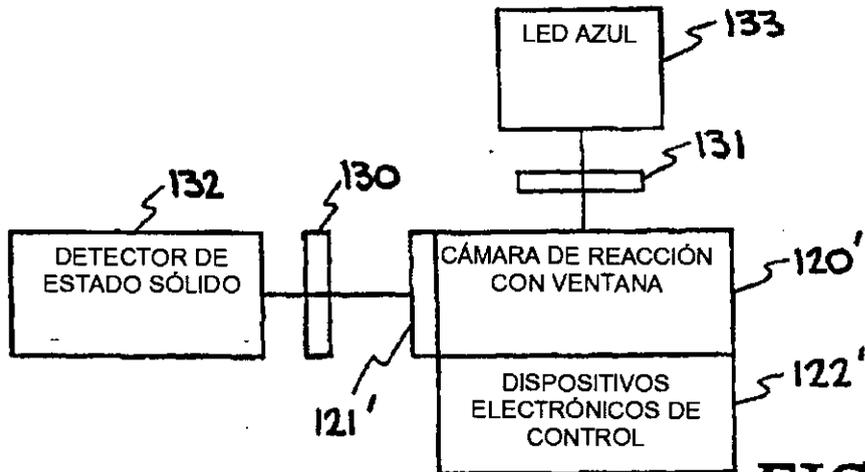


FIG. 16

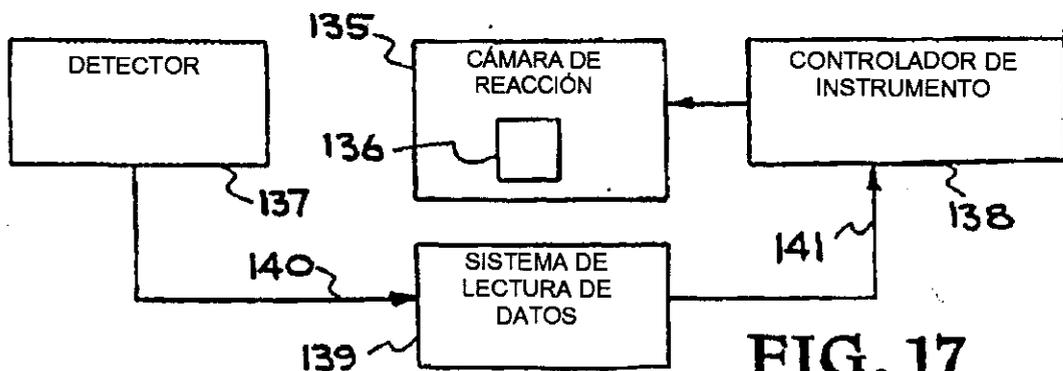


FIG. 17

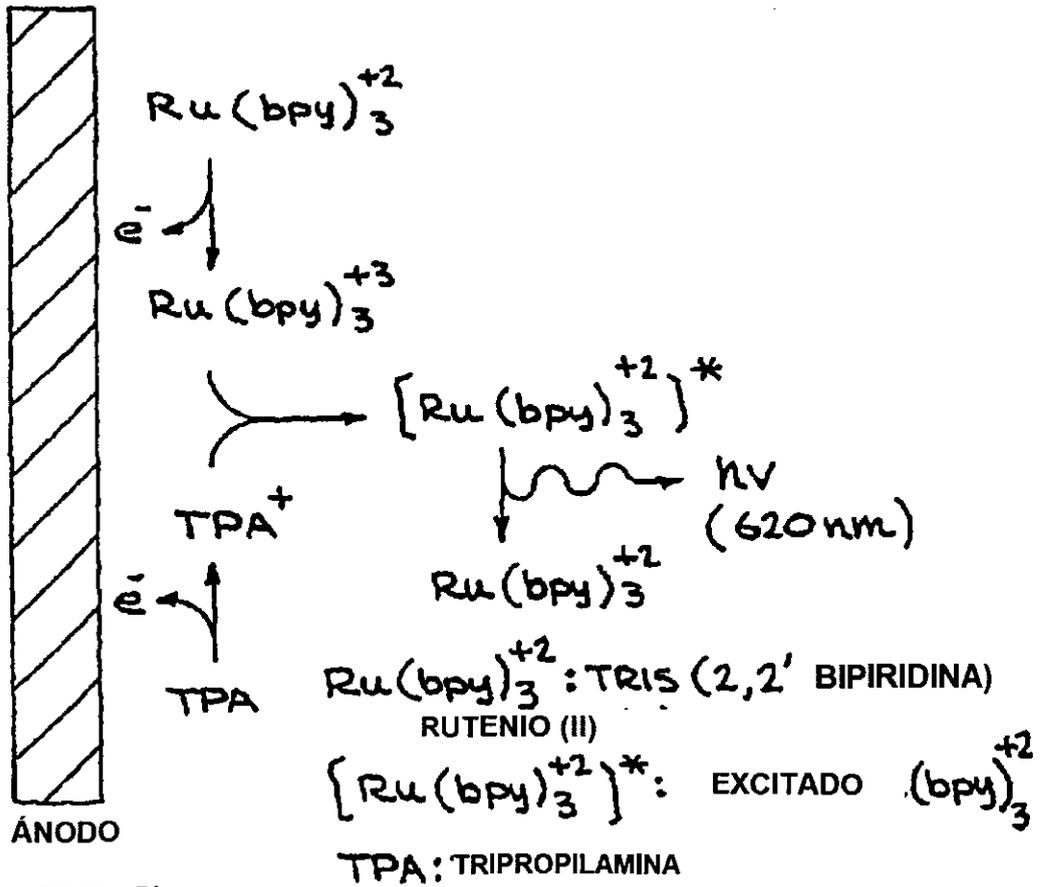
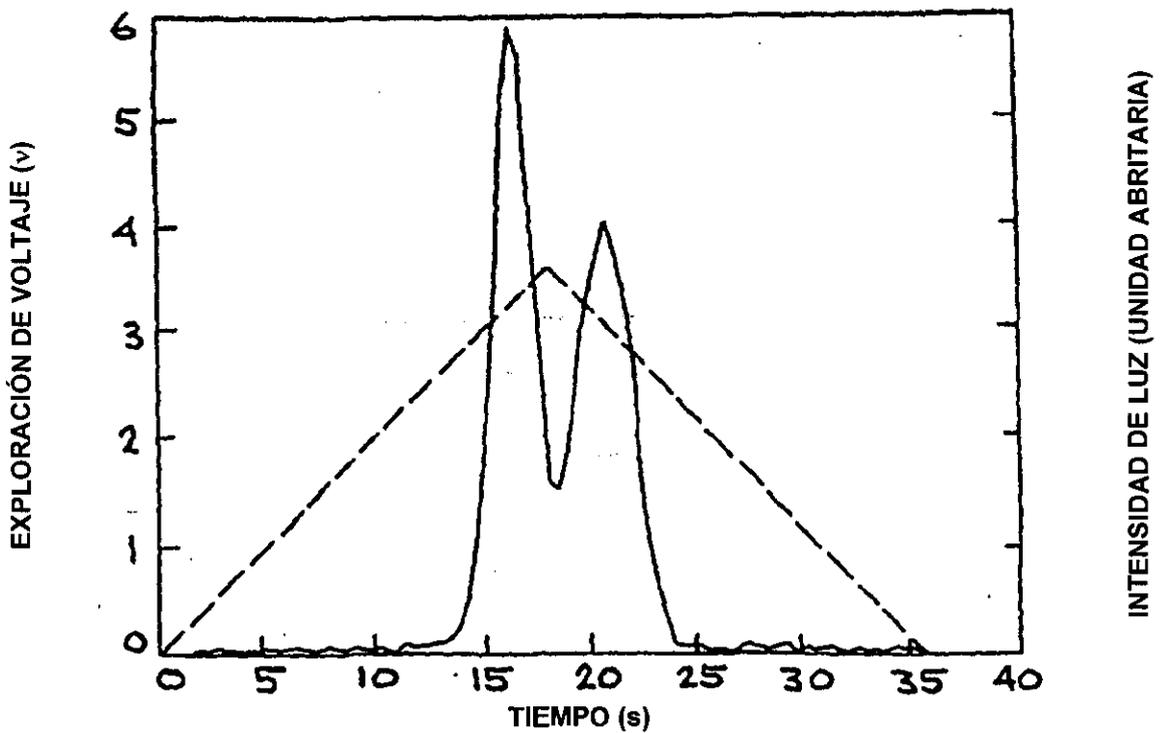


FIG. 18



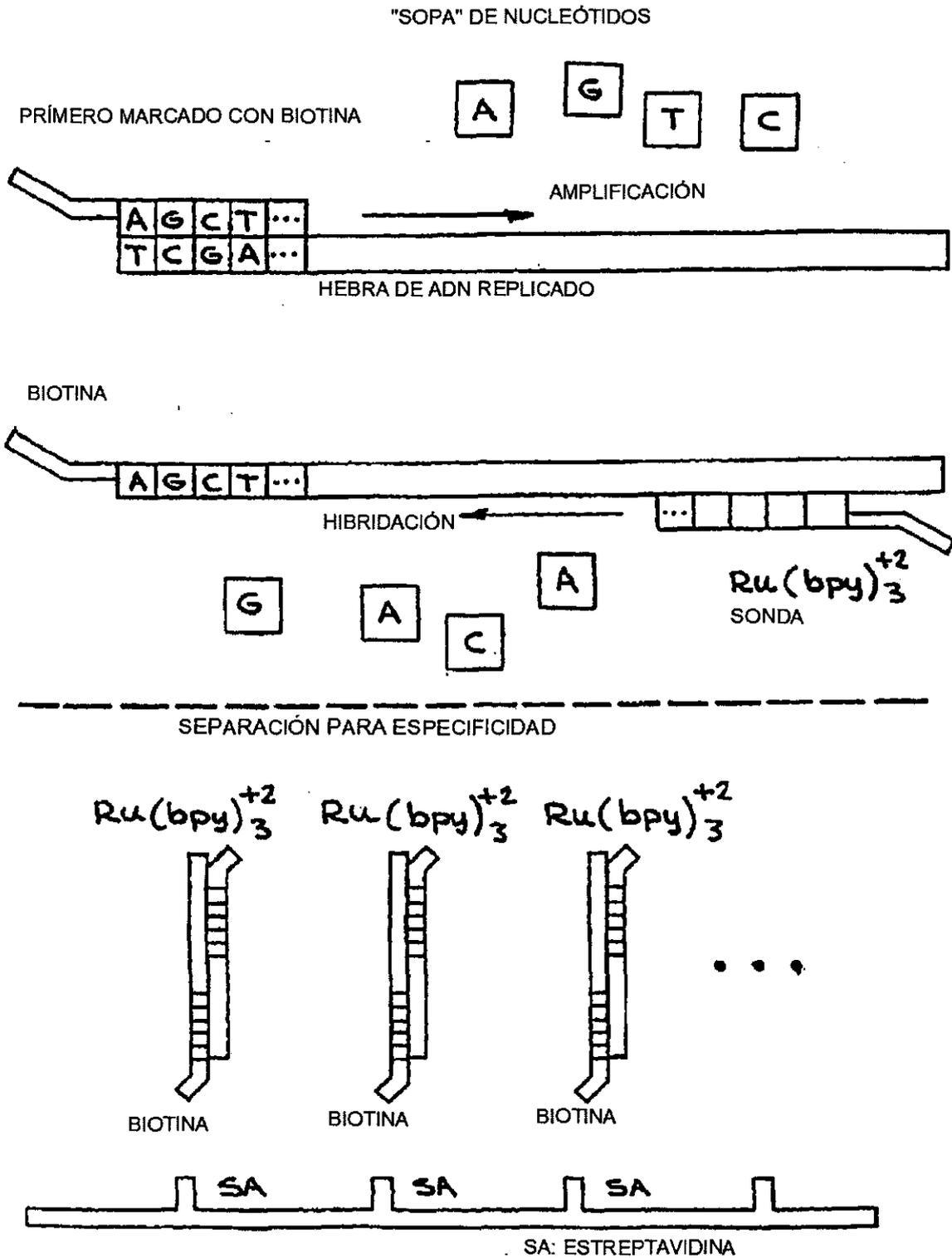
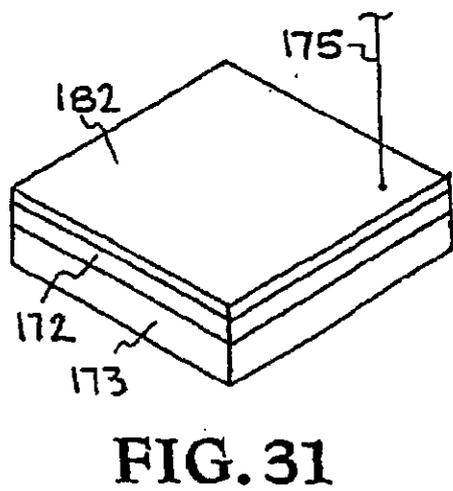
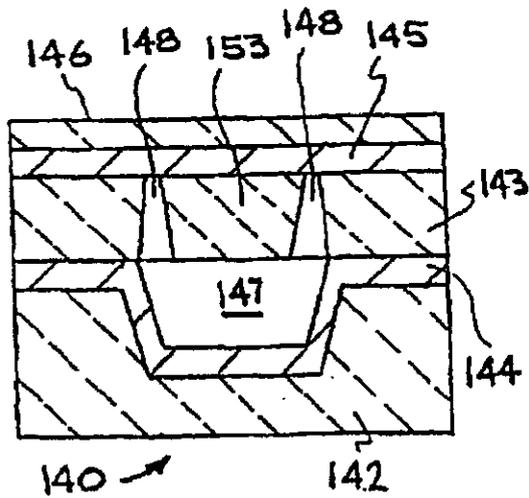
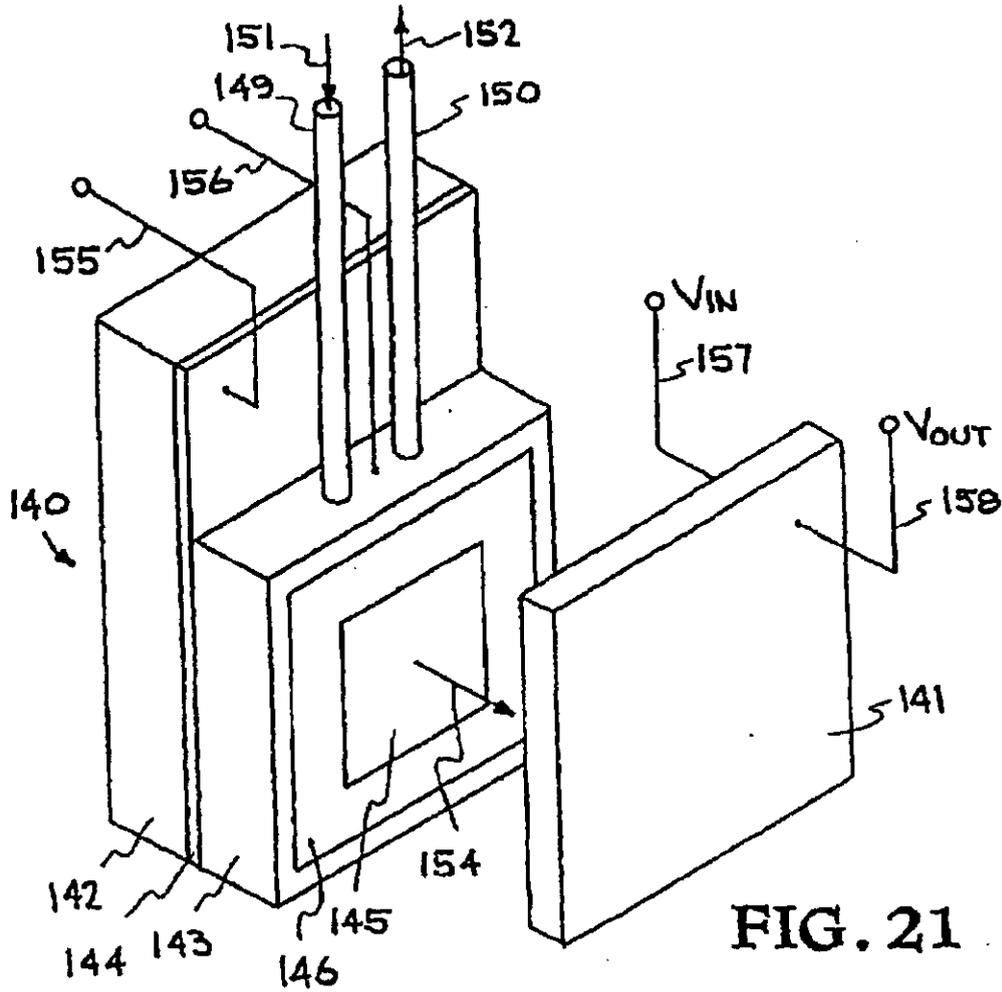


FIG. 19



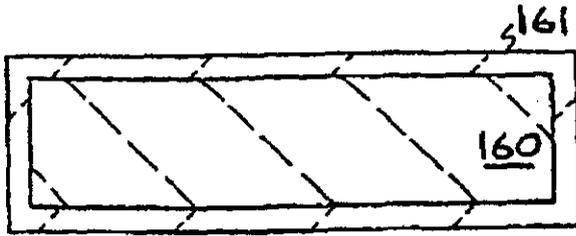


FIG. 23

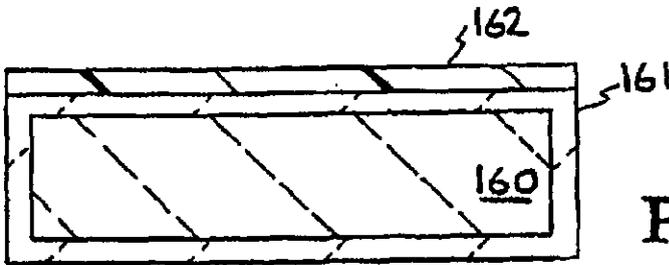


FIG. 24

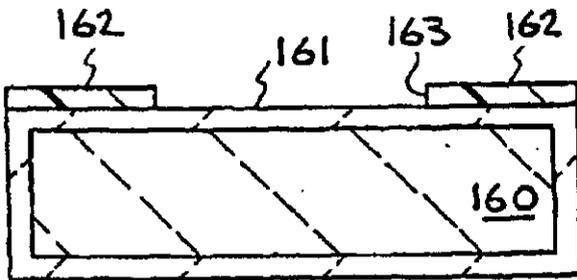


FIG. 25

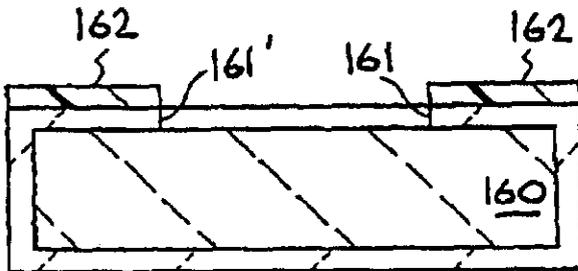


FIG. 26

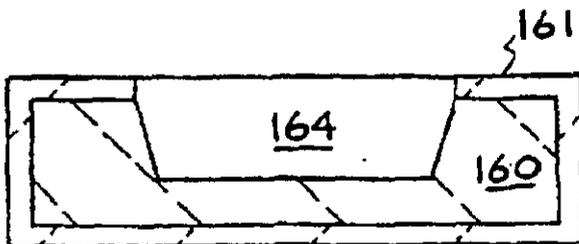


FIG. 27

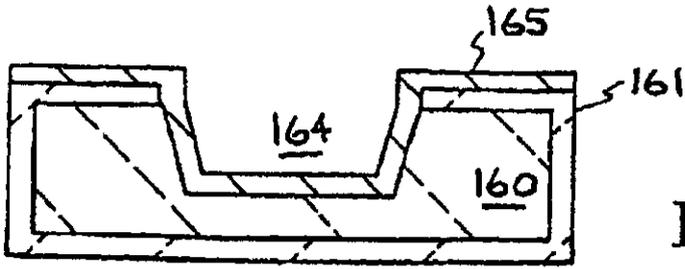


FIG. 28

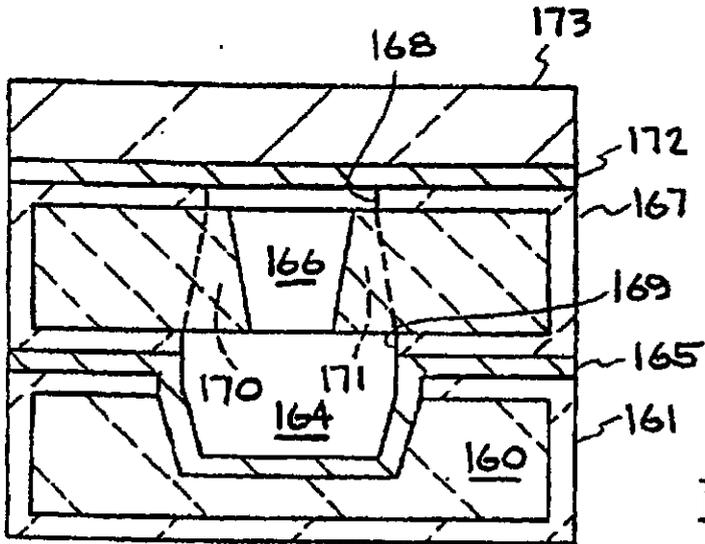


FIG. 29

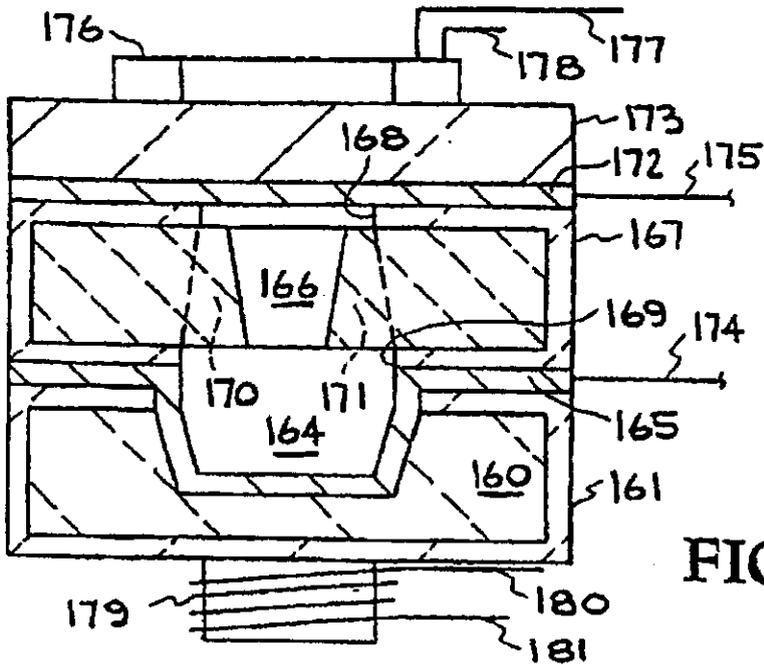


FIG. 30

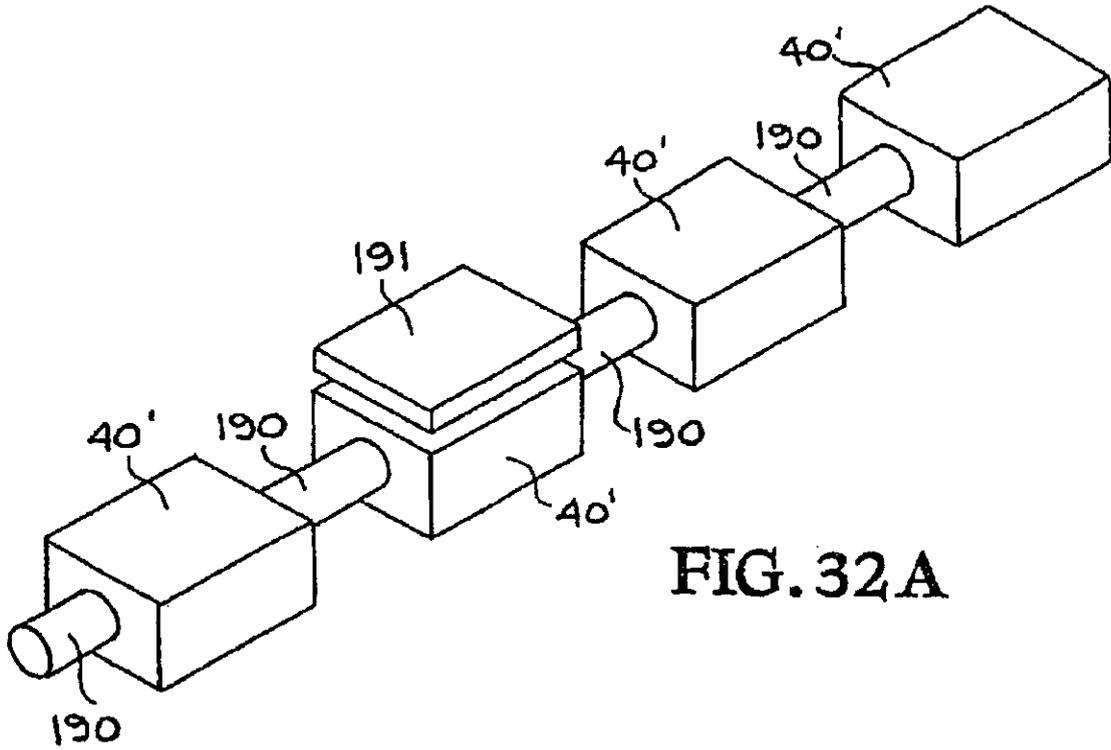


FIG. 32A

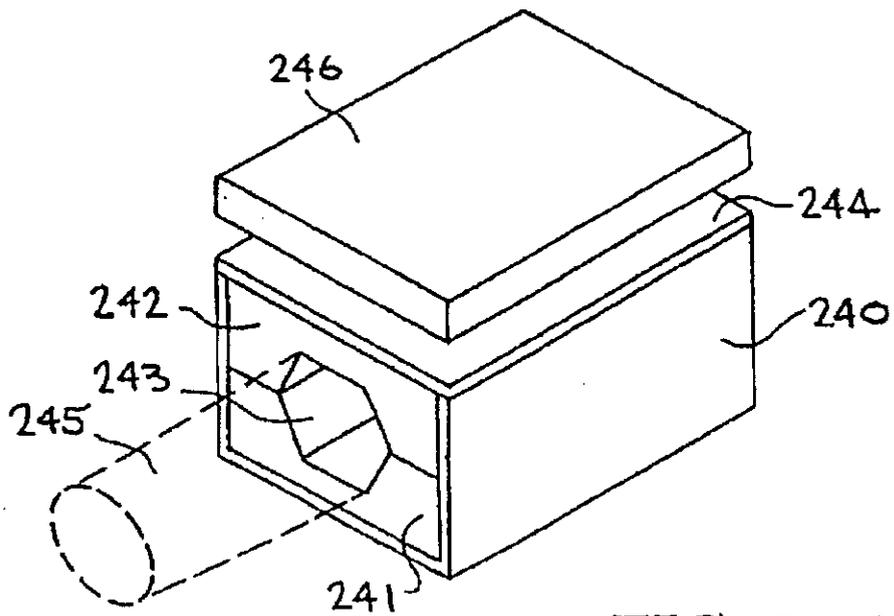


FIG. 33A

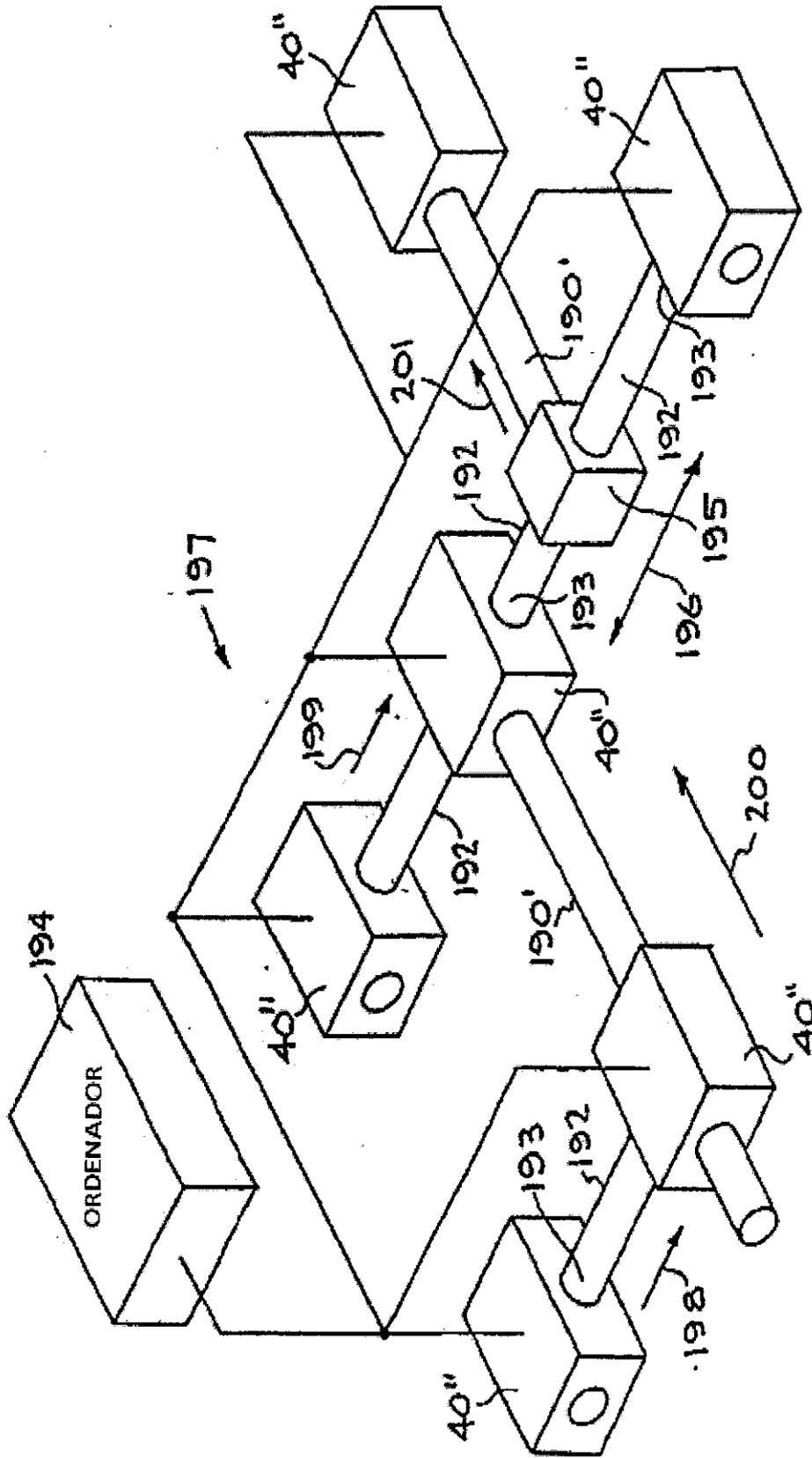


FIG. 32B

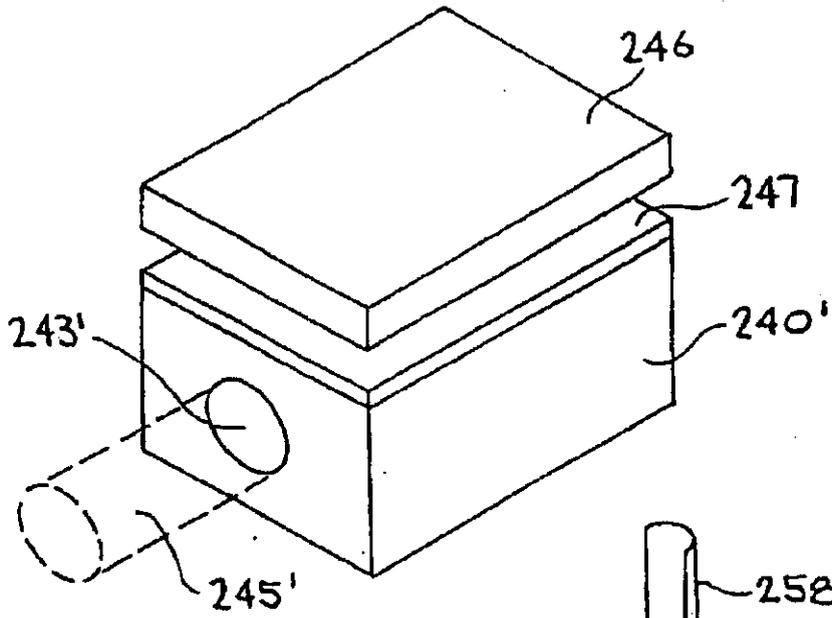


FIG. 33B

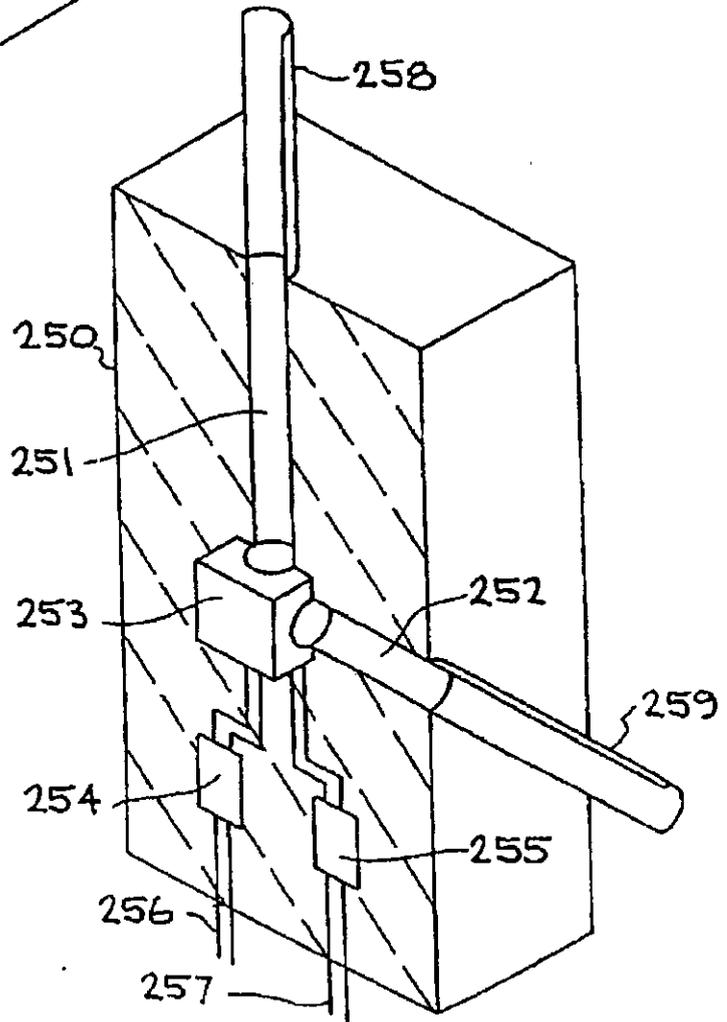


FIG. 34