

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 107**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**B01L 7/00** (2006.01)

**G01N 27/447** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2008 E 08794356 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2152893**

54 Título: **Procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos usando una PCR sobre microchip con detección integrada de CE en tiempo real**

30 Prioridad:

**11.06.2007 US 943248 P**

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

**04.04.2014**

73 Titular/es:

**WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.  
(100.0%)  
1-2, DOSHOMACHI 3-CHOME CHUO-KU  
OSAKA-SHI OSAKA 540-8605, JP**

72 Inventor/es:

**BOUSSE, LUC y  
ZHANG, JIAN-PING**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 453 107 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

Procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos usando una PCR sobre microchip con detección integrada de CE en tiempo real

### Campo de la invención

- 5 La presente invención versa acerca de un procedimiento de amplificación y detección de ácidos nucleicos para un dispositivo microfluídico para llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa de gran volumen (PCR) y la detección integrada en electroforesis capilar (CE).

### Antecedentes de la invención

- 10 La PCR microfluídica se define generalmente como PCR en cámaras con dimensiones que son muy pequeñas, por ejemplo en el intervalo entre 500 y 0,5  $\mu\text{m}$ . Hay sistemas microfluídicos con diversos sistemas calefactores tales como la calefacción zonal, calefactores externos, resistencias integradas, calefacción de Joule y radiación infrarroja, pero esos sistemas requieren detección externa. Eso significa que, al final de la reacción, hay que retirar de la cámara de PCR parte de la muestra y analizarla fuera del sistema por medios tales como la electroforesis en gel o la electroforesis capilar. Se describen ejemplos de trabajo de este tipo en Cheng et al. Nucleic Acids Res, 24(2), p. 380-5 (1996); Kopp y Manz, Science, 280(5366) p. 1046-8 (1998); Oda Anal Chem, 70(20), p. 4361-8 (1998); y Chen et al. Anal Chem, 77(2): p. 658-66 (2005). Un sistema que requiriese detección externa sería incompatible con funciones de detección en tiempo real, porque tal sistema requeriría la retirada de gran parte de la solución de la reacción de PCR para mediciones externas.

- 20 Otro procedimiento de detección usa la detección óptica, que implica intercalar tinciones tales como el SYBR Green (véase Rasmussen et al., Biochemica, 1998(2): p. 8-111998) o sondas fluorogénicas como las sondas Taqman (véanse Kalinina, O., et al., Nucleic Acids Res, 25(10), p. 1999-2004 (1997); Belgrader, P., et al., Science, 284(5413), p. 449-50 (1999); Belgrader, P., et al. Anal Chem, 75(14), p. 3446-50 (2003); y Northrup, M.A., et al., Anal Chem, 70(5), p. 918-22 (1998)). La tinción SYBR Green es una tinción muy específica de asociación al ADN bicatenario para detectar el producto de ADN cuando se acumula durante los ciclos de PCR. Aunque pueden usarse 25 ambos procedimientos de detección en una amplificación de PCR en tiempo real, una distinción entre la tinción intercalante y las técnicas de sonda Taqman es que el procedimiento de detección con tinción intercalante no es específico. Detectará todo el ADN bicatenario, incluyendo los productos no específicos de PCR, tales como formaciones de cavador-dímero. Por esta razón, la amplificación de PCR con una tinción intercalante requiere a menudo un análisis de curva de fusión para distinguir entre un producto deseado de PCR y una amplificación no específica de PCR.

- 30 En cambio, el procedimiento de detección de PCR con sonda Taqman es muy específico, porque la generación de la señal fluorescente depende de la hibridación específica entre la sonda y el producto deseado de PCR. Sin embargo, el procedimiento de detección de PCR con sonda Taqman requiere, a diferencia de la tinción SYBR Green, sintetizar sondas individuales para secuencias diferentes, y está restringido por la limitación de las tinciones fluorescentes que pueden usarse para la marcación de sondas (limitadas, por ejemplo, por el número de tinciones de color diferente) y necesita reactivos caros. Un procedimiento de detección alternativo para la PCR es llevar a cabo una separación electroforética de ADN por tamaños de los productos de reacción. Esto permite que el producto deseado de reacción sea identificado por separado de todas las demás fuentes de ADN o de los contaminantes. Muchos sistemas microfluídicos de PCR con detección externa implican el dimensionamiento del ADN, ya sea en gel o mediante electroforesis capilar, porque es específico y no requiere la síntesis de sondas específicas a la diana. En particular, el documento WO 02/081729 da a conocer un sistema microfluídico para la amplificación de ácidos nucleicos en el que se usa la ciclación térmica que comprende un sustrato que tiene una cámara, una pluralidad de canales de flujo que definen un conjunto de cámaras de reacción, y canales de separación para separar y detectar una fracción del ácido nucleico amplificado. El documento US 2007/119711 da a conocer procedimientos y sistemas para ser usados 45 en la separación de materiales de muestra en diferentes fracciones que emplean fluido a presión para la carga simultánea de una muestra y un reactivo en un canal de carga de muestras de un dispositivo microfluídico. El documento US 2007/017812 da a conocer procedimientos y aparatos para proporcionar sistemas mejorados de inyección de muestras y dispositivos microfluídicos con estructuras tales como microcámaras que proporcionan volúmenes de muestras relativamente grandes. Además, el documento WO 05/080606 da a conocer un dispositivo microfluídico de reacción para una PCR cuantitativa en tiempo real en el que se usa la ciclación térmica, y dicho dispositivo consiste en un sustrato que comprende varias cámaras, una pluralidad de canales de flujo (canales de transporte) en comunicación con las cámaras, y una pluralidad de pocillos. El documento WO 05/080606 aborda, además, el problema de la sensibilidad y menciona que el flujo fluido dentro del dispositivo es un flujo laminar y que la resistencia al flujo en los canales y las cámaras de reacción puede ser calculada usando las fórmulas 55 establecidas en la mecánica de fluidos.

### Sumario de la invención

Se proporciona un procedimiento de amplificación y detección de ácidos nucleicos para un sistema microfluídico que comprende:

(1) proporcionar un sistema microfluídico que comprende:

un sustrato que tiene una cámara para la amplificación de un volumen de ácido nucleico;  
 una pluralidad de pocillos dispuestos sobre el sustrato;  
 canales de flujo que conectan los pocillos y la cámara en el sustrato para permitir el flujo de la solución por la cámara; y  
 uno o más canales de separación proporcionados en el sustrato que conectan la cámara y otros pocillos para separar y detectar una fracción del ácido nucleico amplificado en la cámara, estando configurados la cámara, los canales de flujo y los uno más canales de separación de modo que la resistencia hidrodinámica al flujo en las cámaras y los canales de flujo combinados sea al menos  $10^3$  veces menor que la resistencia hidrodinámica al flujo en los uno o más canales de separación;

- (2) disponer una solución de ácido nucleico en la cámara;
- (3) amplificar el ácido nucleico dispuesto en la cámara;
- (4) introducir desde la cámara una fracción del ácido nucleico amplificado en los uno o más canales de separación;
- (5) separar la fracción del ácido nucleico amplificado mediante los uno o más canales de separación; y
- (6) detectar el ácido nucleico separado,

en el que las etapas (3) a (6) se repiten una o más veces, o la etapa (3) se repite una o más veces y después las etapas (4) a (6) se ejecutan una vez.

La cámara, los canales de flujo y los uno o más canales de separación del sistema microfluídico están configurados de modo que la resistencia hidrodinámica al flujo en las cámaras y los canales de flujo combinados sea aproximadamente  $10^3$  veces menor, o entre aproximadamente  $10^3$  y aproximadamente  $10^9$  veces menor, o entre aproximadamente  $10^3$  y aproximadamente  $10^7$  veces menor, o entre aproximadamente  $10^4$  y aproximadamente  $10^6$  veces menor que la resistencia hidrodinámica al flujo en los uno o más canales de separación. La expresión resistencia hidrodinámica al flujo o resistencia hidráulica al flujo denota la resistencia al flujo impulsado por presión y puede definirse como la relación entre la diferencia de presión dividida por el caudal. El sistema puede incluir, además, un dispositivo de ciclación térmica u otros elementos para llevar a cabo la separación.

Además, en el sistema microfluídico, el volumen combinado de los uno o más canales de separación es más de 100 veces o más menor, o de aproximadamente 100 veces a aproximadamente 1000 veces menor, o de aproximadamente 300 veces a aproximadamente 1000 veces menos que el volumen combinado de la cámara y los canales de flujo.

El sistema puede incluir, además, un dispositivo de ciclización térmica o un dispositivo de control de lectura óptica para llevar a cabo la separación y cuantificar el ADN.

El procedimiento puede incluir, además, (7) cuantificar la cantidad de ácido nucleico presente en base a los datos recogidos.

Por lo tanto, el procedimiento es adecuado para ensayos de PCR en tiempo real así como de punto final.

La separación de los ácidos nucleicos puede llevarse a cabo usando procedimientos electrocinéticos. Se entiende normalmente que el término electrocinético significa el movimiento de soluciones o moléculas en respuesta a un campo eléctrico. Incluye la electroforesis, que es el movimiento de iones o moléculas cargadas en un campo eléctrico, y la electroósmosis, que es el movimiento de una solución volumétrica debido a un campo eléctrico. Las separaciones de ácidos nucleicos pueden llevarse a cabo en condiciones en las que domine la electroforesis, y los ácidos nucleicos tengan movilidades dependientes del tamaño debido a la presencia de una matriz de cribado. Sin embargo, existen y podrían usarse otros procedimientos de separación de los ácidos nucleicos en un sistema o un dispositivo microfluídicos. Por ejemplo, se ha secuenciado ADN separando fragmentos de ADN por espectrometría de masas (patente estadounidense nº 5691141; Koster et al., Nature Biotech. Vol. 14, p. 1123 (1996)), y se han descrito muchas interfaces entre la espectrometría microfluídica y la de masas (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses 5872010, 6803568 y 7105812). Otro procedimiento de separación de los ácidos nucleicos se vale de la hibridación a sondas inmovilizadas, según describen, por ejemplo, Lenigk et al. (Anal. Biochem. Vol. 311, p. 40 (2002)). Los términos "separar" y "separación" se usan en un sentido general, a no ser que estén restringidos adicionalmente.

Se expondrán características adicionales de la invención, en parte, en la descripción que sigue, y en parte serán entendidas por la descripción o pueden aprenderse por la puesta en práctica de la invención. Las características de la invención pueden ser implementadas y logradas por medio de los elementos y las combinaciones señalados en particular en las reivindicaciones adjuntas.

Los dibujos adjuntos, que están incorporados en esta memoria y que constituyen parte de la misma, ilustran realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

**Breve descripción de los dibujos**

Las Figuras 1 (A)-(E) son un ejemplo ilustrativo de un procedimiento de fabricación de un chip microfluídico con prestaciones de PCR-CE en un único sustrato.

La Figura 2 es una realización de un sistema microfluídico usado en el procedimiento de la presente invención.

La Figura 3 es otra realización de un sistema microfluídico usado en el procedimiento de la presente invención.

La Figura 4 es otra realización de un dispositivo microfluídico usado en el procedimiento de la presente invención.

La Figura 5 muestra una curva ejemplar de crecimiento de PCR en tiempo real generada usando una realización de un dispositivo microfluídico usado en el procedimiento de la presente invención.

La Figura 6 muestra un gráfico ejemplar de separación por CE de una realización de un dispositivo microfluídico usado en el procedimiento de la presente invención.

La Figura 7 ilustra otra realización de un dispositivo microfluídico usado en el procedimiento de la presente invención.

Las Figuras 8(A)-(F) muestran resultados de un ensayo de PCR de punto final usando una realización de un dispositivo microfluídico usado en el procedimiento de la presente invención.

La Figura 9 muestra otro resultado de un ensayo de PCR de punto final usando una realización de un dispositivo microfluídico usado en el procedimiento de la presente invención.

**Descripción de las realizaciones**

Ahora se hará referencia en detalle a las presentes realizaciones (realizaciones ejemplares) de la invención, ejemplos de las cuales se ilustran en los dibujos adjuntos. Siempre que sea posible, se usarán los mismos números de referencia de principio a fin de los dibujos para referirse a partes idénticas o semejantes.

Puede configurarse una realización de la presente invención —un sistema microfluídico— para que tenga las siguientes características: Una cámara de PCR puede tener un volumen entre aproximadamente 1  $\mu$ l y aproximadamente 100  $\mu$ l, de aproximadamente 10  $\mu$ l a aproximadamente 75  $\mu$ l, o de aproximadamente 25  $\mu$ l a aproximadamente 50  $\mu$ l, para proporcionar una amplificación de ADN de alta sensibilidad. Como ejemplo, si el menor número de copias que puede amplificarse de forma fiable es 10, entonces en un volumen de 10  $\mu$ l el límite a la sensibilidad es una copia por  $\mu$ l. En un volumen de 100  $\mu$ l, la sensibilidad limitante sería de 100 copias por  $\mu$ l, que es 100 veces menor. Otra característica es que el sistema está equipado para la ciclación térmica del contenido de la cámara de PCR para lograr una amplificación suficiente del ADN. Otra característica más es que el sistema tiene una red de canales de dimensiones suficientemente pequeñas conectada a la cámara de PCR. La red de canales, denominados canales de separación, puede configurarse para que tenga un volumen interno menor que la cámara de PCR para facilitar el análisis de una fracción muy pequeña del ácido nucleico contenido en la cámara. El volumen combinado de los canales de separación puede ser aproximadamente 100 veces o más menor o entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1000 veces menor, o de aproximadamente 300 a aproximadamente 1000 veces menor que el de la cámara de PCR y los canales de flujo. Además, las dimensiones de los canales se mantienen pequeñas para garantizar que la resistencia hidrodinámica al flujo en estos canales sea mucho mayor que la de la cámara de PCR y los otros canales que conducen a la cámara. Haciendo esa relación de las resistencias al flujo muy elevada en el intervalo de aproximadamente  $10^3$  o más, o de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^9$ , o de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^7$ , o de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^6$ , puede lograrse en los canales una función puerta sin ninguna válvula ni tapón. En otra característica, puede usarse la red de canales para un ensayo de dimensionamiento electroforético de ADN. Para implementar este ensayo de dimensionamiento puede emplearse una topología transversal simple de canal para llenar los canales con una matriz de cribado de ADN. Otra característica adicional es que la fabricación de todo el sistema se realiza en un único sustrato desechable.

Evitar el uso de válvulas o tapones tiene méritos. Existen válvulas microfluídicas, pero requieren una secuencia de fabricación más compleja que el sistema aquí descrito, varias capas más y requerimientos de alineamiento. Eso hace que los sistemas con válvulas normalmente sean caros de fabricar como dispositivos desechables. Además, las válvulas microfluídicas pueden adolecer de volumen muerto y caudal de fugas. El uso de tapones, o válvulas de gel, tales como los descritos por Koh et al. (Anal. Chem., Vol. 75, p. 4591 (2003)), puede no ser rentable, y la duración de almacenamiento puede ser limitada. Además, el transporte de ácidos nucleicos a través del tapón de gel reticulado es relativamente lento, y hará que el análisis lleve más tiempo. En consecuencia, puede que solo resulte práctico llevar a cabo un análisis de punto final, no una cuantificación de PCR en tiempo real.

Usando principalmente fuerzas electroforéticas para transportar ácidos nucleicos, puede retirarse para su análisis una fracción muy pequeña del ácido nucleico de la cámara de PCR sin retirar una fracción similar de la solución de la cámara. Retirar aun una pequeña parte alícuota de solución, tal como 10  $\mu$ l, según describe, por ejemplo, Slepnev (patente estadounidense nº 7.081.339), puede dar como resultado perder una fracción significativa del ácido nucleico de la cámara de PCR, y, por lo tanto, puede dificultar el análisis en tiempo real.

Una gran cámara de PCR en un chip microfluídico puede ser combinada con pequeños canales de separación de electroforesis capilar (CE), de modo que la resistencia al fluido hidrodinámico de los canales de separación sea suficientemente mayor que la de la gran cámara de PCR. Puede calcularse la proporción requerida de la resistencia en los canales de separación con respecto a la de la cámara de PCR para lograr separaciones de alta calidad. Para que un cálculo ejemplar llegue a un intervalo estimado de la proporción de resistencias para diseñar un chip de PCR-CE, se da por sentado que una diferencia de presión,  $\Delta P$ , impulsa una solución al interior o al exterior de la cámara de PCR y a lo largo del canal de separación. La diferencia de presión  $\Delta P$  puede ser descrita como sigue:

$$\Delta P = R_{cámara} V_{cámara}$$

siendo  $R_{cámara}$  la resistencia hidrodinámica de la cámara de PCR al flujo y siendo  $V_{cámara}$  el volumen de la cámara de PCR. Para simplificar el cálculo, se aproxima la resistencia hidrodinámica de la cámara de forma que incluya la resistencia de los canales de flujo, que son canales de separación sin CE; así, siempre que, en lo que sigue, se menciona la resistencia de la cámara, se da por sentado que se incluye la resistencia de los canales de flujo. Un caudal puede expresarse en términos de la fracción del volumen de la cámara que se pierde dividido por el tiempo del análisis:

$$Q_{cámara} = \frac{f V_{cámara}}{t_{anál}}$$

siendo  $Q_{cámara}$  el caudal que atraviesa esta cámara, y siendo  $f$  la fracción de este volumen que se pierde. En términos de estas variables, la resistencia hidrodinámica al flujo,  $R_{cámara}$ , puede ser dada por:

$$R_{cámara} = \frac{\Delta P}{Q_{cámara}} = \frac{\Delta P t_{anál}}{f V_{cámara}}$$

En un canal de separación, la ecuación de la resistencia al flujo se presenta, asimismo, como:

$$\Delta P = R_{sep} Q_{sep}$$

siendo  $R_{sep}$  la resistencia hidrodinámica al flujo en el canal de separación, y siendo  $Q_{sep}$  el caudal que atraviesa este canal. Esta ecuación es una simplificación de la mayoría de sistemas, tales como los mostrados en la Fig. 2 o la Fig. 3, porque, en general, hay múltiples canales de separación conectados a la cámara de PCR. La simplificación se realiza aquí como un ejemplo para llegar a un intervalo de órdenes de magnitud de la proporción de resistencias hidrodinámicas. La resistencia hidrodinámica  $R_{sep}$  y el caudal  $Q_{sep}$  pueden ser calculados con mayor precisión teniendo en cuenta la topología real de los canales del sistema, que puede calcularse, por ejemplo, como conexiones en serie y en paralelo de secciones individuales de canales, pero, para los fines del cálculo, se da por sentado que el sistema simple se aproxima a la situación más compleja.

Puede definirse un caudal máximo de los canales de separación mediante cierto desplazamiento permisible de la solución. El desplazamiento máximo  $\Delta x$  puede definirse en términos de la anchura de las bandas de una especie que se separa. El flujo inducido por la presión causará la dispersión de estas bandas. Para evitar añadir significativamente a la dispersión de la separación, puede fijarse  $\Delta x$  para que sea menor que la anchura de las bandas en un factor de al menos dos, o más. En una separación microfluídica normal de ADN necesaria para analizar un producto de PCR, las bandas son del orden de 100 micrómetros de anchura, dependiendo de la anchura del canal. Por lo tanto, se estima que  $\Delta x$  está entre 10 y 50 micrómetros.

Si el área de la sección transversal de los canales es  $A$ , el caudal máximo permisible  $Q_{sep}^{Máx}$  puede escribirse como:

$$Q_{sep}^{Máx} = \frac{\Delta x A}{t_{anál}}$$

La resistencia mínima  $R_{sep}^{Mín}$  al flujo en el canal (resistencia mínima del canal de separación) requerida para garantizar que el flujo esté por debajo de este valor puede estar dada por:

$$R_{sep}^{Mín} = \frac{\Delta P t_{anál}}{\Delta x A}$$

En general, la diferencia de presiones y el tiempo del análisis no son conocidos ni están fijados. Por ello, resulta útil expresar el requisito de una resistencia mínima del canal de separación en términos de la proporción entre la resistencia del canal de separación y la resistencia de la cámara de PCR:

$$\left[ \frac{R_{sep}}{R_{cámara}} \right]^{Mín} = \frac{f V_{cámara}}{\Delta x A}$$

5 Por lo tanto, esta expresión define la proporción mínima requerida de la resistencia al flujo que permitirá un acoplamiento sin válvulas de una cámara de PCR y un conjunto de canales para la separación por CE.

10 En base a esta ecuación puede darse un intervalo estimado de la proporción de la resistencia al flujo. Para una PCR de sensibilidad elevada se requiere un volumen relativamente grande. Por ejemplo, para detectar un patógeno con una concentración de 100 CFU/ml, se necesitaría un volumen de al menos varias decenas de microlitros para garantizar que hay presente al menos un patógeno. Un volumen de cámara ejemplar es 25  $\mu$ l. Puede suponerse que una fracción que puede perderse sin afectar sustancialmente el ensayo es de aproximadamente 0,1; esta fracción es un ejemplo y en algunas circunstancias puede tolerarse una pérdida fraccional mayor, aunque cuanto menor sea, mejor. Así, se estima que un valor ejemplar del numerador de la expresión anterior es 2,5  $\mu$ l. La sección transversal del canal microfluídico puede variar en un amplio intervalo, pero en el campo microfluídico ha variado, por ejemplo, desde aproximadamente 10  $\mu$ m hasta aproximadamente 100  $\mu$ m de lado a lado; y, por lo tanto, para el ejemplo presente, se escoge una dimensión media de 30  $\mu$ m por 30  $\mu$ m. Según se ha expuesto en lo que antecede, el intervalo de valores de  $\Delta x$  se escoge para que sea, como media, de 30  $\mu$ m. El valor resultante del volumen en el denominador es  $2,7 \times 10^5 \mu$ l, y la proporción está dada, entonces, aproximadamente por:

$$\left[ \frac{R_{sep}}{R_{cámara}} \right]^{Mín} = 10^5$$

20 Claramente, este valor depende de diversas suposiciones, siendo la más destacable el valor supuesto de la sección transversal del canal de separación. Si se permite que la dimensión de la sección transversal oscile entre 10  $\mu$ m y 100  $\mu$ m de lado a lado, se obtiene el siguiente intervalo para la proporción de resistencias:

$$\left[ \frac{R_{sep}}{R_{cámara}} \right]^{Mín} = 10^4 \text{ a } 10^6$$

Además, los otros parámetros tienen intervalos posibles, tales como que  $f$  podría estar entre 0,02 y 0,2, y que  $V_{cámara}$  podría oscilar entre 10 y 100  $\mu$ l. Si se tienen en cuenta estas fuentes adicionales de variación, el intervalo posible se extiende a:

$$\left[ \frac{R_{sep}}{R_{cámara}} \right]^{Mín} = 10^3 \text{ a } 10^7$$

25 El anterior intervalo es un ejemplo basado en varias suposiciones descritas más arriba. El intervalo superior o el intervalo inferior pueden aumentar o disminuir adicionalmente dependiendo de cómo se definan los diversos parámetros. Por ejemplo, los diversos parámetros pueden ser ajustados adicionalmente para aumentar el intervalo superior hasta aproximadamente  $10^9$ .

30 Un criterio para diseñar un sistema microfluídico también puede estar basado en una proporción de volúmenes, no en una proporción de resistencias al flujo. Por ejemplo, supongamos que tanto el canal de separación como la cámara de gran volumen (se supone que el volumen de los canales de flujo está incluido en el volumen de la cámara para simplificar el cálculo) tienen una relación mutua de aspecto en corte transversal no demasiado diferente para los fines del cálculo. Esta suposición puede no ser del todo precisa para una cámara de gran volumen en la que, por ejemplo, la proporción entre anchura y profundidad puede ser de 10 a 1, pero para obtener un cálculo de órdenes de magnitud de la proporción de volúmenes esta suposición seguiría siendo válida (por ejemplo, el factor de correlación para la anterior proporción de 10:1 sería solo un factor de aproximadamente cuatro). La resistencia al flujo se representa como sigue:

$$R = \alpha \frac{\mu L}{D^4}$$

siendo  $L$  una longitud, siendo  $\mu$  la viscosidad dinámica, y representando  $D$  una dimensión de la sección transversal (por ejemplo, un diámetro). Para un canal circular, El factor numérico  $\alpha$  es igual a  $128/\pi$ . Así, la proporción de las resistencias al flujo puede reescribirse como sigue:

$$\frac{R_{sep}}{R_{cámara}} = \frac{\mu_{sep}}{\mu_{cámara}} \frac{L_{sep}}{L_{cámara}} \left( \frac{D_{cámara}}{D_{sep}} \right)^4$$

Asimismo, la proporción de volúmenes puede escribirse como:

$$\frac{V_{cámara}}{V_{sep}} = \frac{L_{cámara}}{L_{sep}} \left( \frac{D_{cámara}}{D_{sep}} \right)^2$$

5 Así, las dos proporciones están relacionadas como sigue:

$$\frac{V_{cámara}}{V_{sep}} = \left( \frac{\mu_{cámara}}{\mu_{sep}} \right)^{1/2} \left( \frac{L_{cámara}}{L_{sep}} \right)^{3/2} \left( \frac{R_{sep}}{R_{cámara}} \right)^{1/2}$$

Además, para calcular el orden de magnitud, se supone que tanto la proporción de longitudes como la proporción de viscosidades son aproximadamente iguales a uno. Entonces la proporción de volúmenes se hace igual a la raíz cuadrada de la proporción de resistencias y, para un intervalo de  $10^4$  a  $10^6$  en la proporción de resistencias, el intervalo de la proporción de volúmenes es:

$$\frac{V_{cámara}}{V_{sep}} = 10^2 \text{ a } 10^3$$

10 Así, el volumen combinado total de los canales de separación en el dispositivo puede ser de 100 a 1000 veces menor que el volumen combinado total de la cámara de PCR y los canales de flujo para permitir el análisis de muestras por CE desde la cámara de PCR sin interacción entre la CE y la PCR.

La viscosidad en los canales de separación puede ser mayor, y la longitud de estos canales puede ser mayor. En esos casos, la proporción de volúmenes puede calcularse apropiadamente a la baja en una cantidad apropiada.

15 Fabricar tal sistema requiere fabricar canales con dimensiones ampliamente diferentes. Las dimensiones de una cámara de PCR están ligadas a su volumen deseado, que puede variar según la aplicación. El volumen de la cámara puede configurarse de aproximadamente 1  $\mu$ l a aproximadamente 100  $\mu$ l, de aproximadamente 10  $\mu$ l a aproximadamente 75  $\mu$ l, o de aproximadamente 10  $\mu$ l a aproximadamente 50  $\mu$ l, o de aproximadamente 10  $\mu$ l a aproximadamente 25  $\mu$ l. Así, por ejemplo, para una cámara de 25  $\mu$ l de volumen, la dimensión de la cámara puede ser de 10 mm por 5 mm por 500  $\mu$ m. Puede ser deseable una profundidad de al menos aproximadamente 500  $\mu$ m para evitar que las otras dimensiones se vuelvan excesivamente grandes. Sin embargo, la dimensión de la cámara no está limitada a lo anterior y puede variar y se configurada de forma apropiada para lograr el volumen deseado.

25 Las dimensiones de los canales usados para la separación electroforética y la detección pueden ser mucho menores; por ejemplo, pueden tener una sección transversal de 20  $\mu$ m por 20  $\mu$ m. La profundidad de la red de canales puede reducirse hasta de 5 a 7 micrómetros para aumentar la proporción de las resistencias al flujo. Las anteriores dimensiones son meramente ejemplos y la invención no está limitada a las mismas. Con la condición de que las dimensiones entre la cámara de PCR y la red de canales puedan hacerse lo bastante diferentes para asegurar que la proporción de la resistencia hidrodinámica al flujo en estos canales con respecto a la resistencia presente en la cámara de PCR y sus canales de acceso o flujo sea de aproximadamente  $10^3$  o más, o de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^9$ , o de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^7$ , o de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^9$ , las dimensiones reales pueden variar de forma apropiada. Es decir, las dimensiones de los canales de flujo pueden ser configuradas de forma apropiada en relación con la cámara de PCR para lograr la resistencia hidrodinámica deseada al flujo.

35 Un polímero, por ejemplo polimetilmetacrilato o un polímero olefínico cíclico, estaría bien adaptado para fabricar estructuras microfluídicas de dimensiones desiguales en el mismo sustrato y para hacer desechable el sustrato resultante. Un dispositivo polimérico microfluídico que tenga dimensiones de canales desiguales puede ser fabricado mediante el procedimiento siguiente según se muestra en las Figuras 1(A) a 1(E). Según se muestra en la Fig. 1(A), se selecciona una oblea pulida 110 de silicio de doble cara con un grosor igual a la profundidad deseada de canal, por ejemplo en el intervalo de 500 a 600  $\mu$ m. A continuación, modelar fotolitográficamente el silicio por una cara con

el patrón de los canales superficiales. El modelado puede ser una combinación de resina fotosensible, óxido de silicio y/o nitruro de silicio como capas protectoras para la etapa siguiente. Acto seguido, se decapan los canales superficiales 120 con un decapado por plasma con relación de aspecto elevado, tal como decapado iónico reactivo profundo (DRIE) (Fig. 1(A)). También son posibles otras técnicas de decapado, pero puede usarse el DRIE para crear en las obleas agujeros y zanjas profundos de lados empinados. Se da la vuelta a la oblea 110 y se modela fotolitográficamente el silicio del otro lado con el patrón para los canales profundos 130, en alineamiento con el patrón decapado del otro lado. Esto requiere algún procedimiento de alineamiento, tal como el uso de luz infrarroja para mirar a través de las obleas 110 de silicio. Se decapa completamente atravesando la oblea de silicio con un decapado por plasma con relación de aspecto elevado, tal como el DRIE (Fig. 1(B)). Esto crea una abertura en la oblea 110 de silicio en la ubicación de los canales profundos 130. Acto seguido, se adhiere anódicamente la oblea 110 de silicio a una oblea 140 de vidrio borosilicatado no modelada (Fig. 1(C)). A continuación, se realiza una réplica inversa 150 en níquel de la oblea de silicio/vidrio mediante galvanoplastia (Fig. 1 (D)). Esta réplica 150 se denomina electroformo 150. Se usa el electroformo 150 para moldear o estampar por compresión un sustrato polimérico 160 (Fig. 1(E)). A continuación, se taladra el sustrato polimérico 160 en ubicaciones apropiadas para crear pocillos y se cortan los bordes para formar un chip microfluídico, que puede ser laminado o unido por presión/temperatura con otros materiales. Un procedimiento para sellar los canales es la laminación con una película polimérica.

Alternativamente, las características de gran volumen del chip polimérico microfluídico, tales como la cámara 220 de PCR, pueden ser fabricadas por otros procedimientos, tales como mecanizado por CNC después de que se hayan fabricado por molde o estampado los canales superficiales de separación. Este procedimiento es más lento, dado que debe ser repetido para cada dispositivo, pero tiene la ventaja de permitir mayor flexibilidad en el diseño de la característica de gran volumen.

Se lleva a cabo el decapado profundo en la oblea 110 para crear una parte del electroformo 150 que producirá una cámara de PCR con un volumen, por ejemplo, de aproximadamente 25  $\mu\text{l}$ . La Fig. 2 muestra una realización de un sistema microfluídico. Puede fabricarse un chip polimérico 210 con una cámara 220 de PCR que tenga una profundidad de 500  $\mu\text{m}$  y un área de 50  $\text{mm}^2$ , o un cuadrado de 7  $\times$  7 mm. También son posibles otras dimensiones, y la profundidad, la anchura y la altura pueden ser debidamente controladas según el volumen deseado de la cámara. Además, la cámara tiene canales 230 de acceso o de flujo que conectan la cámara a pocillos 240 de flujo para permitir que la cámara se llene con soluciones apropiadas.

La cámara 220 de PCR también está conectada directa o indirectamente con canales de separación, que están separados de los pocillos 240 de flujo. Canales de separación son una expresión general usada para incluir, entre otros, un canal 250 de carga que puede usarse para introducir una fracción del ADN amplificado y un canal 200 de CE que se cruza (área de intersección) con el canal 250 de carga y que puede ser usado para ejecutar la separación electroforética para detectar el tamaño del ADN simplificado. En la Fig. 2 solo se muestran un canal 250 de carga y un canal 200 de CE, pero el chip puede estar configurado para que tenga más de uno de cada. Puede diseñarse el volumen interno de los canales de separación (por ejemplo, el canal 250 de carga y el canal 200 de CE) para que sea 100 veces o más menor, o de aproximadamente 100 veces a aproximadamente 1000 veces menor, o de aproximadamente 300 veces a aproximadamente 1000 veces menor que los volúmenes combinados de la cámara 220 de PCR y los canales 230 de flujo. Las dimensiones de la cámara 220 de PCR y sus canales 230 de flujo y las dimensiones del canal 250 de carga y del canal 200 de CE pueden variar de forma que se proporcione una relación de la resistencia hidrodinámica al flujo en estos canales con respecto a la resistencia hidrodinámica al flujo presente en la cámara 220 de PCR y sus canales 230 de flujo que sea aproximadamente  $10^3$  o más, o de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^9$ , o de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^7$ , o de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^6$ . Al hacer que la resistencia hidrodinámica del canal 250 de carga y el canal 200 de CE sea elevada en comparación con la de la cámara 220 de PCR, puede lograrse una función puerta para los canales sin tener una válvula ni un tapón. El chip polimérico 210 también está dotado de un dispositivo 270 de control de lectura óptica para leer y procesar señales procedentes del chip polimérico 210 y un dispositivo 280 de ciclización térmica para la ciclización térmica de la cámara 220 de PCR.

El canal 250 de carga está conectado a pocillos 260 de carga por los extremos opuestos no conectados a la cámara 220 de PCR. Los pocillos 260 de carga pueden funcionar como un contacto eléctrico para la introducción y/o la inyección del ADN. Los extremos opuestos del canal 200 de CE están conectados a respectivos pocillos 300 de CE. Los pocillos 300 de CE pueden funcionar como un contacto eléctrico para la electroforesis. Esta disposición evita colocar electrodos en los dos pocillos 240 de flujo conectados a la cámara 220 de PCR por los canales 230 de flujo. Los pocillos 240 de flujo precisan tener un volumen combinado lo suficientemente grande como para llenar la cámara 220. En el anterior diseño, los pocillos 260 de carga se mantienen separados de los pocillos 240 de flujo y están conectados a una fuente de alimentación para proporcionar tensión a los electrodos. Los pocillos 300 de CE también se mantienen separados de los pocillos 240 de flujo y están conectados a una fuente de alimentación para proporcionar tensión a los electrodos. Esta disposición facilita el sellado de los pocillos de flujo durante la ciclización de temperaturas. Además, puede proporcionarse opcionalmente una resistencia 290 de flujo en cada extremo de la cámara de PCR para evitar un flujo excesivo entre la cámara y los pocillos durante la ciclización.

La Fig. 3 muestra otra realización de un sistema microfluídico. Un chip polimérico 310 tiene una cámara 320 de PCR, que está conectada a canales 330 de flujo que conducen a pocillo 340 de flujo. Además de los canales 330 de

flujo, la cámara 320 de PCR está conectada directa o indirectamente con canales de separación. Los canales de separación incluyen un canal 350 de carga, cuyos extremos conducen a pocillos 360 de carga, y un canal 390 de CE, que se cruza (área de intersección) con el canal 350 de carga y cuyos extremos conducen, respectivamente, a pocillos 395 de CE. En la Fig. 3 solo se muestran un canal 350 de carga y un canal 390 de CE, pero el chip puede estar configurado para que tenga más de uno de cada. Este diseño es mucho más compacto que la realización anterior y, así, sería más económico de fabricar, porque pueden fabricarse más chips a partir de un único electroformo. El factor limitante puede ser la necesidad de separar los canales de separación (es decir, el canal 350 de carga y el canal 390 de CE) de la cámara 320 de PCR suficientemente para garantizar que la ciclación de temperatura para la PCR no perturbe las separaciones. Como en la realización anterior, el volumen combinado de los canales de separación (el canal 350 de carga y el canal 390 de CE) puede ser 100 veces o más menor, o de aproximadamente 100 veces a aproximadamente 1000 veces menor, o de aproximadamente 300 veces a aproximadamente 1000 veces menor que los volúmenes combinados de la cámara 320 de PCR y los canales 330 de flujo. Las dimensiones de la cámara 320 de PCR y sus canales 330 de flujo y las dimensiones del canal 350 de carga y del canal 390 de CE pueden variar de forma que se proporcione una relación de la resistencia hidrodinámica al flujo en estos canales con respecto a la resistencia hidrodinámica al flujo presente en la cámara 320 de PCR y sus canales 330 de flujo que sea aproximadamente  $10^3$  o más, o de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^9$ , o de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^7$ , o de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^6$ . Al hacer que la resistencia hidrodinámica del canal 350 de carga y el canal 390 de CE sea elevada en comparación con la de la cámara 320 de PCR, puede lograrse una función puerta para los canales sin tener una válvula ni un tapón. El chip polimérico 310 también está dotado de un dispositivo 370 de control de lectura óptica para leer y procesar señales procedentes del chip polimérico 310 y un dispositivo 380 de ciclización térmica para la ciclación térmica de la cámara 320 de PCR.

Otras características posibles de la cámara de PCR son algunas estructuras internas de soporte para evitar que la película laminada se combe cuando tenga que cubrir un área relativamente grande. Por ejemplo, según se muestra en la Fig. 4, una realización presenta estructuras internas 400 de soporte colocadas dentro de una cámara 410 de PCR para soportar la película laminada y evitar que se combe. Las estructuras 410 de soporte son aquí cuatro estructuras en los rincones rectangulares dentro de la cámara 410 y una quinta estructura de soporte en el centro, teniendo la cámara de PCR una anchura de 5,4 mm en su punto más ancho, una profundidad de 0,5 mm y un volumen total de 25  $\mu$ l. Las dimensiones aquí proporcionadas son ejemplos y no limitan a la cámara. Las estructuras 410 están conectadas al fondo de la cámara y a la película laminada colocada sobre la cámara 410. El tamaño, el número y el diseño de las estructuras de soporte pueden configurarse de forma apropiada con respecto al tamaño y el volumen de la cámara para garantizar que no se produzca ninguna combadura de la película laminada. Es decir, las estructuras de soporte pueden ser una o más y pueden estar diseñadas teniendo en cuenta el volumen, la profundidad y la anchura de la cámara para soportar de forma óptima la película laminada. El material de las estructuras de soporte puede ser el mismo material polimérico que la cámara de PCR, pero también podría ser diferente, con la condición de que sea inerte y no reaccione con ninguna solución dispuesta en la cámara.

Los dispositivos descritos en las realizaciones descritas en lo que antecede están diseñados para ejecutar una PCR-CE en tiempo real, porque, en el curso de una amplificación, pueden tomarse varias muestras de ADN y ser analizadas por el componente de CE integrado en el chip polimérico. La fracción del ADN retirada es tan pequeña que no tiene impacto significativo alguno en el proceso de PCR. Si se suprime el flujo electroosmótico en los canales de separación, como suele ocurrir en las separaciones de ADN, entonces el ADN es movido por completo por electroforesis, y no se retira volumen alguno de la cámara de PCR. Puede tomarse y analizarse una muestra para cada ciclo de PCR, o de cada dos ciclos de PCR. Esto es posible porque los ciclos de PCR en chips microfluídicos generalmente llevan de 15 seg a 60 seg, y las separaciones microfluídicas de ADN más rápidas son del orden de 60 seg o más rápidas. Además, el intervalo de tiempo entre la toma de muestras podría ser más corto que el tiempo requerido para la separación, porque es posible separar múltiples muestras simultáneamente. El hecho de que puedan muestrearse múltiples puntos significa que también puede muestrearse un único punto al final de la amplificación (PCR-CE de punto final).

El procedimiento implicado en el uso de los dispositivos para la PCR en microchip con la detección por CE en tiempo real, tal como los descritos en las realizaciones, puede ejecutarse como sigue: El procedimiento se refiere a los sistemas ejemplares mostrados en la Fig. 2 y la Fig. 3. Se llenan los canales electroforéticos superficiales 200 o 390 de CE de un microchip 210 o 310 con una matriz de cribado de ADN. Esta matriz también puede recubrir las paredes de los canales suficientemente para suprimir el flujo electroosmótico, y puede tener una viscosidad bastante elevada; por ejemplo, entre aproximadamente 10 y 20 centipoise, para contribuir a reducir cualquier flujo inducido por la presión, y aumentar la proporción de la resistencia hidrodinámica al flujo entre los canales y la cámara de PCR. La matriz también puede contener una tinción intercalante apropiada, tal como las tinciones de bromuro de etidio, Cyber Green, Evergreen o Syto para detectar fragmentos de ADN. A continuación, se llena la cámara 220 o 320 de PCR con una mezcla que contiene la muestra y todos los reactivos de la PCR, incluyendo la enzima requerida. Después se sellan los pocillos 240 o 340 de flujo de PCR y se coloca el chip en un sistema de ciclación de temperatura. Acto seguido, mientras tiene lugar la amplificación por la ciclación de temperatura, durante la amplificación (cada ciclo, o cada dos ciclos), se aplica una tensión en los pocillos electroforéticos 260 de carga en el caso de la Fig. 2 o los pocillos 360 en el caso de la Fig. 3 para introducir una fracción del ADN desde la cámara de PCR en los canales 250 o 350 de carga. A continuación, aplicando una tensión en los pocillos 300 o 395 de CE, se

inyecta la parte de este ADN en los canales 200 o 390 de CE a través del área de intersección. Después, se separa el ADN y se lo detecta a una distancia adecuada desde el área de intersección. El campo de la separación y la longitud de la separación pueden ser optimizados para la separación rápida de fragmentos de ADN bicatenario relativamente pequeños. A continuación, en cada separación, se identifica el pico correspondiente al amplicón deseado de PCR y se calcula su tamaño por la altura o el área. Acto seguido, se trazan los tamaños de los picos obtenidos como una función del número de ciclos, y se usan estos datos para determinar la cantidad original del ADN diana presente en la muestra.

Un único ciclo normal de PCR incluye tres etapas: desnaturalización, asociación o hibridación con un cebador y síntesis o extensión del ADN. Durante la desnaturalización, se calienta en primer lugar la mezcla de partida hasta aproximadamente 94 °C a 96 °C para separar la plantilla de ADN bicatenario. Después de la desnaturalización del ADN, se enfría la mezcla hasta aproximadamente 55 °C para permitir que los cebadores se asocien a sus secuencias complementarias en las cadenas separadas. Los cebadores definen los extremos del ADN que han de duplicarse. Acto seguido, la mezcla se calienta hasta una temperatura de aproximadamente 72 °C, para que la ADN polimerasa catalice la extensión de los cebadores hibridados en las cadenas de la plantilla, y este ciclo único es repetido una o más veces.

En algunos casos, un ciclo único de PCR incluye solo dos etapas: desnaturalización y enlace de cebador combinado con síntesis del ADN. En este caso, se calienta en primer lugar la mezcla de partida hasta aproximadamente 94 °C a 96 °C para separar la plantilla de ADN bicatenario. Después de la desnaturalización, se enfría la mezcla hasta una temperatura definida (aproximadamente de 60 a 70 °C) para permitir que los cebadores se asocien a sus secuencias complementarias en las cadenas separadas y para permitir que la ADN polimerasa catalice la extensión de los cebadores hibridados en las cadenas de la plantilla, y este ciclo único es repetido una o más veces.

Es posible llevar a cabo la amplificación de PCR a temperaturas más bajas. Por ejemplo, en la mezcla de reacción se incluyen un aditivo o aditivos tales como la prolina para disminuir la temperatura de desnaturalización del ADN de la plantilla. Por ejemplo, puede llevarse a cabo una PCR de ciclo de bajas temperaturas puede realizarse mediante una baja temperatura de desnaturalización de aproximadamente 75 °C y temperaturas de hibridación con cebadores y de extensión de aproximadamente 55 °C.

En otro ejemplo, puede amplificarse ADN sin la necesidad de termociclación. Por ejemplo, en vez de con calor, se separa la plantilla de ADN medio de una enzima denominada helicasa. Así, el ADN puede amplificarse a una sola temperatura sin el uso de termociclación.

Se inyecta parte de una muestra de reacción, por ejemplo un amplicón de PCR, que haya reaccionado en la cámara, en el canal de separación aplicando tensiones apropiadas, no después de terminar la amplificación mediante ciclación de temperatura de la PCR, sino durante la amplificación mediante la ciclación de temperatura de la PCR. El amplicón de PCR inyectado en el canal de separación es separado en el canal de separación. A continuación, se detecta el amplicón de PCR separado. Después, se repiten una o más veces esta etapa de inyección, esta etapa de separación y esta etapa de detección.

La determinación de la cantidad original del ácido nucleico diana presente en la muestra puede realizarse recogiendo los datos obtenidos repitiendo el procedimiento de detección y cuantificando la cantidad de ácido nucleico presente en base a los datos recogidos. Por ejemplo, la cuantificación de la cantidad de ácido nucleico presente puede determinarse calculando un ciclo umbral.

Como ejemplo, se describirán ahora experimentos de PCR-CE con el chip 210 de PCR de la Fig. 2. Los reactivos usados en los experimentos fueron: solución de BSA (100 µg/ml); ADN genómico de BCG, 10<sup>5</sup> copias/µl; ADN polimerasa rTaq, 5 U/µl; tampón de PCR 10x; 50 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 mM de dNTP; cebador directo IS\_F10, CTCACCTATGTGTCGACCTG, 5 µM; y cebador inverso IS\_R8, GGTTCGAGTACGCCTTCTTG, 5 µM. La solución reactiva de PCR (28 µl) contenía: tampón de PCR 1x; 0,4 mM de dNTP; 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 250 nM de cebador directo; 250 nM de cebador inverso; 1 µl de ADN genómico de BCG (10<sup>5</sup> copias); y 1 U de ADN polimerasa rTaq.

Los canales 200 de CE del chip 210 de PCR-CE se llenaron con una matriz de gel de polidimetilacrilamida que contenía una tinción intercalante, y se cargaron 28 µl de una mezcla de reacción de PCR en el chip 210 de PCR desde un solo pocillo 240. El chip de PCR lleno de reactivos de PCR y de gel fue entonces sujetado con el dispositivo de ciclación térmica de un ciclador térmico 280. Se aplicó una presión de 206,84 kPa a todos los pocillos a través de un dispositivo colector colocado sobre el chip 210, cubriéndolo herméticamente, para suprimir la evaporación durante la ciclación de la PCR. El dispositivo colector es descrito con más detalle en el documento PCT/US2008/06266, presentado el 15 de mayo de 2008, que reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense número 60/938.171, presentada el 15 de mayo de 2007. Se realizó la PCR usando el siguiente protocolo de ciclos: 1 × 96 °C, 30 seg; y 40 × 96 °C, 15 seg, 62 °C, 15 seg y 72 °C, 30 seg.

Aplicando una tensión entre los pocillos 260 de carga en los ciclos 14, 16, 18, 20, 22, 25 y 30, se indujo que las muestras del producto de PCR procedentes de la cámara 220 migraran al canal 250 de carga. Acto seguido, aplicando una tensión entre los pocillos 300 de CE, se inyectaron muestras del producto de PCR en el canal 200 de CE para separarlas y fueron analizadas por el dispositivo 270 de control de lectura óptica. Se normalizó el área pico

del producto de PCR usando un marcador interno (ADN de 100 pb) en la mezcla de PCR y se trazó en función del número de ciclo para generar la curva de crecimiento de PCR, según se muestra en la Fig. 5. La Fig. 6 muestra un electroferograma de separación por CE en el 18º ciclo cuando la muestra del producto de PCR diana (200 pb) empieza a ser detectable. El tiempo total fue 1 hora.

5 Hay diversos procedimientos conocidos para calcular la cuantificación relativa en la PCR de tiempo real. Por ejemplo, la patente estadounidense nº 6.942.971, para cuantificar la cantidad de ADN, describe un programa para almacenar valores de señales que definen una curva de crecimiento para la secuencia de ácidos nucleicos, determinar una derivada de la curva de crecimiento y calcular un valor de número de ciclos o de tiempo asociado con una característica de la derivada. En Yuan et al. BMC Bioinformatics 7:85 (2006), los autores proporcionan un análisis estadístico de datos de PCR en tiempo real para cuantificar la cantidad de ADN producido. En Pfaffl, Nucleic Acid Research, vol. 29, No. 9 (2001), el autor describe un nuevo modelo matemático para la cuantificación relativa en la PCR de tiempo real. Para cuantificar la cantidad de ácido nucleico en la PCR de tiempo real podría usarse cualquiera de estos procedimientos y de otros conocidos en la técnica.

15 En otra realización se demuestra un ensayo de PCR de punto final. Según se muestra en la Fig. 7, un chip microfluídico 600 para PCR con detección por CE tiene canales 605, cada uno de aproximadamente 30 µm de anchura, y una cámara 610 de PCR de aproximadamente 500 µm de profundidad. Básicamente, las dimensiones del chip 600, con los pocillos 1-8, son iguales a lo mostrado en la Fig. 2.

20 Para realizar el ensayo de PCR de punto final, los canales fueron llenados en primer lugar con gel de separación, que consiste en 200 mM de tampón TAPS con un pH de 8, una matriz de cribado de polidimetilacrilamida al 2% y tinción fluorescente dimérica de bromuro de etidio. A continuación, se cargó la cámara 610 con tampones de PCR que contenían todos los reactivos requeridos para la reacción de PCR (cebadores, enzima, tampones, cloruro de magnesio, desoxirribonucleótidos) y diferentes números de copias de la diana. La diana era un fragmento de 200 pb de ADN plasmídico. El canal 605, conectado entre la cámara 610 y un pocillo 5 de electrodo de carga, fue llenado con tampón de PCR. Después de llenar todos los canales y las cámaras, se llenó cada pocillo con gel separación o marcadores o tampón de PCR.

25 A continuación, se puso el chip 600 en un dispositivo de ciclación térmica (no mostrado) consistente en una plancha plana de cobre conectada a un calefactor y un medio de enfriamiento. Se aplicó una presión de 255,11 kPa mediante un dispositivo colector (descrito en el documento PCT/US2008/06266) a todos los pocillos a la vez. Se ajustó la ciclación térmica a 40 ciclos, con la temporización siguiente: desnaturalización 15 seg, hibridación 20 seg y extensión 15 seg. El tiempo total de ciclación fue de 2100 seg. Después de los ciclos de PCR, se soltó la presión lentamente.

30 Tras la ciclación térmica, se llevó a cabo la electroforesis capilar en el chip. Se aplicaron tensiones en los pocillos usando electrodos de platino insertados, mientras se realizaba la detección óptica con un microscopio fluorescente. La luz incidente provenía de un diodo láser verde a 532 nm, y el filtro de excitación estaba en 610 ± 35 nm.

35 La muestra procedente de la cámara de PCR fue movida electroforéticamente hacia el pocillo 8, mientras se mezclaba con los marcadores de dimensionamiento de ADN (100 pb y 700 pb) procedentes del pocillo 3. A la vez, también se dirigieron corrientes desde los pocillos 1 y 7 hacia la intersección para confinar la muestra en esa intersección. En la siguiente etapa, se dirigió el ADN desde un pocillo 7 hasta un pocillo 1 para llevar a cabo la separación mientras se mantiene una corriente retrógrada en los canales de carga de muestras desde los pocillos 8 y 3. La tabla siguiente muestra las tensiones y las corrientes aplicadas para la separación por CE:

etapa	tiempo (s)	1	2	3	4	5	6	7	8
carga	140	-3uA	0uA	-15uA	0uA	-30uA	0uA	-3uA	2100V
separación	45	1900V	0uA	3uA	0uA	0uA	0uA	800V	3uA

45 Las Figuras 8(A)-(F) muestran los resultados de la CE para una serie de experimentos realizados según se ha descrito en lo que antecede, con diferentes números de copias originales del ADN diana en el tampón de PCR — números de copias de 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10 y cero (control)—. Los resultados muestran que el producto resultante de la amplificación de 10 copias originales sigue siendo detectable. Según se muestra en la Fig. 9, este experimento con 10 copias ('10\_día2' en la tabla) fue repetido en un día posterior. El pico amplificado sigue siendo detectable, aunque es mucho menor.

Puede usarse la amplitud de cada pico en este experimento para estimar la concentración de ADN en función de un experimento de calibración llevado a cabo por separado. La tabla siguiente presenta el resultado de la determinación de concentraciones a partir del presente dispositivo microfluídico ejemplar y a partir de otros dispositivos.

50 Tras las tandas de PCR mostradas en las Figuras 8(A)-(F) y en la Fig. 9, se sacaron muestras de los chips y se analizaron en un bioanalizador Agilent 2100, que puede ser usado para determinar la concentración de cada pico. Se llevó a cabo otro experimento de control sobre la misma PCR en un SmartCycler® de Cepheid, que también documenta la concentración de ADN. Los resultados combinados se muestran en la tabla siguiente:

Tabla. Comparación de productos de PCR usando dispositivos y detecciones diferentes

Muestra (números de copias originales)	Resultado del microchip: relación de área pico de la diana y 100 pb (marcador)	Resultado del microchip: concentración de la diana a partir de la calibración (ng/uL)	PCR del microchip: muestra analizada en el bioanalizador (ng/uL)	Reacción de PCR de control en SmartCycler (ng/uL)
100000	3,06	13,87	21,5	26,5
10000	1,43	6,48	11,3	14,5
1000	0,70	3,16	8,6	10,7
100	0,38	1,72	1,02	4,4
10	0,50	2,27	1,5	3
10_día2	0,14	0,62	0,92	
0	0	0	0	0

5 Se demuestra que el chip microfluídico tiene una sensibilidad comparable, si no mejor, a la de los otros dispositivos de detección. La variación de los resultados puede explicarse por la fluctuación estadísticas del número de copias realmente presentes cada vez que se lleva a cabo la disolución. Los niveles cuantitativos de AND presentes después de cada amplificación fueron similares con todos los procedimientos, y aumentaban monótonamente con el número de copias originales de la diana.

10 Hay muchas variaciones y características adicionales posibles que pueden añadirse a los diseños y al procedimiento descritos en lo que antecede. Un ejemplo es una mezcla de la muestra en el chip y la mezcla de PCR usando un pocillo de volumen extra grande. Este ejemplo implicaría el uso de una pipeta externa para colocar en un pocillo, en sucesión, la muestra que ha de analizarse y la mezcla maestra de la PCR que contiene los cebadores, la enzima y los nucleótidos. Tal pocillo requeriría un volumen al menos tan grande como la cámara de PCR, en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 microlitros. Otro ejemplo es una mezcla en el chip de la muestra de ADN procedente de la reacción de PCR con un dimensionamiento estándar. Hacer esto requiere añadir un pocillo adicional, que contiene el estándar o los marcadores del ADN, y un canal que conecta ese pocillo a la porción del canal entre la cámara 220 de PCR y la intersección de inyección. La proporción de la mezcla entre la muestra de ADN procedente de la cámara de PCR y los estándares de ADN puede ser controlada por medio de la tensión o las corrientes aplicadas a los pocillos 260 de separación y el pocillo adicional de marcadores de ADN.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de amplificación y detección de ácidos nucleicos para un sistema microfluídico que comprende:
  - (1) proporcionar un sistema microfluídico que comprende:
    - 5 un sustrato que tiene una cámara (220) para la amplificación de un volumen de ácido nucleico; una pluralidad de pocillos (240) dispuestos sobre el sustrato; canales (230) de flujo que conectan los pocillos (240) y la cámara (220) en el sustrato para permitir el flujo de la solución por la cámara; y
    - 10 uno o más canales (200) de separación proporcionados en el sustrato que conectan la cámara y otros pocillos para separar y detectar una fracción del ácido nucleico amplificado en la cámara, estando configurados la cámara (220), los canales (230) de flujo y los uno más canales (200) de separación de modo que la resistencia hidrodinámica al flujo en las cámaras y los canales de flujo combinados sea al menos  $10^3$  veces menor que la resistencia hidrodinámica al flujo en los uno o más canales de separación;
    - 15 (2) disponer una solución de ácido nucleico en la cámara (220);
    - (3) amplificar el ácido nucleico dispuesto en la cámara (220);
    - (4) introducir desde la cámara (220) una fracción del ácido nucleico amplificado en los uno o más canales (200) de separación;
    - 20 (5) separar la fracción del ácido nucleico amplificado mediante los uno o más canales (200) de separación; y
    - (6) detectar el ácido nucleico separado,

en el que las etapas (3) a (6) se repiten una o más veces, o la etapa (3) se repite una o más veces y después las etapas (4) a (6) se ejecutan una vez.
  2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que en el sistema microfluídico la proporción entre la resistencia hidrodinámica al flujo en los uno o más canales de separación y la resistencia hidrodinámica al flujo en las cámaras y los canales de flujo está entre aproximadamente  $10^3$  y aproximadamente  $10^9$ .
  3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que en el sistema microfluídico un volumen combinado de los uno o más canales de separación es al menos 100 veces menor que un volumen combinado de la cámara y los canales de flujo.
  4. El procedimiento según la reivindicación 1 o 3, en el que el sistema microfluídico, además, comprende:
    - 30 (i) un dispositivo de ciclación térmica para realizar la amplificación de ácido nucleico en la cámara; o
    - (ii) un dispositivo de control de lectura óptica para detectar ópticamente señales de la fracción de ácido nucleico separada electroforéticamente y para procesar la señal.
  5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que en el sistema microfluídico la cámara tiene un volumen entre aproximadamente 1  $\mu$ l y aproximadamente 100  $\mu$ l, preferentemente entre aproximadamente 10  $\mu$ l y aproximadamente 25  $\mu$ l.
  6. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que en el sistema microfluídico el volumen combinado de los uno o más canales de separación es entre aproximadamente 100 veces y aproximadamente 1000 veces menor que el volumen combinación de la cámara y los canales de flujo.
  7. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que en el sistema microfluídico la dimensión de los uno o más canales de separación es menor que la dimensión de cada uno de los canales de flujo y de la cámara, de modo que la resistencia hidrodinámica al flujo en los uno o más canales de separación haga el papel de válvula.
  8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que en el sistema microfluídico:
    - 45 (i) la cámara, los canales de flujo y uno o más canales de separación están configurados de modo que la resistencia hidrodinámica al flujo en las cámaras y los canales de flujo combinados es aproximadamente  $10^3$  o más veces menor que la resistencia hidrodinámica al flujo en los uno o más canales de separación; o
    - (ii) la cámara, los canales de flujo y uno o más canales de separación están configurados de modo que la resistencia hidrodinámica al flujo en las cámaras y los canales de flujo combinados es entre aproximadamente  $10^3$  y aproximadamente  $10^9$  veces menor que la resistencia hidrodinámica al flujo en los uno o más canales de separación; o
    - 50 (iii) la cámara tiene un volumen entre aproximadamente 10  $\mu$ l y aproximadamente 25  $\mu$ l.
  9. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que en el sistema microfluídico:

- 5
- (i) un volumen de los uno o más canales de separación es al menos 100 veces menor que un volumen combinado de la cámara y los canales de flujo; o
  - (ii) un volumen de los uno o más canales de separación es entre aproximadamente 100 veces y aproximadamente 1000 veces menor que un volumen combinado de la cámara y los canales de flujo; o
  - (iii) se proporciona más de un canal de separación en el sustrato para formar una red de canales para un ensayo de dimensionamiento electroforético de ADN.
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la amplificación del ácido nucleico dispuesto en la cámara se realiza por ciclación térmica.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que, además, comprende:
- 10 (7) cuantificar la cantidad de ácido nucleico presente en base a los datos recogidos.
12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la cuantificación de la cantidad de ácido nucleico presente se determina calculando un ciclo umbral.
13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que:
- 15 (i) la cámara, los canales de flujo y uno o más canales de separación están configurados de modo que la resistencia hidrodinámica al flujo en las cámaras y los canales de flujo combinados es al menos  $10^3$  veces menor que la resistencia hidrodinámica al flujo en los uno o más canales de separación; o
- (ii) la cámara los canales de flujo y uno o más canales de separación están configurados de modo que la resistencia hidrodinámica al flujo en las cámaras y los canales de flujo combinados es entre aproximadamente  $10^3$  y aproximadamente  $10^9$  veces menor que la resistencia hidrodinámica al flujo en los uno o más canales de separación; o
- 20 (iii) la cámara tiene un volumen entre aproximadamente 10  $\mu$ l y aproximadamente 25  $\mu$ l.
14. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que:
- (i) un volumen de los uno o más canales de separación es al menos 100 veces menor que un volumen combinado de la cámara y los canales de flujo; o
- 25 (ii) un volumen de los uno o más canales de separación es entre aproximadamente 100 veces y aproximadamente 1000 veces menor que un volumen combinado de la cámara y los canales de flujo.
15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que se proporciona más de un canal de separación en el sustrato para formar una red de canales para un ensayo de dimensionamiento electroforético de ADN.

30

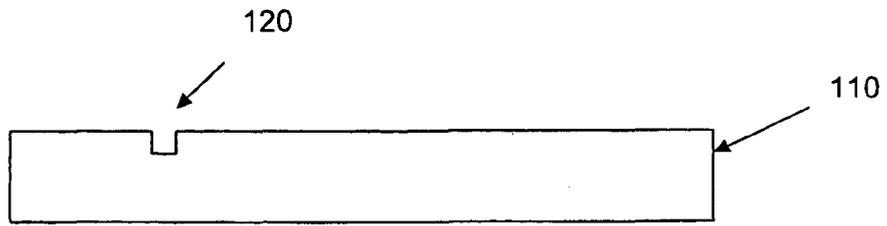


Fig. 1(A)

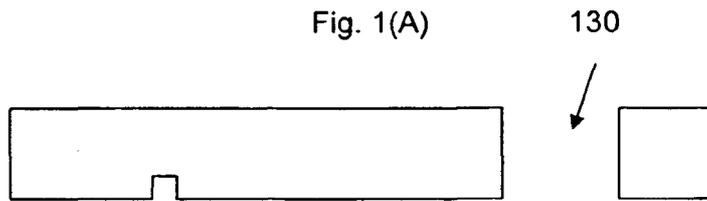


Fig. 1(B)

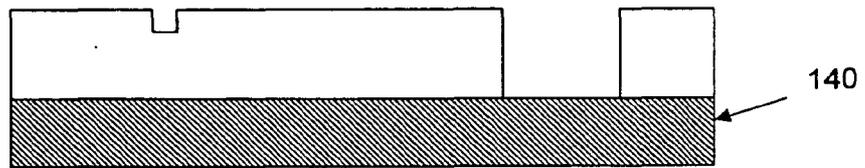


Fig. 1(C)

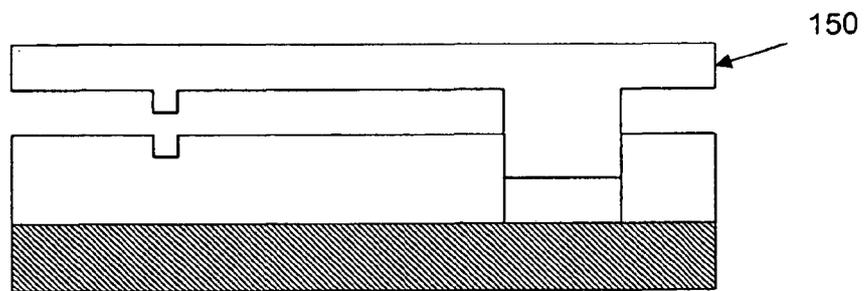


Fig. 1(D)

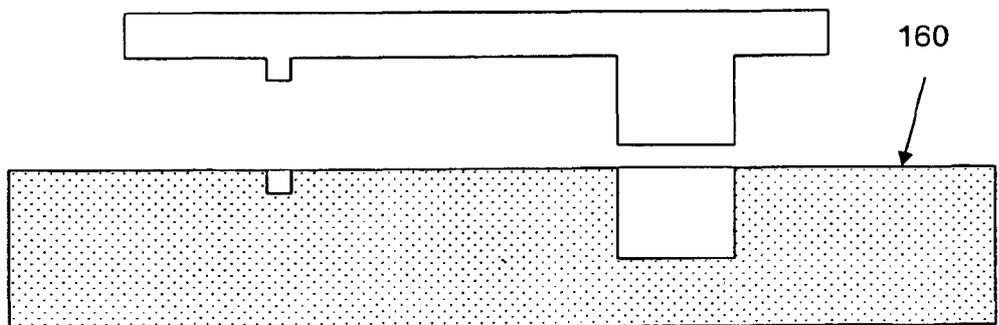


Fig. 1(E)

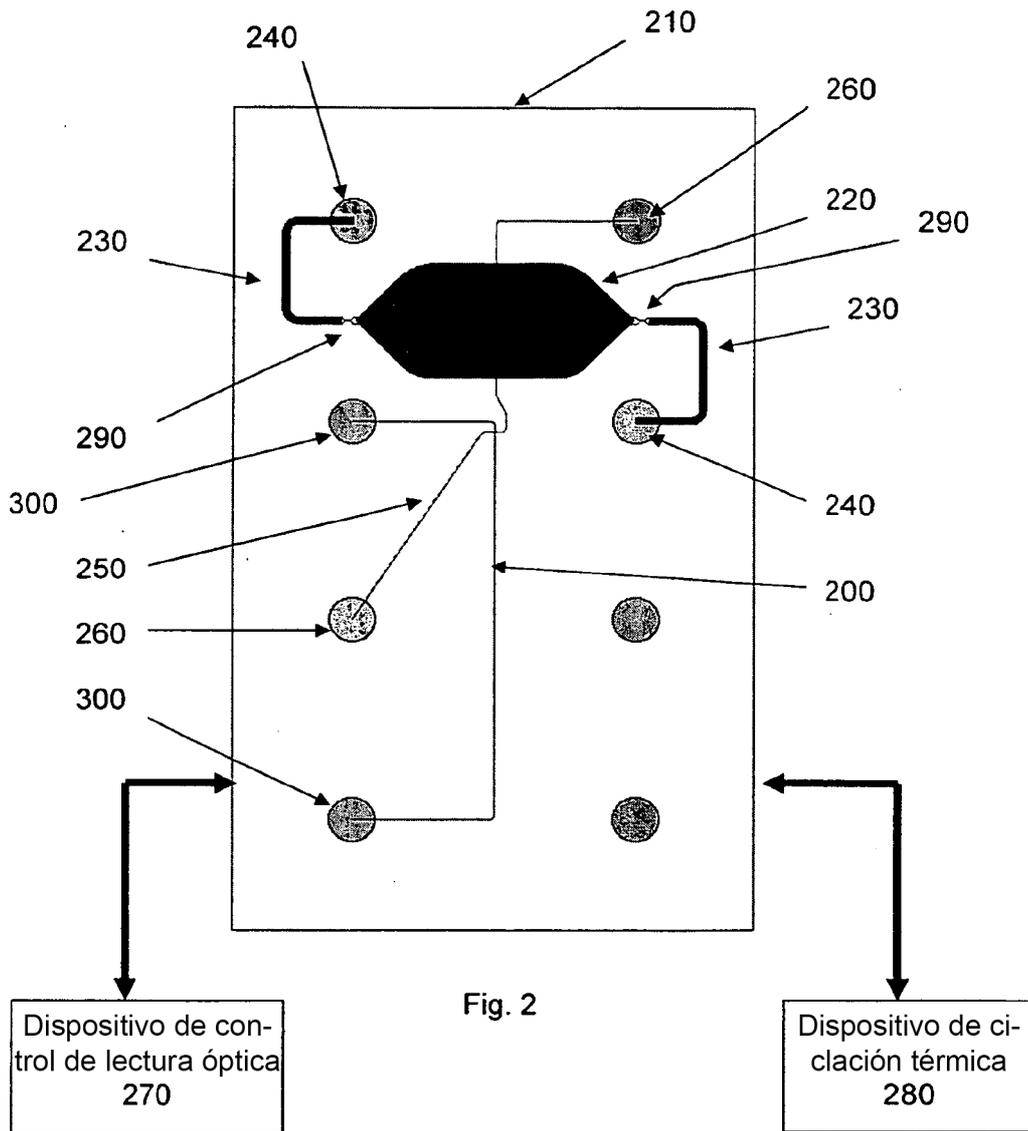
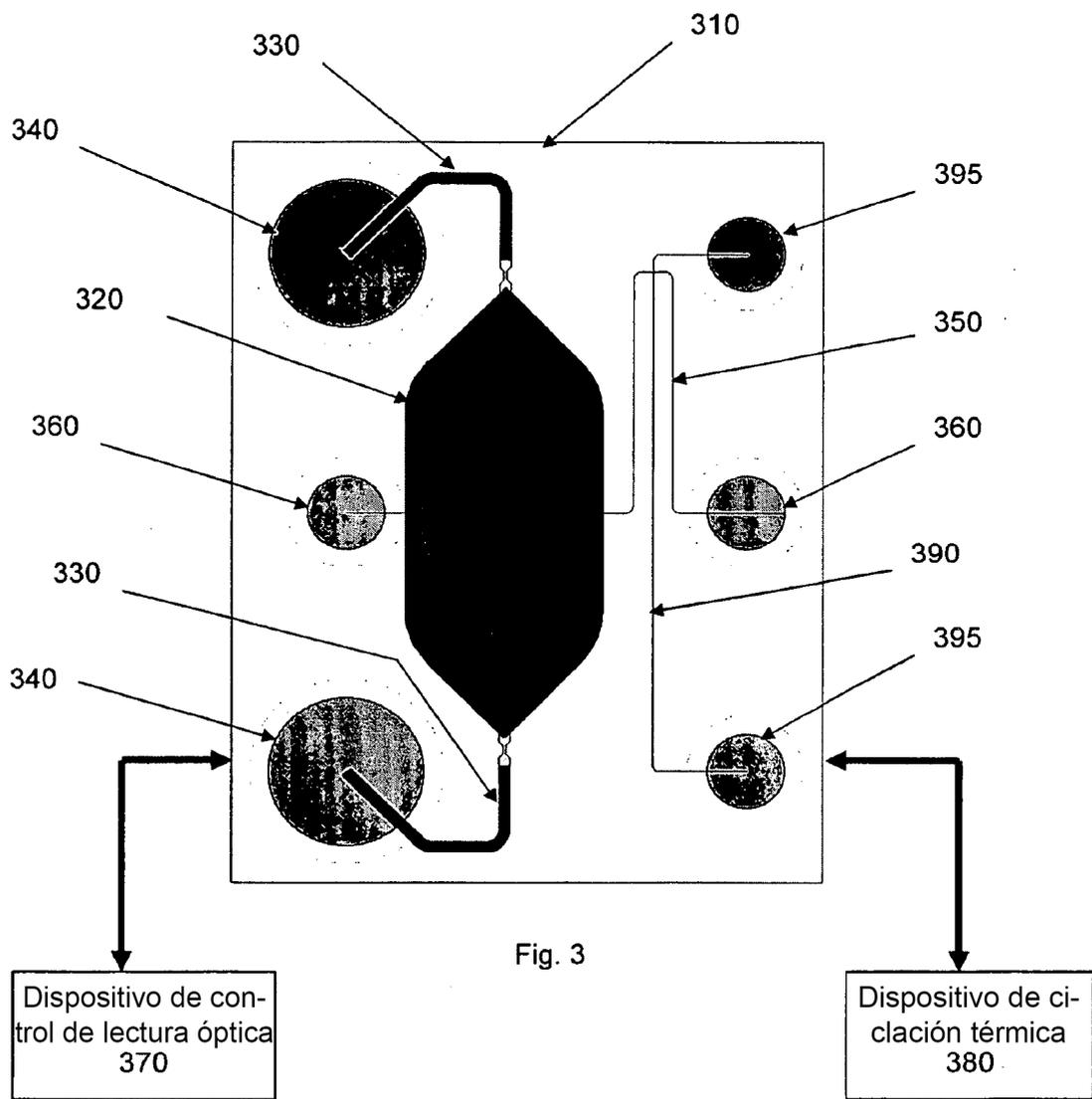
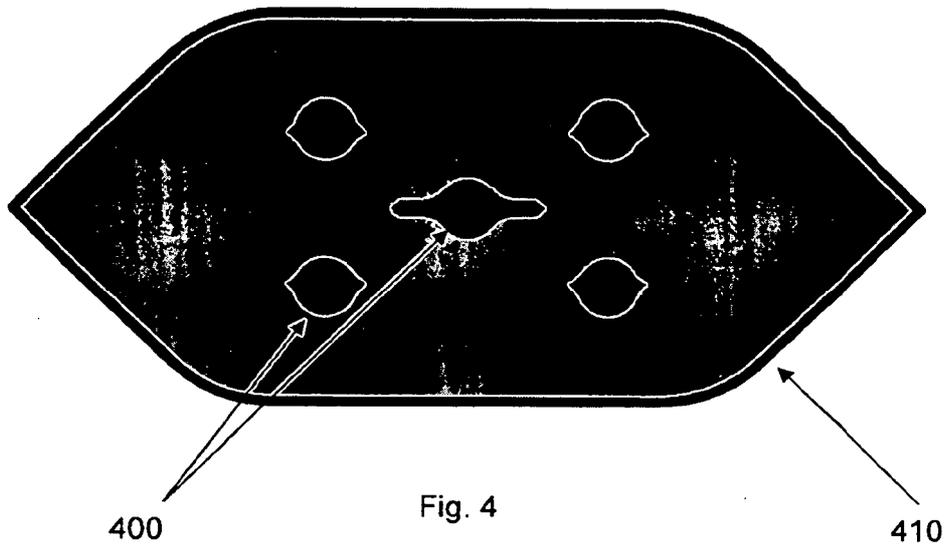


Fig. 2





Curva de crecimiento de PCR en tiempo real  
generada por el dispositivo de PCR-CE

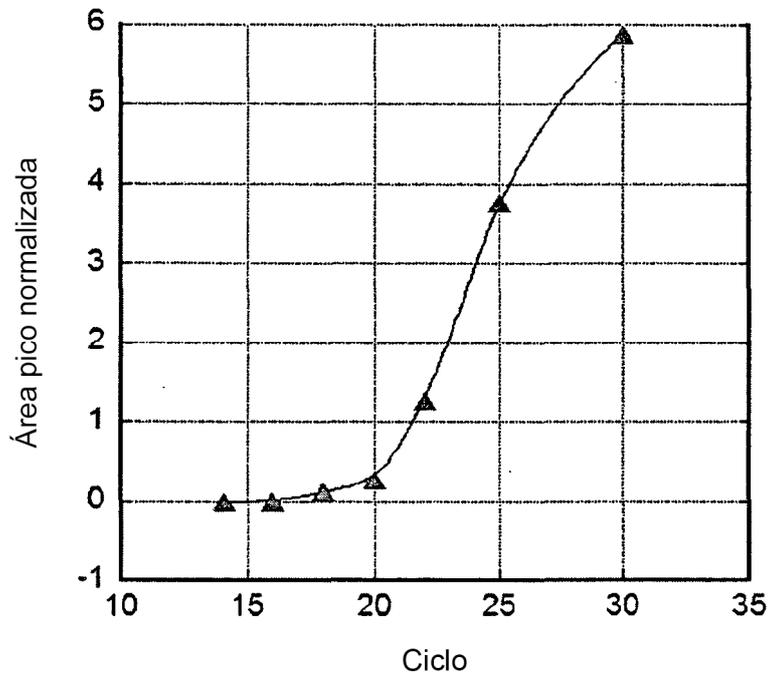


Fig. 5

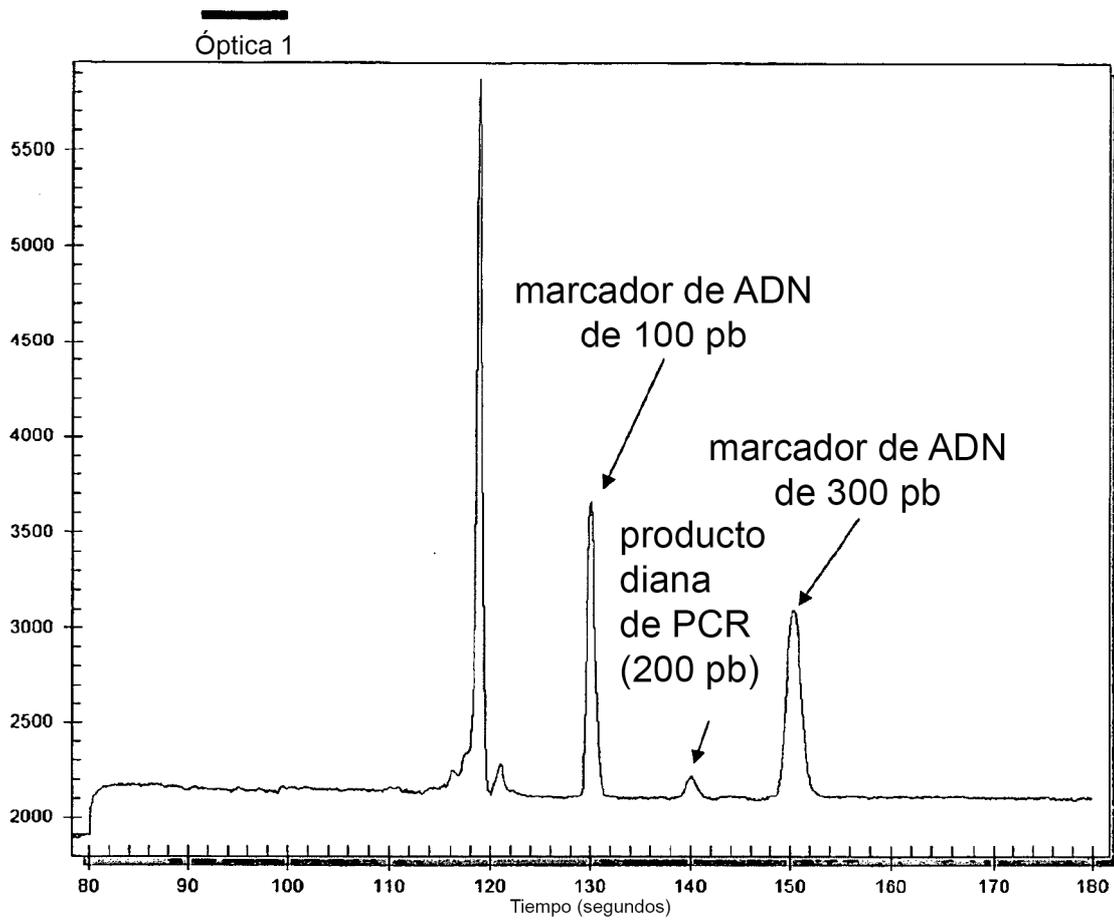


Fig. 6

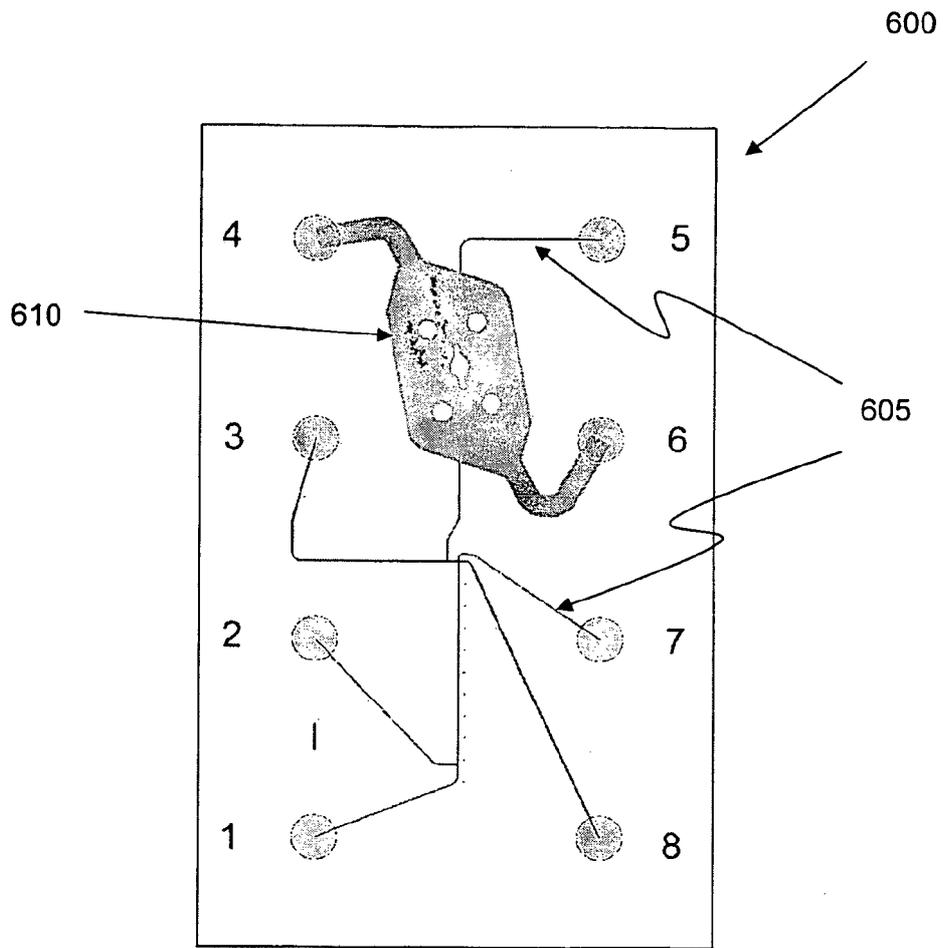
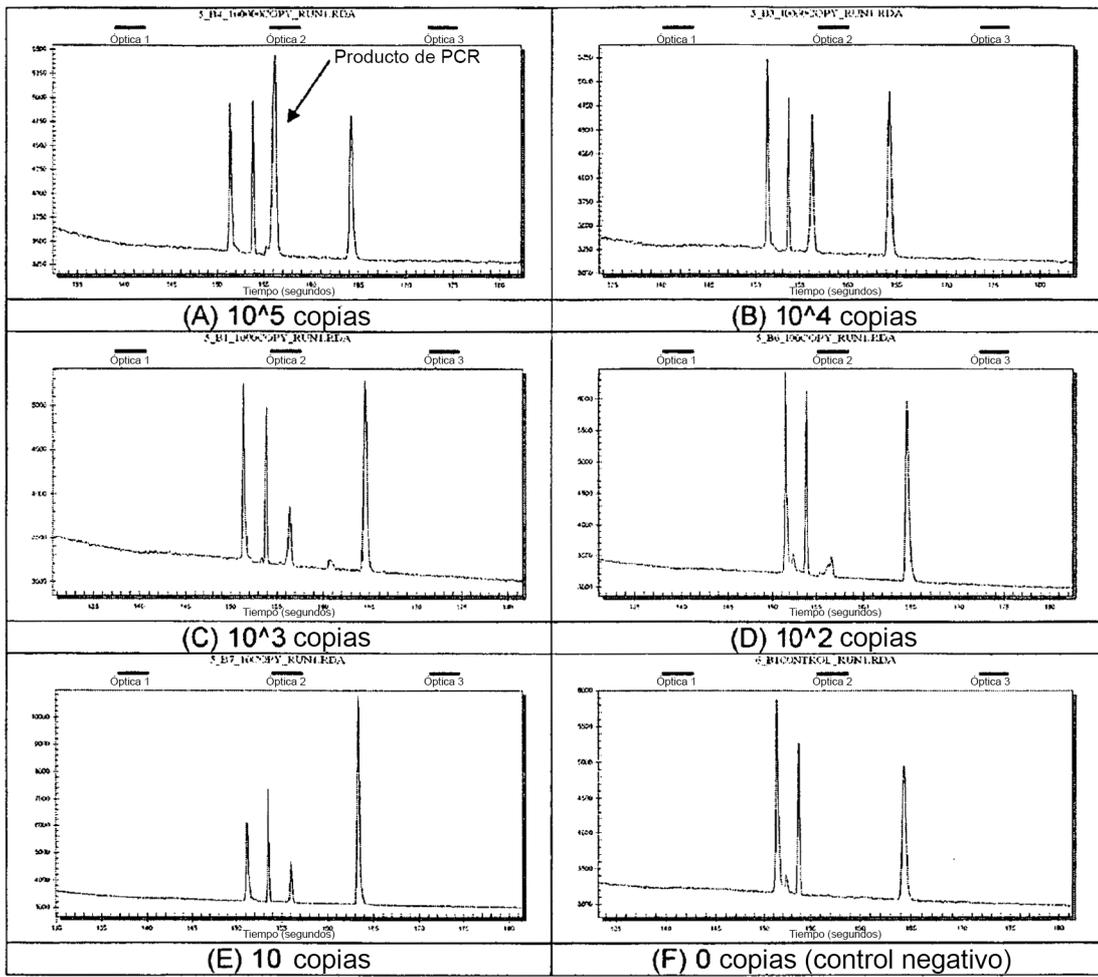


Fig. 7



Figs. 8(A)-(F)

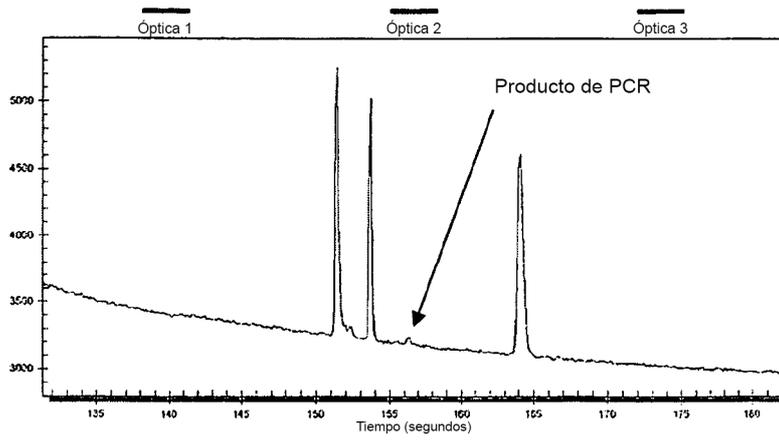


Fig. 9