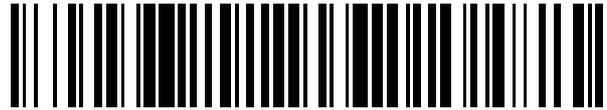


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 379**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2008 E 08746834 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2014 EP 2140274**

54 Título: **Reactivos soportados, métodos y dispositivos**

30 Prioridad:

25.04.2007 US 913814 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.04.2014

73 Titular/es:

**3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY
(100.0%)
3M CENTER POST OFFICE BOX 33427
SAINT PAUL, MN 55133-3427, US**

72 Inventor/es:

**PARTHASARATHY, RANJANI;
DANIELSON, MICHAEL, E.;
FALETTI, JOHN, C. y
BEDINGHAM, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 453 379 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

Reactivos soportados, métodos y dispositivos

5 Los reactivos biológicos asociados con las técnicas de manipulación del ácido nucleico pueden ser caros y estar sujetos a degradación durante la preparación, la conservación y/o la utilización. Las técnicas de manipulación del ácido nucleico incluyen, por ejemplo, métodos de amplificación tales como la reacción en cadena de polimerasa (PCR); métodos de amplificación de polinucleótidos diana tales como la replicación de secuencias auto-sostenidas (3SR) y la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA); métodos basados en amplificación de una señal unida al polinucleótido diana, tales como la amplificación de DNA "de cadena ramificada"; métodos basados en la amplificación de DNA sonda, tales como la reacción en cadena de ligasa (LCR) y la amplificación de la replicasa QB (QBR); métodos basados en transcripción, tales como transcripción activada por ligación (LAT), amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA), amplificación bajo el nombre comercial INVADER, y amplificación mediada transcripcionalmente (TMA); y diversos otros métodos de amplificación, tales como la reacción en cadena de reparación (RCR) y la reacción de la sonda de ciclación (CPR). Reactivos biológicos tales como enzimas, cebadores, y sondas se utilizan en la amplificación y detección de ácido nucleico.

15 Típicamente, los reactivos biológicos, tales como enzimas, se guardan en una solución de glicerol a -20°C o en forma seca para aumentar la estabilidad de almacenamiento. Ejemplos de formas secas incluyen polvos, esferas, tabletas, y films vítreos delgados. Sin embargo, los polvos pueden ser difíciles de medir, las estructuras liofilizadas tales como esferas son frágiles y tienden a desintegrarse cuando se manipulan, y las tabletas y films vítreos delgados pueden ser de disolución lenta.

20 US-A-4.363.874 da a conocer un elemento analítico multicapa para detección de un ligando, y que tiene una capa de reactivo sensible al ligando, una capa reflectante de radiaciones, y una capa de soporte.

US-A-5.415.838 se refiere a un portador que proporciona una zona de reacción para detección colorimétrica de una sustancia gaseosa tóxica. Una lámina compuesta que contiene una lámina portadora de reactivo que tiene una matriz puntual se mantiene entre una parte superior y una parte inferior.

25 Aun cuando se han considerado varios formatos para conservar y suministrar reactivos biológicos, existe una necesidad continuada de formatos de reactivos biológicos que puedan fabricarse, conservarse y utilizarse fácilmente.

30 La presente invención está definida por las características de las reivindicaciones y proporciona generalmente métodos que implican el suministro y la utilización de un film de soporte recubierto con una capa de reactivo. El film de soporte imparte estabilidad dimensional y tenacidad a la capa de reactivo sin interferir sustancialmente con la función del o de los reactivos en la capa de reactivo. De este modo, el reactivo puede estar provisto de una cantidad mínima de materiales asociados, tales como polímeros, cargas, plastificantes, etc., que podrían utilizarse en caso contrario en la capa de reactivo para estabilidad y tenacidad en ausencia del film de soporte. El film de soporte recubierto con la capa de reactivo puede utilizarse ventajosamente para proporcionar reactivos biológicos en una forma dimensionalmente estable, que es suficientemente tenaz para permitir la manipulación, con inclusión de la fabricación, empaquetado, transporte, conservación, y/o colocación en un dispositivo en el cual se utilizan los reactivos. Además, el film de soporte recubierto con la capa de reactivo puede prepararse por separado y con independencia de cualquier dispositivo o porción de un dispositivo en el o la cual puede utilizarse la capa de reactivo.

40 El término "que comprende" y variaciones del mismo (v.g., comprende, incluye, etc.) no tienen un significado limitante donde estos términos aparecen en la descripción y las reivindicaciones.

Como se utiliza en esta memoria, "un", "uno/a", "el/la", "al menos uno/una" y "uno/una o más" se utilizan intercambiamente, a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa.

45 Asimismo en esta memoria, las citas de intervalos numéricos por puntos finales incluyen todos los números subsumidos en el interior de dicho intervalo (v.g., $5\ \mu$ a $20\ \mu$ incluye 5, 5,5, 6,0, 6,75, 7,38, 8,72, 10, etc.).

El sumario anterior de la presente invención no pretende describir cada realización expuesta o cada implementación de la presente invención. La descripción que sigue ejemplifica más particularmente realizaciones ilustrativas.

DESCRIPCIONES BREVES DE LAS FIGURAS

50 FIG. 1 es una vista desde arriba de varias cámaras exteriores de amplificación de un disco microfluídico con un film de soporte dimensionado recubierto con una capa de reactivo en cada cámara.

FIG. 2 es la vista desde arriba de un dispositivo microfluídico con un film de soporte dimensionado recubierto con una capa de reactivo en cada una de las cámaras exteriores del dispositivo.

FIG. 3 es una vista en planta desde arriba de una cámara en el interior de un dispositivo microfluídico con un film de soporte dimensionado recubierto con una capa de reactivo situada en la cámara.

FIG. 4 es una vista en sección transversal de una cámara en el interior de un dispositivo microfluídico con un film de soporte dimensionado recubierto con una capa de reactivo situada en la cámara.

FIG. 5 es una vista desde arriba de una pluralidad de films de soporte dimensionados recubiertos con una capa de reactivo adherida a una pluralidad de posiciones en una hoja.

5 FIG. 6 es una vista en sección transversal de un film de soporte dimensionado recubierto con una capa de reactivo adherida a una hoja.

FIG. 7 es una vista en perspectiva de un film de soporte recubierto con una capa de reactivo.

FIG. 8 es una vista en perspectiva de un film de soporte alternativo recubierto con una capa de reactivo, en donde la capa de reactivo cubre una porción del film de soporte.

10 FIG. 9 es una vista en sección transversal de un film de soporte dimensionado recubierto con una capa de reactivo adherida a una hoja, en donde la capa de reactivo cubre una porción del film de soporte.

FIG. 10 es una vista en sección transversal de una cámara en el interior de un dispositivo microfluídico con un film de soporte recubierto con una capa de reactivo, en donde la capa de reactivo está dimensionada para adaptarse en el interior de la cámara, y en donde el film de soporte cierra herméticamente una abertura de la cámara, y la capa de reactivo está posicionada en el interior de la cámara.

15

Pueden proporcionarse ahora reactivos biológicos en una capa de reactivo sobre de soporte que proporciona la estabilidad dimensional y tenacidad necesarias durante la manipulación, por ejemplo, durante la fabricación, el empaquetado, la conservación, y/o la colocación en un dispositivo en el que se utilizan los reactivos biológicos. La tenacidad se refiere a la resistencia a la rotura o fragmentación, de tal modo que la capa de reactivo y el film de soporte se mantengan intactos.

20

En algunas realizaciones, en las que la capa de reactivo seca o la capa de reactivo seca y el film de soporte están dimensionados para adaptarse en el interior de una cámara, la capa de reactivo seca o la capa de reactivo seca y el film de soporte comprende un área de al menos aproximadamente $0,1 \text{ mm}^2$, 1 mm^2 , 2 mm^2 , 5 mm^2 , o 10 mm^2 . Para algunas de estas realizaciones, la capa de reactivo seca o la capa de reactivo seca y el film de soporte comprende un área de al menos aproximadamente 1 mm^2 , 2 mm^2 o 5 mm^2 . Para algunas de estas realizaciones, la capa de reactivo seca o la capa de reactivo seca y el film de soporte comprende un área no mayor que aproximadamente 1000 mm^2 , 250 mm^2 , 100 mm^2 , 50 mm^2 , 20 mm^2 , 15 mm^2 o 10 mm^2 . La forma de la capa de reactivo seca o la capa de reactivo seca y el film de soporte puede ser cualquier forma que pueda cortarse de un film o alternativamente recubrirse por puntos sobre el film de soporte como se describe más adelante, con inclusión de un triángulo, un cuadrado, un rectángulo, un trapecio, un círculo, un óvalo, y una combinación de los mismos.

25

30

Para algunas realizaciones, con inclusión de una cualquiera de las realizaciones anteriores del film de soporte recubierto con la capa de reactivo o de proporcionar el film de soporte recubierto con la capa de reactivo, el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo (la capa de reactivo o la capa de reactivo y film de soporte están dimensionados) está adherido a una hoja. Para algunas de estas realizaciones, una pluralidad de los films de soporte dimensionados recubiertos con la capa de reactivo están adheridos a la hoja. Para algunas de estas realizaciones, la capa de reactivo es una capa de reactivo seca. La hoja puede ser igual o diferente del film de soporte. La hoja puede ser un film de polímero, una hoja metálica, una combinación de las mismas, o análoga. La hoja puede estar constituida por una sola capa o por capas múltiples. La hoja puede incluir una capa adhesiva. La hoja puede ser de cualquier forma adecuada, por ejemplo, un disco circular, un anillo, un rectángulo, un cuadrado, o análogos.

35

40

El "material muestra", como se utiliza en esta memoria, puede ser un material muestra bruto o un material muestra procesado. Materiales muestra brutos incluyen, por ejemplo, muestras o especímenes clínicos (sangre, tejido, etc.), muestras alimentarias (alimentos, piensos, materias primas para alimentos o piensos, etc.), muestras ambientales (agua, suelo, etc.), o análogas. Los materiales muestra procesados incluyen, por ejemplo, muestras que contienen células o virus separados de un material muestra bruto, y muestras que contienen polinucleótidos aislados de células, virus, o derivados de otras fuentes.

45

La capa de reactivo puede incluir al menos un reactivo que puede utilizarse en al menos un paso de una técnica de manipulación de polinucleótidos o ácidos nucleicos o procesamiento de proteínas, con inclusión de pasos de preparación y detección de la muestra. Para algunas realizaciones, que incluyen una cualquiera de las realizaciones anteriores, la capa de reactivo incluye al menos un reactivo que puede utilizarse en al menos uno de un paso de preparación de la muestra, un paso de amplificación de ácido nucleico, y un paso de detección en un proceso para detección o ensayo de un ácido nucleico. La preparación de la muestra puede incluir, por ejemplo, la captura de un material biológico que contiene un ácido nucleico, lavado de un material biológico que contiene un ácido nucleico, lisis de un material biológico que contiene un ácido nucleico, por ejemplo, células o virus, digestión de residuos celulares, aislamiento, captura, o separación de al menos un polinucleótido o ácido nucleico de una muestra biológica, y/o elución de un ácido nucleico. La amplificación de ácido nucleico puede incluir, por ejemplo, producción de un polinucleótido complementario de un polinucleótido o una porción de un ácido nucleico en números suficientes

50

55

para detección. La detección incluye, por ejemplo, realización de una observación, tal como detección de una fluorescencia, que indica la presencia y/o cantidad de un polinucleótido o ácido nucleico. Para algunas de estas realizaciones, la capa de reactivo incluye al menos un reactivo seleccionado del grupo constituido por un reactivo de lisis, un reactivo de digestión de proteínas, una enzima de amplificación de ácido nucleico, un oligonucleótido, una sonda, nucleótido-trifosfatos, un tampón, una sal, un agente tensioactivo, un tinte, un control de ácido nucleico, un agente reductor, dimetil-sulfóxido (DMSI), glicerol, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-*N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA), microesferas capaces de fijar un ácido nucleico, y una combinación de los mismos. Para algunas de estas realizaciones, el grupo de reactivos a partir de los cuales se selecciona el al menos un reactivo incluye adicionalmente uno cualquiera de, cualquier combinación de, o la totalidad de RNasa, DNasa, un inhibidor de RNasa, un inhibidor de DNasa, Sero-Albúmina Bovina, espermidina, y un conservante. Para algunas de estas realizaciones, la capa de reactivo incluye al menos un reactivo seleccionado del grupo constituido por una enzima de amplificación de ácido nucleico, un oligonucleótido, una sonda, nucleótido-trifosfatos, un tampón, una sal, y microesferas capaces de fijar un ácido nucleico.

La lisis puede realizarse enzimáticamente, químicamente, y/o mecánicamente. Enzimas utilizadas para la lisis incluyen, por ejemplo, lisostafina, lisozima, mutanolisina, u otras. La lisis química puede llevarse a cabo utilizando un agente tensioactivo, álcali, calor, u otros medios. Cuando se utiliza álcali para la lisis, puede utilizarse un reactivo de neutralización para neutralizar la solución o mixtura después de la lisis. La lisis mecánica puede realizarse por mezcla o cizalladura utilizando partículas sólidas o micropartículas tales como cuentas o microcuentas. El reactivo de lisis puede incluir un agente tensioactivo o detergente tal como dodecilsulfato de sodio, dodecilsulfato de litio, o *N*-metil-*N*-(1-oxododecil)glicina, sal de sodio, o análogos, tamponados en caso necesario; un agente caotrópico tal como hidrocloreuro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, yoduro de sodio, o análogos; una enzima de lisis tal como lisozima, lisostafina, mutanolisina, proteinasas, pronasas, celulasas, o cualquiera de las otras enzimas de lisis disponibles comercialmente; un reactivo de lisis alcalina, un reactivo de neutralización, partículas sólidas tales como cuentas, o una combinación de los mismos.

El reactivo de digestión de proteínas puede facilitar la digestión de las proteínas presentes en el material muestra, con inclusión de una enzima de lisis en caso de estar presente. Adicionalmente, el reactivo de digestión de proteínas, por ejemplo, proteinasa K, puede activar como reactivo de lisis en presencia de un agente tensioactivo.

"Enzima de amplificación de ácido nucleico" se refiere a una enzima que puede catalizar la producción de un polinucleótido o un ácido nucleico a partir de un molde de DNA o RNA existente. Para algunas realizaciones, la enzima de amplificación de ácido nucleico es una enzima que puede utilizarse en un proceso para amplificación de un ácido nucleico o una porción de un ácido nucleico. Para algunas realizaciones, la enzima de amplificación de ácido nucleico se selecciona del grupo constituido por una DNA-polimerasa y una transcriptasa inversa. Para algunas realizaciones, la DNA-polimerasa se selecciona del grupo constituido por DNA-polimerasa Taq, DNA-polimerasa Tfi, DNA-polimerasa Tth, DNA-polimerasa Tli, y DNA-polimerasa Pfu. Para algunas de estas realizaciones, la transcriptasa inversa se selecciona del grupo constituido por transcriptasa inversa AMV, transcriptasa inversa M-MLV y transcriptasa inversa M-MLV, RNasa H meNúms. La transcriptasa inversa retroviral, tal como M-MLV y AMV plantea una actividad de DNA-polimerasa dirigida por RNA, una actividad de polimerasa dirigida por DNA, así como una actividad de RNasa H. Para algunas realizaciones, la enzima de amplificación de ácido nucleico es una DNA-polimerasa o una RNA-polimerasa. Para algunas realizaciones, la enzima de amplificación de ácido nucleico es DNA-polimerasa Taq. Para algunas realizaciones, la enzima de amplificación de ácido nucleico es RNA-polimerasa T7.

El "oligonucleótido" puede ser un cebador, un oligonucleótido de terminación, un oligonucleótido extendedor, o un oligonucleótido promotor. Para algunas realizaciones, el oligonucleótido es un cebador. Tales oligonucleótidos están constituidos típicamente por 15 a 30 unidades de nucleótido, lo que determina la región (secuencia direccionada) de un ácido nucleico a amplificar. En condiciones apropiadas, las bases en el cebador se fijan a bases complementarias en la región de interés, después de lo cual la enzima amplificadora del ácido nucleico extiende el cebador como se determina por la secuencia direccionada. Un gran número de cebadores son conocidos y están disponibles comercialmente, y otros pueden diseñarse y producirse utilizando métodos conocidos.

Las sondas permiten la detección de productos de amplificación (amplicones) por fluorescencia, y generación con ello de una señal detectable, cuya intensidad es dependiente del número de moléculas de sonda fluorescentes. Las moléculas de sonda pueden estar constituidas por un oligonucleótido y un grupo fluorescente acoplado con un grupo de extinción. Las sondas pueden emitir fluorescencia cuando la separación o el desacoplamiento del grupo de extinción y el grupo fluorescente ocurren después de la fijación a un amplicón o después de la escisión de una enzima amplificadora de ácido nucleico de la sonda unida al amplicón. Alternativamente, una sonda unida al amplicón puede emitir fluorescencia después de exposición a luz de una longitud de onda apropiada. Para algunas realizaciones, con inclusión de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la sonda se selecciona del grupo constituido por sondas TAQMAN (Applied Biosystems, Foster City, CA), balizas moleculares, sondas SCORPIONS (Eurogentec Ltd., Hampshire, UK), SYBR GREEN (Invitrogen, Carlsbad, CA), sondas de hibridación FRET (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN), sondas Quantitect (Qiagen, Valencia, CA), y antorchas moleculares.

Los nucleótido-trifosfatos (NTPs) con inclusión de ribonucleótido-trifosfatos y desoxirribonucleótido-trifosfatos en caso requerido, son utilizados por la enzima de amplificación de ácido nucleico en la producción de un polinucleótido

o un ácido nucleico a partir de un molde de DNA o RNA existente . Por ejemplo, cuando se amplifica un DNA, se utiliza un juego de dNTP (desoxirribonucleotido-trifosfato), que incluye típicamente dATP (2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato), dCTP (2'-desoxicitidina-5'-difosfato), dGTP (2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato), y dTTP (2'-desoxitimidina-5'-trifosfato).

- 5 Se utilizan tampones para regular el pH del medio de reacción. Una gran diversidad de tampones son conocidos y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, tampones de morfolina, tales como ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES), pueden ser adecuados para proporcionar un intervalo de pH eficaz de aproximadamente 5,0 a 6,5, tampones de imidazol pueden ser adecuados para proporcionar un intervalo de pH eficaz de aproximadamente 6,2 a 7,8, y tampones de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y ciertos tampones de piperazina tales como ácido *N*-(2-hidroxiethyl)piperazina-*N'*-(2-etanosulfónico) (HEPES) pueden ser adecuados para proporcionar un intervalo de pH eficaz de aproximadamente 7,0 a 9,0. El tampón puede afectar a la actividad y fidelidad de las enzimas de amplificación de ácido nucleico, tales como las polimerasas. Para algunas realizaciones, el tampón se selecciona de al menos un tampón que pueda regular el pH en el intervalo de 7,5 a 8,5. Para algunas de estas realizaciones, el tampón es un tampón basado en TRIS. Para algunas de estas realizaciones, el tampón se selecciona del grupo constituido por al menos uno de TRIS-EDTA, solución salina tamponada con TRIS, TRIS-acetato EDTA, y TRIS-borato EDTA. Otros materiales pueden incluirse con estos tampones, tales como agentes tensioactivos y detergentes, por ejemplo, CHAPS o un agente tensioactivo descrito más adelante. Para algunas realizaciones, los tampones están exentos de RNasa y DNasa.

- 20 Las sales pueden afectar a la actividad de las enzimas de amplificación de ácido nucleico. Por ejemplo, son necesarios iones magnesio libres para que algunas polimerasas, tales como DNA-polimerasa Taq, sean activas, en otro ejemplo, en presencia de iones manganeso, DNA-polimerasa Tfl y DNA-polimerasa Tth pueden catalizar la polimerización de nucleótidos en DNA, utilizando RNA como molde. En un ejemplo adicional, la presencia de algunas sales, tales como cloruro de potasio, puede aumentar la actividad de algunas polimerasas tales como DNA-polimerasa Taq. Para algunas realizaciones, que incluyen una cualquiera de las realizaciones anteriores, la sal se selecciona del grupo constituido por al menos una sal de magnesio, manganeso, cinc, sodio y potasio. Para algunas de estas realizaciones, la sal es al menos una de cloruro de magnesio, cloruro de manganeso, sulfato de cinc, acetato de cinc, cloruro de sodio, y cloruro de potasio. Para algunas de estas realizaciones, la sal es cloruro de magnesio.

- 30 Puede incluirse un agente tensioactivo para la lisis o desaglomeración de células, mejora de la mezcladura, intensificación del flujo de fluidos, por ejemplo, en un dispositivo, tal como un dispositivo microfluidico. El agente tensioactivo puede ser no iónico, tal como un copolímero poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) disponible, por ejemplo, bajo el nombre comercial PLURONIC, polietilenglicol (PEG), monolaurato de polioxietilensorbitán disponible bajo el nombre comercial TWEEN 20, 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol disponible bajo el nombre comercial Triton X-100; aniónico, tal como laurilsulfato de litio, sal de sodio de *N*-lauroilsarcosina, y dodecilsulfato de sodio; catiónico, tal como sales de alquil-piridinio y de amonio cuaternario; de ion dipolar, tales como *N*-(C₁₀-C₁₆alquil)-*N,N*-dimetilglicina-betaína (en la familia betaína de agentes tensioactivos); y/o un agente tensioactivo fluorado tal como FLUORAD-FS 300 (3M, St. Paul, MN) y ZONYL (Dupont de Nemours Co., Wilmington, DEL).

- 40 Puede incluirse un tinte en la capa de reactivo para impartir un color o una fluorescencia a la capa de reactivo o a un fluido que está en contacto con la capa de reactivo. El color o la fluorescencia pueden proporcionar evidencia visual o una absorción de luz o emisión de luz detectable que demuestra que la capa de reactivo se ha disuelto, dispersado, o suspendido en el fluido que está en contacto con la capa de reactivo. Para algunas realizaciones, el tinte se selecciona del grupo constituido por tintes fluorescentes, tales como fluoresceína, cianina (que incluye Cy3 y Cy5), Rojo Texas, ROX, FAM, JOE, SYBR Green, Oli Green, y HEX. Además de estos tintes fluorescentes, pueden utilizarse también tintes ultravioleta/visibles, tales como diclorofenol, indofenol, safranina, violeta cristal, y colorantes alimentarios disponibles comercialmente.

- 50 Un control de ácido nucleico es una cantidad conocida de un ácido nucleico o material que contiene ácido nucleico desecado con los reactivos de preparación de la muestra o de amplificación o detección de la misma. Este control interno puede utilizarse para monitorizar la integridad de los reactivos así como la inhibición del material o espécimen de muestra. Un control de DNA plasmídico linealizado se utiliza típicamente como control interno de ácido nucleico.

- 55 El agente reductor es un material capaz de reducir los enlaces disulfuro, por ejemplo en proteínas que pueden estar presentes en un material o espécimen de muestra, y reducir con ello la viscosidad así como mejorar las características de flujo y mezcladura del material de muestra. Para algunas realizaciones, el agente reductor contiene preferiblemente al menos un grupo tiol. Ejemplos de agente reductor incluyen *N*-acetil-*L*-cisteína, ditiotreitól, 2-mercaptoetanol, y 2-mercaptoetilamina.

Puede utilizarse dimetil-sulfóxido (DMSO) para inhibir la formación de estructuras secundarias en el molde de DNA; el glicerol puede mejorar el proceso de amplificación, puede utilizarse como conservante, y puede estabilizar enzimas tales como polimerasas; pueden utilizarse ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) y ácido etilenglicol-

bis(2-aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA) como formadores de quelatos de iones metálicos y también para desactivar enzimas fijadoras de metal (RNAsas) que pueden entorpecer la reacción.

5 Puede utilizarse RNasa o DNasa para descomponer RNA o DNA no deseado que está presente en un material de muestra. Por ejemplo, cuando se está direccionando DNA, el RNA que pueda estar presente puede hacerse no-interferente con RNasa; y análogamente, cuando se está direccionando RNA, el DNA que pueda estar presente puede hacerse no-interferente con DNasa. Alternativamente, cuando pueden estar presentes RNasa y/o DNasa, pero son indeseables debido a su capacidad para descomponer un RNA o DNA direccionado, se puede utilizar un inhibidor de RNasa o inhibidor de DNasa, o ambos, para evitar dicha descomposición, un conservante.

10 Puede utilizarse Seroalbúmina Bovina para estabilizar la enzima amplificadora de ácido nucleico durante la amplificación del ácido nucleico.

Para amplificación, pueden añadirse ciertos compuestos a fin de estimular la enzima amplificadora. Por ejemplo, puede utilizarse espermidina para estimular la RNA-polimerasa.

15 Aunque la capa de reactivo se seca como se describe más adelante, la capa de reactivo puede incluir un conservante para inhibir o prevenir un crecimiento microbiano inadvertido en la capa de reactivo. Por ejemplo, puede utilizarse para este propósito un conservante sintético tal como metil-parabén, propil-parabén, acida de sodio, o análogos.

20 El término "microesferas" se refiere a microesferas, micropartículas, microcuentas, partículas de resina, y análogas. Las microesferas capaces de fijar un ácido nucleico pueden ser útiles en un paso de preparación de la muestra en el que, por ejemplo, al menos un polinucleótido o ácido nucleico se aísla o se separa de una muestra biológica. Ejemplos de microesferas capaces de fijar un polinucleótido o ácido nucleico incluyen partículas de resina y de sílice con iones metálicos inmovilizados en la superficie de las partículas de resina o sílice. Las partículas de resina pueden ser cuentas de látex, cuentas de poliestireno, y análogas. Las partículas de resina o sílice pueden ser magnéticas o no magnéticas. Las partículas pueden ser de tamaño coloidal, por ejemplo aproximadamente 100 nm, a aproximadamente 10 μ . Tales partículas de resina con metal inmovilizado pueden fabricarse como se describe en la patente U.S. No. 7.112.552 en los Ejemplos 1 y 2; la Publicación de Patente U.S No. 2004/0152076 en el párrafo 0152, y en el documento U.S. No. de Serie 60/913,812, titulado COMPOSITIONS, METHODS, AND DEVICES FOR ISOLATING BIOLOGICAL MATERIALS, presentado en 25 de abril 2007. Pueden utilizarse también microesferas para resuspensión y mezcladura de reactivos de preparación, amplificación, o detección de la muestra. Por ejemplo, pueden utilizarse para este propósito cuentas de vidrio o magnéticas con o sin capacidad de fijación.

30 Para algunas realizaciones, con inclusión de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la capa de reactivo incluye al menos un reactivo seleccionado del grupo constituido por una enzima de amplificación de ácido nucleico, un cebador, una sonda, y microesferas capaces de fijar un ácido nucleico. Para algunas realizaciones, con inclusión de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la capa de reactivo incluye al menos un reactivo seleccionado del grupo constituido por una enzima amplificadora de ácido nucleico, un cebador, y una sonda. Para algunas de estas realizaciones, la capa de reactivo incluye una enzima amplificadora de ácido nucleico. En estas realizaciones, la enzima amplificadora de ácido nucleico, el cebador, y las sondas pueden incluir una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente para cada uno de estos reactivos.

40 Para algunas realizaciones, con inclusión de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la capa de reactivo incluye adicionalmente un material matriz seleccionado del grupo constituido por un polímero soluble en agua, un carbohidrato y una combinación de los mismos. Como se utiliza en esta memoria, "soluble en agua" significa que el material, por ejemplo, el polímero soluble en agua, el carbohidrato, o una combinación de los mismos, pueden disolverse, dispersarse o suspenderse en agua a una temperatura que es al menos la temperatura ambiente. Para algunas realizaciones, la temperatura es al menos 50°C. Para algunas realizaciones, la temperatura no es mayor que 100°C, preferiblemente no mayor que 97°C, más preferiblemente no mayor que 75°C. El material matriz puede retener o contener al menos un reactivo. El material matriz puede aumentar también la adhesión de la capa de reactivo al film de soporte y permitir que la capa de reactivo se recubra en un intervalo más amplio de espesores que el que sería posible en caso contrario. La capacidad para preparar la capa de reactivo en un intervalo de espesores amplio permite un mayor intervalo de cantidades de reactivo a proporcionar. Para algunas de estas realizaciones, el material matriz es un polímero soluble en agua. Para algunas de estas realizaciones, el polímero soluble en agua se selecciona del grupo constituido por poli(etilenglicol), poli(alcohol vinílico), poli(alcohol vinílico) parcialmente hidrolizado, polivinilpirrolidona, poli(1-vinilpirrolidona-co-2-dimetilaminoetilmetacrilato), poli(1-vinilpirrolidona-co-acetato de vinilo), y una combinación de los mismos. Para algunas de estas realizaciones, el polímero soluble en agua se selecciona del grupo constituido por poli(alcohol vinílico), poli(acetato de alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, y una combinación de los mismos. Para algunas de estas realizaciones, el polímero soluble en agua es poli(alcohol vinílico) que está hidrolizado al menos en un 80%. Para algunas de estas realizaciones, el poli(alcohol vinílico) está hidrolizado al menos en un 90% y tiene un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 70.000.

Para algunas realizaciones, el material matriz es un carbohidrato. Para algunas de estas realizaciones, el carbohidrato se selecciona del grupo constituido por sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol, rafinosa, estaquiosa,

melecitosa, dextrosa, maltosa, dextrano, celobiosa, pectina, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, goma guar, goma de algarroba, goma arábica, goma de xantano, ficoll, un copolímero poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) con un balance hidrófilo/lipófilo mayor que 7, preferiblemente mayor que 9, de modo más preferible aproximadamente 12, una ciclodextrina, α -ciclodextrina, almidón, pululano, alginatos, 5 gelatinas, y carragena. Núms. Para algunas de estas realizaciones, el carbohidrato se selecciona del grupo constituido por sacarosa, dextrano, trehalosa, pululano, α -ciclodextrina, manitol, sorbitol, y una combinación de los mismos. Para algunas realizaciones, el carbohidrato es un azúcar.

Para algunas de estas realizaciones, el material matriz es una combinación de un polímero soluble en agua y un carbohidrato. En estas realizaciones, el polímero soluble en agua y el carbohidrato pueden seleccionarse 10 independientemente de una cualquiera de las realizaciones anteriores.

La capa de reactivo puede incluir además componentes opcionales adicionales, tales como cargas y plastificantes. Si se incluyen, los componentes opcionales adicionales se utilizan en cantidades mínimas y, preferiblemente, no interfieren con la actividad o función de ninguno de los reactivos.

Para algunas realizaciones, que incluyen una cualquiera de las realizaciones anteriores, la capa de reactivo está 15 constituida por más de una capa. Cada capa puede contener los mismos o diferentes reactivos o los mismos o diferentes componentes matriz, (es decir, polímeros solubles en agua, carbohidratos, u otros componentes opcionales). Alternativamente, en los casos en que la capa de reactivo está constituida por más de una capa, una o más capas pueden no contener reactivo alguno, por ejemplo, una capa superior y/o una capa dispuesta entre dos 20 capas que contienen reactivos, y/o una capa dispuesta entre una capa que contiene al menos un reactivo y el film de soporte.

Para algunas realizaciones, el film de soporte no emite fluorescencia a las longitudes de onda de la luz utilizada para la detección. Para algunas realizaciones, preferiblemente el film de soporte no emite fluorescencia en un grado apreciable y es transparente a o no absorbe apreciablemente la luz utilizada para producir la fluorescencia en una sonda o la luz emitida durante la fluorescencia de una sonda.

El film de soporte se selecciona preferiblemente de tal modo que una superficie mayor del film de soporte se adhiere 25 a la capa de reactivo de tal modo que la capa de reactivo no se desprende fácilmente del film o no se separa fácilmente del film de soporte durante la fabricación, el empaquetado, la conservación, y/o la colocación en un dispositivo. La capa de reactivo se mantiene adherida al film de soporte hasta que el reactivo en la capa de reactivo se disuelve, dispersa, o suspende cuando se utiliza finalmente. Para algunas realizaciones, el film de soporte incluye 30 una capa promotora de adhesión sobre una superficie mayor del film de soporte, de tal modo que la capa promotora de adhesión está en contacto con la capa de reactivo. Para algunas de estas realizaciones, la capa promotora de adhesión es una capa adhesiva de contacto. La capa promotora de adhesión se selecciona de modo que tenga las mismas propiedades de transmisión de luz y no fluorescentes que se han descrito arriba para el film de soporte.

El film de soporte es suficientemente rígido para ser dimensionalmente estable durante el recubrimiento, el 35 dimensionamiento (por ejemplo, corte a troquel), y la colocación en un dispositivo. Por "dimensionalmente estable" se entiende que el film de soporte mantiene su forma y sus dimensiones en el interior de aproximadamente 5%, con preferencia en el interior de aproximadamente 1%, de las dimensiones de los films de soporte antes del recubrimiento.

Para algunas realizaciones, que incluyen una cualquiera de las realizaciones anteriores, preferiblemente el film de 40 soporte es sustancialmente insoluble en agua. Sustancialmente insoluble significa que se pierde menos de 10%, 5%, 1%, 0,1%, o 0,01% en peso del film de soporte. El film de soporte es sustancialmente insoluble en agua a una temperatura que puede llegar hasta la temperatura ambiente, a una temperatura hasta 60°C, o una temperatura hasta 100°C. Con preferencia, menos de 0,01% en peso se pierde a una temperatura hasta 97°C. Esta propiedad evita que cantidades excesivas de materiales superfluos o interferentes pasen a la mixtura de reacción en la cual 45 debe funcionar el reactivo. El film de soporte es inerte con respecto al reactivo contenido en la capa de reactivo, y no interfiere apreciablemente con la función del reactivo.

Para algunas realizaciones, que incluyen una cualquiera de las realizaciones anteriores, el film de soporte es un film 50 de fluorescencia baja constituido por un polímero seleccionado del grupo constituido por un poliéster, un policarbonato, un polipropileno, un polietileno, un poli(acetato de vinilo), un poli(acrilato), un poli(metacrilato), y una combinación de los mismos. Para algunas de estas realizaciones, el film de soporte está constituido por polipropileno orientado, poliéster, o poliolefina.

En una realización alternativa, el film de soporte puede ser una hoja metálica recubierta con adhesivo. La hoja 55 metálica puede ser no magnética, tal como una hoja de aluminio o cobre. El adhesivo puede prevenir que el metal o metales en la hoja interfieran con o contaminen la capa de reactivo. El adhesivo puede aumentar también la adhesión de la capa de reactivo a la hoja metálica. El adhesivo puede ser un adhesivo de fluorescencia baja para minimizar la interferencia con la detección.

El film de fluorescencia baja y el adhesivo de fluorescencia baja mencionados anteriormente no emiten fluorescencia apreciablemente o no emiten fluorescencia a las longitudes de onda utilizadas para la detección.

- El film de soporte puede estar recubierto con una solución, lechada, suspensión, o análogas, que contiene el al menos un reactivo, utilizando una diversidad de métodos de recubrimiento conocidos, seguido por eliminación de una porción, por ejemplo, al menos 50%, 75%, 90%, 99%, o la totalidad del disolvente o fluido utilizado para la lechada, suspensión o análoga a fin de formar la capa de reactivo. La capa de reactivo que se aplica sobre el film de soporte puede depositarse con utilización mínima de aditivos que serían necesarios en caso contrario para producir una capa mecánica y químicamente estable. Dado que tales aditivos pueden interferir potencialmente con los métodos de preparación, amplificación o detección de la muestra, la utilización de niveles reducidos de estos aditivos puede ser ventajosa para la realización de estos métodos.
- Métodos de secado tales como liofilización, secado a vacío, y secado con aire (o gas inerte) a la temperatura ambiente o a una temperatura elevada, tales como secado con aire forzado, puede utilizarse para eliminar el disolvente o fluido después del recubrimiento. El disolvente o fluido es preferiblemente agua. Métodos de recubrimiento conocidos incluyen recubrimiento en matriz, recubrimiento con rodillo, recubrimiento con rodillo inverso, recubrimiento con varilla de alambre envuelta, pulverización, recubrimiento por puntos, y análogos.
- El recubrimiento por puntos incluye la dosificación de un punto de un tamaño que incluye reactivo suficiente para la realización de una reacción deseada en una cámara. Un chorro de tinta, una pipeta, o medios similares pueden utilizarse para dosificar el punto en cualquiera de una gran diversidad de cantidades, formas, y configuraciones. El punto puede dosificarse como un líquido o un sólido, tal como un polvo o un sólido granular. El sólido en polvo o granular puede compactarse sobre el film de soporte, por ejemplo, por compactación con rodillo.
- La forma y/o configuración de la capa de reactivo producida por recubrimiento por puntos pueden verse influenciadas por tratamiento previo de la superficie del film de soporte. Tratamientos tales como plasma, deposición química de vapores, estampación o recubrimiento pueden utilizarse para modificar las características de mojado del film de soporte o controlar de otro modo el área total y la forma del área recubierta por el punto durante el recubrimiento y el secado.
- Para algunas realizaciones, que incluyen una cualquiera de las realizaciones anteriores, el film de soporte recubierto con la capa de reactivo tiene un espesor no mayor que aproximadamente 250 μ , 200 μ , 150 μ , 100 μ , o 50 μ , y en donde el espesor incluye a la vez el film de soporte y la capa de reactivo. Para algunas de estas realizaciones, el espesor es al menos aproximadamente 10 μ , 20 μ , 25 μ , o 50 μ . Para algunas de estas realizaciones, la capa de reactivo tiene un espesor no mayor que aproximadamente 50 μ , 25 μ , 20 μ , 15 μ , 10 μ , 5 μ , o 1 μ . Para algunas de estas realizaciones, la capa de reactivo tiene un espesor de hasta aproximadamente 50 μ , por ejemplo, cuando la capa de reactivo incluye microesferas o cuentas.
- El dimensionamiento del film de soporte recubierto con la capa de reactivo (por dimensionamiento de la capa de reactivo o de la capa de reactivo y el film de soporte) para adaptarse en el interior de al menos una cámara del dispositivo para procesamiento del material de muestra puede realizarse por una diversidad de métodos. Por ejemplo, una matriz de regla, un cúter de matriz rotativa, o un punzón pueden fabricarse y utilizarse para cortar el film de soporte recubierto en piezas dimensionadas para adaptarse en el interior de la al menos una cámara. En otro ejemplo, una hoja de film de soporte recubierto puede cortarse o rasgarse en tiras en una sola dirección. Piezas individuales, dimensionadas como anteriormente, pueden cortarse luego de cada tira, dividiendo así en dados el film de soporte recubierto. En otro ejemplo, una hoja de film de soporte recubierto puede marcarse en tiras en una dirección y rasgarse en tiras en una dirección cruzada. Piezas individuales, dimensionadas como anteriormente, pueden cortarse o desprenderse luego fácilmente de las tiras resultantes en las líneas de marcación. El tamaño de la pieza puede determinarse y establecerse ulteriormente para proporcionar una cantidad predeterminada de un reactivo. Por ejemplo, con una cantidad conocida de reactivo en un área dada de la capa de reactivo, puede determinarse y utilizarse el tamaño requerido para una cantidad particular o predeterminada de reactivo. Una cantidad predeterminada de reactivo es una cantidad de reactivo suficiente para llevar a cabo un paso o proporcionar condiciones para realización de un paso asociado con la preparación de la muestra, la amplificación de ácido nucleico, detección o una combinación de las mismas.
- La capa de reactivo puede dimensionarse también utilizando el recubrimiento por puntos arriba descrito, proporcionando con ello una cantidad predeterminada de un reactivo en un área definida sobre el film de soporte. Por ejemplo, la solución, lechada, suspensión, o análogas que contiene el al menos un reactivo puede dosificarse en localizaciones discretas sobre el film de soporte. Después del secado, los puntos o áreas resultantes que contienen el al menos un reactivo pueden cortarse individualmente por corte del film de soporte circundante para adaptarlo en el interior de una cámara. Alternativamente, el punto o área que contiene el al menos un reactivo puede dimensionarse no sólo para proporcionar una cantidad predeterminada del al menos un reactivo, sino también para adaptarlo en el interior de una abertura en una cámara, de tal modo que la capa de reactivo esté en el interior de la cámara mientras el film de soporte, aunque no se encuentra en el interior de la cámara, puede formar una superficie interior de la cámara en la abertura. Para algunas realizaciones, con inclusión de una cualquiera de las realizaciones anteriores, el film de soporte recubierto con la capa de reactivo se dimensiona ulteriormente para proporcionar una cantidad predeterminada de al menos un reactivo.
- Para algunas realizaciones, con inclusión de una cualquiera de las realizaciones anteriores de un método que incluye proporcionar y dimensionar el film de soporte recubierto con la capa de reactivo, el método comprende

adicionalmente adherir el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de aditivo a una hoja. En tales realizaciones, la superficie mayor del film de soporte, que no está recubierta con la capa de reactivo, puede adherirse a la hoja. La hoja puede ser la misma que o diferente del film de soporte. La hoja puede ser un film de polímero, una hoja metálica, una combinación de las mismas, o análoga. La hoja puede estar constituida por una sola capa o capas múltiples. La hoja puede incluir una capa adhesiva.

Un adhesivo de contacto, adhesivo termofusible, adhesivo termoendurecible, unión térmica, carga estática, u otros medios similares pueden utilizarse para adherir el film de soporte a la hoja. El grado en que el film de soporte se adhiera a la hoja puede controlarse, a fin de que el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo pueda desprenderse del film u hoja para posicionamiento en una cámara de reacción, o el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo adherida al film u hoja pueden utilizarse en combinación. En el último caso, la hoja puede definir una porción de la cámara con el film de soporte recubierto con la capa de reactivo posicionada en el interior de la cámara.

La al menos una cámara del dispositivo para procesamiento del material muestra puede ser, por ejemplo, un tubo de microcentrifuga, una cubeta, una microcubeta, un pocillo, un micropocillo, o análogos. La cámara puede estar equipada con o sin una abertura, con o sin un canal de entrada, y con o sin un canal de salida. La cámara puede servir como depósito para adición de un reactivo a una corriente fluida, o la cámara puede ser un sitio en el que tiene lugar una acción tal como mezclado, lavado, extracción, reacción, y/o análogas.

La capa de reactivo está dimensionada para ajustarse en el interior de la cámara. Para algunas realizaciones, una porción de una superficie mayor del film de soporte se recubre con la capa de reactivo, y el área del film de soporte que está recubierta con la capa de reactivo se dimensiona para adaptarse en el interior de la cámara. Para algunas de estas realizaciones, el film de soporte, con inclusión del área del film de soporte que está recubierta con la capa de reactivo y un área del film de soporte que no está recubierta con la capa de reactivo, está dimensionado para adaptarse en el interior de la cámara. Las dimensiones de la capa de reactivo o la capa de reactivo y el film de soporte son menores que las dimensiones correspondientes de la cámara, dejando espacio entre las paredes de la cámara y los bordes y superficies mayores de la capa de reactivo dimensionada o la capa de reactivo y el film de soporte. Esto permite una colocación fácil de la capa de reactivo dimensionada en el interior de la cámara sin quedar atrapada o colgada en las paredes de la cámara durante el posicionamiento. Esto deja también espacio adicional en el interior de la cámara para un fluido, tal como un fluido acuoso que contiene un material muestra o un componente de un material muestra.

Por tanto, el fluido puede moverse rápidamente en la cámara, cubrir por completo o estar en contacto con la capa total de reactivo, y experimentar mezclado fluido con el o los reactivos en la capa de reactivo, disolución, dispersión, o suspensión del o de los reactivos en la capa de reactivo.

El dispositivo para procesamiento del material muestra puede proporcionar una localización o localizaciones y condiciones para uno cualquiera o la totalidad de los pasos de una técnica de manipulación de polinucleótidos o ácidos nucleicos o procesamiento de proteínas, con inclusión de los pasos de preparación y detección de la muestra. El dispositivo para procesamiento del material de muestra puede proporcionar una localización o localizaciones y condiciones para uno cualquiera o la totalidad de los pasos de preparación de la muestra, amplificación del ácido nucleico, y detección. El material muestra puede estar localizado en una o una pluralidad de cámaras. El dispositivo puede proporcionar control uniforme y exacto de la temperatura de la cámara o cámaras. El dispositivo puede proporcionar canales entre cámaras, por ejemplo, de tal modo que la preparación de la muestra pueda tener lugar en una o más cámaras, y la amplificación y detección del ácido nucleico puede tener lugar en otra cámara. Para algunas realizaciones, que incluyen una cualquiera de las realizaciones anteriores, la al menos una cámara capaz de contener o canalizar un fluido está en el interior de un dispositivo microfluídico. Para algunas realizaciones, con inclusión de una cualquiera de las realizaciones anteriores que incluyen el dispositivo para procesamiento del material muestra, el dispositivo para procesamiento del material muestra es un dispositivo microfluídico. Algunos ejemplos de dispositivos microfluídicos se describen en los números de publicación U.S. 2002/0064885 (Bedingham et al.); US2002/0048533 (Bedingham et al.); US2002/0047003 (Bedingham et al.); y US2003/138779 (Parthasarathy et al.); así como en las Patentes U.S. Núms. 6.627.159; 6.720.187; 6.734.401; 6.814.935; 6.987.253; 7.026.168. y 7.164.107.

Un dispositivo ilustrativo para procesamiento de material muestra es el dispositivo microfluídico representado en las Figuras 2, 3, y 4. El dispositivo 10 puede tener la forma de un disco circular como se ilustra en la Figura 2, aunque pueden utilizarse otras formas. Formas preferidas son aquéllas que pueden dotarse de movimiento giratorio. El dispositivo 10 de las Figuras 2, 3, y 4 está constituido por capas múltiples, que incluyen un sustrato 20, una primera capa 30 y una segunda capa 40 (como se muestra en la Figura 4).

El dispositivo 10 incluye una pluralidad de cámaras 50, cada una de las cuales define un volumen para contener un fluido. El dispositivo ilustrado 10 de la Figura 2 incluye noventa y seis cámaras 50, aunque el número de cámaras puede ser tan pequeño como 1 o mayor que 96.

Las cámaras 50 se muestran en la forma de una cámara que puede contener un fluido, aunque las cámaras 50 pueden tener una forma que canaliza un fluido (v.g., capilares, conductos de paso, canales, surcos), es decir, permite que el fluido pase a través de la cámara.

5 El sustrato 20, la primera capa 30 y la segunda capa 40 están unidos o fijados preferiblemente unos a otros para contener un fluido (v.g., un fluido acuoso) sin pérdida del fluido a través de la unión o fijación entre el sustrato 20 y la primera capa 30 o la segunda capa 40. La unión o fijación puede ser, por ejemplo, un adhesivo de contacto, adhesivo termofusible, adhesivo termoendurecible, o una unión térmica. En la Figura 4, la capa opcional 32 puede unir la primera capa 30 al sustrato 20, y la capa adhesiva opcional 44 puede unir la segunda capa 40 al filtro 20.

10 Las Figuras 2, 3, y 4 ilustran también un film de soporte dimensionado recubierto con una capa de reactivo 100 localizada en el interior de la o las cámaras de proceso 50. El film de soporte dimensionado recubierto con una capa de reactivo 100 se ilustra en la forma de un triángulo. Sin embargo, puede utilizarse cualquier forma conveniente, de tal modo que el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo 100 deje un espacio suficiente entre los bordes del film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo 100 y las paredes de la cámara para colocación fácil totalmente en el interior de la cámara, y un fluido pueda estar fácilmente en contacto con toda la superficie de la capa de reactivo 110. Además, aunque las Figuras 2, 3 y 4 muestran un film de soporte dimensionado recubierto con una capa de reactivo 100 en el interior de la o las cámaras de proceso 50, más de un film de soporte dimensionado recubierto con una capa de reactivo 100 puede encontrarse en el interior de la o las cámaras de proceso 50. Cada capa de reactivo 100 puede contener un reactivo diferente o una combinación de reactivos diferentes.

20 La Figura 2 ilustra la totalidad de las cámaras 50 que tienen un film de soporte dimensionado recubierto con una capa de reactivo 100 en el interior de las cámaras 50. Sin embargo, al menos una pero menos de la totalidad de las cámaras 50 pueden tener un film de soporte dimensionado recubierto con una capa de reactivo 100. Cada film de soporte dimensionado recubierto con una capa de reactivo 100 puede contener los mismos reactivos, algunos pueden contener el mismo reactivo o juego de reactivos mientras que otros contienen un reactivo o juego de reactivos diferentes, o cada uno puede contener un reactivo o juego de reactivos diferentes.

30 La Figura 4 ilustra el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo 100 en contacto con la primera capa 30, aunque el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo 100 puede estar situado en la cámara 50 de tal modo que esté en contacto con una cualquiera de las paredes de la cámara 50, con inclusión de la segunda capa 40. El film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo 100 puede estar adherido a una de las paredes de la cámara 50 por una capa adhesiva opcional 130 proporcionada en la superficie mayor del film de soporte 120 opuesta a la superficie mayor del film de soporte 120 que tiene la cámara de reactivo 110 sobre él. En lugar de o además de la capa adhesiva opcional 130, la capa opcional 32 puede ser una capa adhesiva que puede adherir el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo 100 a la primera capa 30. En otra alternativa, en lugar de o además de la capa adhesiva 130, una capa adhesiva opcional 44 puede adherir el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo 100 a la segunda capa 40. La capa opcional 32, la capa adhesiva opcional 44, y la capa adhesiva opcional 130 pueden ser un adhesivo de contacto, adhesivo termofusible, adhesivo termoendurecible, o unión térmica. Para algunas realizaciones, una cualquiera o la totalidad de estas capas son preferiblemente un adhesivo de contacto.

40 En el dispositivo ilustrado 10 de las Figuras 2, 3 y 4, las cámaras 50 están en comunicación fluida con canales 60 que están también en comunicación fluida con la cámara de suministro 62. La cámara de suministro 62 puede suministrar un fluido (v.g., un material de muestra, un tampón, o análogos) a canales 60 y cámaras 50. El canal 60 está formado en el sustrato 20. En la Figura 4, el canal 60 está confinado por la capa 40, aunque el canal 60 puede encontrarse en lugar de ello en el lado opuesto del sustrato 20 y estar confinado por la capa 30.

45 En el dispositivo 10 que se ilustra en la Figura 2, la cámara de suministro 62 está dividida en dos subcámaras 64 que están aisladas una de otra. Esto permite que un material diferente, por ejemplo un material de muestra o un tampón, se introduzca en cada subcámara 64 para distribución a las cámaras 50 por medio de canales 60. Aunque en la Figura 2 se muestran dos subcámaras 64, puede no existir ninguna subcámara 64 o pueden existir más de 2 subcámaras 64, por ejemplo, tantas subcámaras como canales 60.

50 En el dispositivo ilustrado de la Figura 4, una primera capa 30 está provista en un lado del sustrato 20 e incluye una capa 34. La capa 34 puede estar constituida por una sola capa o por capas múltiples, puede ser un film de polímero tal como se describe en esta memoria para el film de soporte, puede ser una capa metálica, o una combinación de un film de polímero y una capa metálica. Cuando la capa 34 es una capa metálica, puede estar presente una capa opcional 32 para separar la cámara 50 del metal de la capa metálica.

55 En el dispositivo que se ilustra en la Figura 4, está provista de una segunda capa 40 en un lado del sustrato 20 e incluye una capa 42. La capa 42 puede estar constituida por una sola capa o capas múltiples, puede ser un film de polímero tal como se describe en esta memoria para el film de soporte, puede ser una capa metálica, o una combinación de un film de polímero y una capa metálica. Cuando la capa 42 es una capa metálica, puede estar presente una capa opcional 44 para separar la cámara 50 del metal de la capa metálica, y la capa 34 es preferiblemente distinta de una capa metálica, proporcionando con ello la capacidad de detectar fluorescencia a

través de la capa 34. La capa 42 es preferiblemente distinta de una capa metálica, y puede proporcionar la capacidad de detectar la fluorescencia a través de la capa 42.

5 Las Figuras 5 y 6 ilustran una red de capas de reactivo soportado 500 que tienen una pluralidad de films de soporte dimensionados recubiertos con la capa de reactivo 100 adherida a una hoja 35. La hoja 35 puede utilizarse para la primera capa 30 o la segunda capa 40 representada en la Figura 4. La hoja 35 puede tener la forma de un disco circular como se ilustra en la Figura 5, aunque pueden utilizarse otras formas. Formas preferidas son aquéllas que pueden utilizarse para primera capa 30 o segunda capa 40 en un dispositivo tal como el dispositivo 10, una realización del cual se ilustra en la Figura 2. Cada uno de los films de soporte dimensionados recubiertos con la capa de reactivo 100 adherida a la hoja 35 están posicionados para adaptarse en el interior de una cámara 50 cuando se utiliza la hoja 35 para la primera capa 30 o la segunda capa 40 del dispositivo 10 como se muestra, por ejemplo, en la Figura 4. La hoja 35 puede ser como se describe anteriormente para la capa 30.

10 Un film de soporte simple dimensionado recubierto con la capa de reactivo 100 en la red 500 se ilustra en la Figura 6. La hoja 35, la capa 34, la capa opcional 32, la capa adhesiva opcional 130, el film de soporte 120, la capa de reactivo 110, y el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo 100 son como se ha descrito arriba.

En los dispositivos ilustrados que se muestran en las Figuras 4 y 6, puede incluirse una capa opcional promotora de adhesión 140 entre la capa de reactivo 110 y el film de soporte 120.

20 En la Figura 7, un film de soporte recubierto con una capa de reactivo 200 se ilustra en la forma de un cuadrado o rectángulo, aunque pueden utilizarse otras formas. La capa de reactivo 210 cubre una superficie mayor del film de soporte 220. El film de soporte recubierto con la capa de reactivo 200 puede estar dimensionado para adaptarse en el interior de una cámara 50 representada en las Figuras 2, 3 y 4 o puede comprender un área suficientemente grande para producir cierto número de films de soporte dimensionados recubiertos con la capa de reactivo, tales como el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo 100 representada en las Figuras 2, 3, y 4.

25 En la Figura 8, se ilustra un film de soporte alternativo recubierto con una capa de reactivo 300, en donde la capa de reactivo 310 no cubre una superficie mayor completa del film de soporte 320. La capa de reactivo 310 puede aplicarse como recubrimiento sobre el film de soporte 320 mediante recubrimiento por puntos como se describe en esta memoria a fin de proporcionar una cantidad predeterminada de al menos un reactivo en la capa de reactivo 310, que está dimensionada para adaptarse en el interior de una cámara, tal como la cámara 50 en la Figura 2, 3, y 4, o la cámara 55 en la Figura 10. El film de soporte recubierto con la capa de reactivo 300 se ilustra con el film de soporte 320 en la forma de un cuadrado o rectángulo y la capa de reactivo 310 en la forma de un disco circular. Sin embargo, pueden utilizarse otras formas para la capa de soporte 320 y la capa de reactivo 310. La capa de reactivo 310 cubre una porción de una superficie mayor del film de soporte 320. El film de soporte recubierto con la capa adhesiva 300, ilustrada con una sola capa de reactivo 310, puede estar dimensionado para adaptarse en el interior de una cámara 50 representada en las Figuras 2, 3, y 4 por dimensionamiento de la capa de soporte 320. El film de soporte dimensionado resultante recubierto con la capa de reactivo 300 puede estar situado en una cámara de manera análoga a la representada en las Figuras 2, 3, y 4. De acuerdo con la invención, el film de soporte recubierto con la capa de reactivo 300 puede estar situado sobre una abertura de una cámara 55 como se muestra en la Figura 10, con la capa de reactivo dimensionada 310 en el interior de la cámara 55, y el film de soporte 320 está dimensionado para solaparse con la abertura a la cámara 55 y en contacto con el sustrato 20 como se muestra en la Figura 10. Para algunas de estas realizaciones, el film de soporte 320 cierra herméticamente la abertura. En la Figura 10, la abertura, en la cual está situada la capa de reactivo dimensionada 310, como se ilustra, tiene dimensiones más pequeñas que la porción remanente de la cámara 55. Sin embargo, la abertura puede tener la misma dimensión que la cámara, o incluso tener dimensiones mayores que la cámara.

35 En un film de soporte alternativo recubierto con una capa de reactivo 300, el film de soporte 320 puede comprender un área suficientemente grande para incluir una pluralidad de capas de reactivo 310, dimensionada cada una para adaptarse en el interior de una cámara. Por ejemplo, el film de soporte 320 puede estar aplicado por puntos en una pluralidad de localizaciones sobre el film de soporte 320 para proporcionar una red de capas de reactivo 310 sobre el film de soporte 320. La red de capas de reactivo 310 sobre el film de soporte 320 puede estar combinada con una red de cámaras 55, una de las cuales se muestra en la Figura 10, para proporcionar una cámara de reactivo 310 o una pluralidad de cámaras de reactivo 310 en cada cámara 55. En el caso en que existen una pluralidad de capas de reactivo 310, cada una puede contener un reactivo diferente o una combinación de reactivos diferentes.

45 Un film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo puede estar provisto también por la red para uso en una cámara como se ha descrito arriba por corte del film de soporte 320 alrededor de una capa de reactivo 310 y posicionamiento del film de soporte dimensionado resultado recubierto con la capa de reactivo en la cámara.

55 Alternativamente, un film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo 301 puede estar adherido a una hoja como se ilustra en la Figura 9, en donde o bien la capa adhesiva opcional 330, la capa opcional 332, o ambas adhieren el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo 301 a la hoja 35. La hoja 35, y las capas 32 y 34 pueden ser como se ha descrito arriba. La capa adhesiva opcional 330 puede ser como se ha descrito arriba para la capa adhesiva opcional 130. Una pluralidad de los films de soporte dimensionados recubiertos

con la capa de reactivo 301 pueden adherirse a la hoja 35, y estar posicionados cada uno para adaptarse en el interior de una cámara 50 cuando se utiliza la hoja 35 para la primera capa 30 o la segunda capa 40 del dispositivo 10 como se muestra, por ejemplo, en la Figura 4.

5 Como se ha mencionado arriba, en la realización de la invención ilustrada de la Figura 10, el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo como se describe en la Figura 8 está situado sobre una abertura de una cámara 55 con la capa de reactivo 310 en el interior de la cámara 55. El film de soporte 320 está dimensionado para solapar la abertura a la cámara 55 y en contacto con el sustrato 20. Una hoja protectora opcional 350 puede utilizarse para cubrir la superficie expuesta en caso contrario del film de soporte 320 a fin de prevenir el aflojamiento del cierre hermético entre el film de soporte 320 y el sustrato 20. La hoja protectora 350 puede estar unida o fijada al sustrato 350 y opcionalmente al film de soporte 320 mediante, por ejemplo, un adhesivo de contacto, adhesivo termofusible, adhesivo termoendurecible, o una unión térmica. La hoja protectora 350 puede ser la misma que la hoja 35 en las Figuras 6 y 9, por ejemplo, un film de polímero con una capa adhesiva de contacto. La capa 42, la capa opcional 44, y el canal 60 son como se define para la Figura 4.

15 La capa adhesiva opcional 340 en las Figuras 8, 9 y 10 puede ser un adhesivo de contacto. Cuando está presente una capa adhesiva 340, el film de soporte 320 puede ser una hoja metálica, por ejemplo, una lámina delgada de aluminio.

20 Para algunas realizaciones, que incluyen una cualquiera de las realizaciones anteriores en las que se incluye el posicionamiento de la porción de la capa de reactivo del film de soporte recubierto con la capa de reactivo en el interior de la al menos una cámara, el film de soporte recubierto con la capa de reactivo está dispuesto en el interior de la al menos una cámara por contacto del film de soporte recubierto con la capa de reactivo con la punta de un tubo, desplazando el film de soporte recubierto con la capa de reactivo soportada en la punta del tubo hacia la al menos una cámara, y posicionando el film de soporte recubierto con la capa de reactivo o la porción de la capa de reactivo del film de soporte recubierto con la capa de reactivo en el interior de la al menos una cámara. Para algunas de estas realizaciones, el film de soporte recubierto con la capa de reactivo está preferiblemente dimensionado. La punta del tubo puede tener un área menor que una superficie mayor del film de soporte recubierto con la capa de reactivo. El film de soporte recubierto con la capa de reactivo puede mantenerse en la punta del tubo mediante, por ejemplo, una carga electrostática, un adhesivo de contacto, o un vacío suministrado por el tubo (retención por vacío). El tubo puede ser una pipeta, por ejemplo, una pipeta de plástico. El film de soporte recubierto con la capa de reactivo está posicionado en el interior de la al menos una cámara a fin de permitir completar la cobertura completa de la capa de reactivo por un fluido cuando se suministra a la al menos una cámara. El film de soporte recubierto con la capa de reactivo puede desprenderse de la punta del tubo mediante, por ejemplo, reducción de la carga electrostática, atracción a una carga electrostática en el interior de la cámara, puesta en contacto con un adhesivo de contacto en el interior de la cámara, por contacto de un adhesivo de contacto en el film de soporte con una superficie de la cámara, reducción o eliminación del vacío suministrado por el tubo, o por aplicación de una presión positiva de gas a través del tubo.

35 Alternativamente, el film de soporte recubierto con la capa de reactivo puede situarse en el interior de la al menos una cámara aplicando a punzón un film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo fuera de un film de soporte mayor recubierto con la capa de reactivo y dejando que el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo caiga en el interior de la al menos una cámara. En otra alternativa, el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo puede direccionarse a la al menos una cámara por el punzón, una corriente de gas, o análogos.

40 Puede utilizarse un sistema de recogida-y-colocación para colocar el film de soporte recubierto con la capa de reactivo o la porción de la capa de reactivo del film de soporte recubierto con la capa de reactivo en el interior de la al menos una cámara. El film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo puede seleccionarse basándose en el o los reactivos en la capa de reactivo, y puede utilizarse un sistema de retención por vacío para la captura y posicionamiento del film de soporte dimensionado seleccionado recubierto con la capa de reactivo en una cámara seleccionada, seleccionándose la cámara sobre la base de la acción que tendrá lugar en la cámara. Métodos adicionales de recogida-y-colocación que pueden utilizarse se describen en WO 2008/134466.

50 La cámara puede permitir la mezcladura con un fluido para disolver, dispersar, o suspender más rápidamente en el fluido el o los reactivos en la capa de reactivo. Por ejemplo, la cámara puede estar en comunicación fluida con una segunda cámara que contenga un gas, tal como aire. Cuando el fluido se fuerza al interior de la segunda cámara el gas se comprime, forzando al menos una porción del fluido fuera de la segunda cámara. Véase la Publicación Internacional No. WO 2005/061084 A1 (Bedingham et al.). Este movimiento de fluido, que puede repetirse numerosas veces, da como resultado mezcladura. En otro ejemplo, el fluido en la cámara puede calentarse, causando corrientes de convección en el fluido que lleva a cabo la mezcladura. En otro ejemplo, el fluido en la cámara puede someterse a una fuerza g, causando un movimiento de rotación en el fluido que lleva a cabo la mezcladura.

60 Para ciertos dispositivos, con inclusión de uno cualquiera de los métodos anteriores que incluyen la colocación del film de soporte recubierto con la capa de reactivo en el interior de la al menos una cámara, o que incluyen uno cualquiera de los dispositivos anteriores en los que el film de soporte recubierto con la capa de reactivos está

5 contenido en el interior de al menos una cámara del dispositivo, el método comprende adicionalmente adherir el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo a una superficie de la al menos una cámara, o en el caso del dispositivo, el film de soporte recubierto con la capa de reactivo está adherido a una superficie de la al menos una cámara. En tales dispositivos, la superficie mayor del film de soporte, que no está recubierta con la capa de reactivo, está adherida a una superficie de la al menos una cámara. Un adhesivo de contacto, adhesivo termofusible, adhesivo termoendurecible, unión térmica, carga estática, u otros medios análogos pueden utilizarse para adherir el film de soporte a una superficie de la al menos una cámara. Como resultado, el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo puede mantenerse en su lugar en el interior de la cámara, de tal modo que puede accederse fácilmente a la capa de reactivo para despliegue de un reactivo. Los medios para adherir el film de soporte pueden seleccionarse basándose en las condiciones anticipadas para despliegue y utilización del reactivo. Por ejemplo, puede seleccionarse un adhesivo de contacto, que es eficaz en presencia de un ambiente acuoso. Una superficie de la al menos una cámara incluye cualquier superficie en el interior de la cámara, con inclusión de las paredes, el fondo, o la parte superior del interior de la cámara.

15 Para algunas realizaciones, que incluyen uno cualquiera de los métodos anteriores en los que se incluye la colocación del film de soporte recubierto con la capa de reactivo en el interior de la al menos una cámara, el método comprende además sellar parcialmente la al menos una cámara. El sellado parcial incluye la colocación de un film de cubierta, hoja, o capa sobre una abertura en el interior de la al menos una cámara mientras se deja una vía de acceso para el movimiento de un fluido en la al menos una cámara. El camino puede, por ejemplo, ser un canal conectado a la al menos una cámara o puede estar formado por perforación del film, hoja, o capa de cubierta con una pipeta u otro medio de dosificación. El sellado parcial puede equipar la al menos una cámara de tal manera que un fluido dirigido al interior de la cámara pueda poner en contacto la superficie entera de la capa de reactivo del film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo.

25 Para ciertos métodos alternativos en los que se incluye la colocación del film de soporte recubierto con la capa de reactivo en el interior de la al menos una cámara, excepto para realizaciones en las cuales la colocación se realiza de otro modo, el film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo se coloca en el interior de la al menos una cámara por 1) adhesión del film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo a una primera hoja, 2) posicionamiento del film de soporte dimensionado recubierto con la capa de reactivo en el interior de la al menos una cámara, en donde la al menos una cámara se encuentra en una primera superficie mayor de un sustrato, y 3) estratificación de la primera hoja a la primera superficie mayor del sustrato. Para algunos de estos dispositivos, la al menos una cámara en la primera superficie mayor del sustrato se extiende a través del sustrato hasta una segunda superficie mayor del sustrato. Algunos de estos métodos comprenden adicionalmente estratificar una segunda hoja a la segunda superficie mayor del sustrato. Esto puede sellar parcialmente la al menos una cámara como se ha descrito arriba. La hoja puede ser un film de polímero, por ejemplo, como se describe para el film de soporte, una hoja metálica, o análogas. La hoja puede incluir una capa adhesiva.

35 De acuerdo con la invención, la porción de la capa de reactivo del film de soporte recubierto con la capa de reactivo está dimensionada para adaptarse en el interior de y está situada en el interior de la al menos una cámara del dispositivo para procesamiento del material de muestra. La al menos una cámara del dispositivo para procesamiento del material de muestra incluye una abertura de la cámara, y el film de soporte recubierto con la capa de reactivo está situado sobre la abertura con la capa de reactivo dimensionada en el interior de la al menos una cámara. De acuerdo con la invención, el film de soporte solapa la abertura. Para algunas de estas realizaciones, el film de soporte sella la abertura.

45 Para algunas realizaciones, que incluyen una cualquiera de las realizaciones anteriores en las que se incluye la colocación de film de soporte recubierto con la capa de reactivo en el interior de la al menos una cámara, el paso de amplificación del ácido nucleico se lleva a cabo en la al menos una cámara, y en donde la capa de reactivo incluye una enzima de amplificación de ácido nucleico.

Para algunas realizaciones, con inclusión de una cualquiera de las realizaciones anteriores en las que se incluye la colocación del film de soporte recubierto con la capa de reactivo en el interior de la al menos una cámara, el fluido que disuelve, dispersa, o suspende el al menos un reactivo en la capa de reactivo seca comprende agua y al menos un ácido nucleico.

50 De acuerdo con la invención, la al menos una cámara se encuentra en el interior de un dispositivo microfluídico, y la capa de reactivo es una capa de reactivo seca. Para algunas realizaciones, preferiblemente la capa de reactivo seca contiene no más de 50% en peso de agua, basada en el peso total de la capa de reactivo seca. Para algunas realizaciones, la capa de reactivo seca contiene no más de 10%, 5% o 1% en peso de agua. Para algunas realizaciones, la capa de reactivo seca contiene no más de 1% de agua. Para algunas realizaciones, la capa de reactivo seca contiene 0% de agua. Después que la capa de reactivo se aplica sobre el film de soporte, la capa de reactivo puede secarse hasta peso constante. Por ejemplo, la capa de reactivo recubierta puede secarse durante un tiempo suficiente para que el peso de la capa de reactivo recubierta se mantenga esencialmente inalterado cuando se somete a las condiciones de secado durante un periodo de tiempo adicional, dando con ello como resultado una capa de reactivo seca.

Para algunas realizaciones, que incluyen una cualquiera de las realizaciones anteriores en las que está presente o se proporciona el film de soporte recubierto con la capa de reactivo, el film de soporte recubierto con la capa de reactivo está dimensionado para adaptarse en el interior de la al menos una cámara como se ha descrito arriba.

5 La capa adhesiva o el adhesivo de contacto mencionado en diversos lugares anteriores, puede seleccionarse de modo que sea capaz de soportar las fuerzas generadas durante el procesamiento de cualquier material de muestra y/o fluido en una cámara, v.g., las fuerzas desarrolladas durante la distribución, mezclado, procesamiento térmico, etc. del material y/o fluido de muestra. El adhesivo exhibe preferiblemente fluorescencia baja y es compatible con los procesos y materiales arriba descritos.

10 En algunas circunstancias pueden preferirse adhesivos que exhiben propiedades de contacto. Tales adhesivos pueden ser más susceptibles de producción en alto volumen de films de soporte recubiertos con capas de reactivo y dispositivos de procesamiento de muestras, dado que los mismos no implican típicamente los procesos de unión a temperatura elevada utilizados en la unión por fusión, ni presentan los problemas de manipulación inherentes en el uso de adhesivos líquidos, unión con disolvente, unión por ultrasonidos, y análogos.

15 Una técnica bien conocida para identificación de adhesivos de contacto es el criterio de Dahlquist. Este criterio define un adhesivo de contacto como un adhesivo que tiene una deformación por fluencia en 1 segundo mayor que $1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{dina}$ como se describe en *Handbook of Pressure Sensitive Adhesive Technology*, Donatas Satas (Ed.), 2ª edición, p. 172, Van Nostrand Reinhold, Nueva York, NY, 1989. Alternativamente, dado que el módulo es, en primera aproximación, la inversa de la deformación por fluencia, los adhesivos de contacto pueden definirse como adhesivos que tienen un módulo de Young menor que $1 \times 10^6 \text{ dinas/cm}^2$. Otro método bien conocido de
20 identificación de un adhesivo de contacto es que el mismo es agresivo y permanentemente pegajoso a la temperatura ambiente y se adhiere firmemente a una diversidad de superficies desemejantes después de simple contacto sin necesidad de una presión mayor que la del dedo o la mano, y que puede desprenderse de superficies lisas sin dejar un residuo como se describe en *Test Methods for Pressure Sensitive Adhesive Tapes*, Pressure Sensitive Tape Council, (1996). Otra definición adecuada de un adhesivo de contacto adecuado es que el mismo
25 tiene preferiblemente un módulo de almacenamiento a la temperatura ambiente dentro del área definida por puntos siguientes como se representan en un gráfico de módulo frente a frecuencia a 25°C: un intervalo de módulos de aproximadamente 2×10^5 a $4 \times 10^5 \text{ dinas/cm}^2$ a una frecuencia de aproximadamente 0,1 radián/segundo (0,017 Hz), y un intervalo de módulos de aproximadamente 2×10^6 a $8 \times 10^6 \text{ dinas/cm}^2$ a una frecuencia de aproximadamente
30 100 radianes/segundo (17 Hz) (por ejemplo, véase FIG. 8-16 en p. 173 of *Handbook of Pressure Sensitive Adhesive Technology*, Donatas Satas (Ed.), 2ª edición, Van Nostrand Rheinhold, Nueva York, 1989). Cualquiera de estos métodos de identificación de un adhesivo de contacto puede utilizarse para ayudar a identificar adhesivos de contacto potencialmente adecuados para uso en los métodos de la presente invención.

35 Puede preferirse que los aditivos de contacto utilizados en conexión con los films de soporte recubiertos con capas de reactivo y dispositivos de procesamiento de muestras de la presente invención incluyan materiales que aseguren que las propiedades del adhesivo no se vean afectadas desfavorablemente por el agua. Por ejemplo, el adhesivo de contacto no perderá preferiblemente adhesión, fuerza cohesiva, no se reblandecerá, no se hinchará, o no se opacificará en respuesta a la exposición al agua. Asimismo, el adhesivo de contacto no debería contener componente alguno que pueda ser extraído en agua durante el procesamiento de la muestra, comprometiendo así posiblemente la función del o de los reactivos.

40 Teniendo en cuenta estas consideraciones, puede preferirse que el adhesivo de contacto está compuesto de materiales hidrófobos. Como tal, puede ser preferible que el adhesivo de contacto esté compuesto de materiales de silicona. Es decir, el adhesivo de contacto puede seleccionarse de la clase de materiales adhesivos de contacto de silicona, basados en la combinación de polímeros de silicona y resinas adherentes, como se describen en, por ejemplo, "Silicone Pressure Sensitive Adhesives", *Handbook of Pressure Sensitive Adhesive Technology*, 3ª edición,
45 pp. 508 - 517. Los adhesivos de contacto de silicona son conocidos por su hidrofobicidad, su capacidad para soportar temperaturas elevadas, y su capacidad para unirse a una diversidad de superficies desemejantes.

La composición de los adhesivos de contacto se selecciona preferiblemente de modo que cumplan los requisitos severos de la presente invención. Algunas composiciones adecuadas pueden describirse en la Publicación Internacional WO 00/68336 titulada SILICONE ADHESIVES, ARTICLES, AND METHODS (Ko et al.).

50 Otras composiciones adecuadas pueden estar basadas en la familia de adhesivo de contactos basados en silicona-poliurea. Tales composiciones se describen en la Patente U.S. 5.461.134 (Leir et al.); la Patente U.S. 6.007.914 (Joseph et al.); la Publicación Internacional Núm. WO 96/35458 (y sus afines las Solicitudes de Patente U.S. Núms. de Serie 08/427.788 (presentada en 25 de abril 1995); 08/428.934 (presentada en 25 de abril 1995); 08/588.157 (presentada en 17 de enero 1996); y 08/588.159 (presentada en 17 de enero 1996); la Publicación Internacional
55 Núm. WO 96/34028 (y sus afines las Solicitudes de Patente U.S. Núms. de Serie 08/428.299 (presentada en 25 de abril 1995); 08/428.936 (presentada en 25 de abril 1995); 08/569.909 (presentada en 8 de diciembre 1995); y 08/569.877 (presentada en 8 de diciembre 1995)); y la Publicación Internacional Núm. WO 96/34029 (y sus afines las Solicitudes de Patente U.S. Núms. de Serie 08/428.735 (presentada en 25 de abril 1995) y 08/591.205 (presentada en 17 de enero 1996)).

- Tales adhesivos de contacto están basados en la combinación de polímeros silicona-poliurea y agentes de adherencia. Los agentes de adherencia pueden seleccionarse en el interior de las categorías de agentes de adherencia funcionales (reactivos) y no funcionales, según se desee. El nivel de agente o agentes de adherencia puede modificarse según se desee a fin de impartir la adherencia deseada a la composición adhesiva. Por ejemplo,
- 5 puede preferirse que la composición adhesiva de contacto sea un copolímero segmentado adherente de polidiorganosiloxano-oligourea que incluye (a) unidades polidiorganosiloxano blandas, unidades de residuo poliisocianato duras, en donde el residuo poliisocianato es el poliisocianato menos los grupos -NCO, opcionalmente, unidades poliamina orgánicas blandas y/o duras, en donde los residuos de unidades isocianato y unidades amina están conectados por enlaces urea; y (b) uno o más agentes de adherencia (v.g., resinas de silicato, etc.).
- 10 Adicionalmente, la capa adhesiva o el adhesivo de contacto utilizado con los films de soporte recubierto con capas de reactivo y dispositivos de procesamiento de la muestra de la presente invención puede ser un solo adhesivo de contacto o una combinación o mezcla de dos o más adhesivos de contacto. Las capas de contacto pueden ser resultado de procesos de recubrimiento con disolvente, estampación por serigrafía, estampación con rodillos, recubrimiento por extrusión en fusión, pulverización en fusión, recubrimiento en franjas, o estratificación, por
- 15 ejemplo. Una capa adhesiva puede tener una gran diversidad de espesores siempre que la misma exhiba las características y propiedades anteriores. La capa adhesiva puede ser continua y estar exenta de picaduras o porosidad, por ejemplo, cuando sirve como capa de pasivación.

- Debe entenderse que en cualquiera de las realizaciones descritas en esta memoria en las que un film de soporte recubierto con una capa de reactivo o la porción de la capa de reactivo del film de soporte recubierta con la capa de reactivo está situada en el interior o contenido en el interior de una cámara, una o una pluralidad de las porciones de la capa de reactivo de los films de soporte están situados o contenidos en el interior de la cámara. Cada capa de reactivo puede estar separada por un espacio de cualquier otra capa de reactivo que esté presente. Cada capa de reactivo que está presente puede contener un reactivo diferente o una combinación diferente de reactivos. La separación espacial de los reactivos puede proporcionar estabilidad incrementada durante el procesamiento, tal
- 20 como durante el secado y el almacenamiento de los reactivos. Por ejemplo, la separación de una enzima polimerasa de los cebadores puede impedir la formación de cebador dímero y otras reacciones indeseables. Adicionalmente, la separación espacial de los reactivos puede dar como resultado una resuspensión más rápida de cada reactivo. Además, la separación espacial de los reactivos puede permitir el control en cuanto al orden en el que se resuspenden y combinan los reactivos.
- 25
- 30 Objetos y ventajas de esta invención ilustran adicionalmente por los ejemplos que siguen, pero los materiales particulares y las cantidades de los mismos citados en estos ejemplos, así como otras condiciones y detalles, no deben interpretarse como indebidamente limitantes de esta invención.

EJEMPLOS

Ejemplo Comparativo 1

- 35 Films de Enzimas de Soporte

Se preparó una mezcla magistral acuosa homogénea excipiente/enzima por combinación de 20 µl de LightCycler® DNA Master HybProbe (Cat. No. 12158825001, Roche, Indianapolis, IN) y 40 µl de una solución acuosa que contenía 5% de poli(alcohol vinílico) (PVA, pm medio = 30.000-70.000, Cat. Núm. p-8136, Sigma Chemical Co.) y 10% p/v de sacarosa (Cat# S-0389, Sigma Chemical Co.) en un tubo Eppendorf de 1,6 ml. La solución ya

40 homogénea se agitó enérgicamente y se centrifugó.

Se utilizó revestimiento de liberación de silicona Loparex (Parte Núm. 11-0021-1098-6, Loparex Inc., Iowa City, IA) como el film de soporte para estos recubrimientos. El revestimiento se cortó en dos tiras que medían 12 mm x 5 mm. La formulación de enzimas (30 µl, suficiente para proporcionar enzima para 8 reacciones) se aplicó a mano uniformemente en forma de capa sobre la superficie mayor de las tiras que no tenía el recubrimiento de liberación de

45 silicona. Las tiras se dejaron secar al aire en un armario de secado filtrado con HEPA durante 2 horas. Las tiras se cortaron luego en piezas aproximadamente iguales de aproximadamente 1,5 mm de anchura x 5 mm de altura, para adaptarlas a los pocillos exteriores de un Dispositivo de Procesamiento de Muestras Fastman; en este caso, un disco de Arquitectura Abierta (OA). (Los dispositivos de procesamiento de muestras a que se hace referencia en la presente invención pueden ser similares a los descritos, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud de Patente US Núms. 2002/0064885 (Bedingham et al.); 2002/0048533 (Bedingham et al.); 2002/0047003 (Bedingham et al.); 2003/138779 (Parthasarathy et al.); la Patente U.S. Núm. 6.627.159 B1 (Bedingham et al.), y la Publicación Internacional Núm. WO 2005/061084 A1 (Bedingham et al.). Estos documentos dan a conocer una diversidad de construcciones diferentes de dispositivos de procesamiento de muestras que pueden utilizarse en la presente invención). El corte se realizó utilizando una cuchilla de afeitar sobre un bloque de aluminio, y la transferencia al

50 disco OA se realizó por pegado suave del film de soporte recubierto al extremo de una punta de pipeta de plástico seguido por colocación en el pocillo exterior del disco OA por puesta en contacto del material de revestimiento con la superficie adhesiva del pocillo. Se transfirieron al disco un total de 16 piezas. En la preparación para PCR, los pocillos exteriores se sellaron luego por estratificación a presión de un film de poliéster con un adhesivo al disco, utilizando una prensa hidráulica Carver (Modelo Núm. 3889. 1D10:A05, Carver, Inc., Wabash, IN).

55

Ejemplo Comparativo 2

PCR en Tiempo Real (RT-PCT)

Después que los films de soporte recubiertos con la capa de reactivos que contenía los reactivos PCR secos se pusieron en los pocillos exteriores de los radios en el disco OA como se muestra en la Figura 1, y los pocillos se sellaron como se describe en el Ejemplo 1, la enzima y otros componentes en el film de soporte se resuspendieron por mezcla en el disco utilizando velocidades alternantes entre 3.000 y 0 rpm durante 5 minutos. La mezcladura en el disco se realizó utilizando a la vez controles húmedos (reactivos no secados y sin film de soporte) y films soportados recubiertos con la capa de reactivos que contenía los reactivos PCR secos. Se utilizó cDNA (Clontech, Mountain View, CA) tanto con los controles húmedos como con los reactivos secos. Para los controles húmedos, se introdujeron 8 µl de la solución acuosa que contenía 5% de poli(alcohol vinílico) y 10% p/v de sacarosa más 2 µl de la sonda LightCycler® DNA Master Hyb en pocillos vacíos. Para los reactivos secados, se introdujo H₂O de grado PCR en los pocillos que contenían la capa de reactivo secada que contenía la enzima y otros componentes sobre el film de soporte. El H₂O se rehidrató luego y se resuspendió la enzima y los otros reactivos en los films en el interior de los pocillos. Los contenidos de cada pocillo, con inclusión tanto de juegos de control húmedo como de reactivos secados rehidratados se transfirieron luego a un capilar LightCycler y después de la adición de la solución especificada en la Tabla 1, se inició la PCR utilizando los parámetros de tiempo y temperatura especificados en la Tabla 2. Una serie de diluciones de 3 log de cDNA se utilizó para ilustrar el intervalo dinámico del ensayo, que oscilaba entre 20 ng/reacción y 0,2 ng/reacción. Una serie de diluciones al triple de cDNA se amplificó utilizando un ensayo que contenía cebadores h-HPRT y una sonda marcada con fluoresceína (Roche Applied Science).

A los dos juegos de capilares LightCycler (uno que contenía solución de enzima rehidratada, conteniendo el segundo la solución de enzima de control húmeda) se añadió una solución de 10 µl de los componentes que se muestran en la Tabla 1. Los ensayos RT-PCR se realizaron por duplicado de tres puntos de dilución de 20, 2, y 0,2 ng de cDNA.

Tabla 1. Lista de reactivos PCR.

Reagent	Volume (µL)
h-HPRT Detection Mix, 10x (Roche Applied Science)	2,0
25 mM MgCl ₂	4,0
20, 2, and 0.2 ng of cDNA (Clontech, Mountain View, CA)	4,0

Se realizó una serie de diluciones de control húmedas en los capilares LightCycler por adición de 10 µl de la mixtura de reacción anterior. Adicionalmente, se realizaron para cada una de las formulaciones dos reacciones de control sin molde (NTC). Las reacciones NTC contenían 4 µl de agua de grado PCR en lugar del DNA.

Después de cargar las mixturas anteriores en capilares, se inició luego el protocolo de termociclación y se recogieron datos de acuerdo con el programa de termociclación que se muestra a continuación en la Tabla 2, presentándose los resultados más adelante en la Tabla 3.

Tabla 2: Condiciones de la Termociclación en LightCycler

Number Of Cycles	Temperature(s) Within Each Cycle (°C)	Time (seconds)
1	95	60
45	95	0
	55	15*
	72	15

* Data was collected at this point in the cycle during each of the 45 cycles.

* Los datos se recogieron en este momento en el ciclo durante cada uno de los 45 ciclos.

Tabla 3: Valores Ct Tabulados que Comparan Films de Enzima Recubierta con Controles Húmedos. Los valores Ct se muestran para réplicas realizadas en cada condición.

Mezcla Magistral de Enzimas	Muestra de DNA (ng)	Valor Ct			
		Film de Enzima Recubierta	20	24,7	24,2
	2	27,5	27,9	27,8	27,1
	0,2	29,2	30,2	29,7	29,8
	20	24,1	24,0		
	2	26,9	26,8		
	0,2	30,6	31,3		

Ejemplo Comparativo 3

5 Composiciones de Estampación que Contienen Micropartículas Magnéticas

Un volumen de 10 ml de solución que contenía 10% en peso de sacarosa y 5% en peso de dextrano en tampón MES 0,2 M (pH 5,5 con 0,1% en peso de Triton X-100) se mezcló con tinte Azul Brillante de Bromocresol (5 mg) y micropartículas Ga(III) de 1 micrómetro (50 mg/ml de solución) a fin de proporcionar una composición para estampación. La composición se estampó utilizando una impresora BIODOT AD3200 BIOJET PLUS (Biodot Inc. Irvine, CA 92614). Se estampó una red de puntos a 2 µl/punto en el lado adhesivo de un film de PET recubierto con un adhesivo pegajoso de polímero silicona-poliurea, teniendo cada punto un diámetro de aproximadamente 2 mm y conteniendo aproximadamente 100 µg de partículas magnéticas. Los puntos se secaron al aire durante una noche. Todos los puntos eran de tamaño uniforme, y carecían totalmente de grietas o fisuras observables.

Preparación de las micropartículas Ga(III):

15 Se prepararon micropartículas magnéticas mediadas por iones metálicos, a partir de partículas magnéticas con grupos ácido carboxílico en la superficie y con un diámetro de aproximadamente 1 micrómetro (µ) (SERA-MAG Magnetic Particles from Thermo Scientific (conocido como Seradyn Indianapolis, IN), como se describe en WO 2008/134464. Las micropartículas magnéticas carboxiladas se pusieron en un tubo y se lavaron por atracción de las mismas hacia la pared del tubo utilizando un imán, retirada del líquido por aspiración, reemplazamiento del volumen de líquido con la solución de lavado, retirada del tubo del campo magnético, y agitación del tubo para resuspender las micropartículas.

25 Antes del tratamiento de los iones metálicos, las micropartículas magnéticas se lavaron dos veces con tampón MES 0,1 M, pH 5,5 (que contenía 0,1% TRITON X-100) y se resuspendieron luego en el mismo tampón. Después del paso de lavado, se añadieron 0,2 ml de nitrato de galio (III) 0,1 M en solución 0,01 M de HCl por miligramo de micropartículas magnéticas a la suspensión de micropartículas magnéticas. La mezcla se dejó agitar suavemente durante una hora a la temperatura ambiente y se lavó subsiguientemente con el tampón MES anterior a fin de eliminar el exceso de iones metálicos. Las micropartículas magnéticas resultantes mediadas por iones metálicos (micropartículas Ga(III)) se resuspendieron y se guardaron a 4°C en tampón MES.

REIVINDICACIONES

1. Un método de suministro de al menos un reactivo a un dispositivo para procesamiento de material de muestras, comprendiendo el método:
- proporcionar un film de soporte (320) con una capa de reactivo seca (310) que incluye el al menos un reactivo;
- 5 proporcionar un dispositivo microfluidico con al menos una cámara (55):
- disponer la porción de la capa de reactivo del film de soporte (320) recubierta con la capa de reactivo (310) en el interior de la al menos una cámara (55) del dispositivo para procesamiento de material de muestras, en donde la al menos una cámara (55) puede contener o canalizar un fluido; en donde la capa de reactivo (310) está dimensionada para adaptarla en el interior de la al menos una cámara (55) del dispositivo para procesamiento del material de muestra; y
- 10 en donde el al menos un reactivo se adapta en el interior de una abertura de la cámara (55), de tal modo que la capa de reactivo (310) está en el interior de la cámara (55) mientras que el film de soporte (320), aunque no se encuentra en el interior de la cámara (55), está dimensionado para solapar la abertura y forma una superficie interior de la cámara (55) en la abertura.
- 15 2. Un dispositivo para procesamiento de material de muestra, siendo el dispositivo un dispositivo microfluidico que tiene una pluralidad de cámaras (55) que pueden contener o canalizar un fluido, en donde una porción de capa de reactivo seca de un film de soporte (320) recubierto con la capa de reactivo seco (310) está dimensionada para adaptarse en el interior de y está contenida en el interior de al menos una cámara (55) del dispositivo, y caracterizado
- 20 porque la capa de reactivo (310) está adaptada en el interior de una abertura en la al menos una cámara (55), de tal modo que la capa de reactivo (310) está en el interior de la cámara (55) mientras que el film de soporte (320), aunque no en el interior de la cámara (55) está dimensionado para solapar la abertura y forma una superficie interior de la cámara (55) en la abertura.
3. El método de la reivindicación 1 o el dispositivo de la reivindicación 2, en donde la capa de reactivo seca (310) incluye al menos un reactivo que puede utilizarse en al menos uno de un paso de preparación de la muestra, un paso de amplificación de ácido nucleico, y un paso de detección en un proceso para detección o ensayo de un ácido nucleico.
- 25 4. El método de la reivindicación 3 o el dispositivo de la reivindicación 3, en donde el al menos un reactivo se selecciona del grupo constituido por un reactivo de lisis, un reactivo de digestión de proteínas, una enzima de amplificación de ácido nucleico, un oligonucleótido, una sonda, nucleótido-trifosfatos, un tampón, una sal, un agente tensioactivo, un tinte, un control de ácido nucleico, un agente reductor, dimetil-sulfóxido (DMSO), glicerol, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-*N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA), microesferas capaces de fijar un ácido nucleico, y una combinación de los mismos.
- 30 5. El método de la reivindicación 3 o el dispositivo de la reivindicación 3, en donde el al menos un reactivo se selecciona del grupo constituido por una enzima de amplificación de ácido nucleico, un cebador, una sonda, y microesferas capaces de fijar un ácido nucleico.
6. El método de la reivindicación 3 o el dispositivo de la reivindicación 3, en donde el al menos un reactivo es una enzima de amplificación de ácido nucleico.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6, o el dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde la capa de reactivo (310) incluye adicionalmente un material matriz seleccionado del grupo constituido por un polímero soluble en agua, un carbohidrato, y una combinación de los mismos.
- 40 8. El método de la reivindicación 7 o el dispositivo de la reivindicación 7, en donde el material matriz es un polímero soluble en agua.
9. El método de la reivindicación 7 o el dispositivo de la reivindicación 7, en donde el material matriz es un carbohidrato.
- 45 10. El método de la reivindicación 7 o el dispositivo de la reivindicación 7, en donde el material matriz es una combinación de un polímero soluble en agua y un carbohidrato.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7, 8, y 10 o el dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 7, 8 y 10, en donde el polímero soluble en agua se selecciona del grupo constituido por poli(alcohol vinílico), poli(acetato de alcohol vinílico) polivinilpirrolidona, y una combinación de los mismos.
- 50 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7, 9, 10, y 11 como dependiente de la reivindicación 10 o el dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 7, 9, 10, y 11 como dependiente de la reivindicación 10, en

donde el carbohidrato se selecciona del grupo constituido por sacarosa, dextrano, trehalosa, pululano, α -ciclodextrina, manitol, sorbitol, y una combinación de los mismos.

5 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 12, o el dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde el film de soporte (320) recubierto con la capa de reactivo seca (310) está dimensionado adicionalmente para proporcionar una cantidad predeterminada del al menos un reactivo.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 13, o el dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, en donde el film de soporte (320) es sustancialmente insoluble en agua.

10 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 13, o el dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, en donde el fluido puede disolver, dispersar, o suspender los reactivos en la capa de reactivo (310).

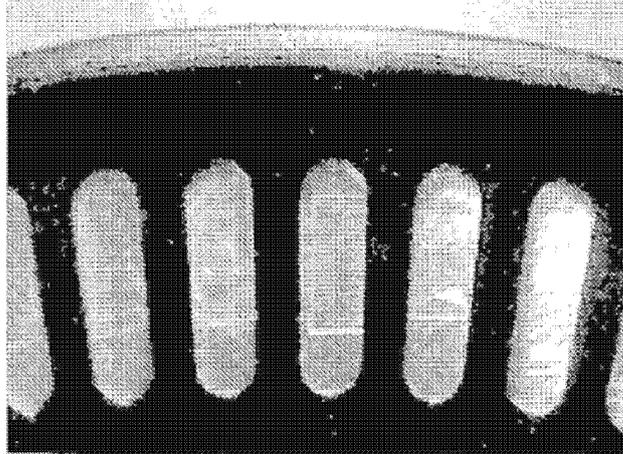


Fig. 1

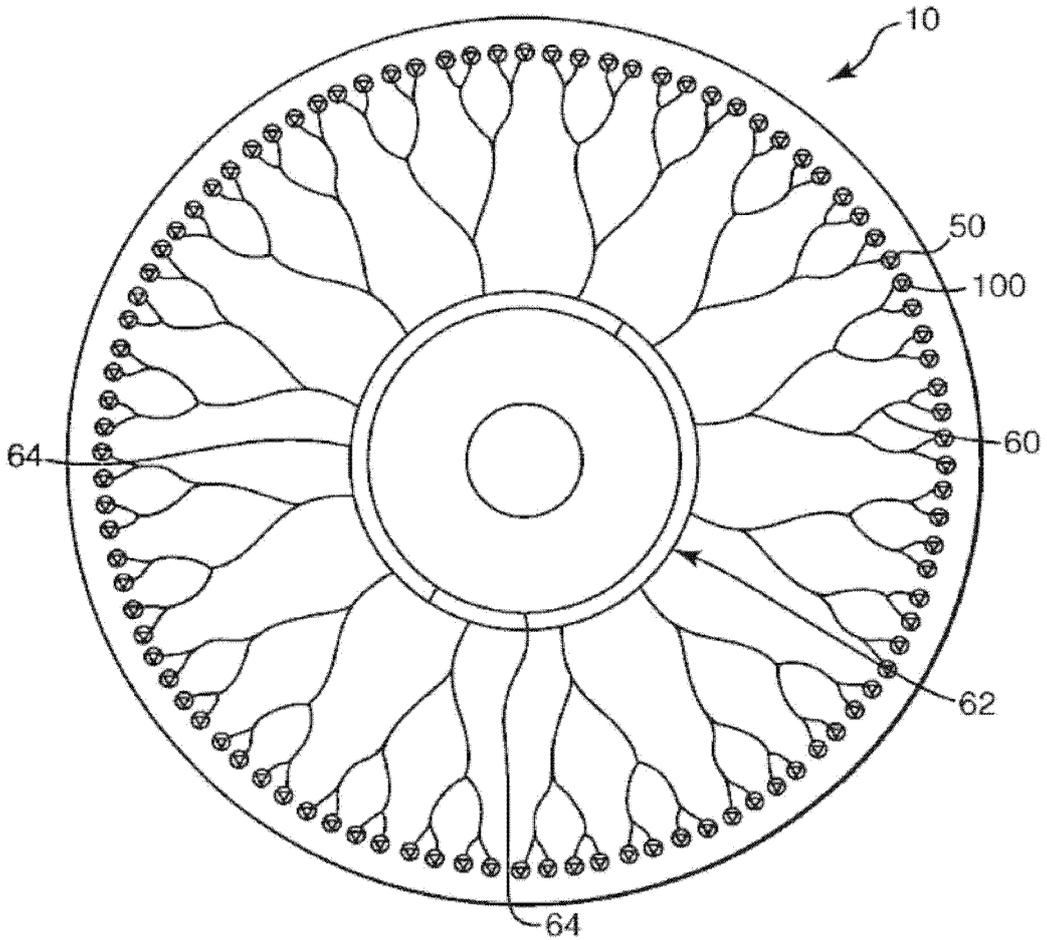


Fig. 2

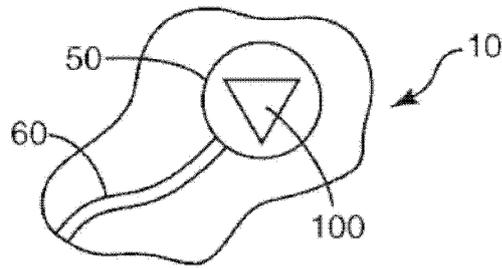


Fig. 3

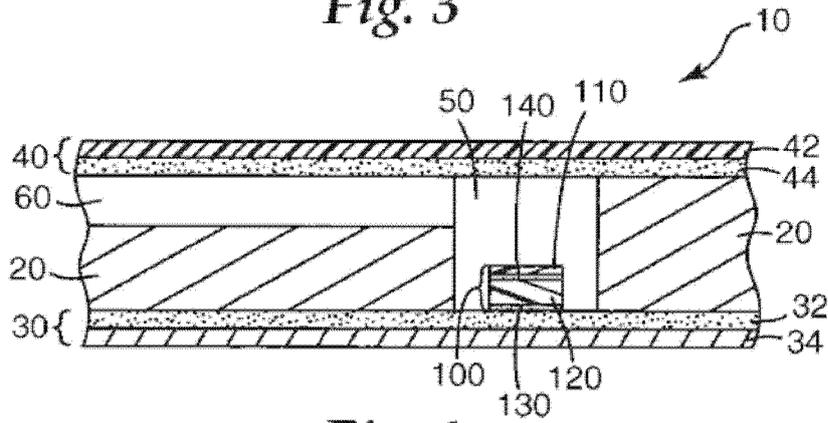


Fig. 4

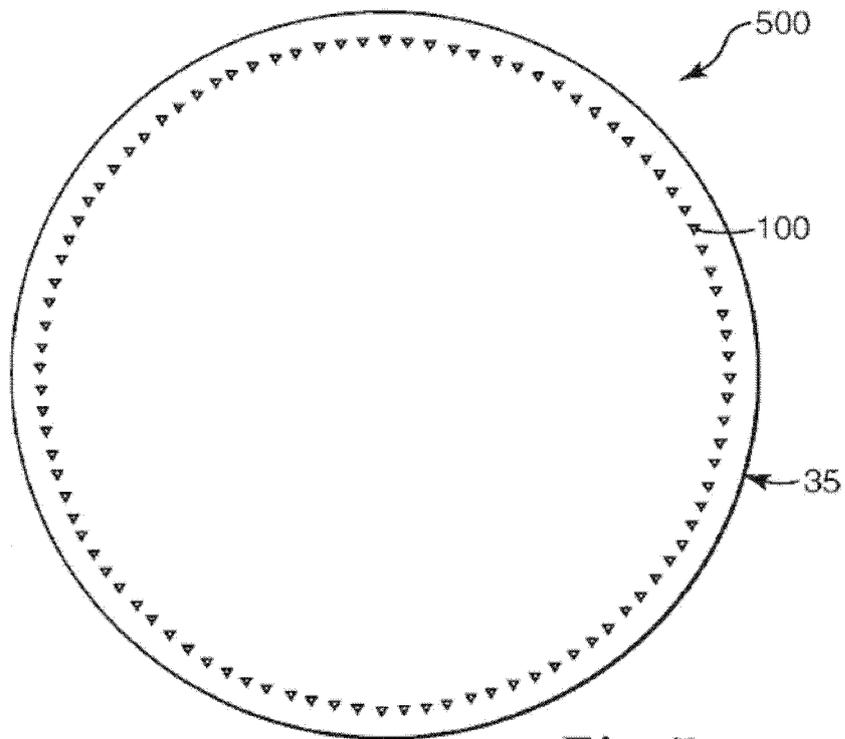


Fig. 5

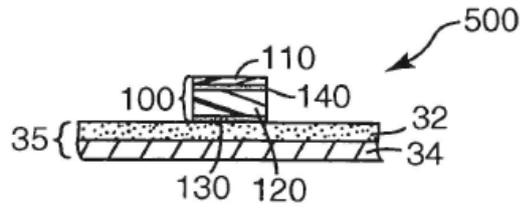


Fig. 6

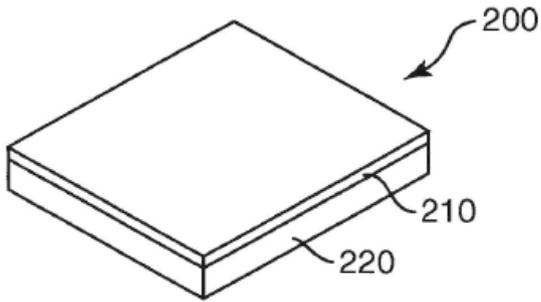


Fig. 7

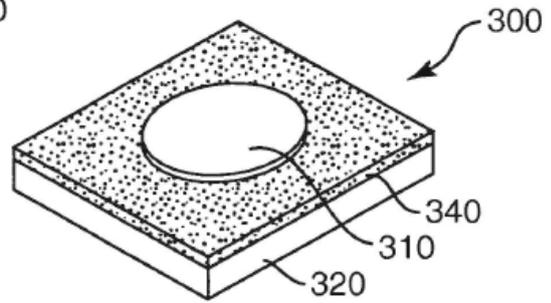


Fig. 8

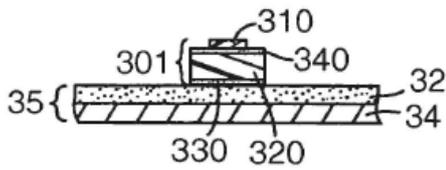


Fig. 9

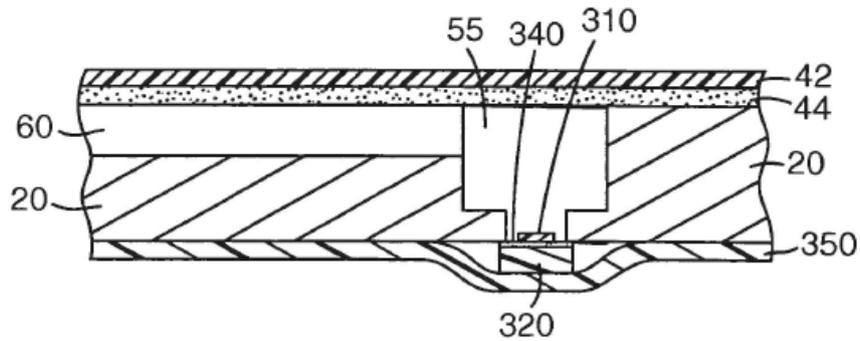


Fig. 10