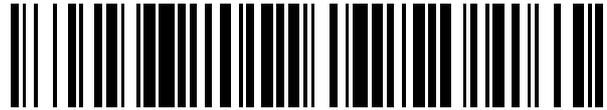


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 644**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2006 E 06799915 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 1886149**

54 Título: **Aparato robusto para análisis de ácido nucleico y proteínas**

30 Prioridad:

19.05.2005 US 132712

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

28.11.2014

73 Titular/es:

**NETBIO, INC. (100.0%)
830 Winter Street
Waltham, MA 02451-1477 , US**

72 Inventor/es:

**TAN, EUGENE;
LAM, HEUNG, CHUAN y
KELLOGG, GREG**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 523 644 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

Aparato robusto para análisis de ácido nucleico y proteínas

5 Campo de la invención

10 La invención se relaciona de manera general con dispositivos para el análisis de ácido nucleico y/o proteínas, y más particularmente con dispositivos robustos con bajos requisitos de consumo de energía que se pueden utilizar para secuenciar o separar ácido nucleico y proteína en ambientes no controlados o semicontrolados que incluye laboratorios móviles, oficinas de médicos, laboratorios de hospital y otros laboratorios clínicos y/o de prueba para humanos, veterinarios o ambientales y puntos de ubicaciones para cuidados.

Antecedentes

15 El proyecto genoma humano ha catalizado el desarrollo de una amplia variedad de tecnologías para el análisis genómico. Un área principal de avances se relaciona con métodos de secuenciación de ADN. Además, también se han desarrollado varias importantes técnicas de detección de variación del genotipo y genética que incluyen detección de polimorfismo de nucleótido único (SNP), polimorfismo de conformación de cadena única (SS-CP), análisis heterodúplex (HA), análisis corto de repetición en tándem (STR) y micro satélite o de repetición de secuenciación simple (SSR).

20 Los métodos para secuenciación de ADN discutidos anteriormente utilizan electroforesis para separar fragmentos de ADN por tamaño, y el uso de marcas (más comúnmente tintes fluorescentemente marcados) para la detección de fragmentos específicos. Un gran número de tintes comercialmente disponibles y de ligadores asociados disponibles para la marcación de ácido nucleico de vendedores incluyen sondas Moleculares de Invitrogen.

25 Los métodos de secuenciación de ADN también se basan en el método de terminación de cadena (Sanger et al., 1977) y el método de degradación química (Maxam y Gilbert, 1977). En el secuenciación Sanger, la secuencia de una molécula de ADN de cadena única se determina mediante la síntesis enzimática de cadenas de poli nucleótidos complementarias, estas cadenas terminan en posiciones de nucleótido específicas. En el secuenciación Maxam y Gilbert, la secuencia de una molécula de ADN de cadena doble se determina mediante el tratamiento con químicos que fragmentan la molécula en posiciones de nucleótido específicas. Ambos métodos de secuenciación utilizan marcas de tinte para identificar cada una de las bases y la separación basada en electroforesis para determinar el tamaño del fragmento de la cadena que finaliza con una base dada.

35 Las reacciones basadas en Sanger que utilizan cebadores de tinte o terminadores de tinte en la reacción para generar fragmentos de ADN con marca para el análisis son de amplio uso hoy. Numerosos vendedores de kits de secuenciación de ciclo comercialmente disponibles incluyen Applied Biosystems and Ge Amersham. Estos kits comercialmente disponibles utilizan los tintes R110, R6G, TMR y ROX (Kits de Secuenciación de Ciclo Terminador de Tinte Termosequencia II de Amersham) y los tintes de transferencia de energía 5CFB-R110, 5CFB-R6G, 5CFB-TMR, 5CFB-ROX (Kit de Secuenciación de Ciclo Terminado ET DYEnamic). Además de los kits de tinte comercialmente disponibles diseñados para el secuenciación de ADN, los tintes, y los ligadores asociados disponibles para marcación de ácido nucleico de vendedores comerciales incluyen sondas moleculares de Invitrogen que también se pueden utilizar.

45 La capacidad de determinar rápidamente la secuencia de ADN de un fragmento dado o de determinar el tamaño de un fragmento dado ofrece soluciones a muchos problemas médicos y forenses. Por ejemplo, el análisis de ADN puede ayudar en el diagnóstico de cáncer, enfermedades infecciosas (por ejemplo enfermedades virales y enfermedades bacteriales tales como sepsis), y trastornos heredados (tales como la fibrosis quística). El análisis de ADN puede ayudar en la medicina personalizada al permitir que se determine la respuesta a un fármaco de un paciente. De manera similar, el secuenciación del ADN o clasificación por tamaño de fragmentos tiene utilidad en escoger pacientes para enfermedades aparentemente saludables o para incluir o excluir pacientes y voluntarios en ensayos clínicos basados en la caracterización cuidadosa de genes o en marcadores genéticos.

55 Estudios del genoma humano han revelado, y continúan revelando, la existencia de mutaciones o polimorfismos específicos. Al incrementar la frecuencia, estas mutaciones o polimorfismos están siendo asociadas con enfermedades monogénicas y poligénicas. Como resultado, el campo del diagnóstico molecular está creciendo y expandiendo. Las pruebas de diagnóstico molecular utilizan marcadores polimórficos, tales como, micro satélites y STR, y la determinación de mutaciones asociadas con enfermedades neoplásicas y otras. Por ejemplo, la presencia de ciertas infecciones virales, tales como el virus herpes simplex (HSV), el virus citomegalia (CMV) y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) se han diagnosticado utilizando fragmentos de ADN amplificados y separados. Ciertos tipos de diagnóstico de cáncer también se llevan a cabo utilizando la separación de fragmentos de ADN amplificados. Específicamente, el diagnóstico de linfomas de células B y T cae en esta categoría. Cuando ocurren cánceres, una célula única que tenga una forma simple de un ADN reacomodado crece a una tasa elevada, conduciendo a la predominancia de esa forma del gen. La separación e identificación del gen mutado se puede llevar a cabo utilizando dispositivos convencionales o de microchip. Para una discusión de la aplicación de los métodos de secuenciación y separación y aparatos para diagnósticos moleculares, ver en general, "Use of Capillary Electrophoresis for High

65

Throughput Screening in Biomedical Applications, A Minireview” de Bosserhoff et al., en Química Combinatoria y Selección de Alto Rendimiento, 2000, emisión 3, páginas 455-66 y “Exploiting Sensitive Laser – Induced Fluorescence Detection on Electrophoretic Microchips for Executing Rapid Clinical Diagnostics,” de Ferrance et al. En Luminiscencia, 2001, emisión 16, página 79- 88.

5 Con respecto al análisis forense, la capacidad para secuenciar y particularmente clasificar por tamaño fragmentos de ADN tiene el potencial de permitir aprender sospechoso rápidamente (reduciendo así el recidivismo) así como también exonerar individuos falsamente acusados. El genoma humano incluye tramos de ADN compuestos de repeticiones cortas en tándem (STR). A la fecha, cientos de locus STR se han mapeado en el genoma humano. El análisis de tales locus (que incluye mini-STR Y-STR, y secuencias mitocondriales) es una herramienta importante para los estudios forenses. Por ejemplo, el trabajo de casos forenses típicamente involucra la separación y análisis de múltiples locus. Algunas pruebas utilizan 6 pruebas de locus conocida como la “Multiplex de Segunda Generación” (SGM), junto con amelogenina (marcador que determina el género) y 4 locus adicionales, D3S 1358; D19S433; D16S539 y D2S1338. Otros kits comercialmente disponibles amplifican locus STR de 15 tetra nucleótidos y el marcador amelogenina (ver, por ejemplo, kit de amplificación PCR identifiler AmpFISTR). La Oficina de Investigación Federal de los Estados Unidos (FBI) la Red Europea de Instituto de Ciencias Forenses (ENFSI) y la Interpol generalmente reconocen los resultados provenientes de kits que incluyan al menos los 13 locus STR núcleo estandarizados bajo el sistema de índice de ADN combinado (CODIS): CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S39, D18S51, D21S11; vWA; FGA; TH01; y TPOX. Para una discusión general, ver Budowle, B. et al., “CODIS y PCR Based Short Tandem Repeat Loci: Law Enforcement Tools,” Segundo Simposio Europeo de Identificación en Humanos, 1998, página 73-88.

20 Un locus STR típico tiene menos de 400 pares base de longitud, e incluye unidades repetitivas simples que tienen de dos a 7 pares base de longitud. Los STR pueden definir alelos que son altamente polimórficos debido a las grandes variaciones entre individuos y el número de repeticiones. Por ejemplo, 4 locus en el genoma humano CSF 1PO, TPOX, TH01, y vWA (abreviados CTTv) se caracterizan por un alelo STR que difiere en el número de repeticiones. Dos unidades repetidas se encuentran en estos locus: AATG para TPOX y TH01, y AGAT para CSF 1PO y vWA.

25 En general, el análisis STR involucra generar un perfil STR de una muestra de ADN, y comparar el perfil STR generado con otros perfiles STR. Generar un perfil STR típicamente involucra amplificar un locus STR que utiliza PCR u otro método de amplificación, entintar o etiquetar los STR dentro de una muestra de ADN, separar los STR etiquetados dentro de la muestra utilizando electroforesis (aplicar un campo eléctrico), y registrar los STR etiquetados utilizando láser u otros dispositivos de excitación de fluorescencia y un galvanómetro u otro dispositivo para dirigir el dispositivo de excitación de fluorescencia hacia una muestra y luego a un detector de luz.

30 Un procedimiento para generar un perfil STR utiliza una placa de gel alargada (o gel de loza) que es de aproximadamente 35 cm de longitud. En general, este proceso (en lo sucesivo denominado como “proceso de placa de gel”) involucra depositar una muestra de ácido nucleico etiquetada (más a menudo ADN, pero un experto en la técnica apreciará que el ARN también se puede utilizar para algunas aplicaciones) en un área de la placa de gel, separar los STR dentro de una muestra de ADN etiquetado en la placa de gel utilizando electroforesis, y explorar la placa de gel con un detector para registrar los STR etiquetados. Típicamente, en el proceso de la placa de gel requiere dos a tres horas para completarse.

35 Otro procedimiento para generar un perfil STR utiliza un capilar que es de 50 a 75 micrómetros de diámetro. Este proceso (en lo sucesivo denominado como “el proceso capilar”) involucra de manera general inyectar electro cinéticamente una muestra de ADN etiquetada en un extremo de un capilar, y arrastrar la muestra a través del capilar utilizando electroforesis para separar los STR. Se utiliza un haz de láser para excitar los STR etiquetados dentro de la muestra para hacer que los STR etiquetados sean fluorescentes. La fluorescencia emitida por los STR se detecta al explorar una porción del capilar con un dispositivo de excitación de fluorescencia, tal como, por ejemplo un láser.

40 Típicamente, la separación STR es más rápida en el proceso capilar que en el proceso de placa de gel. En general, un incremento en la corriente de electroforesis da como resultado en un incremento de la velocidad de separación del STR y mayor corriente de electroforesis típicamente se puede aplicar al capilar que a la placa de gel por que el capilar disipa más fácilmente el calor (originado por la corriente) que lo que de otra manera desviaría los resultados de separación. Un proceso capilar típico requiere entre 10 minutos a una hora para completarse.

45 Sin embargo, controlar la temperatura es un factor crítico relacionado con la precisión de los dispositivos de separación de ADN a base de capilares. Esto ilustra por que los dispositivos de la técnica anterior no son adecuados para ambientes o aplicaciones robustas, no controladas o semi controladas. Los dispositivos de la técnica anterior utilizan un arreglo de 16 capilares que se inyectan y corren simultáneamente a la temperatura de muestra, de tal manera que se puede esperar que la precisión intra corrida sea alta, y que el tamaño de los datos con relación a la escalera alélica dentro de la corrida se puede esperar como confiable. Sin embargo, la precisión de la inter corrida parece ser dependiente de las fluctuaciones de temperatura. Cuando quiera que cambie la temperatura de corrida a corrida, los fragmentos desconocidos pueden no ser capaces de tener un tamaño para una escalera alélica en una diferente corrida. Los fragmentos que descansan por fuera de la caja pueden ser los llamados alelos “por fuera de la escalera” o mal

digitados al caer en una caja adyacente. Como resultado, las muestras analizadas que utilizan este tipo de dispositivo se pueden caracterizar mal, disminuyendo significativamente de esta manera la calidad de los resultados obtenidos.

5 Otro procedimiento para generar unos perfiles de STR utilizan un proceso de chip microfluídico. La tecnología microfluídica es un término utilizado generalmente para describir sistemas fabricados utilizando técnicas de elaboración de semiconductores para crear estructuras que puedan manipular volúmenes pequeños (micro litro, nano litro o pico litro) de líquido, reemplazando equipos de química analítica de macro escala con dispositivos que podrían ser cientos o miles de veces más pequeños y más eficientes. Un dispositivo microfluídico (chip) se caracteriza generalmente por la presencia de canales con al menos una dimensión menor de un milímetro. De manera similar, un micro canal es un canal con al menos una dimensión que es menor de aproximadamente un milímetro. Los chips microfluídicos ofrecen al menos dos ventajas principales comparados con los dispositivos convencionales. Primero, el volumen de la muestra y los reactivos requeridos dentro de estos canales es pequeño, permitiendo tamaños de muestra mínima (generalmente pocos nanolitros) y reducir los costos de reactivos. Segundo, el sistema que contiene tales canales y dispositivos eléctricos o mecánicos de tamaño similar, permite que un amplio arreglo de manipulaciones de muestras complejas sea efectuado dentro de un volumen pequeño. Finalmente un sistema que contiene tales estructuras pequeñas puede ser altamente multiplexado para permitir el procesamiento simultáneo de muestras múltiples.

20 Los chips están generalmente compuestos de vidrio transparente durable. Un chip consiste típicamente de uno o más canales fabricados en un sustrato plano con puntos de acceso para que las muestras sean introducidas en el canal. En una realización, un canal puede consistir de un brazo largo (algunas veces denominado como "canal largo") y un brazo corto (algunas veces denominado como "canal corto"). Se puede efectuar una separación STR individual en cada canal. El brazo corto intercepta el canal largo cerca de un extremo del brazo largo y en un ángulo. En algunos chips, el brazo corto incluye un espacio donde este intercepta el canal largo de tal manera que las porciones del canal corto son paralelas y no colineales. Típicamente, un chip se forma utilizando fotolitografía y técnicas de grabado químico para producir estructuras de canal en galletas de sílice fusionadas. Estas estructuras de canal gravadas están unidas a una galleta de sílice fusionada no gravada para formar una estructura de canal completa.

30 Un proceso de separación STR que utiliza un chip generalmente involucra orientar el microchip de tal manera que este y los canales dentro de la extensión horizontal (es decir perpendicular a la dirección de la gravedad) y depositando una muestra de ADN etiquetado sobre un hueco en la superficie superior del microchip que conecte con un extremo del canal corto de un par de canal. Luego, la muestra de ADN etiquetada es arrastrada horizontalmente a través del canal corto utilizando electroforesis de tal manera que los STR dentro de la muestra estén parcialmente separados a lo largo del canal corto. Luego, una porción de la muestra en la intersección de los canales largo y corto se separan adicionalmente a lo largo del canal largo utilizando electroforesis. Un láser excita el STR etiquetado con fluorescencia. Las fluorescencias emitidas por los STR se detectan y registran de manera similar a aquellas de la placa de gel y de los procesos capilares.

40 Convencionalmente producir un genotipo de ADN de alta velocidad convencional utilizando un chips se describe en un artículo titulado "High-Speed DNA Genotyping Using Microfabricated Capillary Array Electrophoresis Chipas", Analytical Chemistry, Vol. 69, No. 11, Junio, 1, 1997 en las páginas 2181 a 2186. El secuenciación de ADN de ultra alta velocidad utilizando chips de electroforesis capilar se describe en un artículo titulado "Ultra High-Speed DNA Sequencing Using Capillary Electrophoresis Chips". Analytical Chemistry, Vol. 67, No. 20, Oct. 15, 995 en las páginas 3676 a 3680.

45 La Patente U.S No. 6.207.031 de Adourian et al., describe un dispositivo de separación automatizado útil en ensayos de perfilamiento alélico. El dispositivo de separación descrito en la Patente U.S. No. 6.207.031 incluye un dispositivo de canal micro fabricado que tiene un canal de suficientes dimensiones en sección transversal y longitud para permitirle a una muestra ser analizada rápidamente. Específicamente, el canal micro fabricado se llena con una matriz de poliacrilamida reemplazable operada bajo condiciones desnaturalizantes y una escalera STR marcada fluorescentemente se utiliza como un estándar interno para la identificación del alelo. Las muestras analizadas por el método de ensayo se pueden preparar mediante procedimientos estándar y solamente pequeños volúmenes de ensayos se requieren por análisis. Este dispositivo es capaz de operación repetitiva y es adecuado para aplicaciones de alta velocidad automatizadas.

55 Mientras que los dispositivos de separación descritos en la Patente U.S No. 6, 207, 031 son eficientes para separar un gran número de muestras en una cantidad de tiempo relativamente corta, el dispositivo de la Patente U.S No. 6, 027, 031 requiere ser ubicado en un laboratorio establecido bajo un ambiente controlado. Como resultado, en el uso de campo, tal como, por ejemplo, uso de los dispositivos anteriormente descritos en un punto de ubicación de cuidado, tal como el consultorio de un doctor o un sitio de emergencia para desastres es impráctico debido al tamaño, requisitos de energía, restricciones operacionales (es decir impacto de vibración mínimo o equipo óptico sensible) de estos dispositivos. Además, estos dispositivos también tienen mayor consumo de energía que limita la utilidad de estos dispositivos en el uso de campo.

60 El documento U.S 5275710 describe un dispositivo electroforético que permite llevar a cabo la electroforesis mientras monitorea y regula la temperatura y el gradiente de campo eléctrico en el gel. Además, el monitoreo fotomédico, que

incluye el uso de una etapa óptica, se suministra con el fin de monitorear el progreso de la separación electroforética y varía las condiciones al cambiar el progreso según se desee.

5 El documento U.S. 6498497 describe un controlador micro fluidoico y un sistema detector y un método para efectuar ensayos de selección.

El documento U.S. 2817264 describe un aparato de electroforesis que incluye medios para suministrar amortiguamiento que absorbe golpes entre los marcos principales y los sub marcos.

10 Así, existe la necesidad insatisfecha en la industria de dispositivos de secuenciación y separación robustos de tal manera que se puedan obtener mediciones a tiempo y confiables en el campo o en un ambiente no controlado. Además, subsiste la necesidad en la industria de suministrar un dispositivo de secuenciación y/o separación robusto adecuado comercialmente disponible utilizando microfluidicos.

15 Resumen de la invención

En general, la presente invención se relaciona con dispositivos de secuenciación y separación de ácido nucleico altamente robustos miniaturizados, rápidos, (tal como se describe en las reivindicaciones). Tales dispositivos tienen usos en consultorios de médicos, laboratorios de hospital, y otros laboratorios clínicos y/o de prueba para humanos, veterinarios y ambientales y otros puntos de sitios de cuidado. El dispositivo de la presente invención es adecuado para uso por operadores no expertos o semi expertos y en ubicaciones ambientales que son controladas o semi controladas. Los dispositivos de esta invención se puede esperar que suministren mejoras significativas en el desempeño sobre las máquinas de la técnica anterior. Los dispositivos de la presente invención ofrecen las ventajas obligadas de reducir dramáticamente la cantidad de muestra y reactivo y posibilitar químicas de micro escala únicas no posibles con instrumentación de macro escala, aunque puede operar en ambientes no controlados, semi controlados, tales como, por ejemplo el consultorio de un médico, o aun ambientes hostiles, tales como, por ejemplo, laboratorios forenses móviles para crímenes, laboratorios o estaciones de diagnóstico en ubicaciones o ambientes físicos duros o semiduros.

Además, los dispositivos pueden incluir un sistema que mantiene la temperatura del arreglo capilar o su equivalente en un rango de temperatura muy preciso (por ejemplo dentro de \pm un grado C), minimizando de esta manera la variación de corrida a corrida debido a los cambios en la temperatura en el ambiente externo. Como resultado, el número de alelos "fuera de la escalera" generados durante la separación se reduce y así, la calidad de los resultados obtenidos se incrementa sobre los dispositivos de la técnica anterior. Además, las realizaciones descritas aquí se ejecutan utilizando bajos niveles de energía, haciendo las máquinas y dispositivos de esta manera adecuados para uso portátil y/o en el campo.

La presente invención también utiliza un soporte de luz que detecta y emite elementos que incluye espejos, láseres, exploradores y similares para un dispositivo de separación/secuenciación de ADN. Los dispositivos para análisis de ácido nucleico y proteína de la presente invención incorporan ópticas láser especializadas y dispositivos de exploración óptica sensible que detectan de manera reproducible carriles microfluidicos para el desempeño satisfactorio. En razón a que cada uno de los componentes de emisión de luz y de sistema de detección (por ejemplo láser, espejos, exploradores, filtros, detectores de luz) controlan alguna porción de la senda de haz láser, cualquier movimiento o dislocación de un componente puede originar una afectación en la recolección de datos. Como resultado de estas afectaciones, se puede interrumpir o contaminar el flujo de datos, produciendo de esta manera resultados incorrectos. Los dispositivos de la técnica anterior que utilizan sistemas capilares también utilizan sistemas de emisión y detección de luz basados en láser, y por lo tanto, se pueden adaptar para fortalecimiento utilizando las invenciones descritas aquí. El dispositivo de la presente invención incluye un sistema óptico y detector láser altamente robusto para detectar reproduciblemente carriles microfluidicos que minimicen la cantidad de ruido producido en la señal detectada como resultado de la vibración y/o golpe. Además, el dispositivo requiere menos energía que los dispositivos de secuenciación en laboratorio convencional para electroforesis y análisis. Como resultado, el dispositivo de la presente invención se puede utilizar confiablemente en el campo mientras se obtiene resultados de alta resolución. Los dispositivos de secuenciación y separación de ácido nucleico de la técnica anterior también utilizan ópticas láser especializadas y sistemas de detección en carriles capilares. Un experto en la técnica podría fácilmente adaptar las ópticas láser y los sistemas de detección generalmente utilizados en los sistemas capilares para ser fortalecidos de acuerdo con las enseñanzas de esta invención.

En general, el término "analito biomolecular" como se utiliza aquí se refiere tanto a ácidos nucleicos no sintéticos como sintéticos (por ejemplo ADN y ARN) y porciones de los mismos, y proteínas biológicas. Se describen aquí técnicas ultra rápidas prácticas para el perfilamiento alélico de tales analitos biomoleculares en el campo. En particular, las técnicas involucran utilizar un dispositivo de electroforesis microfluidico para analizar repeticiones en tándem cortas (STR) dentro de la muestra de ácido nucleico o proteína, o separar de otra manera las moléculas de ADN para permitir la determinación de la secuencia de ácido nucleico. Más aun, como lo apreciará un experto en la técnica, la muestra puede modificar o "etiquetarse" para incluir algo que se puede detectar mediante un dispositivo de detección. El etiquetado puede lograrse mediante cualquier método aplicable, incluyendo sin limitación, incorporar un tinte, cromóforo, fluóforo, aducto calorimétrico o aducto radioactivo en la muestra. Un método de ensayo descrito aquí ha hecho esto

5 posible para lograr rápidamente separaciones electroforéticas resueltas sobre línea base de muestras STR de locus simple. Los análisis de las muestras (por ejemplo muestras PCR) que contienen los locus definidos o caracterizados mediante un STR que difiere en el número de repeticiones se efectúa rápidamente utilizando el ensayo de perfilamiento alélico descrito aquí. Por ejemplo, los análisis de muestra PCR que contienen 4 a 5 locus se pueden efectuar en menos de aproximadamente 30 minutos.

10 También se describe aquí un dispositivo de separación (o un módulo de prueba). El dispositivo de separación incluye un dispositivo de micro canal que tiene un canal de suficientes dimensiones en sección transversal y longitud para permitirle a una muestra ser analizada rápidamente. En un ejemplo, el dispositivo de separación consiste en un micro canal que tiene un área en sección transversal de desde aproximadamente 300 a aproximadamente 16000 micrómetros cuadrados en sección transversal y aproximadamente 100 a 500 mm de longitud. En ciertos ejemplos el micro canal tiene un área en sección transversal preferida de aproximadamente 2500 micrómetros cuadrados y una longitud de 180 mm. Una escalera STR etiquetada fluorescentemente se utiliza como un estándar interno para la identificación del alelo. Las muestras analizadas mediante el método de ensayo se pueden preparar por procedimientos estándar y solamente se requieren pequeños volúmenes (por ejemplo 4 microlitros o menos) por análisis.

20 Además, los dispositivos de esta invención se pueden utilizar en el secuenciación. Todavía hay buenas razones para secuenciar pequeñas partes de los genomas, especialmente en ambientes semi controlados o no controlados. Por ejemplo, más de 1000 diferentes mutaciones se han encontrado en pacientes con fibrosis quística. Cada una de estas mutaciones ocurre en un enorme gen que codifica una proteína de 1480 aminoácidos conocida como regulador de conductancia de transmembrana de fibrosis quística (CFTR). El gen comprende más de 6000 nucleótidos esparcidos sobre 27 exones en el cromosoma 7. Los defectos en la proteína causan varios síntomas de la enfermedad. Ninguna mutación simple es responsable de todos los casos de fibrosis quística. La gente con la enfermedad hereda dos genes mutantes, pero la mutación específica no requiere ser la misma. Por lo tanto, la capacidad de identificar la mutación específica tiene algún valor predictivo. Como ejemplo adicional, el virus del SIDA muta muy rápidamente y un médico tratante tiene necesidad de poder secuenciar el virus mutado en el sitio de punto de cuidado de tal manera que el paciente pueda ser enviado a casa con la terapia adecuada para combatir el virus mutado en cada etapa del curso de la enfermedad. Aún otra aplicación, el cirujano oncológico que está haciendo un diagnóstico intra operativo en un paciente con cáncer tiene necesidad de poder recibir información de la secuencia en la ubicación del punto de cuidado.

30 También se describen aquí dispositivos portátiles, que son útiles para identificar agentes infecciosos en el ambiente, si la fuente es natural (por ejemplo gripa Aviar o Síndrome Respiratorio Agudo Severo-SARS) o relacionado con actividades humanas (por ejemplo ántrax u otras armas biológicas). En muchas de las utilidades y métodos descritos aquí, el valor de recoger datos de secuenciación y tamaño de ADN se mejora por la capacidad de hacerlo así en el campo. De esta manera, la instrumentación y análisis de ADN portátil y robusta será valiosa para una variedad de aplicaciones.

40 En general, se describe aquí un aparato robusto para analizar una muestra de un analito biomolecular. El aparato robusto incluye un soporte, un dispositivo de electroforesis, una fuente de luz de baja energía (es decir una fuente de luz con menos de aproximadamente 10amps a 240 voltios), un detector de luz, una pluralidad de dispositivos ópticos. El soporte del aparato robusto mantiene un módulo de prueba transparente que tiene al menos un canal dispuesto con el módulo de prueba transparente. El dispositivo de electroforesis se conecta al soporte y suministra energía al módulo de prueba transparente. La fuente de luz emite un haz de luz que es capaz de excitar la muestra del analito biomolecular. La pluralidad de dispositivos ópticos montados en el aparato transmite el haz de luz desde la fuente de luz al módulo de prueba transparente para excitar la muestra del analito biomolecular etiquetado fluorescentemente. Estos dispositivos ópticos también recolectan la fluorescencia proveniente de la muestra del analito biomolecular y transmite en esta fluorescencia al detector de luz.

50 El aparato robusto puede incluir además un suministro de energía portátil que incluye un consumo de energía máximo de 1,5 kVA o menos para suministrar energía eléctrica al aparato robusto. El dispositivo de electroforesis puede incluir un calentador para suministrar energía térmica al módulo de prueba transparente y una pluralidad de pares de electrodos para suministrar energía eléctrica a la pluralidad de micro canales separados.

55 La pluralidad de dispositivos ópticos están rígidamente montados a la placa base dispuesta en el aparato. La fuente de luz del aparato puede ser un láser de baja energía, tal como un láser de estado sólido o cualquier otro láser adecuado. En al menos un canal del módulo de prueba puede ser un micro canal o una pluralidad de canales.

60 Se describe aquí un aparato para analizar un analito biomolecular. El aparato incluye un soporte para sostener el módulo de prueba transparente que tiene al menos un canal microfluídico dispuesto en este. El dispositivo de electroforesis se conecta al soporte y suministra energía al módulo de prueba transparente. Una fuente de luz de baja energía emite un haz de luz que excita la fluorescencia en la muestra del analito biomolecular. Una pluralidad de dispositivos ópticos montados en el aparato transmite en el haz de luz emitido por la fuente de luz al módulo de prueba transparente y del módulo de prueba transparente al detector de luz.

La pluralidad de dispositivos ópticos están rígidamente montados en la placa base dispuesta en el aparato. En otra realización, el dispositivo de electroforesis comprende un calentador para suministrar energía térmica al módulo de prueba transparente y un par de electrodos para suministrar energía eléctrica a al menos un canal microfluídico. En algunas realizaciones, el módulo de prueba incluye una pluralidad de canales microfluídicos. En algunas realizaciones, el módulo de prueba incluye una pluralidad de canales microfluídicos. En ciertas realizaciones, la fuente de luz de baja potencia incluye un láser de baja potencia. En algunas realizaciones, el aparato incluye además una fuente de energía portátil para suministrar energía al aparato. La fuente de energía portátil puede tener un consumo de energía máximo de menos de aproximadamente 1, 5 Kva.

La invención se caracteriza por un aparato para procesar una muestra de un analito biomolecular. El aparato incluye un soporte para sostener un módulo de prueba que comprende una placa transparente que tiene al menos un micro canal dispuesta en este. El dispositivo de electroforesis se conecta al soporte y suministra energía al módulo de prueba. Una fuente de luz que emite un haz de luz excita la fluorescencia en la muestra del analito biomolecular. Una pluralidad de dispositivos ópticos están rígidamente montados en la placa base formada de una pieza simple de material. Los dispositivos ópticos dispuestos en la placa base transmiten el haz de luz emitido por las fuente de luz al módulo de prueba y del módulo de prueba transparente al detector de luz. La placa base está sostenida por un marco que incluye un dispositivo de amortiguamiento para reducir la transmisión de vibraciones generadas por debajo del marco a la placa base. La placa base puede incluir una pluralidad de elementos de aseguramiento para limitar el movimiento de rotación de la pluralidad de dispositivos ópticos en la placa base.

En una realización, el soporte para sostener el módulo de prueba puede incluir un primer miembro con un par de electrodos dispuestos para conectar eléctricamente con las aberturas dispuestas en el módulo de prueba. Un segundo miembro incluye una característica de aseguramiento automatizada para reducir el movimiento lateral del módulo de prueba cuando el módulo de prueba se ubica entre el primer miembro y el segundo miembro.

En una realización, la fuente de luz del aparato es un láser de estado sólido, un láser de baja potencia, o cualquier otro láser adecuado. El detector de luz del aparato puede incluir al menos 5 fotomultiplicadores.

También se describe un módulo de prueba transparente para analizar una muestra del analito biomolecular. El módulo de prueba transparente incluye al menos un canal de fluido dispuesto en un miembro formado de un material transparente. Cada uno de al menos un canal de fluido incluye una porción de separación, una porción del brazo de desperdicio, una primera porción de un brazo de muestra, y una segunda porción de un brazo de muestra. En un ejemplo, la primera porción del brazo de muestra se adapta para recibir una solución de polarización y una segunda porción del brazo de muestra se adapta para recibir la muestra del analito biomolecular. En otro ejemplo, el al menos un canal incluye un canal microfluídico. El módulo de prueba transparente puede formarse de vidrio, de un polímero, de un copolímero, de una combinación de estos.

Se describe aquí un método para determinar las ubicaciones del canal central en el módulo de prueba transparente que incluye una pluralidad de canales de fluidos separados dispuestas en este. El método incluye: suministrar un módulo de prueba transparente que incluye una pluralidad de canales de fluidos separados, cada uno de los canales de fluidos separados tiene una posición de extremo frontal, una posición de canal central, y un ancho de canal conocido; explorar sobre una porción del módulo de prueba transparente que incluye cada una de una pluralidad de canales de fluidos separados con un haz de luz para generar un haz de luz reflejado; reconectar el haz de luz reflejado con un detector de luz para generar una forma de onda de intensidad a través de la porción del módulo de prueba transparente que incluye cada una de una pluralidad de canales de fluido separados; eliminar picos determinados como no asociados con la pluralidad de los canales de fluido separados; identificar una ubicación dentro de la forma de onda de la posición de extremo frontal para cada una de una pluralidad de canales de fluidos separadas; identificar todos los picos restantes junto con la forma de onda dentro de una primera distancia que se extiende desde cada una de las posiciones de extremo frontal identificadas; y determinar las posiciones de canal central de cada una de la pluralidad de canales de fluido separadas de un promedio de ubicaciones de todos los picos restantes dentro de la primera distancia de cada uno de las posiciones de extremo frontales identificadas.

Breve descripción de los dibujos

La anterior y otras características y ventajas de la invención serán evidentes de la siguiente descripción más particular de las realizaciones preferidas de la invención, como se ilustra en los dibujos que la acompañan en los cuales los caracteres de referencia se refieren a las mismas partes en todas las diferentes vistas. Los dibujos no son necesariamente a escala, se hace énfasis en su lugar a los principios ilustrativos de la invención.

La FIG. 1A es una vista en perspectiva de un sistema portátil para procesar un analito biomolecular de acuerdo con la invención. El soporte de la muestra del sistema portátil se muestra en una posición abierta.

La FIG. 1B es otra vista en perspectiva del sistema portátil de la FIG. 1A. El soporte demuestra que el sistema portátil se muestra en una posición cerrada.

La FIG. 1C es una vista lateral del sistema portátil de la FIG. 1A. Una posición de cubierta se ha removido de tal manera que una porción de interior del sistema portátil es visible.

5 La FIG. 2A es una vista esquemática de una excitación láser y de un sistema de detección de fluorescencia utilizado dentro del sistema de procesamiento portátil de la presente invención.

La FIG. 2B es otra vista esquemática del sistema de detección de excitación láser y fluorescencia utilizado dentro del sistema de procesamiento portátil de la presente invención.

10 La FIG. 3A es una vista superior del módulo de prueba que es utilizable en los sistemas de las figuras 1A y 1B.

La FIG. 3B es otra vista superior del módulo de prueba que es utilizable en los sistemas de la FIG. 1A y 1B. El módulo de prueba mostrado en la Figura incluye un tablero de muestra unido para sostener las muestras y los fluidos hacer inyectados en el soporte de prueba.

15 La FIG. 4 es una vista esquemática de un canal utilizable en el módulo de prueba de la FIG. 3

La FIG. 5 es una vista esquemática de otro canal utilizable en la presente invención.

20 La FIG. 6 es una vista esquemática de una realización de una primera condición de polarización aplicada en módulo de prueba utilizada en la presente invención durante la electroforesis.

La FIG. 7 es una vista esquemática de una realización de una segunda condición de polarización aplicada al módulo de prueba durante la electroforesis.

25 La FIG. 8 es una vista esquemática de una realización de una tercera condición de polarización aplicada al módulo de prueba durante la electroforesis.

La FIG. 9 es una vista esquemática de una realización de una cuarta condición de polarización aplicada al módulo de prueba durante la electroforesis.

30 La FIG. 10 es una vista esquemática de una realización de una quinta condición de polarización aplicada al módulo de prueba durante la electroforesis.

35 La FIG. 11 es una vista esquemática de una realización de una sexta condición de polarización aplicada al módulo de prueba durante la electroforesis.

La FIG.12 es una vista esquemática de una realización de una séptima condición de polarización aplicada al módulo de prueba durante la electroforesis.

40 La FIG. 13 es una vista esquemática de una realización de un módulo de prueba dispuesto dentro de una porción de un soporte.

La FIG. 14 es una ilustración de una senda de haz láser a través del módulo de prueba.

45 La FIG. 15 es una gráfica de la intensidad de la luz versus la posición a través de un canal del módulo de prueba.

Las FIGS. 16 A-D son gráficas de datos brutos recolectados de una muestra que incluye una escalera alélica comercialmente disponible y un estándar de tamaño.

50 Las FIGS. 17 A-D son graficas de datos corregidos de los datos brutos mostrados en las FIGS. 16 A-D.

Las FIGS. 18 A-D son graficas de los datos brutos recolectados de la muestra que incluye una plantilla de ADN de un amplicón HIV con cebador.

55 Las FIGS. 19 A-D son graficas de los datos corregidos y de llamado de base de los datos brutos mostrados en la FIGS. 18 A-D.

60 Las FIGS. 20 A-20C son listados de secuencia de un amplicón HIV conocido, datos no editados generados de un dispositivo de análisis de ácido nucleico de la presente invención, y de datos editados generados del dispositivo de análisis de ácido nucleico de la presente invención, respectivamente.

Descripción detallada.

5 Existe una necesidad insatisfecha de un dispositivo de separación/secuenciación de ADN robusto que pueda analizar muestras rápidamente y confiablemente en el campo (es decir uso en sitio diferente al laboratorio). Las aproximaciones tradicionales a los dispositivos de separación /secuenciación de ADN robustos han incluido agregar amortiguamiento voluminoso y/o miembros de soporte estructurales a los dispositivos de laboratorio convencionales. Estas aproximaciones no han cumplido las necesidades de la industria por numerosas razones que incluyen: la no portabilidad de los dispositivos debido al peso extra del amortiguamiento y/o miembros de soporte estructural, pérdida del alineamiento óptico en la excitación y los sistemas de detección que resultan de choque y vibración cuando el dispositivo se mueve, la no confiabilidad de los resultados del dispositivo debido a un incremento en el ruido de fondo generado por las fuerzas de vibración no controladas que actúan sobre el equipo sensible, y las altas fuerzas de consumo de energía inherentes necesarias para los dispositivos convencionales.

10 En contraste con las aproximaciones tradicionales, la invención está dirigida a un dispositivo de separación/secuenciación de ADN robusto (por ejemplo un dispositivo que se puede montar en una unidad móvil) utilizada para analizar analito biomolecular. En general, la invención suministra un análisis de separación y secuenciación rápido, confiable para el campo. En referencia a las FIGS. 1A, 1B, 2A, 2B, el dispositivo de separación robusto 10 incluye un soporte de módulo de prueba 20, un montaje de electroforesis 30 conectado al soporte 20, un sistema de excitación y detección de fluorescencia 40 (ver FIGS. 2A y 2B) localizada por debajo del soporte de muestra 20 y cubierta por una cubierta protectora 50 (ver FIG. 1A). La excitación de fluorescencia y el sistema de detección 40 incluye una abertura 42 dentro del soporte 20 de tal manera que la fuente de energía que induce fluorescencia (por ejemplo un haz láser) y la fluorescencia inducida resultante puedan pasar entre el soporte 20 y el sistema de excitación y detección de fluorescencia 40.

15 El uso de la invención en ambientes no controlados o semicontrolados tal como oficinas del departamento de policía, laboratorios forenses móviles, consultorios de médicos, laboratorios de hospitales, laboratorios clínicos u otros puntos de ubicaciones de cuidado. En tales configuraciones operadores no hábiles o semi hábiles pueden operar y mantener los dispositivos a bajo costo y sin requerir ningún o poco entrenamiento o experiencia. Además, estas configuraciones pueden ser ubicaciones ambientales donde las condiciones ambientales varían significativamente. Los dispositivos pueden soportar temperatura y otras fluctuaciones ambientales sin afectar los resultados. Un aspecto de esta capacidad de sostener golpes y vibraciones sin la necesidad del realineamiento o re inicialización manual. Adicionalmente, en muchos de estos ambientes se requiere resultados rápidos, confiables y precisos mientras que en pacientes esta aun con un usuario del dispositivo (por ejemplo un médico tratante, un directivo de la policía, un científico forense, u otro usuario). Por ejemplo, los dispositivos de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar por un médico de enfermedades infecciosas durante un examen para seleccionar una terapia de anticuerpo apropiada para dar a un paciente enfermo, o por un cirujano oncólogo para hacer un diagnóstico intraoperativo en un paciente con cáncer.

20 El soporte de módulo de prueba 20 recibe y sostiene un módulo de prueba 55 que incluye una pluralidad de micro canales separados. Las muestras del analito biomolecular son inyectadas en los micro canales y luego el módulo de prueba 55 se coloca dentro del soporte 20 para análisis. Después de insertar el módulo de prueba 55 en el soporte 20, un usuario coloca el soporte 20 en una posición cerrada (ver FIG. 1B) de tal manera que el montaje de electroforesis 30 hace contacto con el módulo de prueba 55. Con el soporte 20 en posición cerrada, el usuario activa el montaje de electroforesis 30 para aplicar un voltaje al módulo de prueba 55 de tal manera que los componentes que consisten de analito biomolecular (por ejemplo los STR) se separan.

25 El tamaño de cada componente dentro del dispositivo anexo 10 se puede miniaturizar por una cualquiera de una combinación de los siguientes factores: cambio del tipo de fuente de energía utilizada para inducir fluorescencia, reducción del tamaño del módulo de prueba, reducción de la necesidad del consumo de energía, reducción del tamaño de la electrónica y de la preparación de la muestra que se incorpora en la unidad. Por ejemplo, se puede introducir una pequeña alícuota de sangre en un puerto del dispositivo y ser enrutada a un área de preparación de muestra para la extracción del ADN. La muestra de ADN resultante puede ser entonces manipulada y analizada por el chip microfluídico tal como se describe en cualquier parte de esta especificación.

30 Los sistemas de excitación y detección de fluorescencia 40 excita los componentes separados mediante electroforesis de una muestra de ADN (por ejemplo los STR) al explorar una fuente de energía (por ejemplo un haz láser) a través de una porción de cada uno de los micro canales mientras se recolecta y transmite la fluorescencia inducida desde el analito biomolecular a uno o más detectores de luz para registro y análisis final. En una realización, la excitación de fluorescencia y el montaje de detección 40 incluye un láser 60, un explorador 62, uno o más detectores de luz 64, y varios espejos 68, filtro 70 (por ejemplo filtros de paso de banda, espejos dicróicos), agujero 500, acondicionador de láser 501, y lentes 72 para transmitir el haz láser emitido desde el láser 60 a través de la abertura 42 al módulo de prueba 55 y la fluorescencia inducida de regreso a los detectores de luz 64). El explorador 62 mueve el haz láser entrante a varias posiciones de exploración con relación al módulo de prueba 55. Específicamente, el haz láser pasa a través del acondicionador de haz láser 501 y luego al explorador 62 que mueve el haz láser a varias posiciones de exploración relativas al módulo de prueba 55 para inducir la fluorescencia desde los componentes respectivos separados dentro de los micro canales. La fluorescencia inducida se recolecta con un objetivo con infinito corregido con una abertura numérica 0.45 y una amplificación 10x 42 (Thales- Optem, Centerpoint, NY), dirigido por el explorador 62 (Cambridge Technologies, Cambridge, MA) y transferido a un plano de imagen en el agujerito 500. Los lentes 72A son

5 un montaje que consiste de dos lentes dobles acromáticos, con una longitud focal de 150 mm y un diámetro de 50,8 mm. Los lentes 72B son un doblete acromático con una longitud focal de 100 mm y un diámetro de 50,8 mm. Los lentes 72C son lentes dobles acromáticos con una longitud focal de 150 mm y un diámetro de 50, 8 mm. Los lentes 72D coliman la fluorescencia que pasa a través del agujerito 500 y la transfiere al montaje de detector 502. Los lentes 72D son lentes plano convexos, con longitud focal de 25,0 mm diámetro 12, 7 mm. El montaje detector 502 separa los componentes de longitud de onda de la fluorescencia en la medida en que este pase a través de un conjunto de filtros de paso de banda y espejos dicróicos de paso largo antes de ser recolectados por los detectores. Los conjuntos de filtro dicróico y de paso de banda se seleccionan y optimizan para el tinte utilizado y se pueden conseguir de los vendedores de filtro ópticos que incluyen Chroma Technology Corp, Rockingham, VT. En esta realización, los uno o más detectores de luz son tubos fotomultiplicadores (Hamamatsu, USA). En otras realizaciones los detectores también pueden incluir tubos fotomultiplicadores, fotodiodos y fotodiodos de avalancha.

15 Los uno o más detectores de luz 64 recolectan datos (por ejemplo señales de ADN/STR fluorescentes provenientes del módulo de prueba 55 y suministran los datos electrónicamente a través de un cable unido a un puerto 75 a un sistema de adquisición y almacenamiento de datos ubicado por fuera de la cubierta protectora 50. En una realización, el sistema de adquisición de almacenamiento de datos puede incluir un ordenador robusto disponible de Option Industrial Computers (Vaureuil- Dorion, Quebec, Canadá).

20 Las imágenes de la fluorescencia del agujerito 501 permiten el filtrado espacial de la fluorescencia para eliminar las señales de fondo que incluyen tintes provenientes de carriles adyacentes, fluorescencia proveniente del sustrato, y fluorescencia proveniente de elementos ópticos en la senda de detección. El tamaño del agujerito puede variar desde 50 a 2000 micrómetros siendo 600 micrómetros el seleccionado para esta realización. El tamaño del agujerito se selecciona para permitir que solo la fluorescencia proveniente de dentro del canal se le permita pasar y así un incremento resultante en la proporción de señal arriba del dispositivo.

25 El montaje del acondicionador de haz 501 consiste de tres lentes 72E, 72F y 72G. Los lentes 72E y 72G son Plano Cóncavos, con longitud focal de -75 mm, y un diámetro de media pulgada y los lentes 72F son Lentes Plano Convexos, + 75, 6 mm de longitud focal, y media pulgada de diámetro. Los lentes permiten que el tamaño del haz proveniente del láser sea ajustado permitiendo que se determine el tamaño de mancha de la excitación en el micro chip.

30 En una realización, el agujerito 500 y los lentes colimantes 72D están ausentes permitiéndole a la fluorescencia ser directamente transferida hacia el montaje detector 502. En esta realización la fluorescencia se enfoca en ambiente 72C a un plano de imagen que está entre un conjunto de detectores 64.

35 En una realización, el montaje expansor del haz 501 está ausente dando como resultado un tamaño de muestra de excitación que se controla por el tamaño de mancha inherente del láser 60.

40 En una realización, la discriminación de la longitud de onda proveniente de los fluoróforos excitados se logra mediante el uso de un conjunto de un espejo dicróico de paso corto 70, espejos dicróicos de paso largo 68 y filtros de paso de banda antes de los detectores. En otra realización del dispositivo, la discriminación de la longitud de onda de los fluoróforos se puede lograr al reemplazar el montaje detector 502 con un espectrómetro o un prisma para generar un espectro de longitud de onda espacialmente separado que pueda ser detectado por las cámaras CCD o directores de arreglo lineal.

45 En una realización, el elemento óptico es un espejo dicróico de paso corto 70 que le permite a la luz proveniente del láser de longitud de onda corta pasar, pero refleja la luz proveniente de la fluorescencia excitada hacia los detectores. En otra realización, el elemento óptico 70 es un espejo con un hueco perforado a 45 grados. El hueco en el espejo se diseña para ser un 50 por ciento ligeramente más grande que el diámetro del haz del láser. Este elemento le permite a la luz proveniente del haz de láser que tenga un diámetro de haz de 2 mm para pasar mientras se refleja hacia el detector en un 95 por ciento de la fluorescencia que tiene un tamaño de mancha de 28 mm en ese espejo.

50 Las vibraciones no controladas que interactúan con el sistema de excitación y detección de fluorescencia 40 pueden afectar la recolección de datos y finalmente conducir a problemas con la obtención de resultados confiables. Estos problemas se pueden exacerbar cuando el dispositivo de separación/secuenciación de ADN se utiliza en un ambiente no controlado, tal como cuando el dispositivo se transporta y utiliza en la escena de un crimen (es decir, uso de campo). Para reducir los efectos de la liberación ambiental, la presente invención incluye varios elementos. Estos elementos tienen cada uno un impacto mínimo en el peso total o volumen del dispositivo y así, permitirle al dispositivo de la presente invención ser fácilmente transportado (es decir, portátil). La excitación de fluorescencia y el sistema de detección 40 reciben una placa 80 formada de una pieza de material simple (es decir construcción unitaria). Esto es, enlace 60, el explorador 62, los uno o más directores 64, los espejos 68, los filtros 70, y los lentes 72 se aseguran a la placa 80 hecha de una pieza de material única, tal como, por ejemplo, una pieza única de aluminio. Como resultado, todos los componentes del sistema de excitación y detección de fluorescencia 40 tienen una base común que no tiene uniones u otras intercepciones que pudieran transmitir potencialmente o generar vibraciones en la excitación de fluorescencia y el sistema de detección 40. Los componentes del sistema de excitación y detección de fluorescencia 40 se aseguran a la placa simple 80 con uno o más aseguradores comúnmente utilizados en la industria óptica. Además de

utilizar los aseguradores, algunas realizaciones de la invención también incluyen elementos de seguridad para reducir adicionalmente los movimientos rotacionales de estos componentes durante el uso. En razón a que tales componentes del sistema de excitación y detección de fluorescencia controlan la misma porción de la senda del haz de láser, cualquier movimiento de los componentes puede originar una afectación en la recolección de datos. Como resultados de estas afectaciones, el flujo de datos se puede interrumpir o contaminar, produciendo de esta manera resultados no confiables. Los elementos de aseguramiento, que se pueden unir a la placa 80 antes de la instalación de los componentes sobre este, se extienden verticalmente alejándose de la placa 80 y ajustando en las aberturas quedadas en los componentes para limitar el movimiento rotacional de los componentes durante el uso. Por ejemplo, en una realización, los elementos de seguridad comprenden pasadores guías que se extienden desde la placa 80. Los componentes del sistema de excitación y detección de fluorescencia 40 están ubicados sobre la placa 80 de tal manera que las aberturas en los componentes ajusten cómodamente sobre los pasadores guía para alimentar la rotación de los componentes. Para mantener los componentes en la placa 80, los aseguradores, tales como, por ejemplo, los tornillos se utilizan para conectar los componentes a la placa 80.

La vibración y los golpes se controlan en la presente invención, por medio de uno o más dispositivos de amortiguado ubicados entre el piso y la placa 80 que sostiene el sistema de excitación y detección de fluorescencia 40. Estos dispositivos de amortiguación absorben las fuerzas de vibración y reducen la transmisión de vibraciones al sistema de excitación y detección de fluorescencia 40. Por ejemplo, en la realización de la invención mostrada en las Figuras 1A, 1B y 1C el dispositivo 10 incluye un marco 82 que sostiene la placa 80. Dispuesta entre el marco y la placa 80 están 4 bobinas de amortiguamiento 84 (dos de las cuales están a la vista en las Figuras 1A y 1B, cuatro en la FIG. 1C) que absorben el golpe y otras fuerzas, evitando de esta manera reducir de manera sustancial la transmisión de vibración al sistema de excitación y detección de fluorescencia 40. Las bobinas de amortiguamiento 84 en la realización mostrada en las FIGS. 1A y 1B se ubican para balancear de manera equilibrada el peso del dispositivo. Esto es, cada una de las bobinas 84 sostiene una cantidad igual de peso. En otras realizaciones, las bobinas de amortiguamiento 84 se pueden ubicar simétricamente alrededor del marco 82 o se pueden ubicar como se desee. Más aún, más o menos de cuatro dispositivos de amortiguamiento se pueden utilizar para absorber el golpe. Ejemplos de dispositivos de amortiguamiento adecuados para controlar el golpe y la vibración incluyen aisladores de cuerda de bobinas de alambre (por ejemplo, cuerdas de alambre de acero inoxidable disponibles de Enidine of Orchard Park, NY) de resortes de metal que tienen un coeficiente de rigidez grande, montajes de absorción de golpe neumático o hidráulico, y montajes de absorción de golpe con caucho.

En algunas realizaciones, las características de aseguramiento automatizadas se utilizan para reducir el movimiento del módulo de prueba 55 durante el análisis. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la presente invención, el soporte 20 puede además incluir los topes del módulo de prueba no móviles 86 y defensas de posicionamiento automatizados 88. Las defensas de posicionamiento automatizadas 88 se mueven hacia los topes no móviles 86 en la medida en que la porción superior del soporte 20 está cerrada. Así, las defensas de posicionamiento automatizadas 88 guían y empujan un módulo de prueba insertado 55 hacia arriba contra los topes del módulo de prueba no móviles 86. Como resultado, el módulo de prueba 55 se ubica holgadamente entre los topes del módulo de prueba 86 y las defensas de posicionamiento automatizadas 88, asegurando de esta manera el módulo de prueba en su lugar y reduciendo los movimientos laterales del módulo de prueba durante el análisis.

Todas las características descritas anteriormente se pueden utilizar en combinación para suministrar absorción de golpe y evitar transmisión de vibración al sistema de excitación y detección de fluorescencia 40 sin agregar peso excesivo para destruir la naturaleza robusta y/o el tamaño pequeño, miniaturizado del dispositivo 10.

Otras características también pueden contribuir con la naturaleza robusta del dispositivo 10. Por ejemplo, enlace 60 utilizado dentro del sistema de excitación y detección de fluorescencia 40 se puede seleccionar para emitir una gran cantidad de potencia mientras se utiliza poca energía. Como resultado, se pueden hacer mediciones confiables y detectarse utilizando láser 60, aunque no requiriendo una gran cantidad de energía de una fuente de energía externa conectada al dispositivo 10 a través del puerto 77. En general, los dispositivos convencionales, estacionarios, tales como como el tipo utilizado en los laboratorios, utilizan láser de gas (por ejemplo láser de argón- ion, y láser de helio-neón). Estos láseres de gas requieren una gran cantidad de energía para lanzar el haz adecuadamente. Por ejemplo, un láser de gas típico consume aproximadamente 20 a 30 amperios a 240 voltios (es decir requiere 7200 vatios de potencia y tiene un consumo de energía máximo de aproximadamente 2, 5 kVA o mayor). Así, una fuente de energía portátil conectada a este tipo de láser tendría que ser de un tamaño suficientemente grande para soportar este uso de potencia. En general, los láseres de estado sólido requieren menos energía y son más eficientes que sus contrapartes láser con fase de gas, y así contribuyen a la naturaleza portátil y robusta de la presente invención. Un ejemplo de un láser que requiere potencia limitada para la operación adecuada y es adecuado para uso con la presente invención es un láser de estado sólido, tal como, por ejemplo, un láser de estado sólido bombeado por yodo. Típicamente, los láser de estado sólido bombeados por yodo utilizan menos de dos amperios a 240 voltios (es decir utilizan una potencia de 480 vatios y tienen un consumo de energía máximo de menos de 1, 5 kVA y en algunos casos de menos de 0,5 kVA). En algunas realizaciones, los láser u otras fuentes de luz que consumen menos de 10 amperios a 240 voltios se pueden utilizar sin reducir la portabilidad del dispositivo 10. Por ejemplo, una fuente de luz que consume menos de 10 amperios a 240 voltios utiliza menos de 3000 vatios de energía. Estas fuentes de luz se pueden energizar mediante unas fuentes de energía portátiles pequeñas (por ejemplo, 6000 vatios o menos suministro de energía; 1,5 kVA o un suministro de

energía con consumo de potencia máximo menor, preservando de esta manera la naturaleza miniaturizada de la presente invención. En una realización de la presente invención, la fuente de luz comprende un estado sólido, tal como un láser de estado sólido de zafiro 488 HP (Santa Clara, CA) el cual tiene un consumo de energía máximo de 0,75 kVA. Además, el láser de estado sólido de Zafiro puede soportar 7g de golpe lateral y 15g de vertical. Como lo apreciaría un experto en la técnica, cualquier láser con las propiedades ópticas deseadas se puede utilizar dentro de las enseñanzas de la presente invención.

Un calentador de termo hoja delgada 90 dispuesto dentro del soporte 20 también contribuye a la portabilidad y uso de campo del dispositivo. El calentador 90 está situado dentro del soporte 20 para estar en contacto térmico con un módulo de prueba insertado 55. Este diseño permite que las dimensiones del calentador 90 sean pequeñas y de un tamaño equivalente con el módulo de prueba 55. El calentador 90, que se puede activar a través de un controlador remoto ubicado por fuera del dispositivo 10, se puede utilizar para aplicar energía térmica al módulo de prueba 55. El calor aplicado al módulo de prueba 55 ayuda a la separación del analito biomolecular (es decir, el calentador 90 es parte del dispositivo de electroforesis 30). El uso de un calentador de termo hoja pequeño 90 en combinación con el módulo de prueba 55 (por ejemplo un chip microfluídico plano) permite la transferencia eficiente de calor entre el calentador 90 y el módulo de prueba 55. Como resultado, se logra una gran reducción en la cantidad de energía eléctrica o consumo de potencia requerido para calentar el módulo de prueba y mantener el control de temperatura mejorada. En sistemas de electroforesis capilares convencionales, el control de calentamiento y temperatura de los capilares se logra al colocar los capilares en un horno. Los grandes volúmenes de los hornos y la ineficiente transferencia de calor entre los elementos de calentador del horno y los capilares da como resultado la necesidad de una gran cantidad de energía, que podría drenar potencialmente la fuente de energía portátil y/o requerir un mayor suministro de energía, disminuyendo de esta manera la portabilidad del dispositivo de separación/secuenciación de ácido nucleico. Como resultado, el presente dispositivo puede ser servido mediante una fuente de energía portátil, anexa, pequeña (por ejemplo 6000 W o menos y/o 1,5 kVA o menos de consumo de energía máxima) durante periodos significativos, e incrementado de esta manera la portabilidad de la presente invención.

Además de ayudar en la separación del analito biomolecular, el calentador 90 también contribuye a obtener resultados de alta precisión y alta resolución. Por ejemplo, el contacto íntimo entre el calentador 90 y el módulo de prueba 55 suministra una eficiente transferencia de calor entre estos. Como resultado, el calentador puede mantener la temperatura del módulo de prueba 55 en más o menos 1 grado C de una temperatura de configuración deseada, minimizando de esta manera los efectos de temperatura ambientales perjudiciales.

La electroforesis de separación del analito biomolecular ocurre dentro de los micro canales en el módulo de prueba 55. En general, el módulo de prueba 55 se hace de un material transparente que le permite al menos a una parte de la fuente de energía inducir fluorescencia (por ejemplo haz láser) proveniente del sistema de excitación y detección de fluorescencia 40 para transmitir a través del módulo de prueba 55 para interactuar con la muestra ubicada en esta. Ejemplos de materiales transparentes adecuados incluyen vidrios (por ejemplo vidrio de aluminosilicato, vidrio de boro silicato, vidrio de sílice fundida, y vidrio sódico cálcicos), cristal de alúmina simple, y polímeros o copolímero claros (por ejemplo polimetil metacrilato, policarbonato tratado para uv, o copolímero de olefina cíclico).

En relación a las FIGS. 3A y 4, se muestran uno o más micro canales 110 (16 canales se muestran en la FIG. 3A y un canal de muestra en la FIG. 4) cada uno incluyendo un brazo de muestra 112, un brazo de residuo 114, y un canal de separación 116. Los micro canales 110 se pueden elaborar de una placa transparente al utilizar procedimientos de grabado de fotolitografía y químicos estándares para hacer que los canales tengan una profundidad de aproximadamente 5 a 200 micrómetros y un ancho de aproximadamente 10 a 2000 micrómetros. En una realización, la profundidad del canal preferido es de aproximadamente 40 micrómetros y el ancho del canal preferido es de 90 micrómetros. Como se muestra en la FIG. 4, la muestra y los brazos de residuos 102 y 114 están descentrados uno del otro a una distancia de aproximadamente 5 a 2000 micrómetros a lo largo de la longitud del canal de separación 116. En una realización, la muestra y los brazos de los residuos 112 y 114 están descentrados uno del otro a una distancia de 500 micrómetros a lo largo de la longitud del canal de separación 116. Las aberturas 118 (por ejemplo 118a, 118b, 118c, 118d) para insertar las muestras y remover los residuos así como también hacer las conexiones eléctricas al ánodo 100 y al cátodo 102 son láseres perforados en la placa transparente. Por ejemplo, una placa que incluye 16 micro canales incluye 16 huecos de muestra, 16 huecos de residuos, uno o más huecos de ánodo y uno o más huecos de cátodo. Otro ejemplo incluye los módulos de prueba múltiple 55 (por ejemplo 10 módulos de prueba que tiene cada uno 16 micro canales) formados sobre una placa transparente única que incluye 16 huecos de muestra, 160 huecos de residuos, 160 huecos de ánodo y 160 huecos de cátodo. En aún otro ejemplo, que incluye dos brazos de muestra 112a y 112b por micro canal, una placa es perforada por láser para incluir 32 huecos de muestra, 16 huecos de residuos, uno o más huecos de ánodo, y uno o más huecos de cátodo por módulo de prueba 55. Estas estructuras de micro canal están patronadas y gravadas en una placa transparente mediante los procesos de fabricación de semiconductor tradicionales. Luego del patronamiento, los puertos para acceder a los canales se forman mediante procesos de perforación, que incluye perforación láser, perforación con chorro abrasivo, y perforación ultrasónica. Las placas transparentes gravadas son luego limpiadas con múltiples procesos de limpieza para remover los restos y la contaminación de la superficie.

Para cerrar y sellar los canales 110 de tal manera que ellos se puedan llenar con el analito biomolecular, la placa transparente gravada está térmicamente unida a una placa transparente blanco no gravada. El proceso de unión se efectúa en un horno en un proceso de dos etapas. El proceso de unión de dos etapas incluye la ubicación de dos placas transparentes (es decir, una gravada y una no gravada) en el horno con la placa no gravada cubriendo la superficie gravada de la placa gravada de tal manera que un sello se forma en todos los puntos incluyendo entre los micro canales gravados. Las placas transparentes se calientan a una temperatura menor de aproximadamente 200°C durante aproximadamente 120 minutos. Una fuerza de aproximadamente 0,5 a 100 libras se aplica uniformemente a las placas a través del proceso de calentamiento para promover la unión térmica. Luego de completar el anterior proceso de calentamiento a baja temperatura, el módulo de prueba transparente unido 55 se inspecciona visualmente. Si no existen cuarteaduras u otros daños aparentes, el módulo de prueba transparente unido 55 se calienta en un horno de temperatura alta a una temperatura de aproximadamente 735 grados C para completar el sellado. El anterior proceso de unión térmica se describe adicionalmente en Semiconductor Wafer Bonding: Science and Technology by Q. -Y. Tong and U. Gosele, published by Wiley Publishers November 1998.

En relación a la FIG. 3B, en ciertos ejemplos, el módulo de prueba 55 incluye un tablero de muestra 57 unido a la superficie superior que incluye las aberturas a los micro canales gravados. El tablero de muestra 57 incluye un numero de reservorio 59 para mantener las muestras y los fluidos utilizados en electroforesis. Además de servir como un soporte para fluidos, el tablero de muestra 57 también ayuda a suministrar el alineamiento adecuado del módulo de prueba 55 en el soporte 20. Por ejemplo, los reservorios 59 están ubicados dentro del tablero de muestra 57 para suministrar el alineamiento y el registro de los reservorios y los electrodos del montaje de electroforesis 30 cuando el módulo de prueba 55 se inserta en el soporte 20.

Una vez que se selle el módulo de prueba 55, las superficies internas de los canales son tratadas para evitar la electroósmosis y las interacciones de muestra – pared que utilizan un protocolo Hjierten ligeramente modificado tal como se describe por Luba Mitnik et al. En electroforesis 2002, volumen 23, página 719-26. Los canales se llenan con el material matriz que se tamiza y las aberturas que conducen a los canales se llenan con solución amortiguadora o agua des ionizada. Las aberturas 118 se sellan y el módulo de prueba 55 se almacena hasta que sea necesario para uso (es decir, hasta que el modelo de prueba sea necesario para mantener una muestra de analito biomolecular para análisis).

Cuando una o más muestras están listas para ser analizadas el sello en el módulo de prueba 55 se retira y la solución amortiguadora o agua des ionizada se remueve de cada una de las aberturas que conducen a los canales 110 gravadas en el módulo de prueba 55. Para acondicionar los canales para uso, las aberturas de los canales 110 se hacen fluir con agua des ionizada tres veces. Cada vez el agua se retira mediante aspiración hasta secado. Un gel de electroforesis o matriz/material de tamizado se inyecta en cada uno de los canales con una jeringa. En la medida en que un experto en la técnica lo apreciará, una variedad de tratamientos de canal de superficie y de materiales de tamizado se puede utilizar. Un ejemplo de un material de tamizado adecuado es una poliacrilamida lineal de alto peso molecular (LPA), tal como, por ejemplo, un LPA de alto peso molecular 4% comercialmente disponible de Dakota Scientific (Sioux Falls, SD). Ejemplos de otros materiales de tamizado adecuado se describen por Methal. Et al., en "Polimeric Matrices for ADN Sequencing by Capillary Electrophoresis" En Electroforesis 2000, Vol. 21, páginas 4096-4111 y Ruiz Martinez en "AND Sequencing by Capillary Electrophoresis with Replaceable Linear Polyacrylamide and Laser Induced Fluorescence Detection", in Anal. Chem, vol. 65, páginas 2851-58, 1993.

Los canales se llenan con tres veces el volumen del valor del canal del gel de tamizado proveniente de la abertura de ánodo 118b primero y luego tres veces el volumen del valor del canal del gel del tamizado proveniente de la abertura del cátodo 118a para recubrir el micro canal 110 completamente con el gel y asegurar que se ha retirado toda el agua. Las aberturas 118 de ánodo 100 (es decir la abertura 118b), el cátodo 102 (abertura 118a), y el brazo de residuo 114 (abertura 118c) son entonces llenados con una solución amortiguadora y la abertura 118d del brazo de muestra 112 se llena con agua des ionizada.

Para completar el acondicionamiento de los micro canales, el módulo de prueba 55 se inserta en el soporte 20 y el soporte 20 se cierra de tal manera que las conexiones del cátodo 102 y el ánodo 100 sobre el soporte 20 hace interface con la abertura del cátodo 118 y la abertura del ánodo 118b en el módulo de prueba 55. Se aplica la primera configuración de polarización al módulo de prueba 55 para condicionar los canales en el cual un voltaje de menos de aproximadamente 10 KV se aplica a través del cátodo 102 y el ánodo 100 para mover la matriz de tamizado hacia abajo la separación del canal 110 de la abertura del cátodo 118a hacia la abertura del ánodo 118b. Luego una segunda configuración de polarización se aplica al módulo de prueba 55 para completar el acondicionamiento. La segunda configuración de polarización incluye aplicar un voltaje de menos de 4 KV dentro del brazo de muestra 112 y el brazo de residuo 114 para mover los iones desde la abertura del brazo de muestra 118d hacia la abertura del brazo de desperdicio 118c. El módulo de prueba 55 se retira del soporte 20 y se limpia para retirar toda el agua y el amortiguador. Cada uno de los puertos se enjuaga con agua des ionizada al menos tres veces y luego los micro canales 110 se inspecciona visualmente bajo ampliación para revisar la presencia de burbujas. El módulo de prueba 55 está ahora listo para uso. Los procesos de acondicionamiento se efectúan sobre el módulo de prueba a una temperatura de entre 40 a aproximadamente 70 grados C. Esto es el calentador 90 calienta el módulo de prueba a una temperatura de entre 40 a aproximadamente 70 grados C durante el proceso de acondicionamiento. En ciertas realizaciones, la temperatura preferida de operación es 50 grados C.

5 Un operador carga una muestra de analito biomolecular (que incluye un tinte fluorescente para marcar los STR) en el módulo de prueba 55 al inyectar una muestra o un control de prueba en una o más de las aberturas de muestra 118d de los micro canales 110 a través del tablero de muestra 57. Las aberturas de ánodo, cátodo y residuos 118a, 118b, y 118c se llenan con la solución amortiguadora. El módulo de prueba 55 se coloca de nuevo en el soporte 20 y el ánodo 100 y el cátodo 102 se conectan al módulo de prueba 55.

10 En otro ejemplo, una o más de las etapas de limpieza se eliminan en el proceso de acondicionamiento. Específicamente, en ciertos ejemplos, (ver FIG.5), un módulo de prueba incluye al menos un micro canal 110 que tiene un canal de separación 116, un brazo de residuo 114, y dos brazos de muestra 112a y 112b. Como resultado de incluir los dos brazos de muestra 112a y 112b, los procesos de limpieza utilizados para limpiar el módulo de prueba 55 después del acondicionamiento se eliminan. Esto es, los micro canales están limpios antes de agregar la matriz de tamizado. En esta realización, el brazo de muestra 112a se llena con agua des ionizada y el brazo de muestra 112b se
15 llena con analito biomolecular que incluye tinte fluorescente. El micro canal 110 se acondiciona primero al aplicar la primera y segunda configuraciones de polarización. Luego, la muestra del analito biomolecular se analiza sin haber retirado el módulo de prueba 55 del soporte 20 para limpiar y preparar el módulo de prueba 55 para una segunda corrida. Como resultado de agregar el segundo brazo de muestra 112b, se pueden lograr ahorros significativos en el tiempo de procesamiento.

20 Para analizar una muestra, se pueden utilizar varios procedimientos de electroforesis para preparar y separar la muestra en los STR. Uno de estos procedimientos involucra calentar el módulo de prueba 55 a una temperatura de aproximadamente 40 a aproximadamente 70 grados C aunque aplicando un voltaje para separar el analito biomolecular. En un ejemplo preferido, la temperatura del módulo de prueba se mantiene a 50 grados C durante la electroforesis. Antes de aplicar las condiciones de separación al módulo de prueba 55, al menos una condición de polarización se
25 aplica a cada uno de los micro canales 110 en el módulo de prueba 55 para preparar la muestra para separación. Una primera condición de polarización mueve la solución del amortiguador hacia el canal de separación 110 desde la abertura del cátodo 118a hacia la abertura del ánodo 118b. La primera condición de polarización se representa en la FIG. 6, en la cual un voltaje de menos de 10KV se aplica entre el cátodo 102 y el ánodo 100. Una segunda condición de polarización mostrada en la FIG. 7 aplica un voltaje entre el brazo de muestra 112 y el brazo de residuos 114, y mueve el analito desde el brazo de muestra 112 hacia el brazo de residuo 114. Una tercera condición de polarización mostrada en la FIG. 8 aplica un voltaje desde el brazo de residuo 114 al brazo de muestra 112 para mover el analito desde el
30 brazo de residuo 114 hacia el brazo de muestra 112. Una cuarta condición de polarización mostrada en la FIG.9 aplica un voltaje entre el cátodo 102 y el brazo de residuos 114 para mover el analito alejándolo del canal de separación y regresándolo al brazo de muestra 112 y al brazo de residuo 114. La primera condición de polarización se aplica con un primer suministro de energía y un segundo, tercero, y cuarta condiciones de polarización se aplican con un segundo suministro de energía. Cuando tanto la condición de polarización como una de la segunda, tercera o cuarta condiciones de polarización se aplican al mismo tiempo, se pueden aplicar condiciones de polarización adicionales al micro canal 110. Por ejemplo, como se muestra en la FIG.10, una quinta condición de polarización, que es una combinación de la
35 primera y segunda condiciones de polarización, mueve el analito desde el brazo de muestra 114 hacia el brazo de residuo 114, aunque también moviendo el analito en el canal de separación 116 desde el cátodo 102 hacia el ánodo 100. Una sexta condición de polarización se forma mediante la combinación de la primera y terceras condiciones de polarización y se muestra en la FIG. 11. Una séptima condición de polarización, mostrada en la FIG. 12, es una combinación de la primera y cuartas condiciones de polarización. La séptima condición de polarización mueve el analito en el área de intersección entre el canal de separación y los brazos de muestra y residuo (por ejemplo región de intersección 125) hacia los brazos de muestra y residuos 112, y 114, aunque también moviendo el analito que resta u
40 otras porciones del canal de separación 110 desde el cátodo 102 hacia el ánodo 100.

La aplicación secuencial de las condiciones de polarización anteriores permite un número de diferentes funciones incluyendo carga, apilado, separación, y prevención del exceso de analito de la difusión en el canal de separación
45 durante la separación. El campo eléctrico de entre aproximadamente 50 a aproximadamente 500 V/cm se aplica típicamente a través del cátodo 102 y el ánodo 100 aunque los campos eléctricos de aproximadamente 50 V/cm a aproximadamente 500 V/cm se aplican a las aberturas de los brazos de residuo y desperdicio 118d, 118c. La carga del analito en el canal de separación 116 se logra al aplicar la segunda configuración de polarización junto con un campo eléctrico de aproximadamente 50 V/cm a aproximadamente 400 V/cm durante 0,5 a 5 minutos aproximadamente
50 alrededor de la muestra y los brazos de residuos 112 y 114. Apilar el analito en la región de intersección 125 se logra al aplicar la primera configuración de polarización junto con un campo eléctrico alrededor de los canales 110 de hasta aproximadamente 500 V/cm durante un marco de tiempo relativamente corto (por ejemplo aproximadamente un segundo a aproximadamente 10 segundos). La diferencia de conductividad entre la región de intersección 125 y el canal de separación 116 fuerza el analito a la región de intersección 125 para formar una banda comprimida, que permite las separaciones de alta resolución. Separar el analito se logra al aplicar la primera configuración de polarización junto con un campo eléctrico de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 V/cm para mover la banda comprimida del analito hacia el ánodo 100 desde el cátodo 102. La primera configuración de polarización se aplica a las bandas comprimidas hasta que los fragmentos más largos de interés se hayan movido a través de la zona de detección 150 (es decir una porción del canal de separación que interactúa con el haz láser). El analito desde el brazo de muestra 112 y el brazo de separación 114 pueden difundirse hacia el canal de separación 116 conduciendo a distorsiones en la línea base del
55 60 65

electroforograma y una reducción en la proporción de señal a ruido. Como resultado, el exceso de analito en el brazo de muestra 112 o el brazo de residuo 114 se evita que entre al canal de separación 116 durante el análisis al aplicar una séptima configuración de polarización para asegurar que el campo eléctrico negativo se configure entre la abertura del cátodo 118a y cada una de las aberturas de muestra y residuos 118d y 118c, respectivamente. En algunas realizaciones de la invención, la séptima configuración de polarización tal como se describió anteriormente se aplica para el resto del análisis para asegurar la calidad de la señal recolectada mediante excitación de fluorescencia y el sistema de detección 40. En otras realizaciones, una vez que las bandas de conducción se han movido alejándose de la región de intersección 125 hacia la zona de detección 150, la séptima condición de polarización se apaga y la primera condición de polarización se aplica. En esta realización; el analito en exceso es incapaz de difundirse al canal de separación 116 por que las bandas de conducción se han movido alejándose de la región de intersección 125. Como resultado, el exceso de analito no puede interferir con la recolección de datos. En otra realización, el exceso de analito se evita al ingresar el canal de separación 116 al remover el analito proveniente de la abertura de la muestra 118e y/o la abertura de residuo 118c durante la separación. La tercera o cuarta configuración de polarización se puede aplicar durante la separación para mover el exceso de analito al brazo de muestra 112 o una combinación de los brazos de muestra y residuo 114 para remoción.

Una vez que la muestra de analito biomolecular se separa, las configuraciones de polarización se aplican para mover los componentes separados (los locus STR) hacia las zonas de detección 150. El haz láser emitido desde el láser 60 explora a través de la zona de detección 150 y la luz fluorescente inducida proveniente del ADN se recolecta y transmite por los detectores de luz 64 dentro del sistema de excitación y detección de fluorescencia 40. En la medida en que el haz láser explora a través de la zona de detección 150, la luz láser es absorbida por los locus STR etiquetados fluorescentemente que se están moviendo a través de estos. La fluorescencia inducida de cada uno de los STR etiquetados se recolecta mediante el sistema de excitación y detección de fluorescencia 40 y se transmite a los detectores 64. A través de una combinación de espejos dicróicos y filtros de paso de banda, la longitud de onda de emisión de la etiqueta específica fluorescente de esta manera los STR específicos se identifican. Estos resultados se pueden comparar de los estándares de la industria u otras muestras para propósitos de identificación forense.

Un proceso novedoso de "hallazgo de carril" se puede utilizar para compensar automáticamente los cambios en la posición del chip u otros elementos de desalineamiento en el tren óptico sin requerirle al usuario efectuar un procedimiento de realineamiento. En algunas realizaciones, "el hallazgo de carril" está incluido como uno de los componentes del aparato robusto descrito aquí.

Los temas de alineamiento entre el sistema de excitación y detección de fluorescencia 40 y el módulo de prueba 55 pueden introducir degradación en la calidad de la señal, específicamente el nivel de intensidad relativo de la fluorescencia inducida con relación al nivel de ruido de transfondo. "el hallazgo de carril" es un proceso utilizado para maximizar la proporción de señal a ruido de los datos de fluorescencia provenientes de los STR y mas precisamente encontrar la zona de detección 150. Específicamente, si el alineamiento entre la fuente de energía de excitación y los canales dentro de los módulos de prueba 55 es pobre, el ADN marcado que se mueve a través de la zona de detección 150 no se excitara eficientemente. Además, otras regiones del chip, tal como, por ejemplo, entre los canales, se excitará y así dará como resultado la generación de una fluorescencia de transfondo excesiva. El desalineamiento entre el haz de energía de excitación y el canal también dará como resultado recolección de fluorescencia de transfondo excesiva con relación a la fluorescencia inducida reducida proveniente del ADN, reduciendo de esta manera la proporción de señal a ruido. Como resultado de los datos de muestra de otras regiones diferentes a la zona de detección 150, se producen resultados no confiables y/o no utilizables. El alineamiento entre el haz de energía de excitación de fluorescencia y la zona de detección se puede monitorear y corregir mediante un procesador anexo, tal como un ordenador anexo que corre el software con un programa de hallazgo de carril que corre en este.

Los dispositivos de la presente invención se designan para incorporar módulos 55 o chips de prueba removibles. Algunas realizaciones utilizan métodos para hallazgo de carriles novedosos para determinar la ubicación de cada micro canal 110 después de la inserción inicial o la remoción y reinserción del módulo de prueba 55. El hallazgo de carril elimina la necesidad del realineamiento manual de la pluralidad de ópticas dentro del sistema de excitación y detección de fluorescencia 40 cuando en los módulos de prueba 55 se retiren y/o reinsertan. En una realización, la posición de carril del chip a ser probado se determina al correlacionar la exploración del fotodiodo del chip de prueba con aquella del chip de referencia. Esto se hace al reconectar primero la exploración del fotodiodo para el chip de prueba. Se efectúa un análisis de correlación entre la exploración del fotodiodo para el chip de prueba y el chip de referencia, específicamente para determinar la posición donde ocurre la correlación máxima entre las dos exploraciones de fotodiodo. La posición de correlación máxima entre las dos exploraciones de fotodiodo permite que se determine el descentrado posicional entre el chip de prueba y el chip de referencia, y de esta manera, al aplicar este descentrado a las posiciones de carril del chip de referencia, uno puede determinar la posición del carril del chip de prueba, La exploración del fotodiodo de referencia y la posición del carril se generan al utilizar el módulo de prueba que es llenado con el tinte fluorescente. Esto permite la captura simultánea de los datos de exploración del fotodiodo junto con las posiciones de escáner que generan la fluorescencia máxima de cada carril recolectado por lo detectores.

En otra realización, los hallazgos de carril retiran los picos espurios introducidos de aberraciones, incluyendo sin limitación, aberraciones originadas por raspaduras u otras imperfecciones en el módulo de prueba transparente 55, y la

presencia de partículas extrañas en el módulo de prueba transparente 55 y similares. En referencia a la FIG. 13 la fuente de energía de excitación (por ejemplo un haz láser) es explorado a través de la zona de detección 150 sobre un módulo de prueba particular antes de utilizar el dispositivo 10 para analizar una muestra. En la medida en que el haz láser pasa a través de cada canal 110 este es deflectado por el índice de las discontinuidades de refracción entre el material transparente entre los canales 110 y el medio en los canales. El haz de luz deflectado puede dispersarse y/o guiar la onda a través del módulo de prueba 55 y se puede detectar mediante los fotodiodos 170, 172 colocados a cualquier lado del módulo de prueba. En referencia a la FIG.14, existen 4 casos generales donde la luz láser incidente sobre los canales es deflectada y detectada por los fotodiodos. Como se muestra en la FIG.14, la senda del láser 1 intercepta un borde frontal de un canal y es deflectado hacia el fotodiodo 170. La senda del láser 2 no intercepta un canal, sino que por el contrario viaja solamente a través del material transparente del módulo de prueba, Como resultado, ninguna luz se dirige hacia cualquier fotodiodo 170 o 172. La senda láser 3 intercepta el centro o la mitad del micro canal. Como se muestra en la FIG.14, el haz láser en la senda láser 3 es dirigido hacia ambos fotodiodos 170 y 172 y es así la mejor ubicación para detectar los datos. Finalmente, la senda láser 4 intercepta un retro borde de un canal y es reflejada hacia el fotodiodo 172 solamente. La FIG. 15, muestra una forma de onda típica en el fotodiodo 172 en la medida en que el haz láser explora a través de un micro canal. La forma de onda muestra que la posición de desborde frontal del canal 110 se ubica en aproximadamente 1385 conteos, la posición media se localiza en aproximadamente 1425 conteos, y el borde trasero del canal 110 se localiza en 1475 conteos.

En una realización, el software de hallazgo de carril determina la posición de la mitad de cada canal 110 mediante una serie de etapas diseñadas para eliminar picos espurios y para identificar la posición de borde frontal y trasero de cada micro canal 110. De esta realización, las intensidades de los picos provenientes de todos los canales detectados por los fotodiodos 170 y 172 se normalizan a un valor máximo de 1. Al menos tres exploradores de la zona de detección son registrados y un promedio de vagón de tres puntos se efectúa para alisar los datos recolectados y para alisar las trazas y asegurar la interpretación precisa. Todos los picos dentro de la zona de detección 150 se identifican y cualquier pico no identificado en ambas formas de onda recolectadas por el fotodiodo 170 y el fotodiodo 172 se elimina. El resto de los picos se revisan en busca de picos espurios introducidos por aberraciones, tales como, por ejemplo, aberraciones originadas por raspaduras u otras imperfecciones de partículas extrañas en el módulo de prueba transparente 55. Los picos que resultan de estos defectos o raspaduras se identifican al examinar el espacio entre cada pico. Como se muestra en la FIG.15, cada uno de los picos asociados con un canal particular esta espaciado a intervalos regulares que corresponden a la posición frontal, media y trasera del canal. Esto es, cada pico se localiza a un tercio de la distancia del ancho del canal separado uno del otro. Así, cualquier pico que no esté correlacionado con otros picos en una distancia de ancho de un tercio del canal entre estos se elimina de la forma de onda. Todos los picos restantes se utilizan para determinar la posición media de cada canal 110.

En una realización, la posición media de los canales se determina identificar primero el primer pico en la forma de onda. Este pico se identifica como el borde frontal de primer canal. Se identifican los picos dentro de un ancho de canal 1, 2 desde el borde frontal. Estos picos identificados son promediados para determinar la posición media del primer canal. El siguiente pico localizado a lo largo de la forma de onda a una distancia mayor de los anchos del canal 1, 2, desde el primer pico se identifica y se etiqueta el borde frontal del segundo canal. Los picos dentro de los anchos del canal 1, 2, desde el borde frontal del segundo canal se identifican y se promedian juntos para determinar la posición media del segundo canal. Este proceso de identificación del borde frontal y la posición media continua hasta que se identifican todos los canales con el módulo de prueba 55. Las posiciones medias de cada canal se promedian juntas para determinar el promedio de descentrado desde la posición de borde frontal de los canales. Este descentrado es representativo de la distancia entre el borde frontal y la posición media de cada canal. Un archivo de referencia que incluye las posiciones de borde frontal de cada uno de los canales se actualiza con un descentrado determinado para guiar el movimiento del explorador 62 para dirigir el haz láser a las posiciones apropiadas para la recolección de datos.

En ciertas realizaciones, el dispositivo de separación/secuenciación de ácido nucleico robusto 10 incluye además un sistema novedoso para remover ruido de transfondo desde la señal recolectada por el sistema de excitación y detección de fluorescencia 40. Específicamente, la señal de fluorescencia que es reconectada por el sistema de detección y transmitido a los detectores consiste predominantemente de dos fuentes, el bioanalito etiquetado y el transfondo. El componente de transfondo se relaciona con todos los componentes detectables excepto por el bioanalito etiquetado e incluye la fluorescencia del módulo de prueba 55, cualquiera de los elementos fluorescentes en la senda de detección, y la luz de transfondo no se bloquea. Este transfondo es de un nivel de intensidad fijo y agrega directamente la señal desde el bioanalito etiquetado. En una realización de la presente invención, el circuito de sustracción de línea base se implementa para retirar el nivel de transfondo fijo desde el detector antes de la amplificación y conversión electrónica de la señal de forma análoga a digital. La remoción del ruido de transfondo (es decir el descentrado de transfondo) remite un rango dinámico mayor para la detección de la señal. En los sistemas de la técnica anterior, los detectores convierten la fluorescencia detectada (transfondo y señal) en una corriente, que es luego convertida en un voltaje a través de una amplificación electrónica. El voltaje análogo se convierte a forma digital a través de un convertido análogo a digital. En ciertas realizaciones de la presente descripción, una fuente de corriente se conecta al circuito detector, directamente después del detector y antes de la amplificación electrónica, para posibilitar la aplicación de una corriente de sustracción para la remoción del transfondo y conducir a un rango dinámico mayor que los dispositivos de la técnica anterior. La corriente se controla electrónicamente y es seleccionable por el usuario.

Una de las ventajas del sistema de sustracción del transfondo de la presente descripción sobre los sistemas de la técnica anterior es el rango dinámico de señal creciente. Como resultado del rango dinámico de señal creciente, un rango mayor de concentraciones de muestra se puede detectar. Por ejemplo, una muestra recolectada de una escena de crimen típicamente incluye una concentración grande de ADN de la víctima y una concentración pequeña del ADN del perpetrador. Esto es, la muestra incluye una cantidad diluida del ADN del perpetrador y una mayor concentración del ADN de la víctima. El sistema de sustracción de transfondo de la presente invención le permite al usuario detectar un rango grande de concentraciones de señal/muestra dentro de una muestra única sin saturar el convertidor A/D con ruido de transfondo, aunque teniendo suficiente sensibilidad para detectar la concentración de dilución de la segunda fuente de ADN (por ejemplo el ADN del perpetrador).

EJEMPLOS

Se suministran los siguientes ejemplos para ilustración adicional y facilitar el entendimiento de la invención. Estos ejemplos específicos pretenden ser ilustrativos de la invención y no pretenden ser limitantes.

Ejemplo 1

El siguiente ejemplo ilustra un uso forense de un dispositivo de análisis de ácido nucleico robusto de acuerdo con la presente invención. En este ejemplo, un aparato para análisis de ácido nucleico robusto similar a aquel mostrado en las FIGS. 1A, 1B y 1C se utilizó para analizar una muestra de referencia.

La muestra de referencia consistió de una escalera alélica proveniente de un kit STR comercialmente disponible (AmpFISTR SGM Plus, from Applied Biosystems, Foster City, CA) y tamaño estándar (GeneScam 400 HD(ROX) Size Standard, from Applied Biosystems, Foster City, CA). La muestra se preparó utilizando dos microlitros de escalera alélica, 0,5 microlitros de tamaño estándar, y 10,5 microlitros de agua des ionizada. La muestra se desnaturalizó antes de análisis al calentar la muestra a aproximadamente 90 grados C durante aproximadamente 3 minutos luego de enfriar rápidamente la muestra sobre hielo. La muestra fue inyectada entonces en un chip microfluídico limpio.

Antes de la inyección de la muestra, se limpió el chip microfluídico y se acondiciono para eliminar el exceso de iones en los canales del chip. Específicamente, cada canal en el chip microfluídico fue llenado a través de una prensa con 4% de material de tamizado LPA (Dakota Scientific, Sioux Falls, SD) para limpiar los canales y las aberturas del ánodo, cátodo, brazo de muestra, brazo de residuos. Después de que se completó la limpieza, las aberturas del ánodo y el cátodo se llenaron con 500 microlitros de amortiguador 1 x TTE (disponible de Dakota Scientific, Sioux Falls, SD), la abertura del brazo de residuos se llenó con 33 microlitros de amortiguador 1 x TTE, y la abertura del brazo de la muestra se llenó con 13 microlitros de agua des ionizada. Cada uno de los canales se acondicionó a través de un proceso de pre electroforesis en el cual un campo eléctrico de 190 V/cm se aplicó a través del cátodo y el ánodo durante 6 minutos seguido por un campo eléctrico de 875 V/cm que se aplicó a través de un brazo de muestra en un brazo de residuo durante 3 minutos.

Luego de la pre electroforesis, las aberturas del cátodo, ánodo, brazo de muestra y brazo de residuo se limpió y se llenó. Las aberturas de cátodo y ánodo se llenaron con 500 microlitros de un amortiguador 1 x TTE, la abertura del brazo de desperdicio se llenó con 33 microlitros de amortiguador de TTE, y la abertura de brazo de muestra se llenó con 13 microlitros de la muestra tal como se describió anteriormente.

La muestra se cargó en el canal de separación al aplicar el campo de 875 V/cm a través de los brazos de muestra y desperdicio aunque aplicando simultáneamente el campo de 88 V/cm a través del ánodo y el cátodo durante 1, 5 minutos. Luego de la carga, la muestra se separó y el exceso de muestra se retiró del canal de separación al aplicar 190 V a través del cátodo y el ánodo aunque aplicando simultáneamente 800 V a cada una de las aberturas de brazos de muestra y brazo de residuo. Estas condiciones se aplicaron al chip microfluídico durante 45 minutos para separar la muestra.

Los sistemas de excitación y detección de fluorescencia fueron entonces activados para excitar fluorescentemente los locus STR etiquetados dentro de la muestra separada. Las FIGS. 16A, 16B, 16C y 16D muestran los electroforegramas brutos de la escalera alélica generada por los datos recolectados por el sistema de excitación y detección de fluorescencia. Cada uno de los electroforegramas recolectados representa un dato de intensidad capturado por uno de los tubos fotomultiplicadores ubicados dentro del aparato. Esto es la FIG.16A muestra los datos recolectados por el tubo fotomultiplicador configurado para amplificar y detectar la luz de longitud de onda azul, la FIG. 16B muestra los datos recolectados por el tubo fotomultiplicador configurado para amplificar y detectar la luz de longitud de onda verde, la FIG.16C muestra los datos recolectados por el tubo fotomultiplicador configurado para amplificar y detectar la longitud de onda amarilla, y la FIG.16D muestra los datos recolectados por el tubo fotomultiplicador configurado para amplificar y detectar la luz de longitud de onda roja.

Los datos de cada uno de los electroforegramas fueron corregidos utilizando métodos de procesamiento de señal para suavizar la línea base, sustracción, y corrección de color con un método de matriz 4 x 4 como se describió por L. Li et al. En electroforesis 1999, volumen 20, emisión 1, páginas 1433-1442. Las FIGS. 17A, 17B, 17C y 17D muestran las vistas

5 expandidas de los datos corregidos. La FIG. 17A, que muestra la traza corregida de datos de la luz de longitud de onda azul, muestra la presencia de los siguientes locus: D3S 1358, VWA, D16S 539, y D2S 1338 y todos los de los alelos (es decir 8, 14, 9, y 14, respectivamente) asociada con cada uno de los locus, en la FIG. 17B, la traza corregida de los datos de luz de longitud de onda verde muestra la presencia de Amelogenina y el locus de 8S 1179, D21S 11, D18S51 y los alelos asociados a este. La FIG. 17C muestra la traza corregida de los datos de luz de longitud de onda amarilla. La FIG. 17C muestra la presencia de los siguientes locus: D19S433, TH01, y FGA (ambos conjuntos de peso molecular bajo y alto) junto con los alelos asociados con cada uno de los datos de luz de longitud de onda. La traza de luz de longitud de onda roja corregida muestra picos de tamaño estándar en 90, 100, 120, 150, 160, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 290, 300, 320, 340, 360, 380 y 400.

10 La identificación clara de los 11 alelos asociados a locus junto con todos los estándares de tamaño en la muestra, muestran que el aparato para analizar el ácido nucleico robusto tiene una capacidad de discriminación bien adecuada para el análisis forense. Específicamente, los resultados mostrados en la FIG. 16 A-D y 17 A-D muestran que este aparato tiene un poder de discriminación de aproximadamente 1 a $3,3 \times 10^{12}$.

15 Ejemplo 2

20 El siguiente ejemplo lustra el uso de una secuencia de ADN de un dispositivo de análisis de ácido nucleico robusto de acuerdo con la presente invención. En este ejemplo, un dispositivo de análisis de ácido nucleico robusto similar a aquel mostrado en las FIGS 1A, 1B y 1C se utilizó para analizar una muestra que incluye una plantilla de ADN proveniente de un amplicón de B.FR. HXB2, con un cebador GB107. La muestra se amplificó y se etiquetó con un kit de secuenciación de ciclo comercialmente disponible (Kit de pre mezcla de Secuenciación de Ciclo Terminador de Tinte Termo Secuencasa II) disponible de Amersham Biosciences, ahora parte de GE Healthcare (Waukesha, Wisconsin). La reacción de secuenciación de ciclo se efectuó siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. La reacción de secuenciación total consistió de 750 nano gramas de una plantilla de ADN, un microlitro de cebador 5 micromolar, 2 microlitros de mezcla de reactivo de Termo Secuencasa II, 2 microlitros de mezcla de reactivo de Termo Secuencasa II B, y agua hasta llegar a un volumen de 20 microlitros. La reacción fue ciclada con el siguiente programa, con las etapas 2 a 4 siendo repetidas 30 veces: 1) 96 grados C, 1 minuto; 2) 96 grados C, 30 segundos, 3) 50 grados C, 15 segundos; 4) 60 grados C, 1,5 minutos; y 5) 60 grados C, 5 minutos. El producto de reacción se almacenó a 6 grados C hasta que estuvo listo para uso momento en el cual la muestra se resuspendió en 130 microlitros de agua y se desnaturizó al calentar la muestra 70 grados C durante 3 minutos seguida por enfriado sobre el hielo.

35 Antes de inyectar la muestra en un módulo de prueba transparente los canales del módulo de prueba se limpiaron y acondicionaron (es decir se sometieron a pre electroforesis) tal como se describió en el Ejemplo 1. Luego de la pre electroforesis, las aberturas del ánodo, cátodo, brazo de muestra, y brazo de residuo de cada canal se limpió y llenó. Las aberturas de cátodo y ánodo se llenaron con 500 microlitros de un amortiguador 1 x TTE disponible de Dakota Scientific, Sioux Falls, SD. La abertura del brazo de residuos se llenó con 33 microlitros de un amortiguador 1 x TTE y la abertura del brazo de muestra se llenó con 13 microlitros de la muestra resuspendida y desnaturizada

40 La muestra se cargó en el canal de separación proveniente de la abertura del brazo de muestra al aplicar un campo de 875 V/cm a través del brazo de muestra y el brazo de residuo durante 60 segundos. La muestra fue entonces separada con una muestra de exceso que es empujada hacia atrás hacia las aberturas de brazo de muestra y residuo al aplicar 190 V a través de el cátodo y el ánodo, aunque aplicando simultáneamente 400 V a cada uno de las aberturas del brazo de muestra y de residuo. Estas condiciones de voltaje se aplicaron durante 60 minutos para separar la muestra.

45 El sistema de excitación y detección de fluorescencia se activó entonces para excitar el ADN etiquetado fluorescentemente dentro de las muestras separadas. Las Figs. 18A, 18B, 18C, y 18D muestran los electroforegramas brutos de la secuencia de ADN generada por los datos recolectados por el sistema de excitación y detección de fluorescencia. Cada uno de los electroforegramas recolectados representa unos datos de intensidad capturados por uno de los tubos del fotomultiplicador ubicados dentro del aparato. Esto es la FIG. 18A muestra los datos recolectados por el tubo fotomultiplicador configurado para amplificar y detectar la luz de longitud de onda azul, la FIG. 18B muestra los datos recolectados por el tubo fotomultiplicador configurado para amplificar y detectar la luz de longitud de onda verde, la FIG. 18C muestra los datos recolectados por el tubo fotomultiplicador configurados para amplificar y detectar la luz de longitud de onda amarilla, y la FIG 18D muestra los datos recolectados por el tubo fotomultiplicador configurado para amplificar y detectar la luz de longitud de onda roja.

50 Los datos provenientes de cada uno de los electroforegramas se corrigió utilizando métodos de procesamiento de señal tal como se describe en L. Li et al en Electroforesis 1999, volumen 20, edición 1, páginas 1433-1442. El procesamiento adicional de las trazas corregidas se logró por una llamada base, que asocia uno de los cuatro nucleótidos con cada pico en la traza. Las trazas son suavizadas al utilizar un vagón de 9 puntos promedio y luego las trazas son diferenciadas. Los picos identifican al evaluar las trazas diferenciadas para ubicar el cruce cero con un cambio en pendiente positivo o negativo. Los picos identificados en las trazas en la luz de longitud de onda azul, la luz de longitud de onda verde, la luz de longitud de onda amarilla y la luz de longitud de onda roja se correlacionan con las bases G.A.T. y C, respectivamente. Un experto en la técnica de procesamiento de datos puede apreciar la naturaleza rudimentaria de esta rutina de llamada de base, que se utilizó para demostrar la efectividad de este dispositivo.

5 Llamadores de base más sofisticados generan típicamente lecturas contiguas mayores con los mismos datos comparados con los métodos descritos anteriormente. Una descripción detallada de la llamada base se puede encontrar en "Base- Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred I. Accuracy Assessment" de Ewing et al., in Genome Research 1998, volumen 8, páginas 175-185 y "Base- Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred II. Error Probabilities" de Ewing et al., in Genome Research 1998 volumen 8, páginas 186-194, cuya descripción se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

10 Las FIGS. 19A, 19B, 19C, y 19D muestran vistas expandidas de los datos corregidos. La FIG. 19A, que muestra la traza corregida de los datos para la luz de longitud de onda azul, muestra la clara identificación del nucleótido guanina. En la FIG. 19B, en la traza corregida de los datos de la luz de longitud de onda verde muestran la clara identificación de la adenina. La FIG. 19C muestra la traza corregida de los datos de luz de longitud de onda amarilla. La FIG. 19C muestra la clara identificación de la timina. La FIG. 19D muestra la traza corregida de los datos de luz de longitud de onda roja. La traza de luz de longitud de onda roja corregida muestra la identificación de la citosina.

15 En referencia a las FIGS. 20A, 20B, y 20C, la clara identificación de los nucleótidos asociados con la plantilla de ADN proveniente del amplicón HIV conocido B. FR. HXB2 muestra que el dispositivo de análisis de ácido nucleico robusto es bien adecuado para análisis de secuenciación para ser efectuado en los puntos de ubicaciones de cuidado. La FIG. 20A muestra un listado de secuencia del amplicón conocido. La FIG. 20B muestra un listado de secuencia obtenido del análisis de los resultados generados provenientes del dispositivo de análisis de ácido nucleico robusto utilizado en este ejemplo. La lista de secuencia mostrada en la FIG. 20B no está editada y se generó después de los datos tal como se muestra en las FIGS. 19A- 19B estuvieron utilizando técnicas complementadas con inverso conocidas en el arte debido al cebador inverso utilizado con esta muestra. La lista de la secuencia no editada mostrada en la FIG. 20B consiste de 20 378 bases contiguas que exhiben 100% de identificación con el amplicón de la FIG. 20A, desde las bases 436 a la 813. Este resultado se mejora además al evitar manualmente los datos y retirar y reemplazar los obvios errores incorporados durante la llamada base. La FIG. 20C muestra la lista de secuencia obtenida después de editar manualmente los datos. La lista de secuencia editada consiste de 544 bases continuas que exhiben 100% de identificación con el amplicón de las bases 297 a 840.

30 Aunque una cierta realización de la presente invención se ha descrito al utilizar un esquema de hallazgo de carril particular para determinar la ubicación de la mitad de cada canal, otros algoritmos de hallazgo de carril se pueden aplicar. En una cierta realización adicional de la invención el esquema de hallazgo de carril se puede modificar para detectar los cambios en la fluorescencia en lugar de la intensidad de luz. En esta realización particular, los tubos foto multiplicadores se utilizan para capturar la señal reflejada en lugar de los fotodiodos.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un aparato (10) para procesar una muestra de analito biomolecular, el aparato (10) comprende:
un soporte (20) para sostener un módulo de prueba (55) dicho módulo de prueba (55) comprende una placa transparente que comprende uno o más micro canales (110), en uso al menos un micro canal (110) que está en comunicación fluida con la muestra;
- 10 un dispositivo de electroforesis (30) conectado al soporte 20 para suministrar energía para el módulo de prueba (55);
Una fuente de luz (60) para emitir un haz de luz que el uso excita la fluorescencia en la muestra del analito biomolecular;
un detector de luz (64); y
- 15 una pluralidad de dispositivos ópticos (68, 70, 72) montados dentro del aparato; en donde dicha fuente de luz (60), detector de luz (64) y la pluralidad de dispositivos ópticos (68, 70, 72) se montaron rígidamente a una placa base única (80) para transmitir el haz de luz emitido por la fuente de luz (60) en uso al módulo de prueba (55) y desde el módulo de prueba al detector de luz (64), la placa base (80) que se forma de una pieza única de material y soportada por un m arco (82) que incluye al menos un dispositivo de amortiguamiento (84) para reducir la transmisión de vibración generada por debajo del marco (82) a la placa base (80).
- 20
2. El aparato de la reivindicación 1, en donde la placa base (80) incluye una pluralidad de elementos de aseguramiento para limitar el movimiento de rotación de la pluralidad de dispositivos ópticos (68, 70, 72) sobre la placa base.
- 25
3. El aparato de la reivindicación 1, en donde el soporte (20) para soportar el módulo de prueba (55) comprende: un primer miembro que incluye un par de electrodos (100, 102) dispuesto para conectar eléctricamente con las aberturas dispuesta en el módulo de prueba (55); y un segundo miembro que incluye una característica de aseguramiento automatizada (86) para reducir el movimiento lateral del módulo de prueba (55) cuando el módulo de prueba está ubicado entre el primer miembro y el segundo miembro.
- 30
4. El aparato de la reivindicación 1, en donde en al menos un canal (110) comprende al menos un canal microfluídico.
5. El aparato de la reivindicación 1, en donde el detector de luz (64) incluye al menos cinco fotomultiplicadores.
- 35
6. El aparato de la reivindicación 1, que comprende además un componente de hallazgo de carril para determinar automáticamente una ubicación de al menos un canal (110) dispuesto dentro del módulo de prueba.

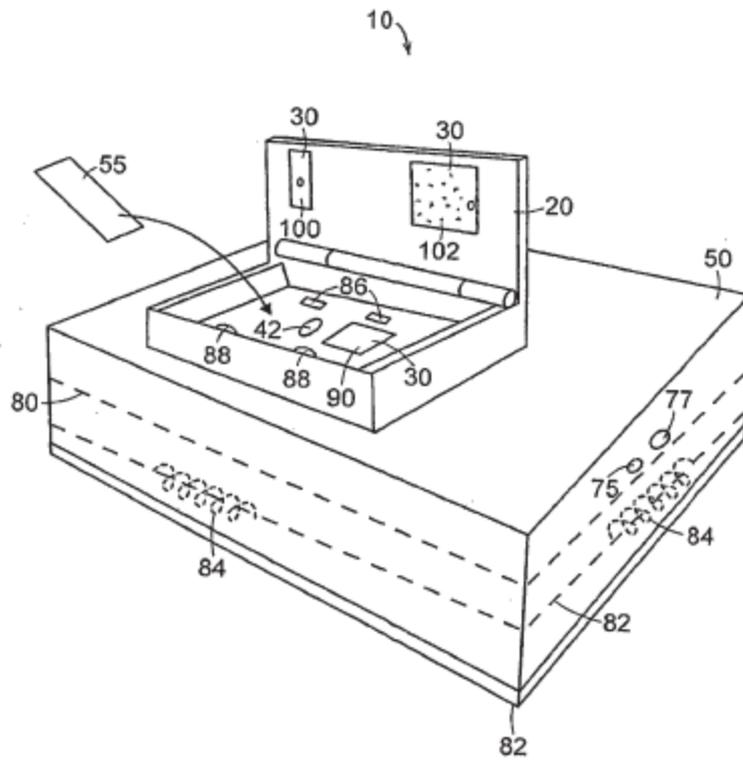


FIG. 1A

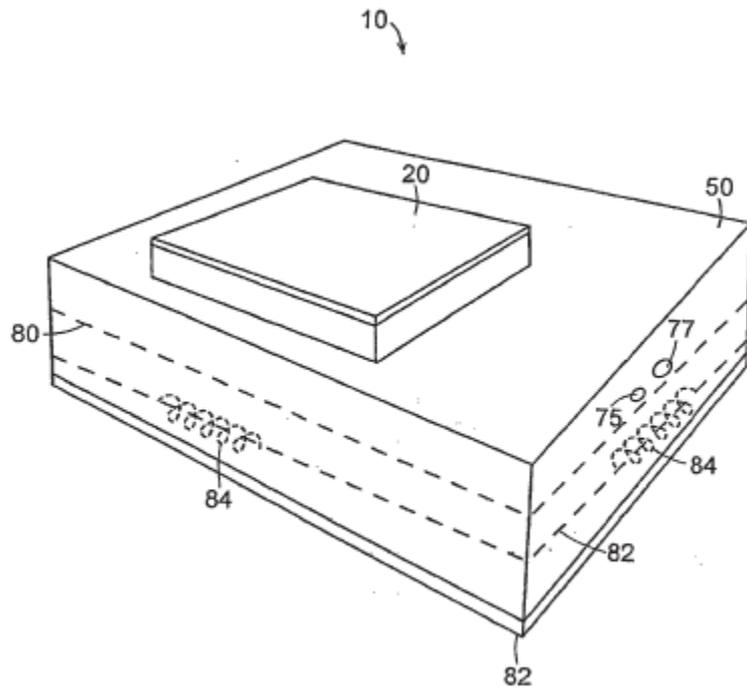


FIG. 1B

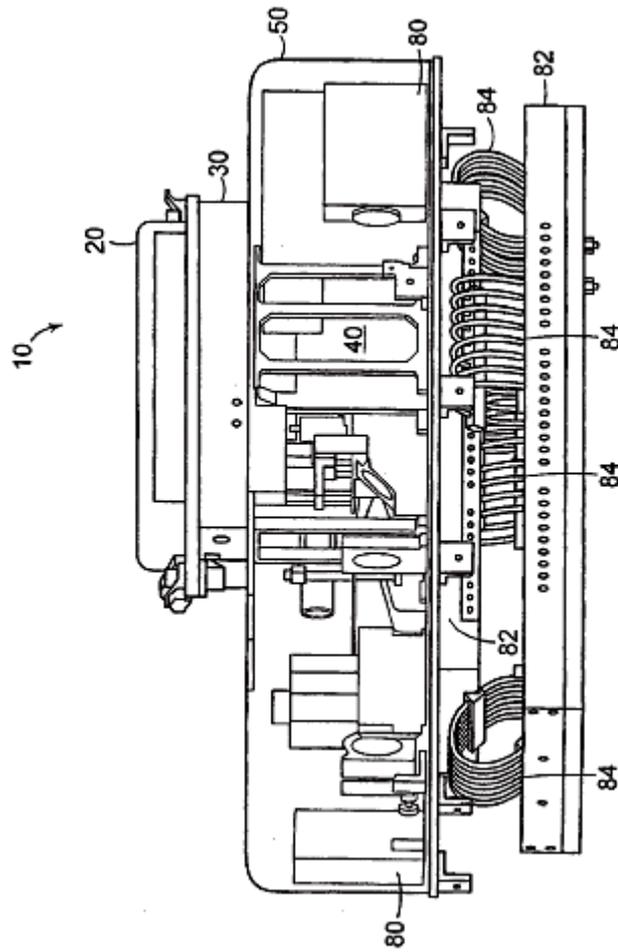


FIG. 1C

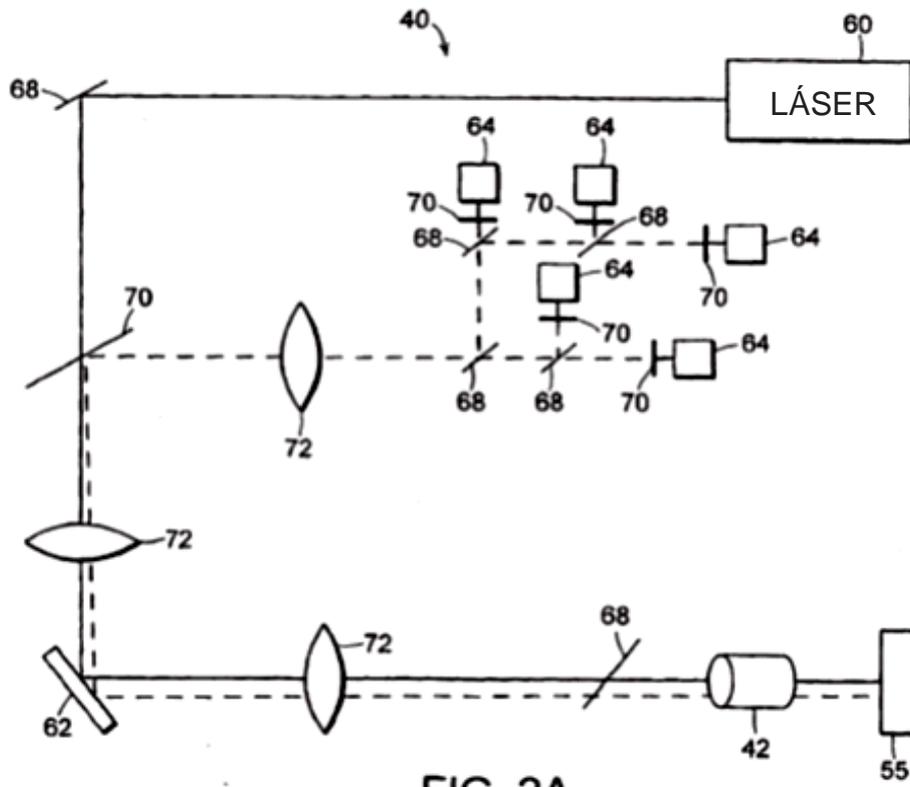


FIG. 2A

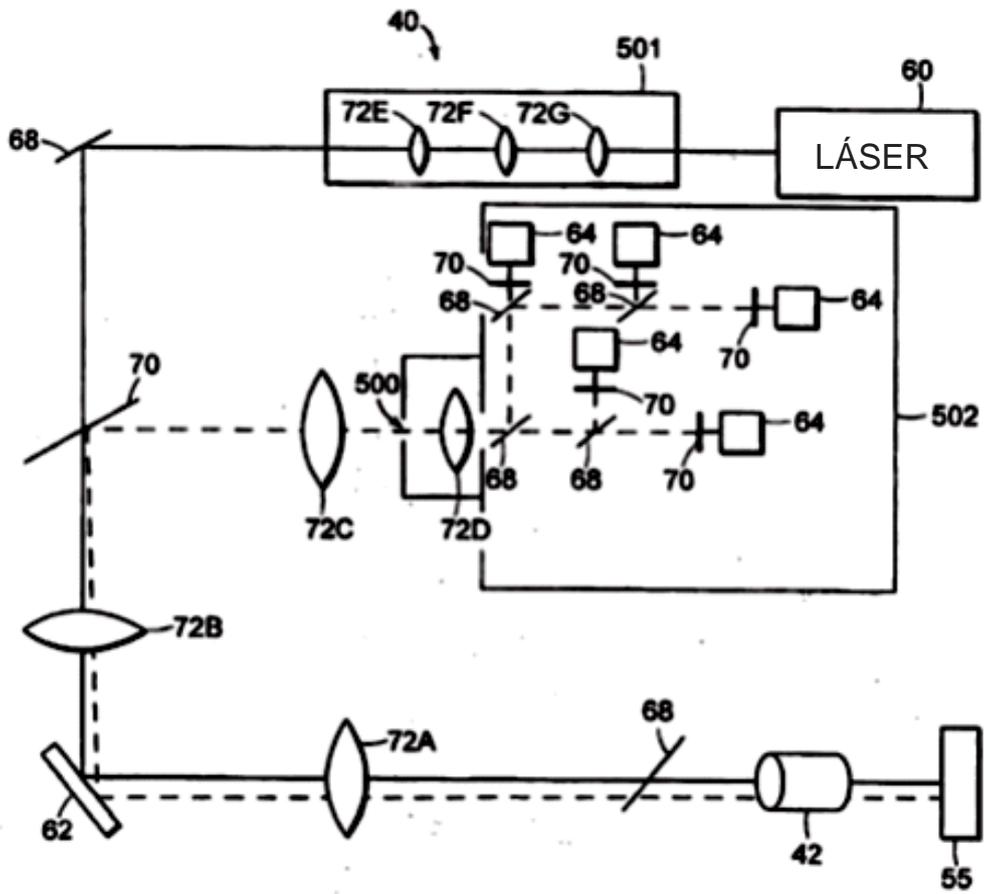


FIG. 2B

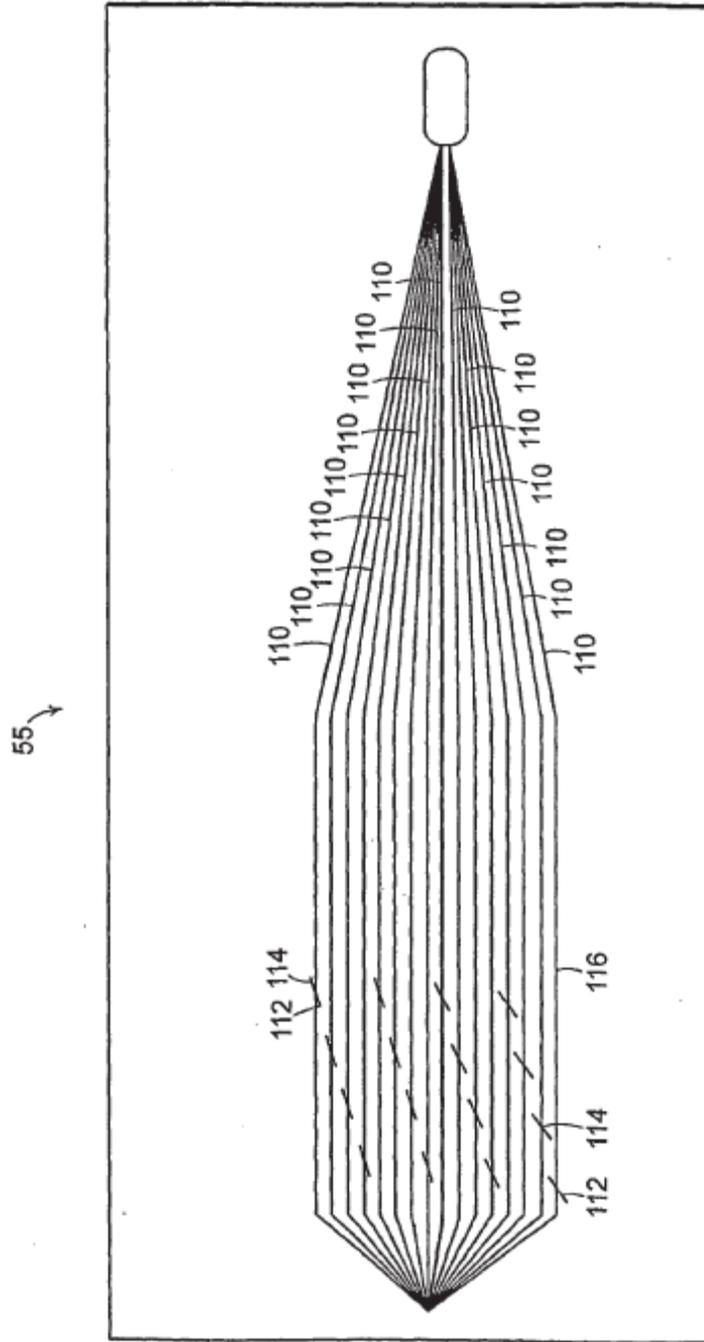


FIG. 3A

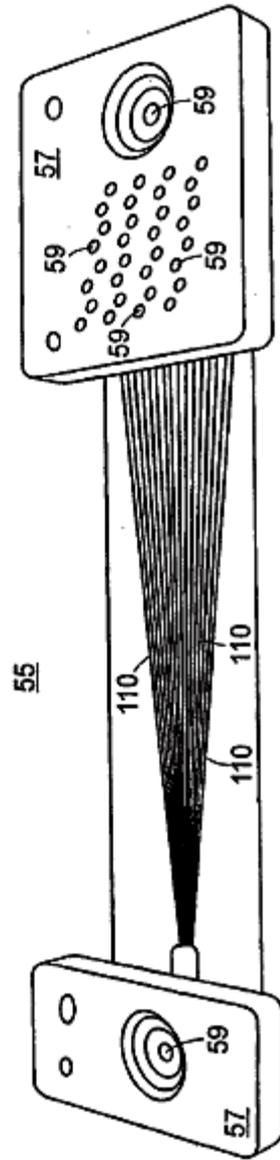


FIG. 3B

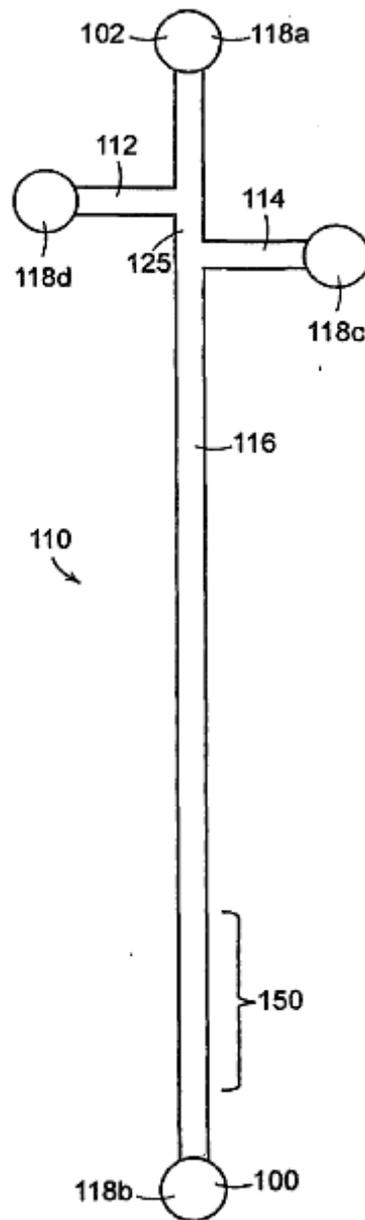


FIG. 4

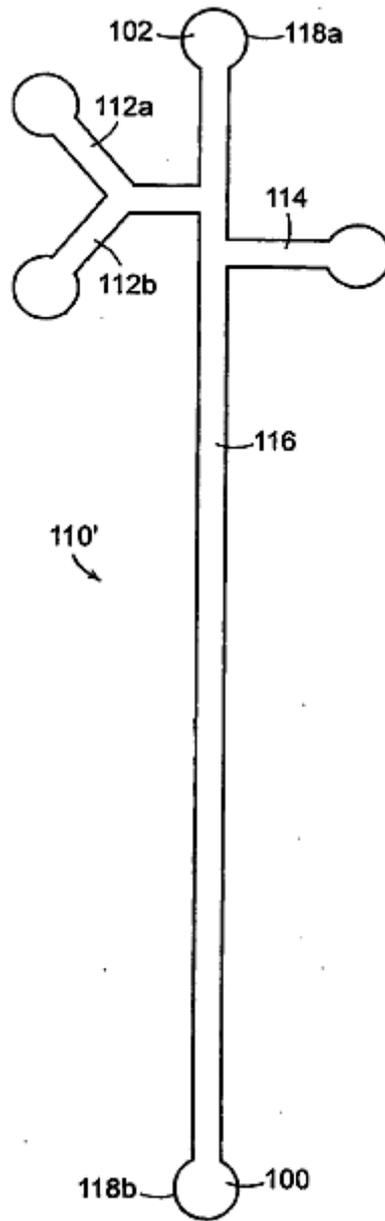


FIG. 5

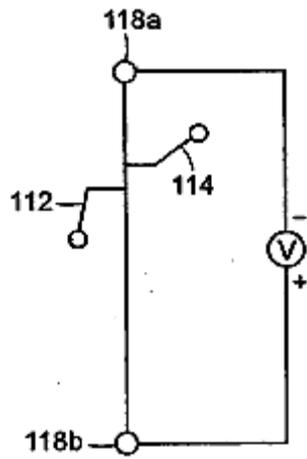


FIG. 6

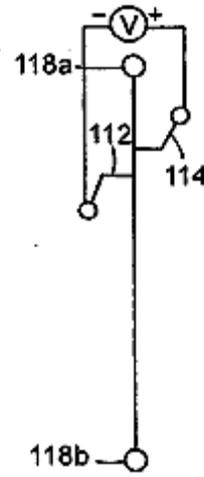


FIG. 7

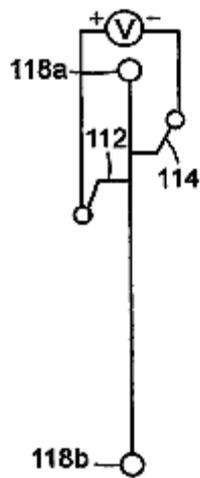


FIG. 8

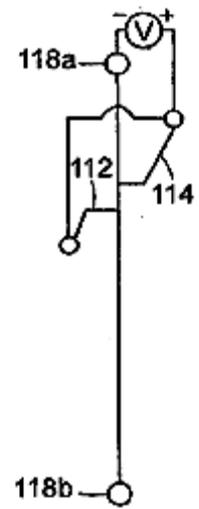


FIG. 9

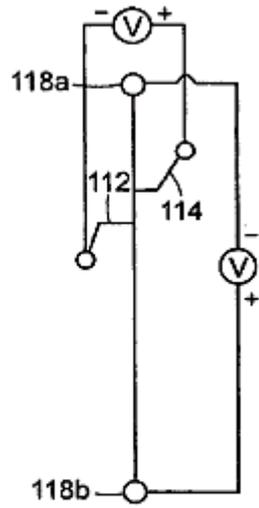


FIG. 10

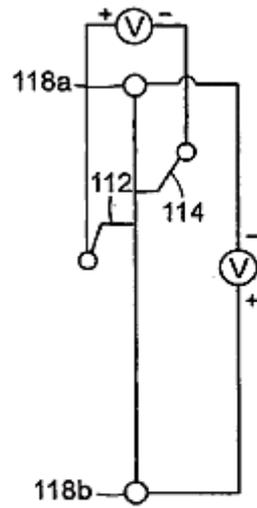


FIG. 11

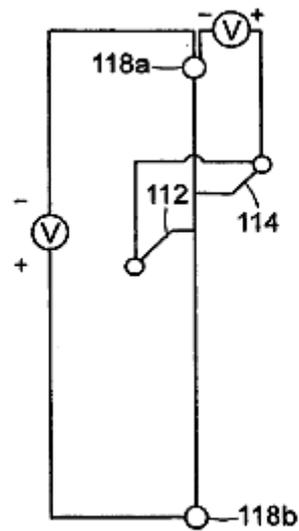


FIG. 12

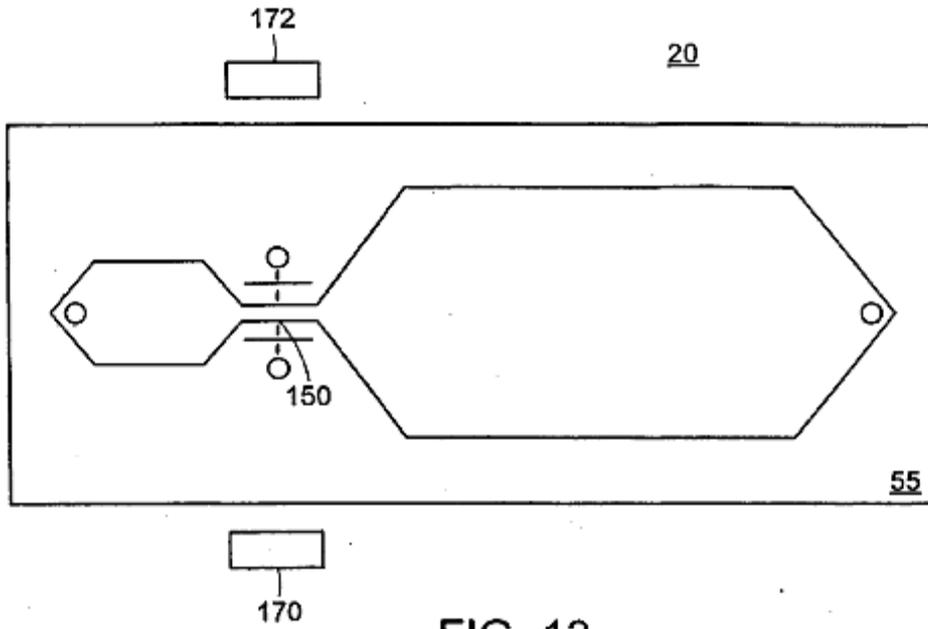


FIG. 13

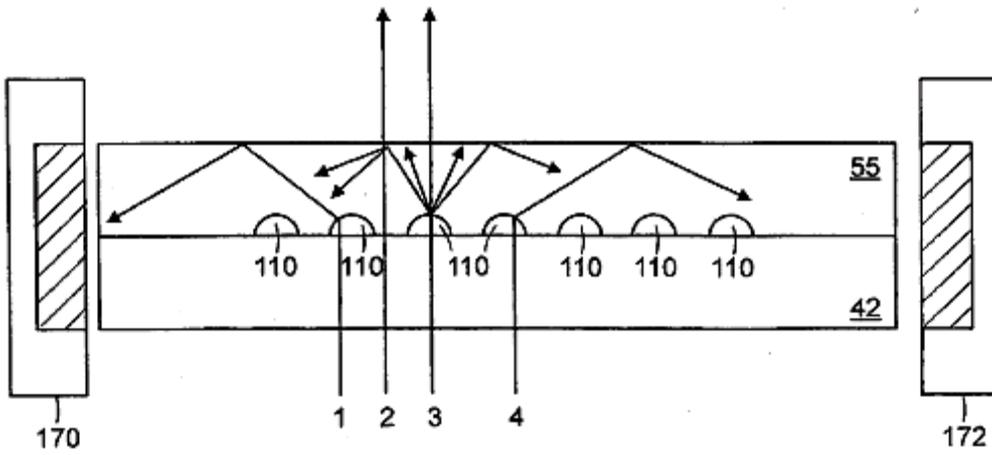


FIG. 14

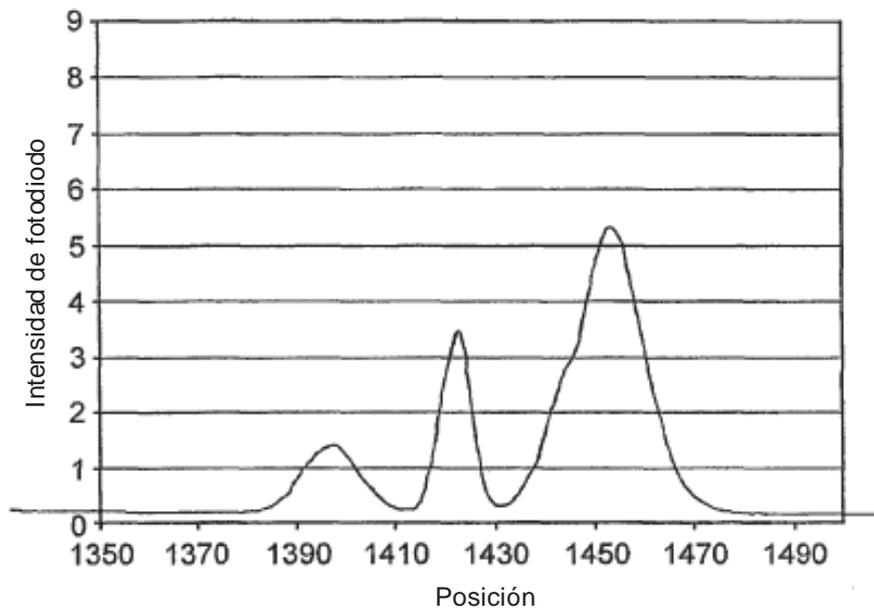


FIG. 15

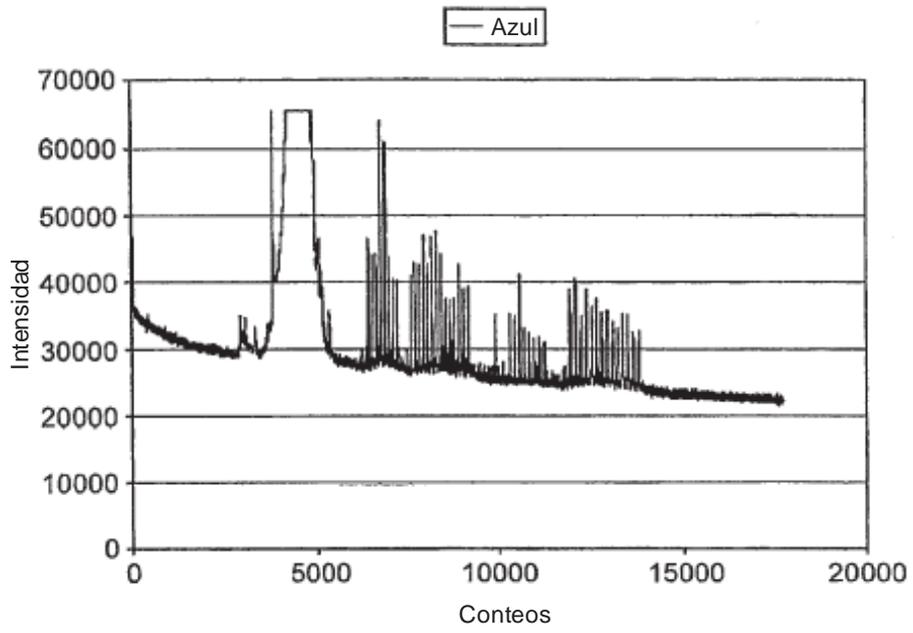


FIG. 16A

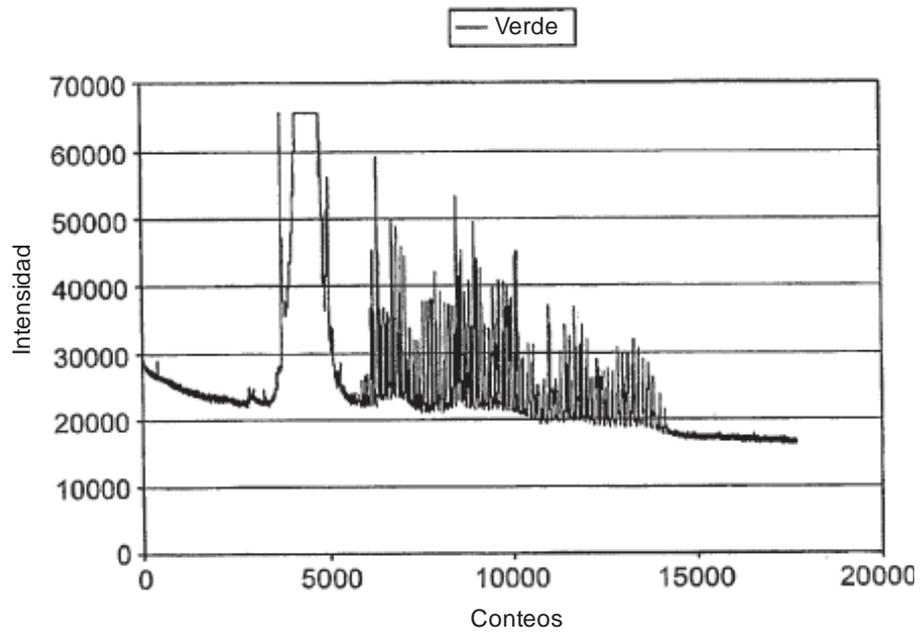


FIG. 16B

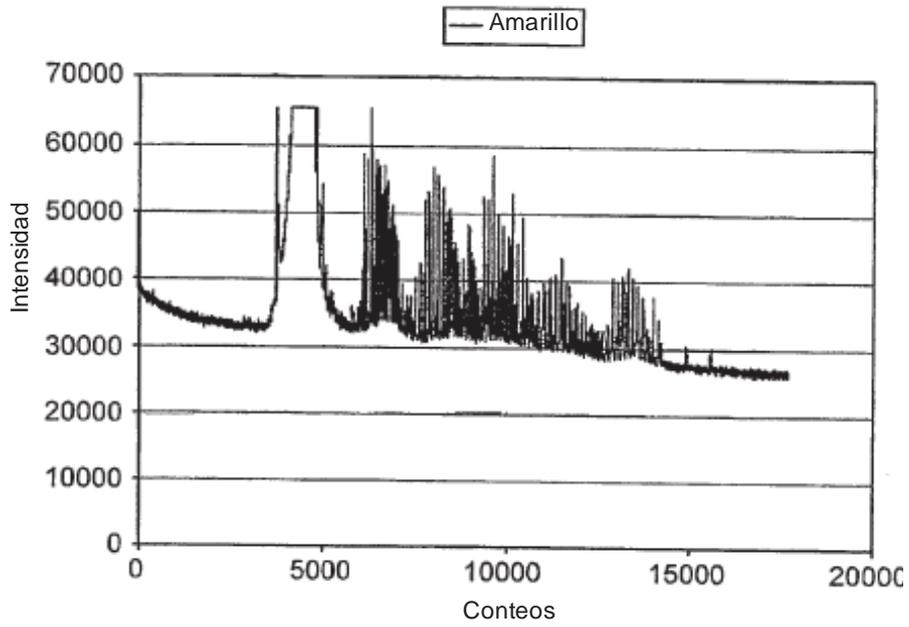


FIG. 16C

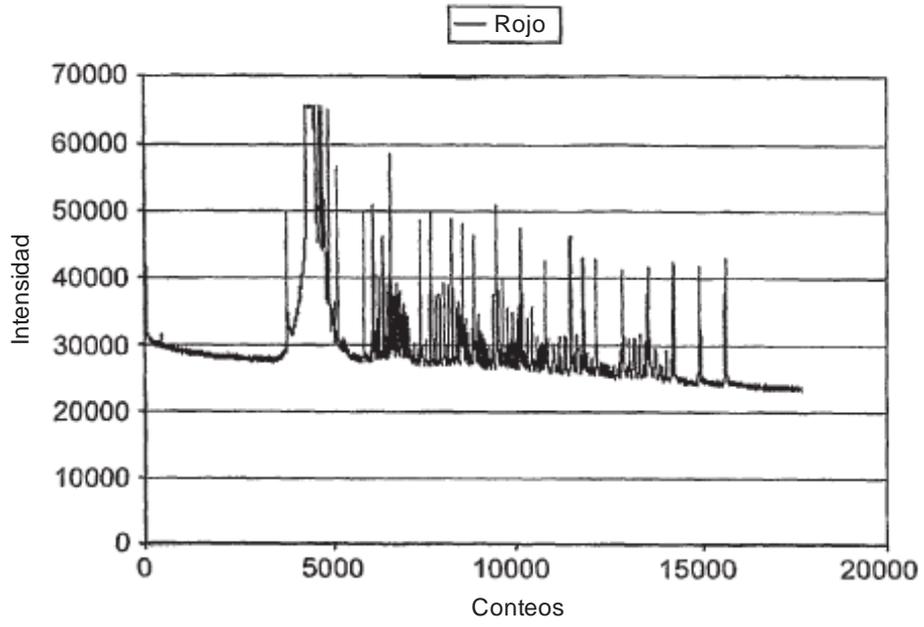


FIG. 16D

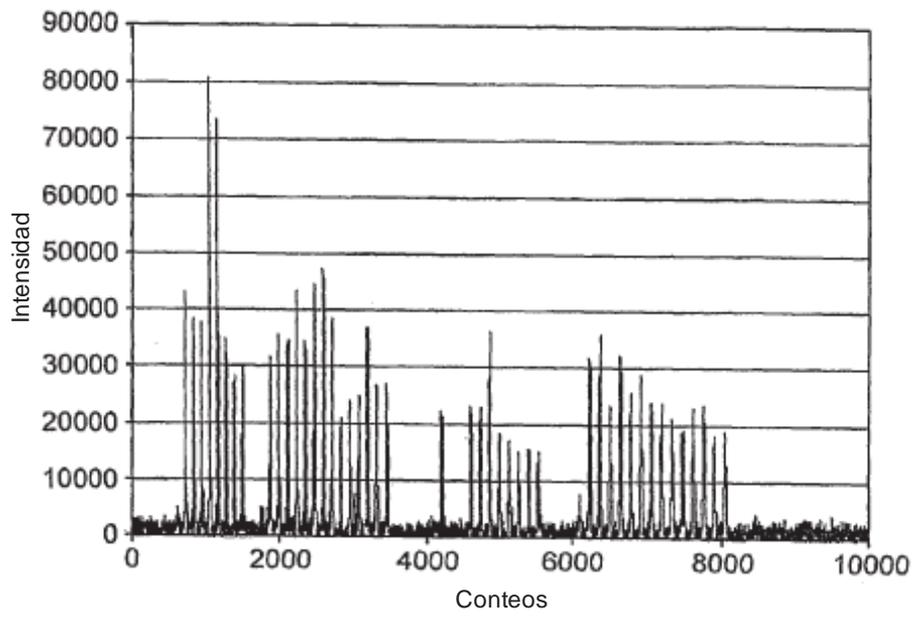


FIG. 17A

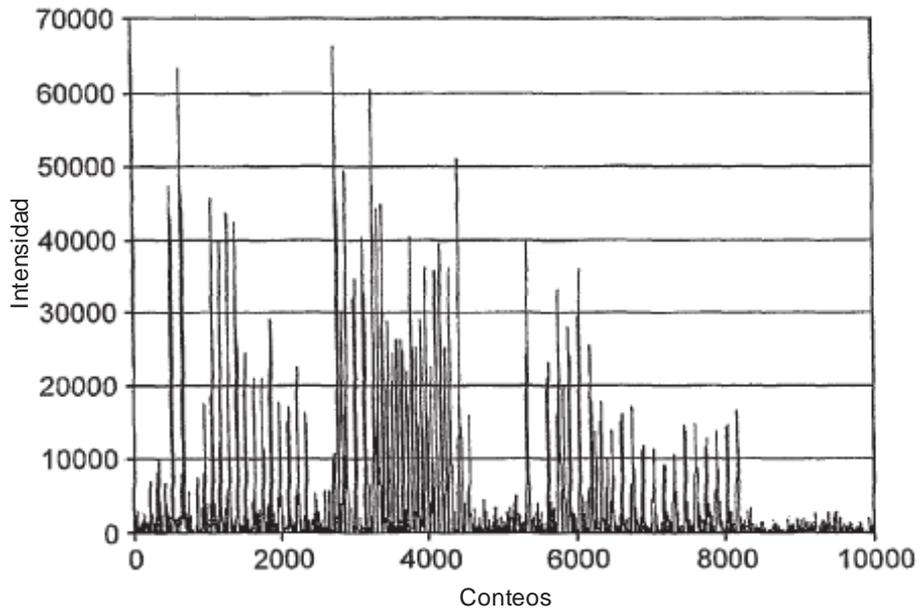


FIG. 17B

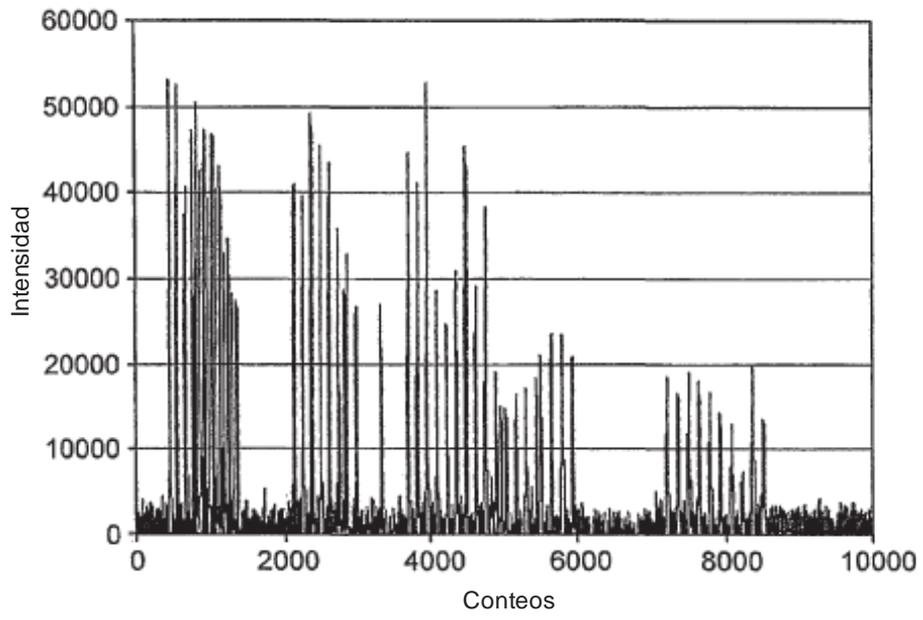


FIG. 17C

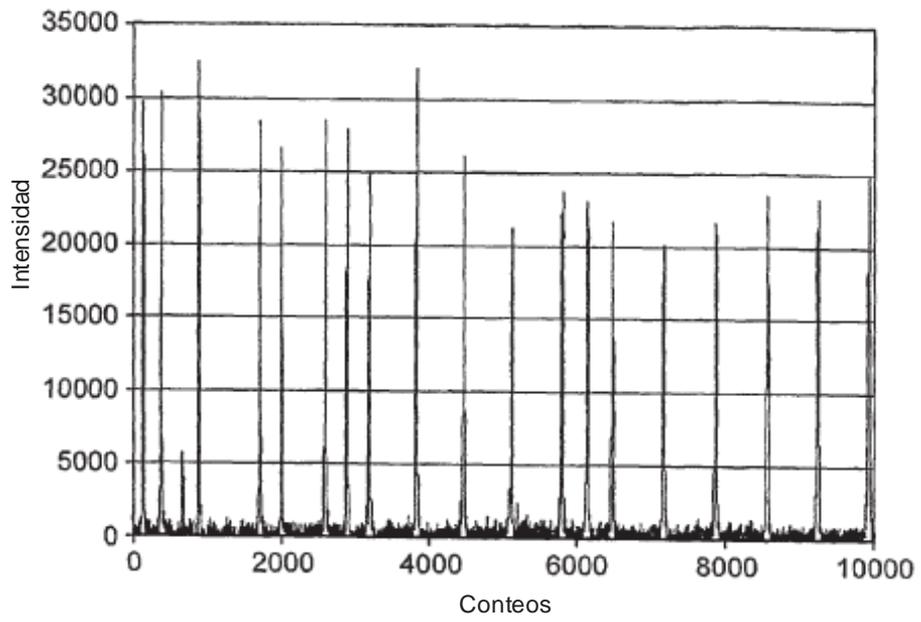


FIG. 17D

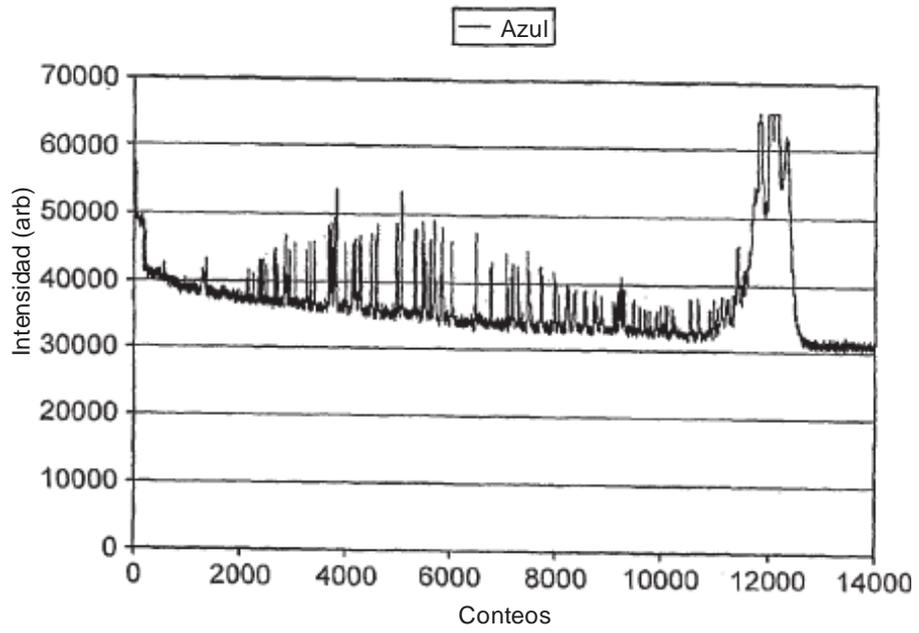


FIG. 18A

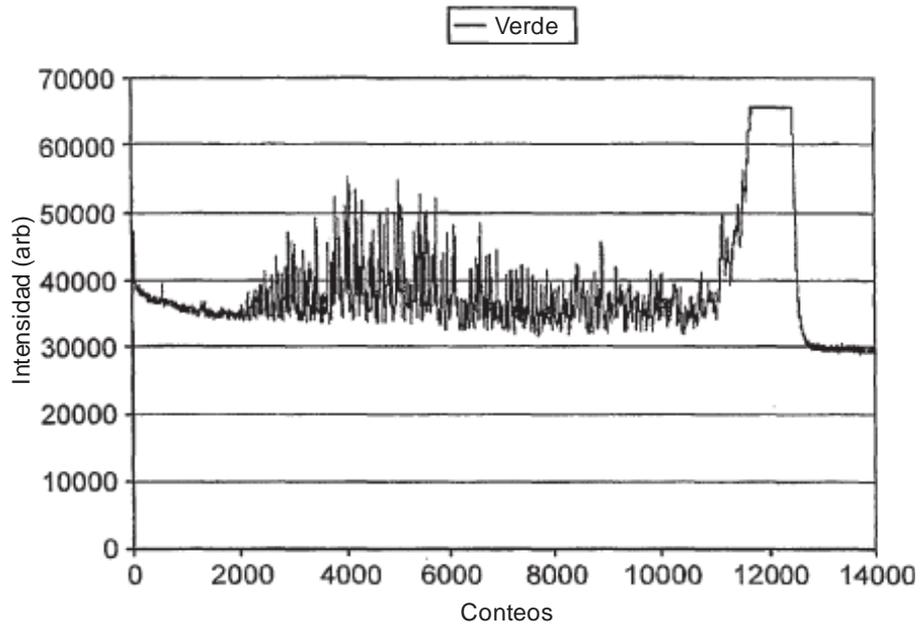


FIG. 18B

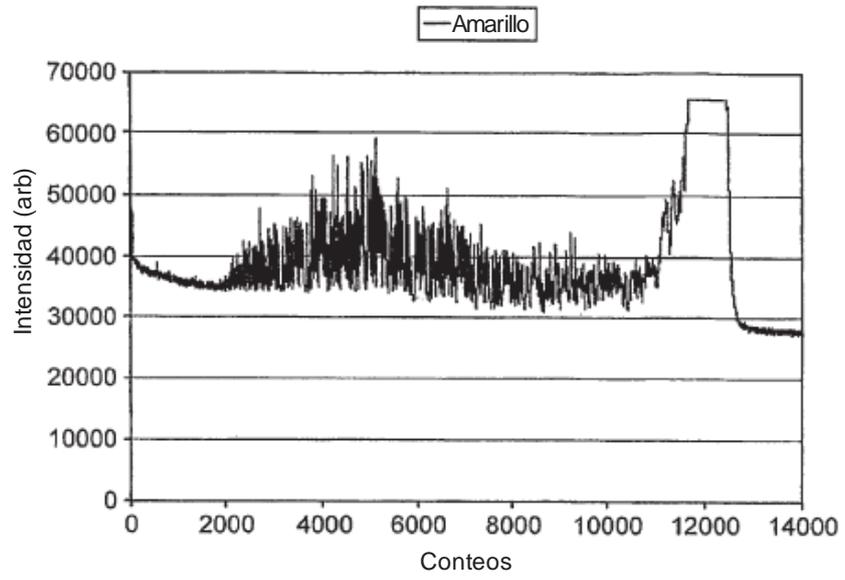


FIG. 18C

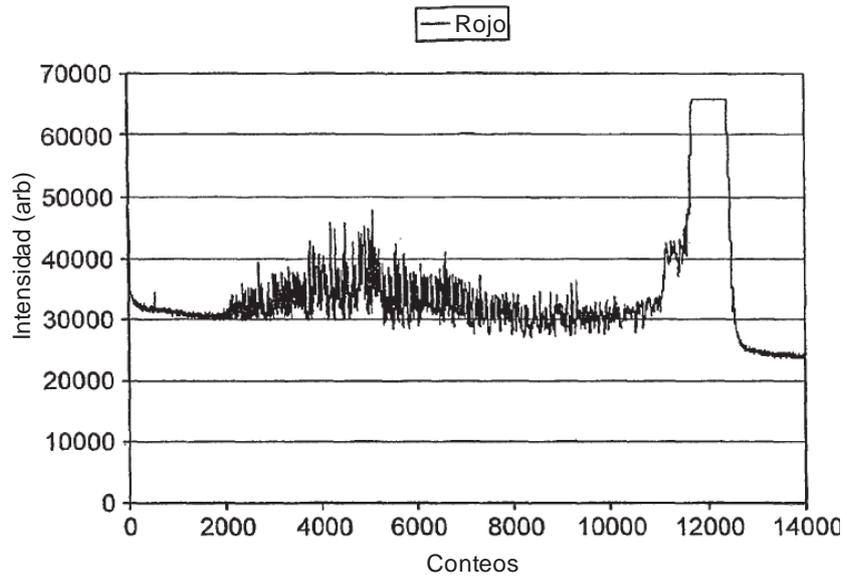


FIG. 18D

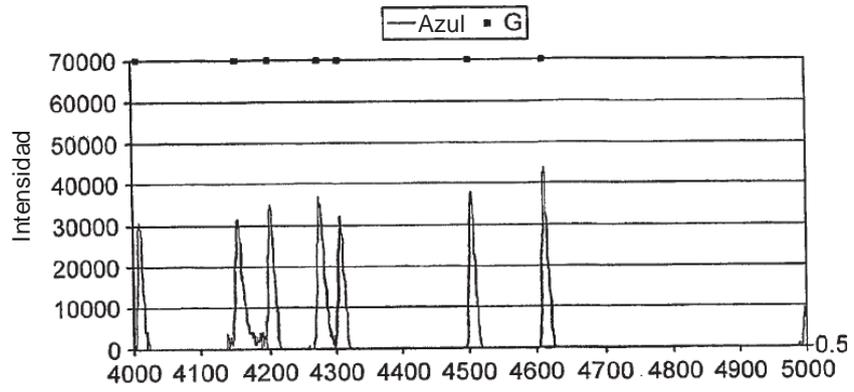


FIG. 19A

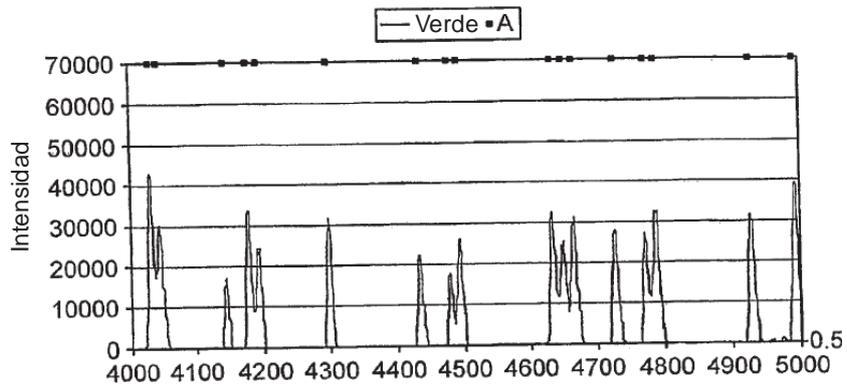


FIG. 19B

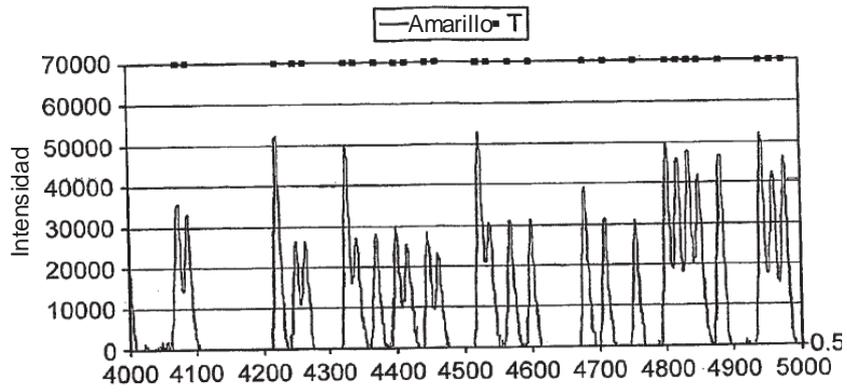


FIG. 19C

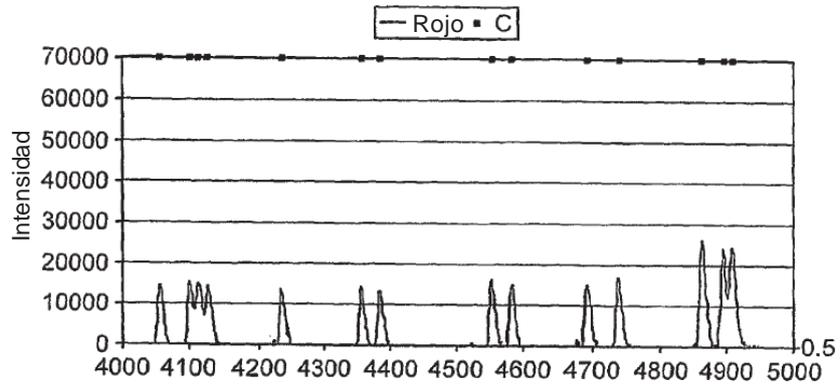


FIG. 19D

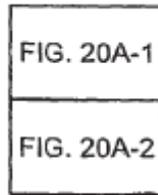


FIG. 20A

Secuencia del Amplicón B.FR.HXB2

```

0-----1-----2-----3-----4-----5-----6
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890

1 CTAGAGGGAATTTCTCAGAGCAGACCAGAGCCCAACAGCCCCACCAGAAAGAGAGCTTCA
61 GGTCGGGGTAGAGACAACAACCTCCCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAACGTGT
121 ATCCTTTAACTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAATAAAGATAGG
181 GGGCAACTAAAGGAAGCTCTATTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAAGAAAT
241 GAGTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGAATTGGAGGTTTATTATCAAAGT
301 AAGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGTGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATT
361 AGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGTTGCAC
421 TTTAAATTTTCCCATTAGCCCTATTGAGACTGTACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGA
481 TGGCCCAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAATAAAGCATTAGTAGAAAT
541 TTGTACAGAAATGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAATAATTGGCCCTGAGAAATCCATACAA
601 TACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAAATTAGTAGATTT
661 CAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAAATACCACATCC
721 CGCAGGGTTAAAAAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTC
781 AGTTCCCTTAGATGAAGACTTCAGGAAGTACTGCATTTACCATACTAGTATAAACAACAA
841 TGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAGGATCACC
901 AGCAATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCCTTTTAAAAAACAAAAATCCAGA
961 CATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAAATAGGGCA
    
```

FIG. 20A-1

```

021 GCATAGAACAAAAATAGAGGAGCTGAGACAACATCTGTTGAGGTTGGGACTTACCACACC
081 AGACAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCCTTTGGATGGGTTATGAACCTCCATCCTGA
141 TAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGTGCCAGAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGACAT
201 ACAGAAAGTTAGTGGGAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTACCAGGGAATTAAGTAAG
261 GCAATTATGTAACCTCTTAGAGGAACCAAGCACTAACAGAAAGTAATACCCTAACAGA
321 AGAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAAAACAGAGAGATTCTAAAAGAACCCAGTACATGGAGT
381 GTATTATGACCCATCAAAAGACTTAAATAGCAGAAAATACAGAAGCAGGGCAAGGCCAATG
441 GACATATCAAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAATCTGAAAACAGGAAAATATGCAAGAAT
501 GAGGGGTGCCCACTAATGATGTAAAACAATTAACAGAGGCAGTGCAAAAATAACCAC
561 AGAAGCATAAGTAAATATGGGGAAGACTCCATAATTTAAACTACCCATACAAAAGGAAAC
621 ATGGGAAACATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGT
681 TAATACCCCTCG

123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
0-----1-----2-----3-----4-----5-----6

```

FIG. 20A-2

Secuencia no editada

```

0-----1-----2-----3-----4-----5-----6
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890

1 TAGCCCTATTGAGACTGTACCAGTAAATAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAGTTAA
61 ACAATGGCCATTGACAGAAAGAAAATAAAGCATTAGTAGAAAATTGTACAGAAAATGGA
121 AAAGGAAGGAAAATTTCAAAAAATGGGCCCTGAGAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGC
181 CATAAAGAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGAATTCAGAGAACTTAATAA
241 GAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAAATACCACATCCCCGAGGGTTAAAAAA
301 GAAAAAATCAGTACAGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTCAGTTCCCTTAGATGA
361 AGACTTCAGGAAGTATAC

123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
0-----1-----2-----3-----4-----5-----6

```

FIG. 20B

Secuencia corregida e inspeccionada manualmente

```

0-----1-----2-----3-----4-----5-----6
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890

 1 AAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAAATCTGTGGACATAAAAGCTATAGGTACAG
61 TATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAAATTGGAAGAAAATCTGTTGACTCAGATTGGTT
121 GCACCTTAAATTTCCCATTAGCCCTATTGAGACTGTACCAGTAAATAAAGCCAGGAA
181 TGGATGGCCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAGAATAAATAAAGCATTAGTAG
241 AAATTTGTACAGAAATGGAAAAGGAAGGAAAATTTCAAAAATTTGGCCCTGAGAATCCAT
301 ACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAG
361 ATTCAGAGAACCTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCAC
421 ATCCCGCAGGGTTAAAAAAGAAAATAACAGTAAACAGTACTGGATGTGGGTGATGCATATT
481 TTTTCAGTTCCCTTAGATGAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCCTAGTATAA
541 ACAA

123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
0-----1-----2-----3-----4-----5-----6

```

FIG. 20C