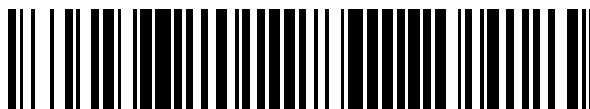


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 097**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2005 E 05745564 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 1745153**

54 Título: **Procesamiento de muestras que contienen polinucleótidos**

30 Prioridad:

03.05.2004 US 567174 P

21.01.2005 US 645784 P

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

04.12.2015

73 Titular/es:

**HANDYLAB, INC. (100.0%)
5230 S. STATE ROAD SUITE 100
ANN ARBOR, MI 48108-9754, US**

72 Inventor/es:

**WU, BETTY;
ALTHAUS, JOHN, S.;
BRAHMASANDRA, SUNDARESH, N.;
HANDIQUE, KALYAN y
PHADKE, NIKHIL**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 553 097 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

Procesamiento de muestras que contienen polinucleótidos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para procesar muestras que contienen polinucleótidos así como a sistemas relacionados.

10 Antecedentes

El análisis de una muestra biológica a menudo incluye detectar uno o más polinucleótidos presentes en la muestra. Un ejemplo de detección es la detección cualitativa, que se refiere, por ejemplo, a la determinación de la presencia del polinucleótido y/o la determinación de la información relacionada con, por ejemplo, el tipo, tamaño, presencia o ausencia de mutaciones, y/o la secuencia del polinucleótido. Otro ejemplo de detección es la detección cuantitativa, que se refiere, por ejemplo, a la determinación de la cantidad del polinucleótido presente. La detección puede incluir aspectos tanto cualitativos como cuantitativos.

La detección de polinucleótidos implica a menudo el uso de una enzima. Por ejemplo, algunos métodos de detección incluyen amplificación de polinucleótidos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o una técnica de amplificación relacionada. Otros métodos de detección que no amplifican el polinucleótido que se tiene que detectar también hacen uso de enzimas. Sin embargo, el funcionamiento de las enzimas usadas en tales técnicas se puede inhibir por la presencia de inhibidores presentes junto con el polinucleótido que se tiene que detectar. Los inhibidores pueden interferir, por ejemplo, la eficacia y/o la especificidad de las enzimas.

25 Sumario de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método para procesar uno o más polinucleótidos (por ejemplo, para concentrar el polinucleótido o polinucleótidos y/o para separar los polinucleótidos de los compuestos inhibidores (por ejemplo, hemoglobina) que podrían inhibir la detección y/o la amplificación de los polinucleótidos). También se describen sistemas relacionados.

En algunas realizaciones, el método incluye poner en contacto los polinucleótidos y un compuesto relativamente inmovilizado que se asocia preferentemente a (por ejemplo, retiene) los polinucleótidos en lugar de los inhibidores. Un compuesto a modo de ejemplo es una poliamida policatiónica (por ejemplo, poli-L-lisina y/o poli-D-lisina), que se puede unir a una superficie (por ejemplo, una superficie de una o más partículas). El compuesto retiene los polinucleótidos de modo que se puedan separar los polinucleótidos y los inhibidores, tal como mediante lavado de la superficie con el compuesto y polinucleótidos asociados. Después de la separación, la asociación entre el polinucleótido y el compuesto se puede interrumpir para liberar (por ejemplo, separar) los polinucleótidos del compuesto y la superficie.

En algunas realizaciones, la superficie (por ejemplo, una superficie de una o más partículas) se modifica con una poliamida policatiónica, que puede estar unida covalentemente a la superficie. La poliamida policatiónica puede incluir al menos una de poli-L-lisina y poli-D-lisina. En algunas realizaciones, la poliamida policatiónica (por ejemplo, la al menos una de poli-L-lisina y poli-D-lisina) tiene un peso molecular promedio de al menos aproximadamente 7500 Da. La poliamida policatiónica (por ejemplo, la al menos una de poli-L-lisina y poli-D-lisina) puede tener un peso molecular promedio de menos de aproximadamente 35.000 Da (por ejemplo, un peso molecular promedio de menos de aproximadamente 30.000 Da (por ejemplo, un peso molecular promedio de aproximadamente 25.000 Da)). La poliamida policatiónica (por ejemplo, la al menos una de poli-L-lisina y poli-D-lisina) puede tener un peso molecular mediana de al menos aproximadamente 15.000 Da. La poliamida policatiónica (por ejemplo, la al menos una de poli-L-lisina y poli-D-lisina) puede tener un peso molecular mediana de menos de aproximadamente 25.000 Da (por ejemplo, un peso molecular mediana de menos de aproximadamente 20.000 Da (por ejemplo, un peso molecular mediana de aproximadamente 20.000 Da)).

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un dispositivo de preparación de muestra que incluye una superficie que incluye una poliamida policatiónica unida a la misma y un conducto de introducción de muestra en comunicación con la superficie para poner en contacto la superficie con una muestra fluida.

En algunos aspectos, el dispositivo incluye una fuente térmica configurada para calentar un líquido acuoso en contacto con la superficie hasta al menos aproximadamente 65 °C.

En algunos aspectos, el dispositivo incluye un depósito de líquido que tiene un pH de al menos aproximadamente 10 (por ejemplo, aproximadamente 10,5 o más). El dispositivo se configura para poner en contacto la superficie con el líquido (por ejemplo, por accionamiento de una fuente de presión para mover el líquido).

En algunas realizaciones, la superficie comprende superficies de una pluralidad de partículas.

En algunas realizaciones, la poliamida policationica incluye poli-L-lisina y/o poli-D-lisina.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para procesar una muestra que incluye proporcionar una mezcla que incluye un líquido y una cantidad de polinucleótido, poner en contacto un miembro de retención con la mezcla. El miembro de retención se puede configurar para que retenga preferentemente polinucleótidos en comparación con los inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa. Básicamente todo el líquido de la mezcla se retira desde el miembro de retención. Los polinucleótidos se liberan desde el miembro de retención.

10 El polinucleótido tiene un tamaño de menos de aproximadamente 7,5 Mpb.

El líquido puede ser un primer líquido y retirar básicamente todo el líquido desde el miembro de retención puede incluir poner en contacto el miembro de retención con un segundo líquido.

15 Poner en contacto el miembro de retención con un segundo líquido puede incluir accionar una fuente de presión accionada térmicamente para aplicar una presión al segundo líquido. Poner en contacto el miembro de retención con un segundo líquido puede incluir abrir una válvula accionada térmicamente para poner el segundo líquido en comunicación fluida con el miembro de retención.

20 El segundo líquido puede tener un volumen de menos de aproximadamente 50 microlitros.

El miembro de retención puede incluir una superficie que tiene un compuesto configurado para unirse preferentemente a polinucleótidos en lugar de inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, hemoglobina, péptidos, compuestos fecales, ácidos húmicos, compuestos mucosos, proteínas de unión a ADN, o sacáridos).

La superficie puede incluir una polilisina (por ejemplo, poli-L-lisina y/o poli-D-lisina).

30 El segundo líquido puede incluir un detergente (por ejemplo, SDS)

La liberación puede incluir calentar el miembro de retención a una temperatura de al menos aproximadamente 50 °C (por ejemplo, aproximadamente 65 °C). La temperatura puede ser insuficiente para que el líquido ebulle en presencia del miembro de retención durante el calentamiento. La temperatura puede ser 100 °C o menos (por ejemplo, menos de 100 °C, aproximadamente 97 °C o menos). La temperatura se puede mantener durante menos de aproximadamente 10 minutos (por ejemplo, durante menos de aproximadamente 5 minutos, durante menos de aproximadamente 3 minutos).

La liberación se puede llevar a cabo sin centrifugación del miembro de retención.

40 En ciertas realizaciones, los inhibidores de la PCR se retiran rápidamente de las muestras clínicas para crear una muestra lista para PCR. El método puede comprender la preparación de una muestra que contiene polinucleótidos que este básicamente exenta de inhibidores. Las muestras se pueden preparar a partir de, por ejemplo, lisados en bruto que resultan de técnicas de lisado térmicas, químicas, ultrasónicas, mecánicas, electrostáticas, y otras técnicas de lisado. Las muestras se pueden preparar sin centrifugación. Las muestras se pueden preparar usando dispositivos microfluidos o a una escala mayor.

50 Otro aspecto de la divulgación se refiere a un miembro de retención, por ejemplo, una pluralidad de partículas tales como perlas, que comprenden polilisina unida, por ejemplo, poli-L-lisina, y métodos y sistemas relacionados. El miembro de retención se une preferentemente a polinucleótidos, por ejemplo, ADN, comparación con los inhibidores. El miembro de retención se puede usar para preparar muestras de polinucleótidos para procesamiento adicional, tal como amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa.

55 En ciertas realizaciones, más de un 90 % de un polinucleótido presente en una muestra se puede unir al miembro de retención, liberar, y recuperar.

En ciertas realizaciones, un polinucleótido se puede unir al miembro de retención, liberar, y recuperar, en menos de 10 minutos, menos de 7,5 minutos, menos de 5 minutos, o menos de 3 minutos.

60 Un polinucleótido se puede unir a un miembro de retención, liberar, y recuperar sin someter el polinucleótido, el miembro de retención, y/o los inhibidores a centrifugación.

La separación de los polinucleótidos y los inhibidores excluye generalmente someter los polinucleótidos, los inhibidores, la región de procesamiento, y/o el miembro de retención a sedimentación (por ejemplo, centrifugación).

65

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un dispositivo microfluído que incluye un canal, una primera masa de una sustancia térmicamente sensible (TRS) dispuesta en un primer lado del canal, una segunda masa de una TRS dispuesta en un segundo lado del canal enfrente del primer lado del canal, una fuente de presión de gas asociada a la primera masa de la TRS. El accionamiento de la fuente de presión de gas impulsa la primera masa de la TRS dentro de la segunda masa de la TRS y obstruye el canal.

El dispositivo microfluído puede incluir una segunda fuente de presión de gas asociada a la segunda masa de la TRS. El accionamiento de la segunda fuente de presión de gas impulsa la segunda masa de TRS dentro de la primera masa de TRS.

Al menos una (por ejemplo, ambas) de la primera y la segunda masas de TRS puede ser una cera.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para obstruir un canal de un dispositivo microfluído. Una masa de una TRS se calienta y se impulsa a través del canal (por ejemplo, mediante presión de gas) dentro de una segunda masa de TRS. La segunda masa de TRS también se puede impulsar (por ejemplo, mediante presión de gas) hacia la primera masa de TRS.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un accionador para un dispositivo microfluído. El accionador incluye un canal, una cámara conectada al canal, al menos un depósito de líquido encapsulado dispuesto en la cámara, y un gas que rodea el depósito de la cámara. El calentamiento de la cámara expande el depósito de líquido encapsulado y presuriza el gas. Por lo general, el líquido tiene un punto de ebullición de aproximadamente 90 °C o menos. El líquido puede ser un hidrocarburo que tiene aproximadamente 10 átomos de carbono o inferior.

El líquido se puede encapsular con un polímero.

El accionador puede incluir múltiples depósitos de líquido encapsulado dispuestos en la cámara.

Los depósitos múltiples se pueden dispersar dentro de un sólido (por ejemplo, una cera).

Los depósitos múltiples se pueden disponer dentro de una cubierta flexible (por ejemplo, un saco flexible).

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método que incluye presurizar un gas dentro de una cámara de un dispositivo microfluído para crear una presión de gas suficiente para mover un líquido dentro de un canal del dispositivo microfluído. La presurización del gas expande por lo general al menos un depósito de líquido encapsulado dispuesto dentro de la cámara.

La expansión de al menos un depósito puede incluir el calentamiento de la cámara.

La presurización del gas puede incluir expandir múltiples depósitos de líquido encapsulado. Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para combinar (por ejemplo, mezclar) un primer y un segundo líquidos y a los dispositivos relacionados. El dispositivo incluye una masa de una sustancia sensible a la temperatura (TRS) que separa el primer y segundo canales del dispositivo. El dispositivo se configura para mover un primer líquido por el primer canal de modo que una parte (por ejemplo, una parte central) del primer líquido sea adyacente a la TRS y para mover un segundo líquido por el segundo canal de modo que una parte (por ejemplo, una parte central) del segundo líquido sea adyacente a la TRS. Se acciona una fuente térmica para mover la TRS (por ejemplo, mediante fusión, dispersión, fragmentación). Las partes centrales del primer y segundo líquidos se combinan por lo general sin separarse mediante una interfase de gas. Por lo general, solo se combinan un subconjunto del primer líquido y un subconjunto del segundo líquido. Los líquidos se mezclan después de moverse por un canal de mezcla.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a una partícula de reactivo liofilizada y a un método de preparación de la partícula.

En algunos aspectos, las partículas liofilizadas incluyen múltiples partículas de menor tamaño que tienen cada una una pluralidad de ligandos que se asocian preferentemente a polinucleótidos en comparación con los inhibidores de PCR. Las partículas liofilizadas pueden incluir también (o alternativamente) reactivos de lisado (por ejemplo, enzimas) configurados para lisar células para liberar polinucleótidos. Las partículas liofilizadas pueden incluir también (o alternativamente) enzimas (por ejemplo, proteasas) que degraden las proteínas.

Las células se pueden lisar por combinación de una solución de las células con las partículas liofilizadas para reconstituir las partículas. Los reactivos de lisado reconstituidos lisan las células. Los polinucleótidos se asocian a los ligandos de las partículas de menor tamaño. Durante la lisis, la solución se puede calentar (por ejemplo, por radiación usando una lámpara (por ejemplo, una lámpara calentadora)).

Entre algunos aspectos, las partículas liofilizadas incluyen reactivos (por ejemplo, cebadores, plásmidos de control, enzimas polimerasa) para llevar a cabo una reacción de PCR.

Un método para preparar partículas liofilizadas incluye formar una solución de reactivos de la partícula y un crioprotector (por ejemplo, un azúcar o un polialcohol). La solución se deposita gota a gota en una superficie hidrófoba enfriada (por ejemplo, una película de diamante o una superficie de politetrafluoroetileno). Las partículas se congelan y se someten a presión reducida (por lo general mientras aún están congeladas) durante un tiempo suficiente para retirar (por ejemplo, sublimar) el disolvente. Las partículas liofilizadas pueden tener un diámetro de aproximadamente 5 mm o menos (por ejemplo, aproximadamente 2,5 mm o menos, aproximadamente 1,75 mm o menos).

El documento de Patente US 2002/0039783 se refiere a un dispositivo para lisar componentes de una muestra de fluido. El dispositivo incluye una cámara de lisado para capturar los componentes de una mezcla y un medio para transferir energía ultrasónica a la muestra.

El artículo "Microchip-Based Purification of DNA from Biological Samples" de Breadmore *et al.*, páginas 1880-1886 de *Analytical Chemistry*, 15 de abril de 2003 describe métodos para la purificación de ADN a partir de muestras biológicas usando perlas de sílice.

El artículo "Microfluidic chip for high efficiency DNA extraction" de Chung Yung-Chiang *et al.*, páginas 141-147 de *Lab on a Chip*, abril de 2004, se refiere a un dispositivo para extraer ADN de células lisadas usando perlas inmovilizadas.

El artículo "Comparison of Commercial DNA Extraction Kits for Extraction of Bacterial Genomic DNA from Whole-Blood Samples" de Smith *et al.*, páginas 2440-2443 de *Journal of Clinical Microbiology*, junio de 2003, se refiere a la comparación de kits conocidos para la extracción de ADN genómico bacteriano de muestras de sangre.

El documento de Patente US 5.599.667 describe el uso de sólidos policationicos en la purificación de ácidos nucleicos a partir de soluciones que contienen contaminantes.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una vista en perspectiva de un dispositivo microfluído.

La Figura 2 es una vista en sección transversal de una región de procesamiento para retener polinucleótidos y/o separar polinucleótidos de inhibidores.

La Figura 3 es una vista en sección transversal de un accionador.

La Figura 4 es una vista en perspectiva de un dispositivo microfluído.

La Figura 5 es una vista en sección transversal lateral del dispositivo microfluído de la Figura 4.

La Figura 6 es una vista en perspectiva de una red microfluída del dispositivo microfluído de la Figura 4.

La Figura 7 ilustra un conjunto de fuentes térmicas para operar los componentes del dispositivo microfluído de la Figura 4.

Las Figuras 8 y 9 ilustran una válvula en los estados abierto y cerrado, respectivamente.

Las Figuras 10A-10D ilustran una puerta de mezcla de la red microfluída de la Figura 6 y las regiones adyacentes de la red.

La Figura 11 ilustra un dispositivo para separar polinucleótidos e inhibidores.

La Figura 12 ilustra el dispositivo de la Figura 11 y un dispositivo para la operación del mismo.

La Figura 13 ilustra un dispositivo microfluído.

La Figura 14 es una sección transversal del dispositivo microfluído de la Figura 13 tomada a lo largo de 5.

La Figura 15 ilustra la retención de ADN de esperma de arenque.

La Figura 16 ilustra la retención y liberación de ADN de estreptococos del grupo B.

La Figura 17 ilustra la respuesta de PCR de una muestra de la que se han retirado los inhibidores y de una muestra de la que no se han retirado los inhibidores.

La Figura 18 ilustra la respuesta de PCR de una muestra preparada de acuerdo con la invención y una muestra preparada usando un método de extracción de ADN comercial.

La Figura 19a ilustra un diagrama de flujo que muestra las etapas llevadas a cabo durante un método para la separación de polinucleótidos e inhibidores.

La Figura 19b ilustra el ADN de muestras sometidas al método de la Figura 19a.

Descripción detallada de la invención

El análisis de muestras biológicas incluye a menudo determinar si uno o más polinucleótidos (por ejemplo, ADN, ARN, ARNm, o ARNr) están presentes en la mezcla. Por ejemplo, se puede analizar una muestra para determinar si está presente un polinucleótido indicativo de la presencia de un patógeno particular. Por lo general, las muestras biológicas son mezclas complejas. Por ejemplo, se puede proporcionar una muestra en forma de una muestra de sangre, una muestra de tejido (por ejemplo, un hisopo de, por ejemplo, tejido nasal, bucal, anal, o vaginal), un aspirado de biopsia, un lisado, en forma de hongos, o en forma de bacterias. Los polinucleótidos que se tienen que determinar pueden estar contenidos dentro de partículas (por ejemplo, células (por ejemplo, glóbulos blancos y/o glóbulos rojos), fragmentos de tejidos, bacterias (por ejemplo, bacterias Gram positivas y/o bacterias Gram negativas), hongos, esporas). Uno o más líquidos (por ejemplo, agua, un tampón, sangre, plasma sanguíneo, saliva,

orina, fluido espinal, o disolvente orgánico) son por lo general parte de la muestra y/o se añaden a la muestra durante una etapa de procesamiento.

Los métodos para analizar muestras biológicas incluyen proporcionar una muestra biológica (por ejemplo, un hisopo), liberar los polinucleótidos de las partículas (por ejemplo, bacterias) de la muestra, amplificar uno o más de los polinucleótidos liberados (por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)), y determinar la presencia (o ausencia) del polinucleótido o polinucleótidos amplificados (por ejemplo, mediante detección de fluorescencia). Sin embargo, las muestras biológicas incluyen por lo general inhibidores (por ejemplo, compuestos mucosos, hemoglobina, compuestos fecales, y proteínas de unión a ADN) que pueden inhibir la determinación de la presencia de los polinucleótidos en la muestra. Por ejemplo, tales inhibidores pueden reducir la eficacia de amplificación de los polinucleótidos mediante PCR u otras técnicas enzimáticas para determinar la presencia de los polinucleótidos. Si la concentración de inhibidores no se reduce con respecto a la de los polinucleótidos que se tienen que determinar, el análisis puede producir resultados falsos negativos.

Los inventores describen métodos y sistemas relacionados para procesar muestras biológicas (por ejemplo, muestras que tienen uno o más polinucleótidos que se tienen que determinar). Por lo general, los métodos y los sistemas reducen la concentración de inhibidores con respecto a la concentración de los polinucleótidos que se tienen que determinar.

Por referencia a la Figura 1, un dispositivo microfluído 200 incluye una primera, segunda, y tercera etapas 205, 207, y 209 que definen una red microfluída 201 que tiene diversos componentes configurados para procesar una muestra que incluye uno o más polinucleótidos que se tienen que determinar. El dispositivo 200 procesa por lo general la muestra por aumento de la concentración de un polinucleótido que se tiene que determinar y/o por reducción de la concentración de inhibidores con respecto a la concentración del polinucleótido que se tiene que determinar.

Los inventores discutimos a continuación la disposición de los componentes de la red 201.

La red 201 incluye un puerto de entrada 202 mediante el que se puede introducir el material de muestra a la red y un puerto de salida 236 mediante el que se puede retirar una muestra procesada (por ejemplo, expulsar por o extraer de) la red 201. Un canal 204 se extiende entre el puerto de entrada 202 y una junta 255. Una válvula 205 se ubica a lo largo del canal 204. Un canal de depósito 240 se extiende entre la junta 255 y un accionador 244. Las puertas 242 y 246 se ubican a lo largo del canal 240. Un canal 257 se extiende entre la junta 255 y una junta 257. Una válvula 208 se ubica a lo largo del canal 257. Un canal de depósito 246 se extiende entre la junta 259 y un accionador 248. Las puertas 250 y 252 se ubican a lo largo del canal 246. Un canal 261 se extiende entre la junta 259 y una junta 263. Una válvula 210 y un respiradero hidrófobo 212 se ubican a lo largo del canal 261. Un canal 256 se extiende entre la junta 263 y un accionador 254. Una puerta 258 se ubica a lo largo del canal 256.

Un canal 214 se extiende entre la junta 263 y una cámara de procesamiento 220, que tiene un puerto de entrada 265 y un puerto de salida 267. Un canal 228 se extiende entre el puerto de salida 267 de la cámara de procesamiento y un depósito de agua 232. Una válvula 234 se ubica a lo largo del canal 228. Un canal 230 se extiende entre el puerto de salida 267 de la cámara de procesamiento y el puerto de salida 236.

Los inventores volvemos a continuación a los componentes particulares de la red 201.

También por referencia a la Figura 2, la cámara de procesamiento 220 incluye una pluralidad de partículas (por ejemplo, perlas, microesferas) 218 configuradas para retener polinucleótidos de la muestra en un primer conjunto de condiciones (por ejemplo, una primera temperatura y/o un primer pH) y para liberar los polinucleótidos en un segundo conjunto de condiciones (por ejemplo, una segunda temperatura mayor y/o un segundo pH más básico). Por lo general, los polinucleótidos se retienen preferentemente en comparación con los inhibidores que puedan estar presentes en la mezcla. Las partículas 218 se configuran como un miembro de retención 216 (por ejemplo, una columna) a través de la que puede pasar el material de muestra (por ejemplo, los polinucleótidos) cuando se mueve entre el puerto de entrada 265 y el puerto de salida 267 de la región de procesamiento 220.

Un filtro 219 evita que las partículas 218 pasen corriente abajo de la región de procesamiento 220. Un canal 287 conecta el filtro 219 con el puerto de salida 267. El filtro 219 tiene un área superficial dentro de la región de procesamiento 220 que es mayor que el área de la sección transversal del puerto de entrada 265. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proporción del área superficial del filtro 219 dentro de la región de procesamiento 220 con respecto al área de la sección transversal del puerto de entrada 265 (área de sección transversal que es por lo general aproximadamente la misma que el área de la sección transversal del canal 214) es al menos aproximadamente 5 (por ejemplo, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 20). En algunas realizaciones, el área superficial del filtro 219 dentro de la región de procesamiento 220 es al menos aproximadamente 1 mm^2 (por ejemplo, al menos aproximadamente 2 mm^2 , al menos aproximadamente 3 mm^2). En algunas realizaciones, el área de la sección transversal del puerto de entrada 265 y/o el canal 214 es aproximadamente $0,25 \text{ mm}^2$ o menos (por ejemplo, aproximadamente $0,2 \text{ mm}^2$ o menos, aproximadamente $0,15 \text{ mm}^2$ o menos, aproximadamente $0,1 \text{ mm}^2$ o menos). La mayor área superficial presentada por el filtro 219 con respecto al material que fluye a través de la región de procesamiento 220 ayuda a evitar la

obstrucción de la región de procesamiento mientras que se evita un aumento significativo en el volumen de vacío (discutido posteriormente) de la región de procesamiento.

- Las partículas 218 se modifican con al menos un ligando que retiene polinucleótidos (por ejemplo, preferentemente en comparación con los inhibidores). Por lo general, los ligandos retienen polinucleótidos de líquidos que tienen un pH de aproximadamente 9,5 o menos (por ejemplo, aproximadamente 9,0 o menos, aproximadamente 8,75 o menos, aproximadamente 8,5 o menos). A medida que una solución de muestra se mueve a través de la región de procesamiento 220, se retienen los polinucleótidos mientras que el líquido y los demás componentes de la solución (por ejemplo, los inhibidores) se retienen menos (por ejemplo, no se retienen) y salen de la región de procesamiento.
- En general, los ligandos liberan los polinucleótidos cuando el pH es aproximadamente 10 o mayor (por ejemplo, aproximadamente 10,5 o mayor, aproximadamente 11,0 o mayor). Por lo tanto, los polinucleótidos se pueden liberar de las partículas modificadas con ligando al líquido circundante.
- Algunos ligandos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, poliamidas (por ejemplo, poliamidas policatiónicas tales como poli-L-lisina, poli-D-lisina, poli-DL-ornitina). Otros ligandos incluyen, por ejemplo, intercaladores, poliintercaladores, poliaminas aglutinantes del surco menor (por ejemplo, espermidina), homopolímeros y copolímeros que comprenden una pluralidad de aminoácidos, y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, los ligandos tienen un peso molecular promedio de al menos aproximadamente 5000 Da (por ejemplo, al menos aproximadamente 7500 Da, de al menos aproximadamente 15000 Da). En algunas realizaciones, los ligandos tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 50000 Da o menos (por ejemplo, aproximadamente 35000, o menos, aproximadamente 27500 Da o menos). En algunas realizaciones, el ligando es un ligando de polilisina unido a la superficie de la partícula por un enlace amida.
- En ciertas realizaciones, los ligandos son resistentes a la degradación enzimática, tal como la degradación mediante enzimas proteasa (por ejemplo, mezclas de endo y exoproteasas tales como pronasa) que escinden los enlaces peptídicos. Algunos ligandos resistentes a proteasas a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, poli-D-lisina y otros ligandos que son enantiómeros de ligandos susceptibles al ataque enzimático.
- Las partículas 218 están formadas por lo general por un material al que se pueden asociar los ligandos. Algunos materiales a modo de ejemplo de los que pueden estar formadas las partículas 218 incluyen materiales poliméricos que se pueden modificar para unir un ligando. Algunos materiales poliméricos habituales proporcionan o se pueden modificar para que proporcionen grupos carboxílico y/o grupos amino disponibles para unir ligandos. Algunos materiales poliméricos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, poliestireno, polímeros de látex (por ejemplo, látex revestido con policarboxilato), poliacrilamida, óxido de polietileno, y derivados de los mismos. Algunos materiales poliméricos que se pueden usar para formar las partículas 218 se describen en el documento de Patente de Estados Unidos Nº 6.235.313 de Mathiowitz *et al.* Otros materiales incluyen vidrio, sílice, agarosa, y materiales modificados con amino-propil-tri-etoxi-silano (APES).
- Algunas partículas a modo de ejemplo que se pueden modificar con ligandos adecuados incluyen partículas de carboxilato (por ejemplo, perlas magnéticas modificadas con carboxilato (perlas modificadas Sera-Mag Magnetic Carboxylate, Nº de catálogo 3008050250, Sera-dyn) y microesferas Polybead modificadas con carboxilato disponibles en Polyscience, nº de catálogo 09850). En algunas realizaciones, los ligandos incluyen poli-D-lisina y las perlas comprenden un polímero (por ejemplo, látex revestido con policarboxilato).
- En general, la proporción de la masa de las partículas con respecto a la masa de los polinucleótidos retenidos por las partículas es no más de aproximadamente 25 o más (por ejemplo, no más de aproximadamente 20, no más de aproximadamente 10). Por ejemplo, en algunas realizaciones, aproximadamente 1 gramo de partículas retiene aproximadamente 100 miligramos de polinucleótidos.
- Por lo general, el volumen total de la región de procesamiento 220 (incluyendo las partículas 218) entre el puerto de entrada 265 y el filtro 219 es aproximadamente 15 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 10 microlitros o menos, aproximadamente 5 microlitros o menos, aproximadamente 2,5 microlitros o menos, aproximadamente 2 microlitros o menos). En una realización a modo de ejemplo, el volumen total de la región de procesamiento 220 es aproximadamente 2,3 microlitros. En algunas realizaciones, las partículas 218 ocupan al menos aproximadamente un 10 por ciento (por ejemplo, al menos aproximadamente un 15 por ciento) del volumen total de la región de procesamiento 220. En algunas realizaciones, las partículas 218 ocupan aproximadamente un 75 por ciento o menos (por ejemplo, aproximadamente un 50 por ciento o menos, aproximadamente un 35 por ciento o menos) del volumen total de la cámara de procesamiento 220.
- En algunas realizaciones, el volumen de la región de procesamiento 220 que está exento de estar ocupado por líquido (por ejemplo, el volumen de vacío de la región de procesamiento 220 que incluye intersticios entre las partículas 218) es aproximadamente igual al volumen total menos el volumen ocupado por las partículas. Por lo general, el volumen de vacío de la región de procesamiento 220 es aproximadamente 10 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 7,5 microlitros o menos, aproximadamente 5 microlitros o menos, aproximadamente 2,5 microlitros o menos, aproximadamente 2 microlitros o menos). En algunas realizaciones, el volumen de vacío es aproximadamente 50 nanolitros o más (por ejemplo, aproximadamente 100 nanolitros o más, aproximadamente 250

nanolitros o más). En una realización a modo de ejemplo, el volumen total de la región de procesamiento 220 es aproximadamente 2,3 microlitros. Por ejemplo, en una realización a modo de ejemplo, el volumen total de la región de procesamiento es aproximadamente 2,3 microlitros, el volumen ocupado por las partículas es aproximadamente 0,3 microlitros, y el volumen exento de estar ocupado por líquido (volumen de vacío) es aproximadamente 2 microlitros.

Las partículas 218 tienen por lo general un diámetro medio de aproximadamente 20 micrómetros o menos (por ejemplo, aproximadamente 15 micrómetros o menos, aproximadamente 10 micrómetros o menos). En algunas realizaciones, las partículas 218 tienen un diámetro medio de al menos aproximadamente 4 micrómetros (por ejemplo, al menos aproximadamente 6 micrómetros, al menos aproximadamente 8 micrómetros).

En algunas realizaciones, el volumen del canal 287 entre el filtro 219 y el puerto de salida 267 es básicamente menor que el volumen de vacío de la región de procesamiento 220. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el volumen del canal 287 entre el filtro 219 y el puerto de salida 267 es aproximadamente un 35 % o menos (por ejemplo, aproximadamente un 25 % o menos, aproximadamente un 20 % o menos) que el volumen de vacío. En una realización a modo de ejemplo, el volumen del canal 287 entre el filtro 219 y el puerto de salida 267 es aproximadamente 500 microlitros.

La densidad de partículas es por lo general al menos aproximadamente 10^8 partículas por mililitro (por ejemplo, aproximadamente 10^9 partículas por mililitro). Por ejemplo, una región de procesamiento con un volumen total de aproximadamente 1 microlitro puede incluir aproximadamente 10^3 perlas.

El filtro 219 tiene por lo general poros con una anchura menor que el diámetro de las partículas 218. En una realización a modo de ejemplo, el filtro 219 tiene poros que tienen una anchura media de aproximadamente 8 micrómetros y las partículas 218 tienen un diámetro medio de aproximadamente 10 micrómetros.

En algunas realizaciones, al menos alguna (por ejemplo, la totalidad) de las partículas son magnéticas. En realizaciones alternativas, pocas (por ejemplo, ninguna) de las partículas son magnéticas.

En algunas realizaciones, al menos alguna (por ejemplo, la totalidad) de las partículas son sólidas. En algunas realizaciones, al menos algunas (por ejemplo, la totalidad) de las partículas son porosas (por ejemplo, las partículas pueden tener canales que se extienden al menos parcialmente dentro de ellas).

Los canales de la red microfluida 201 tienen por lo general al menos una dimensión de sección transversal submilimétrica. Por ejemplo, los canales de la red 201 pueden tener una anchura y/o una profundidad de aproximadamente 1 mm o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 micrómetros o menos, aproximadamente 500 micrómetros, o menos, aproximadamente 250 micrómetros o menos).

Una válvula es un componente que tiene un estado normalmente abierto que permite que el material pase por un canal desde una posición en un lado de la válvula (por ejemplo, corriente arriba de la válvula) a una posición en el otro lado de la válvula (por ejemplo, corriente abajo de la válvula). Después de accionamiento, la válvula cambia a un estado cerrado que evita que el material pase por el canal desde un lado de la válvula al otro. Por ejemplo, la válvula 205 incluye una masa 251 de una sustancia térmicamente sensible (TRS) que es relativamente inmóvil a una primera temperatura y más móvil a una segunda temperatura. Una cámara 253 está en comunicación gaseosa con la masa 251. Tras calentamiento de gas (por ejemplo, aire) en la cámara 253 y calentamiento de la masa 251 de TRS a la segunda temperatura, la presión de gas dentro de la cámara 253 mueve la masa 251 al canal 204 obstruyendo al material del paso por el mismo. Otras válvulas de la red 201 tienen la misma estructura y operan de la misma forma que la válvula 205.

Una masa de TRS puede ser una masa básicamente sólida o una aglomeración de partículas de menor tamaño que cooperan para obstruir el paso. Algunos ejemplos de TRS incluyen una aleación eutéctica (por ejemplo, una soldadura), cera (por ejemplo, una olefina), polímeros, plásticos, y combinaciones de los mismos. La primera y segunda temperaturas no son lo suficientemente altas para dañar los materiales, tales como las capas de polímero del dispositivo 200. Generalmente, la segunda temperatura es menos de aproximadamente 90 °C y la primera temperatura es menor que la segunda temperatura (por ejemplo, aproximadamente 70 °C o menos).

Una puerta es un componente que tiene un estado normalmente cerrado que no permite que el material pase por un canal desde una posición de un lado de la puerta al otro lado de la puerta. Tras accionamiento, la puerta cambia a un estado cerrado en el que se permite que el material pase desde un lado de la puerta (por ejemplo, corriente arriba de la puerta) al otro lado de la puerta (por ejemplo, corriente abajo de la puerta). Por ejemplo, la puerta 242 incluye una masa 271 de TRS ubicada para obstruir el paso del material entre la junta 255 y el canal 240. Tras el calentamiento de la masa 271 a la segunda temperatura, la masa cambia el estado (por ejemplo, por fusión, por dispersión, por fragmentación, y/o por disolución) para permitir el paso del material entre la junta 255 y el canal 240.

La parte del canal 240 entre las puertas 242 y 246 forma un depósito de fluido 279 configurado para contener un líquido (por ejemplo, agua, un líquido orgánico, o una combinación de los mismos). Durante el almacenamiento, las

puertas 242 y 246 limitan (por ejemplo, evitan) la evaporación del líquido dentro del depósito de fluido. Durante la operación del dispositivo 200, el líquido del depósito 279 se usa por lo general como un líquido de lavado para retirar los inhibidores de la región de procesamiento 220 mientras se dejan los polinucleótidos asociados a las partículas 218. Por lo general, el líquido de lavado es una solución que tiene uno o más componentes adicionales (por ejemplo, un tampón, quelante, tensioactivo, un detergente, una base, un ácido, o una combinación de los mismos). Algunas soluciones a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, una solución de Tris 10-50 mM a pH 8,0, EDTA 0,5-2 mM, y SDS al 0,5 % - 2 %, una solución de Tris 10-50 mM a pH 8,0, EDTA 0,5 a 2 mM, y Triton X-100 al 0,5 % - 2 %.

La parte del canal 246 entre las puertas 250 y 252 forma un depósito de fluido 281 configurado como el depósito 279 para contener un líquido (por ejemplo, una solución) con evaporación limitada o ninguna evaporación. Durante la operación del dispositivo 200, el líquido del depósito 281 se usa por lo general como líquido de liberación en el que se liberan los polinucleótidos que se han retenido por las partículas 218. Un líquido de liberación a modo de ejemplo es una solución de hidróxido (por ejemplo, una solución de NaOH) que tiene una concentración, por ejemplo, entre aproximadamente hidróxido 2 mM (por ejemplo, aproximadamente NaOH 2 mM) y aproximadamente hidróxido 500 mM (por ejemplo, aproximadamente NaOH 500 mM). En algunas realizaciones, el líquido del depósito 281 es una solución de hidróxido que tiene una concentración de aproximadamente 25 mM o menos (por ejemplo, una concentración de hidróxido de aproximadamente 15 mM).

Los depósitos 279, 281 contienen por lo general al menos aproximadamente 0,375 microlitros de líquido (por ejemplo, al menos aproximadamente 0,750 microlitros, al menos aproximadamente 1,25 microlitros, al menos aproximadamente 2,5 microlitros). En algunas realizaciones, los depósitos 279, 281 contienen aproximadamente 7,5 microlitros o menos de líquido (por ejemplo, aproximadamente 5 microlitros o menos, aproximadamente 4 microlitros o menos, aproximadamente 3 microlitros o menos).

Un accionador es un componente que proporciona una presión de gas que puede mover material (por ejemplo, material de muestra y/o material de reactivo) entre una ubicación de la red 201 y otra ubicación. Por ejemplo, por referencia a la Figura 3, el accionador 244 incluye una cámara 272 que tiene una masa 273 de material expansivo térmicamente (TEM) en la misma. Cuando se calienta, el TEM se expande disminuyendo el volumen libre dentro de la cámara 272 y presurizando el gas (por ejemplo, aire) que rodea la masa 273 dentro de la cámara 272. Por lo general, las puertas 246 y 242 se accionan con el accionador 244. Por lo tanto, el gas presurizado impulsa el líquido del depósito de fluido 279 hacia la junta 255. En algunas realizaciones, el accionador 244 puede generar una presión diferencial de más de aproximadamente 3 psi (por ejemplo, al menos aproximadamente 4 psi, al menos aproximadamente 5 psi) entre el accionador y la junta 255.

El TEM incluye una pluralidad de depósitos de líquido sellados (por ejemplo, esferas) 275 dispersados dentro de un vehículo 277. Por lo general, el líquido es un líquido de presión de vapor elevada (por ejemplo, isobutano y/o isopentano) sellado dentro de una carcasa (por ejemplo, una carcasa polimérica formada por monómeros tales como cloruro de vinilideno, acrilonitrilo y metacrilato de metilo). El vehículo 277 tiene propiedades (por ejemplo, flexibilidad y/o la capacidad de ablandarse (por ejemplo, fundirse) a temperaturas elevadas) que permiten la expansión de los depósitos 275 sin permitir que los depósitos pasen por el canal 240. En algunas realizaciones, el vehículo 277 es una cera (por ejemplo, una olefina) o un polímero con una temperatura de transición vítrea adecuada. Por lo general, los depósitos componen al menos aproximadamente un 25 por ciento en peso (por ejemplo, al menos aproximadamente un 35 por ciento en peso, al menos aproximadamente un 50 por ciento en peso) del TEM. En algunas realizaciones, los depósitos componen aproximadamente un 75 por ciento en peso o menos (por ejemplo, aproximadamente un 65 por ciento en peso o menos, aproximadamente un 50 por ciento en peso o menos) del TEM. Algunos depósitos de líquido sellados adecuados se pueden obtener en Expancel (Akzo Nobel).

Cuando el TEM se calienta (por ejemplo, a una temperatura de al menos aproximadamente 50 °C (por ejemplo, al menos a aproximadamente 75 °C, al menos aproximadamente 90 °C)), el líquido se vaporiza y aumenta el volumen de cada depósito sellado y de la masa 273. El vehículo 277 se ablanda permitiendo que se expanda la masa 273. Por lo general, el TEM se calienta a una temperatura de menos de aproximadamente 150 °C (por ejemplo, aproximadamente 125 °C o menos, aproximadamente 110 °C o menos, aproximadamente 100 °C o menos) durante el accionamiento. En algunas realizaciones, el volumen del TEM se expande al menos aproximadamente 5 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces).

Un respiradero hidrófobo (por ejemplo, el respiradero 212) es una estructura que permite que el gas salga a un canal mientras se limita (por ejemplo, se evita) que el líquido salga al canal. Por lo general, los respiraderos hidrófobos incluyen una capa de material hidrófobo poroso (por ejemplo, un filtro poroso tal como una membrana hidrófoba porosa de Osmonics) que define una pared del canal. Como se discute posteriormente, los respiraderos hidrófobos se pueden usar para ubicar una microgota de muestra en una ubicación deseada dentro de la red 201.

Los respiraderos hidrófobos tienen por lo general una longitud de al menos aproximadamente 2,5 mm (por ejemplo, al menos aproximadamente 5 mm, al menos aproximadamente 7,5 mm) a lo largo de un canal. La longitud del respiradero hidrófobo es por lo general al menos aproximadamente 5 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces) mayor que la profundidad del canal dentro del

respiradero hidrófobo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la profundidad del canal dentro del respiradero hidrófobo es aproximadamente 300 micrómetros o menos (por ejemplo, aproximadamente 250 micrómetros o menos, aproximadamente 200 micrómetros o menos, aproximadamente 150 micrómetros o menos).

La profundidad del canal dentro del respiradero hidrófobo es por lo general aproximadamente un 75 % o menos (por ejemplo, aproximadamente un 65 % o menos, aproximadamente un 60 % o menos) de la profundidad del canal corriente arriba o corriente abajo del respiradero hidrófobo. Por ejemplo, en algunas realizaciones la profundidad del canal dentro del respiradero hidrófobo es aproximadamente 150 micrómetros y la profundidad del canal corriente arriba y corriente abajo del respiradero hidrófobo es aproximadamente 250 micrómetros.

La anchura del canal dentro del respiradero hidrófobo es por lo general al menos aproximadamente un 25 % mayor (por ejemplo, al menos aproximadamente un 50 % mayor) que la anchura del canal corriente arriba del respiradero y corriente abajo del respiradero. Por ejemplo, en una realización a modo de ejemplo, la anchura del canal dentro del respiradero hidrófobo es aproximadamente 400 micrómetros y la anchura del canal corriente arriba y corriente abajo del respiradero es aproximadamente 250 micrómetros.

El dispositivo microfluído 200 se puede fabricar según se desee. Por lo general, las capas 205, 207, y 209 están formadas por un material polimérico. Los componentes de la red 201 están formados por lo general mediante moldeado (por ejemplo, mediante moldeado por inyección) de las capas 207, 209. La capa 205 es por lo general un material polimérico flexible (por ejemplo, un laminado) que se asegura (por ejemplo, adhesivamente y/o térmicamente) a la capa 207 para sellar los componentes de la red 201. Las capas 207 y 209 se pueden asegurar entre sí usando adhesivo.

En uso, por lo general el dispositivo 200 se asocia térmicamente a un conjunto de fuentes térmicas configurado para operar los componentes (por ejemplo, válvulas, puertas, accionadores, y región de procesamiento 220) del dispositivo. En algunas realizaciones, las fuentes térmicas están integradas en un sistema operativo, que opera el dispositivo durante el uso. El sistema operativo incluye un procesador (por ejemplo, un ordenador) configurado para accionar las fuentes térmicas de acuerdo con un protocolo deseado. Se describen procesadores configurados para operar dispositivos microfluídos en el documento de Patente WO 02078845 (Handylab inc.). En otras realizaciones, las fuentes térmicas están integradas en el propio dispositivo.

El dispositivo 200 se puede operar como sigue a continuación. Las válvulas de la red 201 se configuran en el estado abierto. Las puertas de la red 201 se configuran en el estado cerrado. Se introduce una muestra fluida que comprende los polinucleótidos en la red 201 a través del puerto de entrada 202. Por ejemplo, la muestra se puede introducir con una jeringa que tenga un ajuste Luer. La jeringa proporciona presión para mover inicialmente la muestra dentro de la red 201. La muestra pasa por los canales 204, 257, 261, y 214 al puerto de entrada 265 de la región de procesamiento 220. La muestra pasa a través de la región de procesamiento 220, sale a través del puerto de salida 267, y pasa por el canal 228 a la cámara de residuos 232. Cuando el borde de fuga (por ejemplo, la interfase de líquido-gas corriente arriba) de la muestra alcanza el respiradero hidrófobo 212, la presión proporcionada por el dispositivo de introducción (por ejemplo, la jeringa) se libera de la red 201 para detener el movimiento adicional de la muestra.

Por lo general, la cantidad de muestra introducida es aproximadamente 500 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 250 microlitros o menos, aproximadamente 100 microlitros o menos, aproximadamente 50 microlitros o menos, aproximadamente 25 microlitros o menos, aproximadamente 10 microlitros o menos). En algunas realizaciones, la cantidad de muestra es aproximadamente 2 microlitros o menos (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 microlitros o menos).

Los polinucleótidos que entran en la región de procesamiento 220 pasan a través de los intersticios entre las partículas 218. Los polinucleótidos de la muestra contactan con el miembro de retención 216 y se retienen preferentemente en comparación con el líquido de la muestra y ciertos otros componentes de la muestra (por ejemplo, los inhibidores). Por lo general, el miembro de retención 220 retiene al menos aproximadamente un 50 % de los polinucleótidos (al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %) de los polinucleótidos presentes en la muestra que entraron en la región de procesamiento 220. El líquido de la muestra y los inhibidores presentes en la muestra salen de la región de procesamiento 220 a través del puerto de salida 267 y entran en la cámara de residuos 232. La región de procesamiento está por lo general a una temperatura de aproximadamente 50 °C o menos (por ejemplo, 30 °C o menos) durante la introducción de la muestra.

El procesamiento continúa por lavado del miembro de retención 216 con el líquido del depósito 279 para separar los inhibidores remanentes de los polinucleótidos retenidos por el miembro de retención 216. Para lavar el miembro de retención 216, se cierra la válvula 206 y se abren las puertas 242, 246 del primer depósito 240. Se acciona el accionador 244 y mueve el líquido de lavado del depósito 279 por los canales 257, 261, y 214, a través de la región de procesamiento 220, y al interior del depósito de residuos 232. El líquido de lavado mueve la muestra que pudiera haber quedado dentro de los canales 204, 257, 261, y 214 a través de la región de procesamiento y al interior de la cámara de residuos 232. Una vez el borde de fuga del líquido de lavado alcanza el respiradero 212, la presión de

gas generada por el accionador 244 se libera y se detiene el movimiento adicional del líquido.

El volumen de líquido de lavado movido por el accionador 244 a través de la región de procesamiento 220 es por lo general al menos aproximadamente 2 veces el volumen de vacío de la región de procesamiento 220 (por ejemplo, al menos aproximadamente 3 veces el volumen de vacío) y puede ser aproximadamente 10 veces el volumen de vacío o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 veces el volumen de vacío o menos). La región de procesamiento está por lo general a una temperatura de aproximadamente 50 °C o menos (por ejemplo, 30 °C o menos) durante el lavado. Algunos fluidos de lavado a modo de ejemplo incluyen los líquidos discutidos con respecto a los depósitos 279 y 281.

El procesamiento continúa por liberación de los polinucleótidos del miembro de retención 216. Por lo general, el líquido de lavado del depósito 279 se reemplaza con líquido de liberación (por ejemplo, una solución de hidróxido) del depósito 281 antes de la liberación de los polinucleótidos. Se cierra la válvula 208 y se abren las puertas 250, 252. Se acciona el accionador 248 moviendo de ese modo el líquido de liberación del depósito 281 por los canales 261, 214 y al interior de la región de procesamiento 220 y en contacto con el miembro de retención 216. Cuando el borde de fuga del líquido de liberación del depósito 281 alcanza el respiradero hidrófobo 212, la presión generada por el accionador 248 se libera deteniendo el movimiento adicional del líquido. El volumen de líquido movido por el accionador 248 a través de la región de procesamiento 220 es por lo general al menos aproximadamente igual al volumen de vacío de la región de procesamiento 220 (por ejemplo, al menos aproximadamente 2 veces el volumen de vacío) y puede ser aproximadamente 10 veces el volumen de vacío o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 veces el volumen de vacío o menos).

Una vez el miembro de retención 216 con los polinucleótidos retenidos se ha puesto en contacto con el líquido del depósito 281, se lleva a cabo por lo general una etapa de liberación. Por lo general, la etapa de liberación incluye el calentamiento del líquido de liberación presente en la región de procesamiento 216. Generalmente, el líquido se calienta a una temperatura insuficiente para que el líquido ebulle en presencia del miembro de retención. En algunas realizaciones, la temperatura es 100 °C o menos (por ejemplo, menos de 100 °C, aproximadamente 97 °C o menos). En algunas realizaciones, la temperatura es aproximadamente 65 °C o más (por ejemplo, aproximadamente 75 °C o más, aproximadamente 80 °C o más, aproximadamente 90 °C o más). En algunas realizaciones, la temperatura se mantiene durante aproximadamente 1 minuto o más (por ejemplo, aproximadamente 2 minutos o más, aproximadamente 5 minutos o más, aproximadamente 10 minutos o más). En algunas realizaciones, la temperatura se mantiene durante aproximadamente 30 minutos (por ejemplo, aproximadamente 15 minutos o menos, aproximadamente 10 minutos o menos, aproximadamente 5 minutos o menos). En una realización a modo de ejemplo, la región de procesamiento 220 se calienta entre aproximadamente 65 y 90 °C (por ejemplo, a aproximadamente 70 °C) durante entre aproximadamente 1 y 7 minutos (por ejemplo, durante aproximadamente 2 minutos).

Los polinucleótidos se liberan en el líquido presente en la región de procesamiento 220 (por ejemplo, los polinucleótidos se liberan por lo general en una cantidad de líquido de liberación que tiene un volumen aproximadamente igual que el volumen de vacío de la región de procesamiento 220). Por lo general, los polinucleótidos se liberan en aproximadamente 10 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 microlitros o menos, aproximadamente 2,5 microlitros o menos) de líquido.

En ciertas realizaciones, la proporción del volumen de muestra original movido a través de la región de procesamiento 220 con respecto al volumen de líquido en el que se liberan los polinucleótidos es al menos aproximadamente 10 (por ejemplo, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 1000). En algunas realizaciones, se pueden retener los polinucleótidos de una muestra que tiene un volumen de aproximadamente 2 ml en la región de procesamiento, y liberar en aproximadamente 4 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 3 microlitros o menos, aproximadamente 2 microlitros o menos, aproximadamente 1 microlitros o menos) de líquido.

El líquido en el que se liberan los polinucleótidos incluye por lo general al menos aproximadamente un 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %) de los polinucleótidos presentes en la muestra que entra en la región de procesamiento 220. La concentración de polinucleótidos presente en el líquido de liberación puede ser mayor que en la muestra original debido a que el volumen del líquido de liberación es por lo general menor que el volumen de la muestra líquida original que se mueve a través de la región de procesamiento. Por ejemplo, la concentración de los polinucleótidos en el líquido de liberación puede ser al menos aproximadamente 10 veces mayor (por ejemplo, al menos aproximadamente 25 veces mayor, al menos aproximadamente 100 veces mayor) que la concentración de los polinucleótidos en la muestra introducida en el dispositivo 200. La concentración de inhibidores presente en el líquido en el que se liberan los polinucleótidos es generalmente menor que la concentración de inhibidores en la muestra fluida original en una cantidad suficiente para aumentar la eficacia de amplificación de los polinucleótidos.

El intervalo de tiempo entre la introducción de la muestra que contiene polinucleótidos en la región de procesamiento 220 y la liberación de los polinucleótidos en el líquido de liberación es por lo general aproximadamente 15 minutos o menos (por ejemplo, aproximadamente 10 minutos o menos, aproximadamente cinco minutos o menos).

El líquido que incluye los polinucleótidos liberados se puede retirar de la región de procesamiento 220 como sigue a continuación. Se cierran las válvulas 210 y 234. Se abren las puertas 238 y 258. Se acciona el accionador 254 para generar una presión que mueve el líquido y los polinucleótidos desde la región de procesamiento 220, al interior del canal 230, y hacia el puerto de salida 236. El líquido con los polinucleótidos se puede retirar usando, por ejemplo,

5 una jeringa o dispositivo de muestreo automatizado. Dependiendo del líquido en contacto con el miembro de retención 216 durante la liberación de los polinucleótidos, la solución con los polinucleótidos liberados se puede neutralizar con una cantidad de tampón (por ejemplo, un volumen igual de tampón Tris-HCl 25 - 50 mM a pH 8,0).

Aunque se ha descrito que la liberación de los polinucleótidos incluye una etapa de calentamiento, los

10 polinucleótidos se pueden liberar sin calentamiento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el líquido del depósito 281 tiene una fuerza iónica, pH, concentración de tensioactivo, composición, o combinación de los mismos que libera los polinucleótidos del miembro de retención.

Aunque se ha descrito que los polinucleótidos se liberan en un volumen individual de líquido presente en la región de procesamiento 220, se pueden usar otras configuraciones. Por ejemplo, los polinucleótidos se pueden liberar con la introducción concomitante (por etapas o continua) de fluido en y/o a través de la región de procesamiento 220. En tales realizaciones, los polinucleótidos se pueden liberar en un líquido que tiene un volumen de aproximadamente 10 veces o menos (por ejemplo, aproximadamente 7,5 veces o menos, aproximadamente 5 veces o menos, aproximadamente 2,5 veces o menos, aproximadamente 2 veces o menos) que el volumen de vacío de la región de

20 procesamiento 220.

Aunque se ha descrito que los depósitos 279, 281 contienen líquidos entre la primera y segunda puertas, se pueden usar otras configuraciones. Por ejemplo, el líquido para cada depósito puede estar contenido dentro de un estuche (por ejemplo, un envase de blíster) aislado de la red 201 mediante una membrana generalmente impermeable. El estuche se configura de modo que un usuario pueda romper la membrana para impulsar el líquido a los depósitos

25 279, 281 donde los accionadores 244, 248 pueden mover el líquido durante el uso.

Aunque se ha descrito que las regiones de procesamiento tienen dimensiones de escala de microlitros, se pueden usar otras dimensiones. Por ejemplo, las regiones de procesamiento con superficies (por ejemplo, partículas)

30 configuradas para retener preferentemente polinucleótidos en lugar de inhibidores pueden tener grandes volúmenes (por ejemplo, muchas decenas de microlitros o más, al menos aproximadamente 1 mililitro o más). En algunas realizaciones, la región de procesamiento tiene una escala de sobremesa.

Aunque se ha descrito que la región de procesamiento 220 tiene un miembro de retención formado por múltiples partículas de superficie modificada, se pueden usar otras configuraciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la región de procesamiento 220 incluye un miembro de retención configurado como un miembro poroso (por ejemplo, un filtro, una membrana porosa, o una matriz de gel) que tiene múltiples aberturas (por ejemplo, poros y/o canales) a través de los que pasan los polinucleótidos. Las superficies del miembro poroso se modifican para retener preferentemente polinucleótidos. Las membranas de filtro disponibles, por ejemplo, en Osmonics, están formadas

40 por polímeros que pueden tener la superficie modificada y se usan para retener polinucleótidos dentro de la región de procesamiento 220. En algunas realizaciones, la región de procesamiento 220 incluye un miembro de retención configurado como una pluralidad de superficies (por ejemplo, paredes o deflectores) a través de los que pasa la muestra. Las paredes o los deflectores se modifican para retener preferentemente polinucleótidos.

Aunque se ha descrito la región de procesamiento 220 como un componente de una red microfluida, se pueden usar otras configuraciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el miembro de retención se puede retirar de una región de procesamiento para procesarse en otra parte. Por ejemplo, el miembro de retención se puede poner en contacto con una mezcla que comprende polinucleótidos e inhibidores en una ubicación y a continuación moverse a otra ubicación en la que se retiran los polinucleótidos del miembro de retención.

50

Aunque se han mostrado los depósitos 275 como dispersos dentro de un vehículo, se pueden usar otras configuraciones. Por ejemplo, los depósitos 275 se pueden revestir con una cubierta flexible formada por, por ejemplo, (por ejemplo, una membrana, por ejemplo, una cubierta tal como un saco). En algunas realizaciones, los depósitos están sueltos dentro de la cámara 272. En tales realizaciones, el accionador 244 puede incluir un miembro poroso que tiene poros demasiado pequeños para permitir el paso de los depósitos 275 pero suficientemente grandes para permitir que el gas salga de la cámara 272.

55

Se describen dispositivos microfluidos con diversos componentes en el documento de Patente WO 2005 011867 (Handylab inc.).

60

Aunque se ha descrito el dispositivo microfluido 300 como configurado para recibir polinucleótidos ya liberados de las células, los dispositivos microfluidos se pueden configurar para liberar polinucleótidos de las células (por ejemplo, por lisado de las células). Por ejemplo, por referencia a las Figuras 4-6, un dispositivo microfluido 300 incluye una cámara 302 de lisado de muestra en la que las células se lisan para liberar los polinucleótidos en la misma. El dispositivo microfluido 300 incluye además las capas de sustrato L1-L3, una red microfluida 304 (de la que solo se observan algunas partes en la Figura 4), y los depósitos de reactivo líquido R1-R4. Los depósitos de reactivo líquido

65

R1-R4 contienen reactivos líquidos (por ejemplo, para procesar material de muestra) y se conectan a la red 304 mediante los puertos de reactivo RP1-RP4.

La red 304 se define básicamente entre las capas L2 y L3 pero se extiende en parte entre las tres capas L1-L3. La red microfluida 304 incluye múltiples componentes que incluyen canales Ci, válvulas Vi, válvulas dobles Vi', puertas Gi, puertas de mezcla MG_i, respiraderos Hi, accionadores de gas (por ejemplo, bombas) Pi, una primera región de procesamiento B1, una segunda región de procesamiento B2, zonas de detección Di, respiraderos de aire AV_i, y zonas de residuos Wi. Los componentes de la red 304 se accionan por lo general térmicamente. Como se observa en la Figura 7, una red 312 de fuente térmica incluye fuentes térmicas (por ejemplo, fuentes térmicas resistivas) que tienen ubicaciones que corresponden a componentes de la red microfluida 304. Por ejemplo, las ubicaciones de las fuentes térmicas HP_i corresponden a las ubicaciones de los accionadores Pi, las ubicaciones de las fuentes térmicas HG_i corresponden a las ubicaciones de las puertas Gi y las puertas de mezcla, las ubicaciones de las fuentes térmicas HV_i corresponden a las ubicaciones de las válvulas Vi y dobles válvulas Vi', y las ubicaciones de las fuentes térmicas HD1 corresponden a las ubicaciones de las cámaras de procesamiento Di de la red 304. En uso, los componentes del dispositivo 300 se disponen en contacto térmico con las fuentes térmicas correspondientes de la red 312, que se opera por lo general usando un procesador como se ha descrito anteriormente para el dispositivo 200. La red 312 de fuente térmica puede estar integrada en o separada del dispositivo 300 como se ha descrito para el dispositivo 200.

A continuación los inventores discutimos los componentes del dispositivo microfluida 300.

Los respiraderos de aire AV_i son componentes que permiten que el gas (por ejemplo, aire) desplazado por el movimiento de los líquidos dentro de la red 304 se libere de modo que la presión acumulada no inhiba el movimiento deseado de los líquidos. Por ejemplo, el respirador de aire AV2 permite que se mueva líquido por el canal C14 y al canal C16 por liberación de gas corriente abajo del líquido a través de respiraderos AV2.

Las válvulas Vi son componentes que tienen un estado normalmente abierto que permite que el material pase por un canal desde una posición en un lado de la válvula (por ejemplo, corriente arriba de la válvula) a una posición en el otro lado de la válvula (por ejemplo, corriente abajo de la válvula). Las válvulas Vi pueden tener la misma estructura que las válvulas del dispositivo microfluida 200.

Como se observa en las Figuras 8 y 9, las válvulas dobles Vi' también son componentes que tienen un estado normalmente abierto que permite que el material pase por un canal desde una posición en un lado de la válvula (por ejemplo, corriente arriba de la válvula) a una posición en el otro lado de la válvula (por ejemplo, corriente abajo de la válvula). Tomando la válvula doble V11' de las Figuras 8 y 9 como ejemplo, las válvulas dobles Vi' incluyen una primera y una segunda masas 314, 316 de una TRS (por ejemplo, una aleación eutéctica o una cera) separadas entre sí en cada lado de un canal (por ejemplo, el canal C14). Por lo general, las masas de TRS 314, 316 están compensadas entre sí (por ejemplo, por una distancia de aproximadamente un 50 % de la anchura de las masas de TRS o menos). El material que se mueve a través de la válvula abierta pasa entre la primera y la segunda masas de TRS 314, 316. Cada masa de TRS 314, 316 se asocia a una cámara respectiva 318, 320, que por lo general incluye un gas (por ejemplo, aire).

Las masas de TRS 314, 316 y las cámaras 318, 320 de la válvula doble Vi' están en contacto térmico con una fuente térmica HV11' correspondiente de la red 312 de fuentes térmicas. El accionamiento de la fuente térmica HV11' hace que las masas de TRS 314, 316 cambien a un segundo estado más móvil (por ejemplo, un estado parcialmente fundido) y aumenta la presión de gas dentro de las cámaras 318, 320. La presión de gas impulsa las masas de TRS 314, 316 a través del canal C11 y cierra la válvula HV11' (Figura 9). Por lo general, las masas 314, 316 se combinan al menos parcialmente para formar una masa 322 que obstruye el canal C11.

Volviendo a la Figura 6, las puertas Gi son componentes que tienen un estado normalmente cerrado que no permite que el material pase por un canal desde una posición de un lado de la puerta al otro lado de la puerta. Las puertas Gi pueden tener la misma estructura que se ha descrito para las puertas del dispositivo 200.

Como se observa en las Figuras 10A-10D, las puertas de mezcla MG_i son componentes que permiten que dos volúmenes de líquido se combinen (por ejemplo, se mezclen) dentro de la red 304. Las puertas de mezcla MG_i se discuten adicionalmente más adelante.

Los accionadores Pi son componentes que proporcionan una presión de gas para mover el material (por ejemplo, el material de muestra y/o el material de reactivo) entre una ubicación de la red 304 y otra ubicación. Los accionadores Pi pueden ser iguales que los accionadores del dispositivo 200. Por ejemplo, cada accionador Pi incluye una cámara con una masa 273 de TEM que se puede calentar para presurizar gas dentro de la cámara. Cada accionador Pi incluye una puerta Gi correspondiente (por ejemplo, la puerta G2 del accionador P1) que evita que el líquido entre en la cámara del accionador. Por lo general, la puerta se acciona (por ejemplo, se abre) para permitir que la presión creada en la cámara del accionador entre en la red microfluida.

Las cámaras de residuos Wi son componentes que pueden recibir el líquido de residuo (por ejemplo, exceso de líquido) resultante de la manipulación (por ejemplo, movimiento y/o mezcla) de líquidos en la red 304. Por lo general, cada cámara de residuos Wi tiene un respiradero de aire asociado que permite que el gas desplace el líquido que entra en la cámara que se tiene que ventilar.

La primera región de procesamiento B1 es un componente que permite que los polinucleótidos se concentren y/o se separen de los inhibidores de una muestra. La región de procesamiento B1 se puede configurar y operar como la región de procesamiento 220 del dispositivo 200. En algunas realizaciones, la primera región de procesamiento B1 incluye un miembro de retención (por ejemplo, múltiples partículas (por ejemplo, microesferas o perlas), un miembro poroso, múltiples paredes) que tiene al menos una superficie modificada con uno o más ligandos como se ha descrito para la región de procesamiento 220. Por ejemplo, el ligando puede incluir una o más poliamidas (por ejemplo, poliamidas policatiónicas tales como poli-L-lisina, poli-D-lisina, poli-DL-ornitina). En algunas realizaciones, las partículas del miembro de retención se disponen en la cámara de lavado 302 y se mueven a la región de procesamiento B1 junto con el material de muestra.

La segunda región de procesamiento B2 es un componente que permite que el material (por ejemplo, el material de muestra) se combine con compuestos (por ejemplo, reactivos) para determinar la presencia de uno o más polinucleótidos. En algunas realizaciones, los compuestos incluyen uno o más reactivos de PCR (por ejemplo, cebadores, plásmidos de control, y enzimas polimerasa). Por lo general, los compuestos se almacenan en la región de procesamiento en forma de una o más partículas liofilizadas (por ejemplo, microgránulos). Las partículas tienen generalmente una vida útil a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20 °C) de al menos aproximadamente 6 meses (por ejemplo, al menos aproximadamente 12 meses). El líquido que entra en la segunda región de procesamiento B2 disuelve (por ejemplo, reconstituye) los compuestos liofilizados.

Por lo general, la partícula o partículas liofilizadas de la región de procesamiento B2 tienen un volumen medio de aproximadamente 5 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 4 microlitros o menos, aproximadamente 3 microlitros o menos, aproximadamente 2 microlitros o menos). En algunas realizaciones, la partícula o partículas liofilizadas de la región de procesamiento B2 tienen un diámetro medio de aproximadamente 4 mm o menos (por ejemplo, aproximadamente 3 mm o menos, aproximadamente 2 mm o menos). En una realización a modo de ejemplo, la partícula o partículas liofilizadas tienen un volumen medio de aproximadamente 2 microlitros y un diámetro medio de aproximadamente 1,35 mm. Las partículas liofilizadas para determinar la presencia de los uno o más polinucleótidos incluyen por lo general compuestos múltiples. En algunas realizaciones, las partículas liofilizadas incluyen uno o más compuestos usados en una reacción para determinar la presencia de un polinucleótido y/o para aumentar la concentración del polinucleótido. Por ejemplo, las partículas liofilizadas pueden incluir una o más enzimas para amplificar el polinucleótido tal como mediante PCR. Los inventores discutimos a continuación a modo de ejemplo partículas liofilizadas que incluyen reactivos a modo de ejemplo para la amplificación de polinucleótidos asociados a bacterias de estreptococos del grupo B (GBS). En algunas realizaciones, las partículas liofilizadas incluyen un crioprotector, una o más sales, uno o más cebadores (por ejemplo, Cebador F de GBS y/o Cebador R de GBS), una o más sondas (por ejemplo, Sonda de GBS - FAM), uno o más plásmidos de control internos, uno o más controles de especificidad (por ejemplo, ADN de *Streptococcus pneumoniae* como control para la PCR de GBS), uno o más reactivos de PCR (por ejemplo, dNTP y/o dUTP), uno o más agentes bloqueantes o de carga (por ejemplo, proteínas no específicas (por ejemplo, albúmina en suero bovino (BSA), ARNsaA, o gelatina)), y una polimerasa (por ejemplo, Polimerasa Taq exenta de glicerol).

Los crioprotectores ayudan generalmente a aumentar la estabilidad de las partículas liofilizadas y ayudan a prevenir el daño en otros compuestos de las partículas (por ejemplo, previniendo la desnaturalización de las enzimas durante la preparación y/o almacenamiento de las partículas). En algunas realizaciones, el crioprotector incluye uno o más azúcares (por ejemplo, uno o más disacáridos (por ejemplo, trehalosa, melizitoso, rafinosa)) y/o uno o más polialcoholes (por ejemplo, manitol, sorbitol).

Las partículas liofilizadas se pueden preparar según se desee. Por lo general, los compuestos de las partículas liofilizadas se combinan con un disolvente (por ejemplo, agua) para preparar una solución, que a continuación se coloca (por ejemplo, en alícuotas discretas (por ejemplo, gotas) tal como mediante una pipeta) sobre una superficie hidrófoba enfriada (por ejemplo, una película de diamante o una superficie de politetrafluoretileno). En general, la temperatura de la superficie se reduce hasta cerca de la temperatura del nitrógeno líquido (por ejemplo, aproximadamente -150 °F o menos, aproximadamente -200 °F o menos, aproximadamente -275 °F o menos). La solución se congela en forma de partículas discretas. Las partículas congeladas se someten a vacío mientras aún están congeladas a una presión y durante un tiempo suficientes para retirar el disolvente (por ejemplo, mediante sublimación) de los microgránulos.

En general, la concentración de los compuestos en la solución a partir de la que se preparan las partículas es mayor que cuando se reconstituyen en el dispositivo microfluído. Por lo general, la proporción de la concentración de la solución con respecto a la concentración reconstituida es al menos aproximadamente 3 (por ejemplo, al menos aproximadamente 4,5). En algunas realizaciones, la proporción es aproximadamente 6.

- Una solución a modo de ejemplo para preparar microgránulos liofilizados para su uso en la amplificación de polinucleótidos indicativos de la presencia de GBS se puede preparar por combinación de un crioprotector (por ejemplo, 120 mg de trehalosa en forma de un polvo seco), una solución tampón (por ejemplo, 48 microlitros de una solución de Tris 1 M a pH 8,4, KCl 2,5 M, y $MgCl_2$ 200 mM), un primer cebador (por ejemplo, 1,92 microlitros de
- 5 Cebador F de GBS 500 micromolar (Invitrogen)), un segundo cebador (por ejemplo, 1,92 microlitros de Cebador R de GBS 500 micromolar (Invitrogen)), una sonda (por ejemplo, 1,92 microlitros de Sonda de GBS - FAM 250 micromolar (IDT / Biosearch Technologies)), una sonda de control (por ejemplo, 1,92 microlitros de Cal Orange 560 250 micromolar (Biosearch Technologies)), un plásmido de plantilla (por ejemplo, 0,6 microlitros de una solución de 10^5 copias de plásmido por microlitro), un control de especificidad (por ejemplo, 1,2 microlitros de una solución de 10
- 10 nanogramos por microlitro (por ejemplo, aproximadamente 5.000.000 copias por microlitro) de ADN de *Streptococcus pneumoniae* (ATCC)), reactivos de PCR (por ejemplo, 4,8 microlitros de una solución 100 milimolar de dNTP (Epicenter) y 4 microlitros de una solución 20 milimolar de dUTP (Epicenter)), un agente de carga (por ejemplo, 24 microlitros de una solución de 50 miligramos por mililitro de BSA (Invitrogen)), una polimerasa (por ejemplo, 60 microlitros de una solución de 5 U por microlitro de Polimerasa Taq exenta de glicerol (Invitrogen /
- 15 Eppendorf)) y un disolvente (por ejemplo, agua) para preparar aproximadamente 400 microlitros de una solución. Se congelan y desolvatan 200 alícuotas de aproximadamente 2 microlitros de cada una de estas soluciones como se ha descrito anteriormente para preparar los microgránulos de 200. Cuando se reconstituyen, las 200 partículas proporcionan una solución de reactivo de PCR que tiene un volumen total de aproximadamente 2,4 mililitros.
- 20 Como se observa en la Figura 5, los depósitos de reactivo Ri se configuran para contener reactivos líquidos (por ejemplo, agua, solución tampón, solución de hidróxido) separados de la red 304 hasta que están listos para uso. Los depósitos R1 incluyen una cubierta 329 que define un espacio sellado 330 para contener líquidos. Cada espacio 330 se separa del puerto de reactivo RPi y la red 304 por una pared inferior 33 de la cubierta 329. Una parte de la cubierta 329 se conforma como un miembro perforante 331 orientado hacia la pared inferior 333 de cada cubierta.
- 25 Cuando se va a usar el dispositivo 300, se accionan los depósitos de reactivo Ri presionando el miembro perforante 331 para perforar la cubierta. El miembro perforante 331 se puede presionar por un usuario (por ejemplo, con el pulgar) o por el sistema operativo usado para operar el dispositivo 300.
- 30 Cuando se perfora la pared 333, el fluido del depósito entra en la red 333. Por ejemplo, como se observa en las Figuras 5 y 6, el líquido del depósito R2 entra en la red 304 por el puerto RP2 y viaja por el canal C2. La puerta G3 evita que el líquido pase por el canal C8. El exceso de líquido pasa por el canal C7 y a la cámara de residuos W2. Cuando el borde de fuga del líquido del depósito R2 pasa el respiradero hidrófugo H2, la presión creada en el depósito se libera deteniendo el movimiento adicional del líquido. Por lo tanto, la red 304 recibe una alícuota de reactivo líquido que tiene un volumen definido por el volumen de canal C2 entre la junta J1 y la junta J2. Cuando se
- 35 acciona el accionador P1, esta alícuota de reactivo se mueve adicionalmente dentro de la red 304. Los depósitos de reactivo R1, R3, y R4 están asociados a los canales, respiraderos hidrófugos, y accionadores correspondientes.
- 40 En la configuración mostrada, el depósito de reactivo R1 contiene por lo general un líquido de liberación (por ejemplo, una solución de hidróxido como se ha discutido anteriormente para el dispositivo 200) para liberar los polinucleótidos retenidos en la región de procesamiento B1. El depósito de reactivo R2 contiene por lo general un líquido de lavado (por ejemplo, una solución tampón como se ha discutido anteriormente para el dispositivo 200) para retirar los compuestos no retenidos (por ejemplo, inhibidores) de la región de procesamiento B1 antes de la liberación de los polinucleótidos. El depósito de reactivo R3 contiene por lo general un tampón de neutralización (por ejemplo, tampón Tris-HCl 25 - 50 mM a pH 8,0). El depósito de reactivo R4 contiene por lo general agua
- 45 desionizada.
- 50 La cámara de lavado 302 se divide en una cámara de lavado principal 306 y una cámara de residuos 308. El material no puede pasar de una de las cámaras 306, 308 a la otra cámara sin pasar a través de al menos una parte de la red 304. La cámara de lavado principal 306 incluye un puerto de entrada de muestra SP1 para introducir la muestra en la cámara 306, un puerto de salida de muestra SP2 que conecta la cámara 306 con la red 304, y reactivo liofilizado LP que interactúa con el material de muestra en la cámara 306 como se discute posteriormente. El puerto de entrada SP1 incluye una válvula de una vía que permite que el material (por ejemplo, material de muestra y gas) entre en la cámara 306 pero limite (por ejemplo, evite) que el material salga de la cámara 308 por el puerto SP1. Por lo general, el puerto SP1 incluye un conector (por ejemplo, un conector Luer) configurado para coincidir con un dispositivo de
- 55 entrada de muestra (por ejemplo, una jeringa) para formar un sello hermético al gas. La cámara principal 306 tiene por lo general un volumen de aproximadamente 5 mililitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 4 mililitros o menos). Antes de su uso, la cámara principal 306 se llena por lo general con un gas (por ejemplo, aire).
- 60 La cámara de residuos 308 incluye una parte de residuos W6 mediante la que puede entrar líquido en la cámara 308 desde la red 304 y un respiradero 310 mediante el que puede salir el gas desplazado por el líquido que entra en la cámara 308.
- 65 Las partículas de reactivo liofilizadas LP de la cámara de lavado 302 incluyen uno o más compuestos (por ejemplo, reactivos) configurados para liberar polinucleótidos de las células (por ejemplo, por lavado de las células). Por ejemplo, las partículas LP pueden incluir una o más enzimas configuradas para reducir (por ejemplo, desnaturalizar) proteínas (por ejemplo, proteinasas, proteasas (por ejemplo, pronasa), tripsina, proteinasa K, enzimas líticas de

fagos (por ejemplo, PlyGBS)), lisozimas (por ejemplo, una lisozima modificada tal como ReadyLyse), enzimas específicas de células (por ejemplo, mutanolisina para lisar estreptococos del grupo B)).

En algunas realizaciones, las partículas LP incluyen por lo general además o alternativamente componentes para retener polinucleótidos en comparación con los inhibidores. Por ejemplo, las partículas LP pueden incluir múltiples partículas 218 de superficie modificada con ligandos como se ha discutido anteriormente para el dispositivo 200. Las partículas LP pueden incluir enzimas que reducen polinucleótidos que podrían competir con un polinucleótido que se tiene que determinar por los sitios de unión de las partículas de superficie modificada. Por ejemplo, para reducir el ARN que podría competir con el ADN que se tiene que determinar, las partículas LP pueden incluir una enzima tal como ARNasa (por ejemplo, ARNsaA ISC BioExpress (Amresco)).

En una realización a modo de ejemplo, las celdas de partículas LP incluyen un crioprotector, partículas modificadas con ligandos configurados para retener polinucleótidos en comparación con inhibidores, y una o más enzimas.

Por lo general, las partículas LP tienen un volumen medio de aproximadamente 35 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 27,5 microlitros o menos, aproximadamente 25 microlitros o menos, aproximadamente 20 microlitros o menos). En algunas realizaciones, las partículas LP tienen un diámetro medio de aproximadamente 8 mm o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 mm o menos, aproximadamente 4 mm o menos). En una realización a modo de ejemplo, la partícula o partículas liofilizadas tienen un volumen medio de aproximadamente 20 microlitros y un diámetro medio de aproximadamente 3,5 mm.

Las partículas LP se pueden preparar según se desee. Por lo general, las partículas se preparan usando un crioprotector y una superficie hidrófoba enfriada como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, se puede preparar una solución para preparar partículas LP por combinación de un crioprotector (por ejemplo, 6 gramos de trehalosa), una pluralidad de partículas modificadas con ligandos (por ejemplo, aproximadamente 2 mililitros de una suspensión de partículas modificadas con carboxilato con ligandos de poli-D-lisina), una proteasa (por ejemplo, 400 miligramos de pronasa), una ARNasa (por ejemplo, 30 miligramos de ARNsaA (actividad de 120 U por miligramo), una enzima que digiere peptidoglicano (por ejemplo, ReadyLyse (por ejemplo, 160 microlitros de una solución de 30000 U por microlitro de ReadyLyse)), una enzima específica de células (por ejemplo, mutanolisina (por ejemplo, 200 microlitros de una solución de 50 U por microlitro de mutanolisina), y un disolvente (por ejemplo, agua) para preparar aproximadamente 20 mililitros. Se congelan y se desolvatan 1000 alícuotas de aproximadamente 20 microlitros de cada una de estas soluciones como se ha descrito anteriormente para preparar los microgránulos de 1000. Cuando se reconstituyen, los microgránulos se usan por lo general para preparar un total de aproximadamente 200 mililitros de solución.

En uso, el dispositivo 300 se puede operar como sigue a continuación. Las válvulas Vi y Vi' de la red 304 se configuran en el estado abierto. Las puertas Gi y las puertas de mezcla MG_i de la red 304 se configuran en el estado cerrado. Los puertos de reactivo R1-R4 se presionan para introducir reactivos líquidos en la red 304 como se ha discutido anteriormente. Se introduce una muestra en la cámara de lisado 302 a través del puerto SP1 y se combinan con las partículas liofilizadas LP en la cámara de lisado principal 306. Por lo general, la muestra incluye una combinación de partículas (por ejemplo, células) y una solución tampón. Por ejemplo, una muestra a modo de ejemplo incluye aproximadamente 2 partes de sangre completa con respecto a aproximadamente 3 partes de solución tampón (por ejemplo, una solución de Tris 20 mM a pH 8,0, EDTA 1 mM, y SDS al 1 %). Otra muestra a modo de ejemplo incluye estreptococos del grupo B y una solución tampón (por ejemplo, una solución de Tris 20 mM a pH 8,0, EDTA mM, y Triton X-100 al 1 %).

En general, el volumen de muestra introducido es menor que el volumen total de la cámara de lisado principal 306. Por ejemplo, el volumen de muestra puede ser aproximadamente un 50 % o menos (por ejemplo, aproximadamente un 35 % o menos, aproximadamente un 30 % o menos) del volumen total de la cámara 306. Una muestra habitual tiene un volumen de aproximadamente 3 mililitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 1,5 mililitros o menos). Se introduce generalmente un volumen de gas (por ejemplo, aire) en la cámara principal 306 junto con la muestra. Por lo general, el volumen de gas introducido es aproximadamente un 50 % o menos (por ejemplo, aproximadamente un 35 % o menos, aproximadamente un 30 % o menos) del volumen total de la cámara 306. El volumen de muestra y el gas se combinan para presurizar el gas ya presente en la cámara 306. La válvula 307 y el puerto SP1 evitan que el gas salga de la cámara 306. Debido a que las puertas G3, G4, G8, y G10 están en el estado cerrado, se evita que la muestra presurizada entre en la red 304 a través del puerto SP2.

La muestra disuelve las partículas LP en la cámara 306. Los reactivos de lisado reconstituidos (por ejemplo, ReadyLyse, mutanolisina) comienzan a lisar las células de la muestra liberando polinucleótidos. Otros reactivos (por ejemplo, enzimas proteasa tales como pronasa) comienzan a reducir o desnaturalizar los inhibidores (por ejemplo, proteínas) de la muestra. Los polinucleótidos de la muestra comienzan a asociarse (por ejemplo, unirse) a los ligandos de las partículas 218 liberados de las partículas LP. Por lo general, la muestra de la cámara 306 se calienta (por ejemplo, hasta al menos aproximadamente 50 °C, hasta al menos aproximadamente 60 °C) durante un periodo de tiempo (por ejemplo, durante aproximadamente 15 minutos o menos, aproximadamente 10 minutos o menos, aproximadamente 7 minutos o menos) mientras se produce el lisado. En algunas realizaciones, se usa energía óptica al menos en parte para calentar los contenidos de la cámara de lisado 306. Por ejemplo, el sistema operativo

usado para operar el dispositivo 300 puede incluir una lámpara (por ejemplo, una lámpara que emita luz principalmente en el infrarrojo) dispuesta en contacto térmico y óptico con la cámara 306. La cámara 306 incluye un sensor de temperatura TS usado para monitorizar la temperatura de la muestra en la cámara 306. El rendimiento de la lámpara aumenta o disminuye basándose en la temperatura determinada por el sensor TS.

5 Continuando con la operación del dispositivo 300, se acciona (por ejemplo, se abre) G2 para proporcionar una ruta entre el puerto SP2 de la cámara de lisado principal 306 y el puerto W6 de la cámara de residuos de lisado 308. La ruta se prolonga por el canal C9, el canal C8, a través de la región de procesamiento B1, y el canal C11. La presión en la cámara 306 impulsa el material de muestra de lisado (que contiene lisado, polinucleótidos unidos a partículas 10 218, y otros componentes de la muestra) a lo largo de la ruta. Las partículas 218 (con polinucleótidos) se retienen en la región de procesamiento B1 (por ejemplo, mediante un filtro) mientras el líquido y los demás componentes de la muestra fluyen a la cámara de residuos 308. Después de un periodo de tiempo (por ejemplo, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 minutos), la presión en la cámara de lisado 306 se libera por apertura de la puerta G1 para crear una segunda ruta entre los puertos SP2 y W6. Se cierran las válvulas dobles V1' y V8' para aislar la cámara de 15 lisado 302 de la red 304.

La operación del dispositivo 300 continúa con el accionamiento de la bomba P1 y la apertura de las puertas G2, G3 y G9. La bomba P1 impulsa líquido de lavado al canal C2 corriente abajo de la junta J1 a través de la región de procesamiento B1 y a la cámara de residuos W5. El líquido de lavado retira los inhibidores y los demás componentes 20 no retenidos por las partículas 218 de la región de procesamiento B1. Cuando el borde de fuga del líquido de lavado (por ejemplo, la interfase corriente arriba) pasa por el respiradero hidrófobo H14, la presión del accionador P1 se libera de la red 304, deteniendo el movimiento adicional del líquido. Se cierran las válvulas dobles V2' y V9'.

La operación continúa con el accionamiento de la bomba P2 y la apertura de las puertas G6, G4 y G8 para mover el líquido liberado desde el depósito de reactivo R1 a la región de procesamiento B1 y en contacto con las partículas 25 218. El respiradero de aire AV1 libera la presión delante del líquido de liberación en movimiento. El respiradero hidrófobo H6 libera la presión detrás del borde de fuga del líquido de liberación deteniendo el movimiento adicional del líquido de liberación. Se cierran las válvulas dobles V6' y V10'.

La operación continúa por calentamiento de la región de procesamiento B1 (por ejemplo, por calentamiento de las partículas 218) para liberar los polinucleótidos de las partículas 218. Las partículas se pueden calentar como se ha descrito anteriormente para el dispositivo 200. Por lo general, el líquido de liberación incluye hidróxido 30 aproximadamente 15 mM (por ejemplo, solución de NaOH) y las partículas se calientan hasta aproximadamente 70 °C durante aproximadamente 2 minutos para liberar los polinucleótidos de las partículas 218.

La operación continúa con el accionamiento de la bomba P3 y la apertura de las puertas G5 y G10 para mover el líquido de liberación de la región de procesamiento B1 corriente abajo. El respiradero de aire AV2 libera la presión 35 de gas corriente abajo del líquido de liberación permitiendo que el líquido se mueva al canal C16. El respiradero hidrófobo H8 libera la presión corriente arriba del líquido de liberación deteniendo el movimiento adicional. Se cierran la válvula doble V11' y la válvula V 14.

Por referencia a las Figuras 10A-10D, la puerta de mezcla MG11 se usa para mezclar una parte del líquido de liberación que incluye los nucleótidos liberados de las partículas 218 y tampón de neutralización del depósito de reactivo R3. La Figura 10A muestra la región de la puerta de mezcla MG11 antes de presionar el depósito de 45 reactivo R3 para introducir el tampón de neutralización en la región 304. La Figura 10B muestra la región de la puerta de mezcla MG11, después de que se haya introducido en la tampón de neutralización en los canales C13 y C12. Se cierra la válvula doble V13' para aislar la red 304 del depósito de reactivo R3. Se cierra la válvula doble V12' para aislar la red 304 de la cámara de residuos W3. El tampón de neutralización entra en contacto con un lado de una masa 324 de TRS de la puerta MG11.

La Figura 10c muestra la región de la puerta de mezcla MG11 después de que el líquido de liberación se haya movido al canal C16. Las dimensiones de la red microfluida 304 (por ejemplo, las dimensiones del canal y la 50 ubicación del respiradero hidrófobo H8) se configuran de modo que la parte del líquido de liberación ubicada entre las juntas J3 y J4 de los canales C16 y C14 corresponda aproximadamente al volumen de líquido en contacto con las partículas 218 durante la etapa de liberación. En algunas realizaciones, el volumen del líquido ubicado entre las 55 juntas J3 y J4 es menos de aproximadamente 5 microlitros (por ejemplo, aproximadamente 4 microlitros o menos, aproximadamente 2,5 microlitros o menos). En una realización a modo de ejemplo, el volumen de líquido de liberación entre las juntas J3 y J4 es aproximadamente 1,75 microlitros. Por lo general, el líquido entre las juntas J3 y J4 incluye al menos aproximadamente un 50 % de los polinucleótidos (al menos aproximadamente un 75 %, al 60 menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %) de los polinucleótidos presentes en la muestra que entra en la región de procesamiento B1. Se cierra la válvula V14 para aislar la red 304 del respiradero de aire AV2.

Antes del accionamiento de la puerta de mezcla MG11, el líquido de liberación en la junta J4 y el tampón de 65 neutralización en la junta J6 entre los canales C13 y C12 están separados únicamente por la masa 324 de TRS (por ejemplo, los líquidos no están separados por un volumen de gas). Para combinar el líquido de liberación y el tampón

de neutralización, se accionan la bomba P4 y las puertas G12, G13, y MG11. La bomba P4 impulsa el volumen de líquido de neutralización entre las juntas J5 y J6 y el volumen de líquido de liberación entre las juntas J4 y J3 al canal de mezcla C15 (Figura 10D). Por lo general, la masa 324 de TRS se dispersa y/o se funde permitiendo que se combinen los dos líquidos. Los líquidos combinados incluyen una interfase 335 corriente abajo (formada por la junta J3) y una interfase corriente arriba (formada por la junta J5). La presencia de estas interfases permite una mezcla más eficaz (por ejemplo, la recirculación del líquido combinado) que si las interfases no estuvieron presentes. Como se observa en la Figura 10D, la mezcla comienza por lo general cerca de la interfase entre los dos líquidos. El canal de mezcla C15 es por lo general al menos aproximadamente tan largo (por ejemplo, al menos aproximadamente dos veces tan largo) como la longitud total de los líquidos combinados dentro de canal.

El volumen de tampón de neutralización combinado con el líquido de liberación se determina mediante las dimensiones del canal entre las juntas J5 y J6. Por lo general, el volumen de líquido de neutralización combinado es aproximadamente el mismo que el volumen de líquido de liberación combinado. En algunas realizaciones, el volumen de líquido ubicado entre las juntas J5 y J6 es menos de aproximadamente 5 microlitros (por ejemplo, aproximadamente 4 microlitros o menos, aproximadamente 2,5 microlitros o menos). En una realización a modo de ejemplo, el volumen de líquido de liberación entre las juntas J5 y J6 es aproximadamente 2,25 microlitros (por ejemplo, el volumen total de líquido de liberación y tampón de neutralización es aproximadamente 4 microlitros).

Volviendo a la Figura 6, el líquido de liberación y el tampón de neutralización combinados se mueven por el canal de mezcla C15 y al canal C32 (ventilado corriente arriba por el respiradero de aire AV8). El movimiento continúa hasta que la interfase corriente arriba de los líquidos combinados pasa por el respiradero hidrófobo H11, que libera la presión del accionador P4 deteniendo el movimiento adicional de los líquidos combinados.

Continuando con la operación del dispositivo 300, se accionan el accionador P5 y las puertas G14, G15 y G17 para disolver las partículas de PCR liofilizadas presentes en la segunda región de procesamiento B2 en agua desde un depósito de reactivo R4. El respiradero hidrófobo H10 libera la presión del accionador P5 corriente arriba del agua deteniendo el movimiento adicional. La disolución se produce por lo general en aproximadamente 2 minutos o menos (por ejemplo, en aproximadamente 1 minuto o menos), para disolver el microgránulo de reactivo de PCR. Se cierra la válvula V17.

Continuando con la operación del dispositivo 300, se accionan el accionador P6 y la puerta G16 para impulsar los compuestos disueltos de las partículas liofilizadas desde la región de procesamiento B2 al canal C31, donde los reactivos disueltos se mezclan para formar una solución homogénea de partículas liofilizadas disueltas. El accionador P6 mueve la solución a los canales C35 y C33 (ventilados corriente abajo por el respiradero de aire AV5). El respiradero hidrófobo H9 libera la presión generada por el accionador P6 corriente arriba de la solución deteniendo el movimiento adicional. Se cierran las válvulas V 18, V19, V20', y V22'.

Continuando con la operación del dispositivo 300, se accionan el accionador P7 y las puertas G18, MG20 y G22 para combinar (por ejemplo, mezclar) una parte del líquido de liberación neutralizado en el canal 32 entre la puerta MG20 y la puerta G22 y una parte de la solución de partículas liofilizadas disueltas en el canal C35 entre las puertas G18 y MG20. Los líquidos combinados viajan por el canal de mezcla C37 y a la región de detección D2. Un respiradero de aire AV3 libera la presión de gas corriente abajo de los líquidos combinados. Cuando la interfase corriente arriba de los líquidos combinados pasa por el respiradero hidrófobo H13, la presión del accionador P7 se libera y los líquidos combinados se ubican dentro de la región de detección D2.

Se accionan el accionador P8 y las puertas MG2, G23, y G19 para combinar una parte del agua del depósito de reactivo R4 entre MG2 y la puerta G23 con una segunda parte de la solución de partículas liofilizadas disueltas en el canal C33 entre las puertas G19 y MG2. Los líquidos combinados viajan por un canal de mezcla C41 y a la región de detección D1. Un respiradero de aire AV4 libera la presión de gas corriente abajo de los líquidos combinados. Cuando la interfase corriente arriba de los líquidos combinados pasa por el respiradero hidrófobo H12, la presión del accionador P8 se libera y los líquidos combinados se ubican dentro de la región de detección D1.

Continuando con la operación del dispositivo 300, se cierran las válvulas dobles V26' y V27' para aislar la región de detección D1 de la red 304 y se cierran las válvulas dobles V24' y V25' para aislar la región de detección D2 de la red 304. Los contenidos de cada región de detección (líquido de liberación neutralizado con los polinucleótidos de la muestra en la región de detección D2 con reactivos de PCR de la solución de partículas liofilizadas disueltas y agua desionizada con reactivos de PCR de la solución de partículas liofilizadas disueltas en la región de detección D1) se someten a etapas de calentamiento y refrigeración para amplificar los polinucleótidos (si estuvieran presentes en la región de detección D2). Las válvulas dobles de cada región de detección evitan la evaporación de los contenidos de la región de detección durante el calentamiento. Los polinucleótidos amplificados se detectan por lo general usando detección de fluorescencia.

Por referencia a la Figura 11, se configura un dispositivo 700 para procesar una muestra que contiene polinucleótidos, tal como para preparar la muestra para la amplificación de los polinucleótidos. El dispositivo 700 incluye un depósito de muestra 704, un depósito de reactivo 706, un generador de presión de gas 708, un cierre (por ejemplo, una tapa 710), y una región de procesamiento 702 que incluye un miembro de retención 704 que tiene una

pluralidad de partículas (por ejemplo, perlas de carboxilato 705 de superficie modificada con un ligando, por ejemplo, poli-L-lisina y/o poli-D-lisina). El miembro de retención 705 y las perlas 705 pueden compartir cualquiera o todas las propiedades del miembro de retención 216 y las partículas de superficie modificada 218. El dispositivo 700 también incluye una abertura 716 y una válvula, por ejemplo, una válvula accionada térmicamente 714 para abrir y cerrar la

5

abertura 716.

En uso, se añade una muestra que contiene polinucleótidos al depósito de muestra 704. Las cantidades de muestra habituales varían de aproximadamente 100 µl a aproximadamente 2 µl, aunque se pueden usar cantidades mayores o menores.

10

Se puede proporcionar el depósito de reactivo 706 para usuarios del dispositivo 700 con el reactivo cargado previamente. Alternativamente, el dispositivo 700 se puede configurar de modo que los usuarios añadan reactivo al dispositivo 700. En cualquier caso, los reactivos pueden incluir, por ejemplo, soluciones de NaOH y/o soluciones tampón tal como cualquiera de tales soluciones discutidas en el presente documento.

15

Una vez se ha añadido muestra y, si fuera necesario, reactivo al dispositivo 700, se cierra la tapa 710 para evitar la evaporación de los materiales de muestra y reactivo.

20

También por referencia a la Figura 12, se configura un operador 718 para operar el dispositivo 700. El operador 718 incluye una primera fuente térmica 720 y una segunda fuente térmica 722. La primera fuente térmica 720 calienta la muestra presente dentro del depósito de muestra 704, tal como para lisar las células de la muestra que contiene polinucleótidos para preparar polinucleótidos libres.

25

El dispositivo 700 también puede incluir un depósito de enzima 712 que comprende una enzima, por ejemplo, una proteasa tal como pronasa, configurada para escindir enlaces peptídicos de los polipéptidos presentes en la muestra que contiene polinucleótidos. Se puede proporcionar el depósito de enzima 712 para los usuarios del dispositivo 700 con la enzima cargada previamente. Alternativamente, el dispositivo 700 se puede configurar de modo que los usuarios añadan enzima al dispositivo 700.

30

El dispositivo 700 se puede usar para reducir la cantidad de inhibidores presentes con respecto a la cantidad de los polinucleótidos que se tienen que determinar. De ese modo, la muestra se eluye a través de la región de procesamiento 702 para poner en contacto los constituyentes de la muestra con las perlas 705. Las perlas 705 retienen los polinucleótidos de la muestra en comparación con los inhibidores como se describe en otro lugar en el presente documento. Con la válvula 714 en el estado abierto, los constituyentes de la muestra no retenidos en la

35

región de procesamiento 702 salen del dispositivo 700 a través de la abertura.

Una vez ha eluido la muestra que contiene polinucleótidos a través de la región de procesamiento 702, se eluye una cantidad de reactivo, por ejemplo, una solución de lavado, por ejemplo, un tampón tal como Tris-EDTA de pH 8,0 con Triton X100 al 1 %, a través de la región de procesamiento 702. La solución de lavado se almacena generalmente en el depósito de reactivo 706, que puede incluir una válvula configurada para liberar una cantidad de solución de lavado. La solución de lavado eluye la muestra que contiene polinucleótidos remanente y los inhibidores sin eluir los polinucleótidos retenidos.

40

Una vez se han separado los inhibidores de los polinucleótidos retenidos, los polinucleótidos se liberan de las perlas 705. En algunas realizaciones, los polinucleótidos se liberan poniendo en contacto las perlas 705 con una solución de liberación, por ejemplo, una solución de NaOH o una solución tampón que tiene un pH diferente del de la solución de lavado. Alternativamente, o en combinación, las perlas con los polinucleótidos retenidos se calientan, tal como usando la segunda fuente térmica 722 del operador 718. Cuando se usa calor para liberar los polinucleótidos, la solución de liberación puede ser idéntica a la solución de lavado.

50

El generador de presión de gas 708 se puede usar para expulsar una cantidad de solución de liberación con los polinucleótidos liberados del dispositivo 700. El generador de presión de gas y/o el operador 718 pueden incluir una fuente térmica para calentar el gas presente dentro del generador 708. El gas caliente se expande y proporciona la presión de gas para expulsar la muestra. En algunas realizaciones, y tanto si se usa la presión de gas generada térmicamente como si no, el generador de presión de gas 708 se configura para expulsar un volumen predeterminado de material. Por lo general, la cantidad de solución expulsada es menos de aproximadamente 500 µl, menos de aproximadamente 250 µl, menos de aproximadamente 100 µl, menos de aproximadamente 50 µl, por ejemplo, menos de aproximadamente 25 µl.

55

60 Ejemplos

Los siguientes Ejemplos son ilustrativos y no pretende ser limitantes.

Preparación del miembro de retención

Se activaron perlas magnéticas de superficie de carboxilato (Sera-Mag Magnetic Carboxylate Modified, N° de Cat. 3008050250, Seradyn) a una concentración de aproximadamente 10^{11} ml⁻¹ durante 30 minutos usando N-hidroxilsuccinimida (NHS) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) en una solución tampón 500 mM de pH 6,1 de ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES). Las perlas activadas se incubaron con poli-L-lisina (PLL) de peso molecular promedio de 3000 Da o 300.000 Da. Después de 2 lavados para retirar la PLL no unida, las perlas estuvieron listas para su uso.

10 Dispositivo microfluida

Por referencia a las Figuras 13 y 14, se fabricó un dispositivo microfluida 300 para demostrar la separación de los polinucleótidos de los inhibidores. El dispositivo 300 comprende una primera y segunda partes de sustrato 302', 304', que comprenden respectivamente una primera y segunda capas 302a', 302b' y 304a', 304b'. La primera y la segunda capas 302a', 302b' definen un canal 306' que comprende un puerto de entrada 310' y un puerto de salida 312'. La primera y la segunda capas 304a', 304b' definen un canal 308' que comprende un puerto de entrada 314' y un puerto de salida 316'. La primera y la segunda partes de sustrato 302', 304' se acoplaron usando el adhesivo 324' de modo que el puerto de salida 312' comunicara con el puerto de entrada 314' con un filtro 318' ubicado entre los mismos. Una parte del puerto de salida 312' se llenó con las perlas activadas preparadas anteriormente para proporcionar una región de procesamiento 320' que comprende un miembro de retención (las perlas). Una pipeta 322' (Fig. 14) asegurada mediante el adhesivo 326' facilitó la introducción de la muestra.

En uso, la muestra introducida a través del puerto de entrada 310' pasó por el canal y a través de la región de procesamiento 320'. El exceso de material de muestra pasó por el canal 308' y salió del dispositivo 300' a través del puerto de salida 316'. Los polinucleótidos se retuvieron preferentemente por las perlas en comparación con los inhibidores. Una vez se hubo introducido la muestra, se introdujeron líquidos adicionales, por ejemplo, un líquido de lavado y/o un líquido para su uso en la liberación de los polinucleótidos retenidos, a través del puerto de entrada 326'.

30 Retención de ADN

La retención de los polinucleótidos por las perlas modificadas con poli-L-lisina del dispositivo 300' se demostró preparando los respectivos dispositivos que comprendían regiones de procesamiento que tenían un volumen de aproximadamente 1 µl incluyendo aproximadamente 1000 perlas. Las perlas se modificaron con poli-L-lisina de entre aproximadamente 15.000 y 30.000 Da. Cada región de procesamiento se llenó con un líquido que comprendía ADN de esperma de arenque (aproximadamente 20 µl de muestra con una concentración de aproximadamente 20 mg/ml) poniendo de este modo en contacto las perlas y el líquido. Después de que el líquido y las perlas hubieran estado en contacto durante 10 minutos, se retiró el líquido de cada región de procesamiento y se sometió a PCR cuantitativa en tiempo real para determinar la cantidad de ADN de esperma de arenque presente en el líquido.

Se llevaron a cabo dos controles. En primer lugar, se empaquetó una región de procesamiento por lo demás idéntica con perlas sin modificar, es decir, perlas que eran idénticas a las perlas de poli-L-lisina excepto por las etapas de activación e incubación de poli-L-lisina. El líquido que comprendía ADN de esperma de arenque se puso en contacto con estas perlas, se mantuvo en reposo durante 10 minutos, se retiró, y se sometió a PCR cuantitativa en tiempo real. En segundo lugar, el líquido que comprendía el ADN de esperma de arenque ("el líquido sin procesar") se sometió a PCR cuantitativa en tiempo real.

Por referencia a la Figura 15, el primer y segundo controles exhibieron respuestas básicamente idénticas indicando la presencia de ADN de esperma de arenque en el líquido puesto en contacto con las perlas sin modificar y el líquido sin procesar. El líquido que se había puesto en contacto con las perlas de poli-L-lisina de 3000 Da exhibió una respuesta inferior indicando que las perlas modificadas habían retenido básicamente la totalidad el ADN de esperma de arenque. La respuesta de PCR del líquido que se había puesto en contacto con las perlas de poli-L-lisina de 300.000 Da exhibió una respuesta de amplificación que fue al menos aproximadamente un 50 % mayor que para las perlas de 3000 Da indicando que la modificación superficial de peso molecular inferior fue más eficaz en la retención del ADN de esperma de arenque.

Liberación del ADN de las perlas modificadas con poli-L-lisina

Los dispositivos que tenían regiones de procesamiento se empaquetaron con perlas modificadas con poli-L-lisina de 3000 Da. El líquido que comprendía polinucleótidos obtenidos a partir de estreptococos del grupo B (GBS) se puso en contacto con las perlas y se incubó durante 10 minutos como se ha indicado anteriormente para el ADN de esperma de arenque. Este líquido se había obtenido sometiendo aproximadamente 10.000 bacterias GBS en 10 µl de Tris 20 mM de pH 8, EDTA 1 mM, tampón Triton X-100 al 1 % a lisado térmico a 97 °C durante 3 min.

Después de 10 minutos, se retiró el líquido en contacto con las perlas haciendo fluir aproximadamente 10 µl de solución de lavado (Tris-EDTA de pH 8,0 con Triton X100 al 1 %) a través de la región de procesamiento.

Posteriormente, se añadió aproximadamente 1 µl de solución 5 mM de NaOH a la región de procesamiento. Este proceso dejó la región de procesamiento empaquetada llena con la solución de NaOH en contacto con las perlas. La solución en contacto con las perlas se calentó a 95 °C. Después de 5 minutos de calentamiento a 95 °C, la solución en contacto con las perlas se retiró por elución de la región de procesamiento con un volumen de solución igual a tres veces el volumen de vacío de la región de procesamiento.

Por referencia a la Figura 16, se sometieron cinco alícuotas de solución a amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real. Las alícuotas E1, E2, y E3 contenían cada una aproximadamente 1 µl de líquido. La alícuota L se correspondió con el líquido de la muestra original que había pasado a través de la región de procesamiento. La alícuota W era líquido obtenido de la solución de lavado sin calentamiento. La alícuota E1 corresponde con el volumen muerto del dispositivo 300, aproximadamente igual al volumen del canal 308. De ese modo, el líquido de la alícuota E1 estaba presente en el canal 308 y no en contacto con las perlas durante el calentamiento. Este líquido se hizo pasar a través de la región de procesamiento antes del calentamiento. La alícuota E2 comprende líquido que estaba presente dentro de la región de procesamiento y en contacto con las perlas durante el calentamiento. La alícuota E3 comprende líquido usado para retirar la alícuota E2 de la región de procesamiento.

Como se observa en la Figura 16, más de un 65 % del ADN de GBS presente en la muestra inicial se retuvo por y se liberó de las perlas (Alícuota E2). La alícuota E2 también demuestra la liberación de más de un 80 % del ADN que había sido retenido por las perlas. Menos de aproximadamente un 18 % del ADN de GBS pasó a través de la región de procesamiento sin ser capturado. La solución de lavado sin calentamiento comprendía menos de un 5 % del ADN de GBS (Alícuota W).

Separación de polinucleótidos e inhibidores

Las células bucales del revestimiento de las mejillas proporcionan una fuente de material genético humano (ADN) que se puede usar para la detección de polimorfismo de nucleótido simple (SNP). Se sometió una muestra que comprendía células bucales a lisado térmico para liberar ADN del interior de las células. Se usó el dispositivo 300 para separar el ADN de los inhibidores concomitantes como se ha descrito anteriormente. Una muestra depurada que correspondía a la alícuota E2 de la Figura 16 se sometió a la reacción en cadena de la polimerasa. También se amplificó una muestra de control o en bruto que se obtuvo del lisado térmico.

Por referencia a la Figura 17, la muestra depurada exhibió una respuesta de PCR básicamente mayor en menos ciclos que la muestra de control. Por ejemplo, la muestra depurada excedió de una respuesta de 20 en 32 ciclos mientras que la muestra de control requirió aproximadamente 45 ciclos para conseguir la misma respuesta.

La sangre actúa como una matriz de muestra en una diversidad de ensayos diagnósticos que incluyen detección de agentes de enfermedades infecciosas, marcadores de cáncer y otros marcadores genéticos. La hemoglobina presente en las muestras de sangre es un potente inhibidor documentado de PCR. Se lisaron dos muestras de sangre de 5 ml en tampón Tris 20 mM de pH 8, EDTA 1 mM, SDS al 1 % y se introdujeron en los respectivos dispositivos 300, que se operaron como se ha descrito anteriormente para preparar dos muestras depuradas. Se lisó una tercera muestra de sangre de 5 ml y se preparó usando el método de extracción de ADN comercial Puregene, Gentra Systems, MN. Las respectivas muestras depuradas y la muestra sometida al método de extracción comercial se usaron para el análisis de discriminación Allelic (reactivos CYP2D6*4, Applied Biosystems, CA). Cada muestra contenía una cantidad de ADN correspondiente a aproximadamente 1 ml de sangre.

Por referencia a la Figura 18, las muestras depuradas y extraídas comercialmente exhibieron una respuesta de PCR similar demostrando que la región de procesamiento del dispositivo 300' retiro de forma eficaz los inhibidores de las muestras de sangre.

Miembro de retención resistente a proteasa

La preparación de muestras de polinucleótidos para procesamiento adicional incluye a menudo someter las muestras a tratamiento de proteasa en el que una proteasa escinde los enlaces peptídicos de las proteínas de la muestra. Una proteasa a modo de ejemplo es pronasa, una mezcla de endo y exoproteasas. La pronasa escinde la mayoría de los enlaces peptídicos. Ciertos ligandos, tales como poli-L-lisina son susceptibles a la ruptura por la pronasa y otras proteasas. De ese modo, las muestras no se someten generalmente a tratamiento de proteasa en presencia del miembro de retención si los ligandos unidos al mismo son susceptibles a las proteasas.

La poli-D-lisina, el enantiómero dextrógiro de polilisina resiste la escisión de la pronasa y otras proteasas. Se estudió la capacidad de un miembro de retención que comprende poli-D-lisina unida para retener ADN incluso cuando se sometía a un tratamiento de proteasa.

Se prepararon ocho (8) muestras. Un primer grupo de 4 muestras contenía 1000 células de GBS en 10 µl de tampón. Un segundo grupo de 4 muestras contenía 100 células de GBS en 10 µl de tampón. Cada una de las 8 muestras se calentó a 97 °C durante 3 min para lisar las células de GBS. Se crearon cuatro (4) conjuntos de muestras a partir de las muestras calentadas. Cada conjunto de muestras contenía 1 muestra de cada uno del

primer y segundo grupos. Las muestras de cada conjunto de muestras se trataron como sigue a continuación.

Por referencia a la Figura 19a, las muestras del conjunto de muestras 1 se sometieron a incubación con pronasa para preparar las respectivas muestras con proteínas escindidas, que a continuación se calentaron para inactivar las proteasas. Las muestras calentadas con proteínas escindidas se pusieron en contacto con los respectivos miembros de retención que comprendían cada uno un conjunto de perlas modificadas con poli-L-lisina. Después de 5 minutos, se lavaron los respectivos conjuntos de perlas con 5 microlitros de solución 5 mM de NaOH para separar los inhibidores y los productos de la escisión de las proteínas del ADN unido. Los respectivos conjuntos de perlas se pusieron en contacto cada uno con una segunda alícuota de solución de NaOH y se calentaron a 80 (ochenta) °C durante 2 minutos para liberar el ADN. Las soluciones con el ADN liberado se neutralizaron con un volumen igual de tampón. Las soluciones neutralizadas se analizaron para determinar la eficacia de recuperación de ADN. Los resultados se promediaron y se muestran en la Figura 19b.

Las muestras del conjunto de muestras 2 se sometieron a incubación con pronasa para preparar las respectivas muestras con proteínas escindidas, que a continuación se calentaron para inactivar las proteasas. Las muestras calentadas con proteínas escindidas se pusieron en contacto con los respectivos miembros de retención que comprendían cada uno un conjunto de perlas modificadas con poli-D-lisina. Después de 5 minutos, se lavaron los respectivos conjuntos de perlas con 5 microlitros de solución 5 mM de NaOH para separar los inhibidores y los productos de la escisión de las proteínas del ADN unido. Los respectivos conjuntos de perlas se pusieron en contacto cada uno con una segunda alícuota de solución de NaOH y se calentaron a 80 (ochenta) °C durante 2 minutos para liberar el ADN. Las soluciones con el ADN liberado se neutralizaron con un volumen igual de tampón. Las soluciones neutralizadas se analizaron para determinar la eficacia de recuperación de ADN. Los resultados se promediaron y se muestran en la Figura 19b.

Las muestras del conjunto de muestras 3 se sometieron a incubación con pronasa para preparar las respectivas muestras con proteínas escindidas. Las proteasas no se desactivaron ni térmica ni químicamente. Las muestras con proteínas escindidas se pusieron en contacto con los respectivos miembros de retención que comprendían cada uno un conjunto de perlas modificadas con poli-L-lisina. Después de 5 minutos, se lavaron los respectivos conjuntos de perlas con 5 microlitros de solución 5 mM de NaOH para separar los inhibidores y los productos de la escisión de las proteínas del ADN unido. Los respectivos conjuntos de perlas se pusieron en contacto cada uno con una segunda alícuota de solución de NaOH y se calentaron a 80 (ochenta) °C durante 2 minutos para liberar el ADN. Las soluciones con los polinucleótidos liberados se neutralizaron cada una con un volumen igual de tampón. Las soluciones neutralizadas se analizaron para determinar la eficacia de recuperación de ADN. Los resultados se promediaron y se muestran en la Figura 19b.

Las muestras del conjunto de muestras 4 se sometieron a incubación con pronasa para preparar las respectivas muestras con proteínas escindidas. Las proteasas no se desactivaron ni térmica ni químicamente. Las muestras con proteínas escindidas se pusieron en contacto con los respectivos miembros de retención que comprendían cada uno un conjunto de perlas modificadas con poli-D-lisina. Después de 5 minutos, se lavaron los respectivos conjuntos de perlas con 5 microlitros de solución 5 mM de NaOH para separar los inhibidores y los productos de la escisión de las proteínas del ADN unido. Los respectivos conjuntos de perlas se pusieron en contacto cada uno con una segunda alícuota de solución de NaOH y se calentaron a 80 (ochenta) °C durante 2 minutos para liberar el ADN. Las soluciones con los polinucleótidos liberados se neutralizaron cada una con un volumen igual de tampón. Las soluciones neutralizadas se analizaron para determinar la eficacia de recuperación de ADN. Los resultados se promediaron y se muestran en la Figura 19b.

Como se observa en la Figura 19b, se recuperó un promedio de más de un 80 % de ADN de las células de GBS usando el conjunto de muestras 4 en el que las muestras se pusieron en contacto con perlas modificadas con poli-D-lisina y se sometieron a incubación con pronasa en presencia de las perlas sin inactivación de la proteasa. La eficacia de recuperación para el conjunto de muestras 4 es más del doble que para cualquiera de las demás muestras. Específicamente, las eficacias de recuperación para los conjuntos de muestras 1, 2, 3, y 4, fueron del 29 %, 32 %, 14 %, y 81,5 %, respectivamente. Las eficacias demuestran que se pueden obtener elevadas eficacias de recuperación para muestras sometidas a incubación con proteasa en presencia de un miembro de retención que retiene ADN.

Se encuentran otras realizaciones en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para separar uno o más polinucleótidos de una muestra que contiene inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa, comprendiendo el método:
 - poner en contacto una solución de la mezcla con una pluralidad de partículas de unión a polinucleótidos, donde las partículas de unión se configuran para retener preferentemente el uno o más polinucleótidos de la muestra en comparación con los inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa;
 - donde la pluralidad de partículas de unión tienen superficies que comprenden una poliamida policatiónica configurada para unirse a polinucleótidos en presencia de los inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa;
 - retirar la solución que contiene los inhibidores de la pluralidad de partículas de unión; y
 - liberar los uno o más polinucleótidos de las partículas de unión en un volumen de líquido, donde la liberación se produce a un pH de 10,5 o mayor.
2. El método de la reivindicación 1, donde los uno o más polinucleótidos tienen un tamaño de menos de aproximadamente 7,5 Mpb.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende además, después de la puesta en contacto, lavar las partículas con un volumen de solución de lavado menor de aproximadamente 50 microlitros.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la liberación comprende calentar la pluralidad de partículas a una temperatura entre aproximadamente 50 °C y aproximadamente 100 °C.
5. El método de la reivindicación 4, donde la pluralidad de partículas se calienta en presencia de un líquido y la temperatura es insuficiente para que el líquido ebulle en presencia de la pluralidad de partículas durante el calentamiento.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, donde la temperatura se mantiene entre aproximadamente 1 y 10 minutos.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el método no comprende la centrifugación de las partículas.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la superficie comprende un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en poli-DL-ornitina, poli-L-lisina y poli-D-lisina.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tiempo requerido para completar la puesta en contacto, retirada, liberación es menor de 15 minutos.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la poliamida policatiónica es resistente a la degradación por pronasa.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la poliamida está unida covalentemente a la superficie de las partículas.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la poliamida es poli-L-lisina o poli-D-lisina y tiene un peso molecular promedio entre aproximadamente 7.500 Da y aproximadamente 35.000 Da.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las partículas están hechas de un material polimérico modificado para incluir uno o más grupos ácido carboxílico y/o uno o más grupos amino, donde los grupos proporcionan un punto de unión para uno o más ligandos.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las partículas tienen un diámetro medio entre aproximadamente 4 micrómetros y aproximadamente 20 micrómetros.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las partículas están presentes con una densidad de aproximadamente 10^8 partículas por mililitro.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde al menos algunas de las partículas son magnéticas.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las partículas se retienen en un filtro.
18. El método de la reivindicación 17, donde el filtro tiene un área superficial entre aproximadamente 1 mm^2 y aproximadamente 3 mm^2 .

19. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la liberación se produce a un pH de aproximadamente 11,0 o mayor.
- 5 20. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la puesta en contacto tiene lugar en presencia de reactivos de lisis.
21. El método de la reivindicación 20, donde la puesta en contacto en presencia de reactivos de lisis comprende calentar la muestra a una temperatura mayor de 50 °C.
- 10 22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21, donde la puesta en contacto en presencia de reactivos de lisis tiene lugar durante un periodo de menos de 15 minutos.

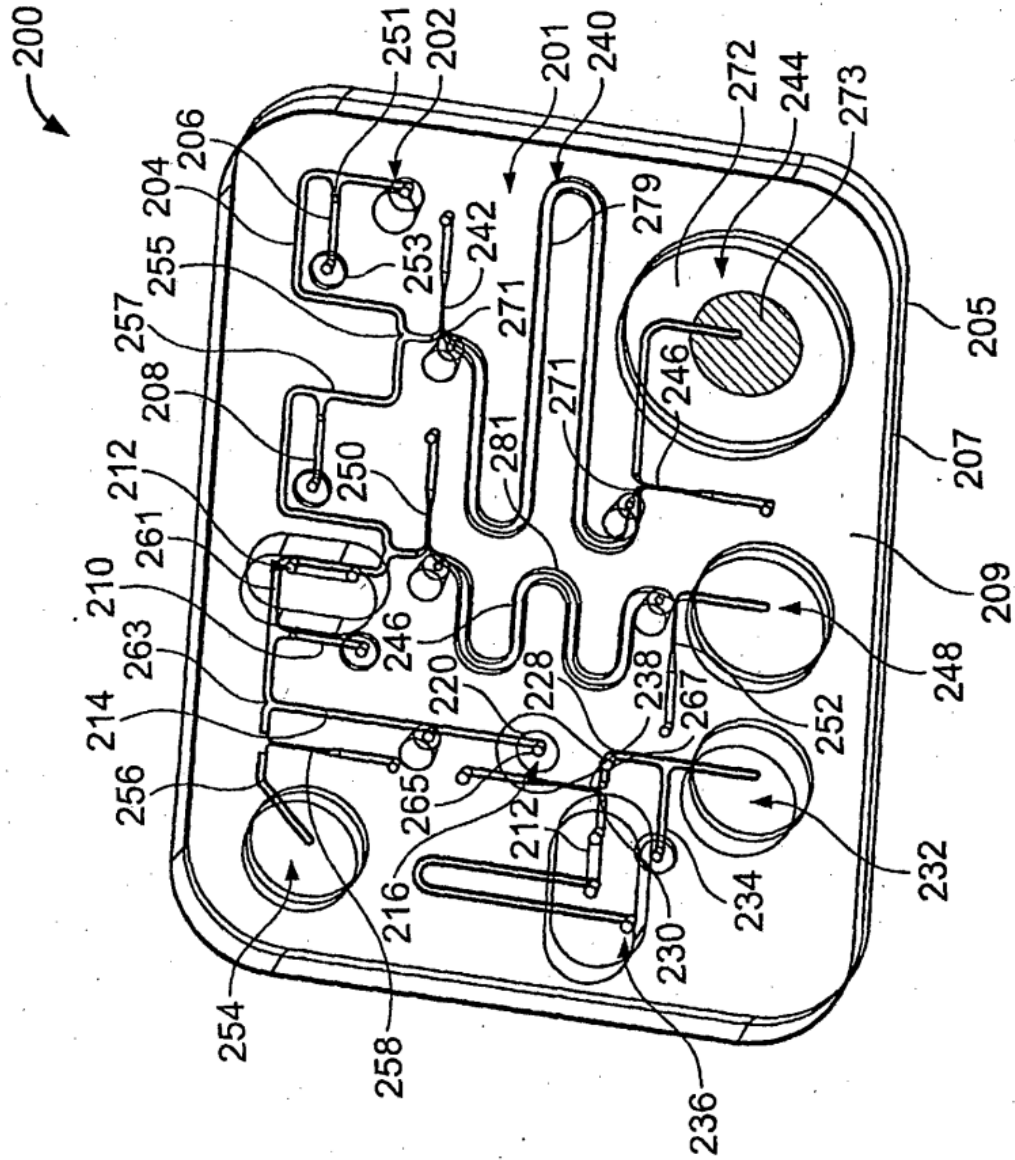


FIG. 1

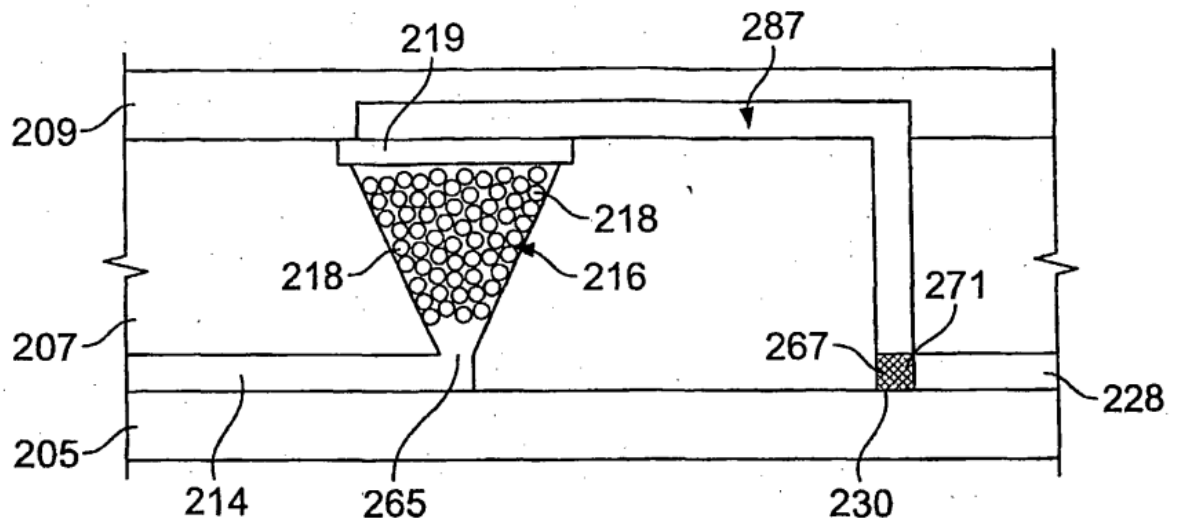


FIG. 2

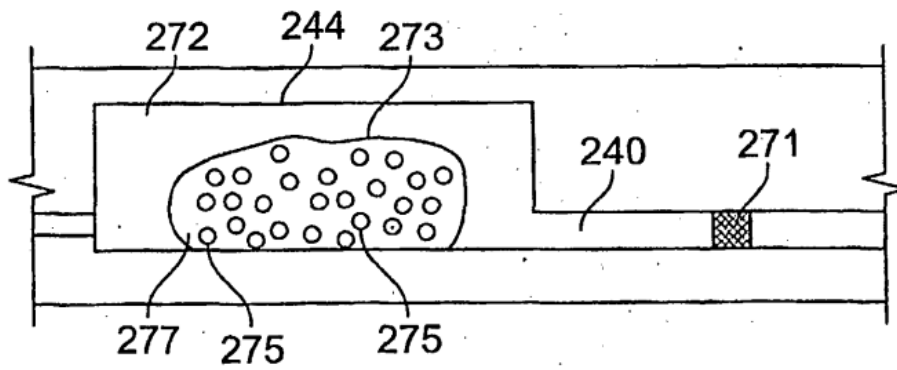


FIG. 3

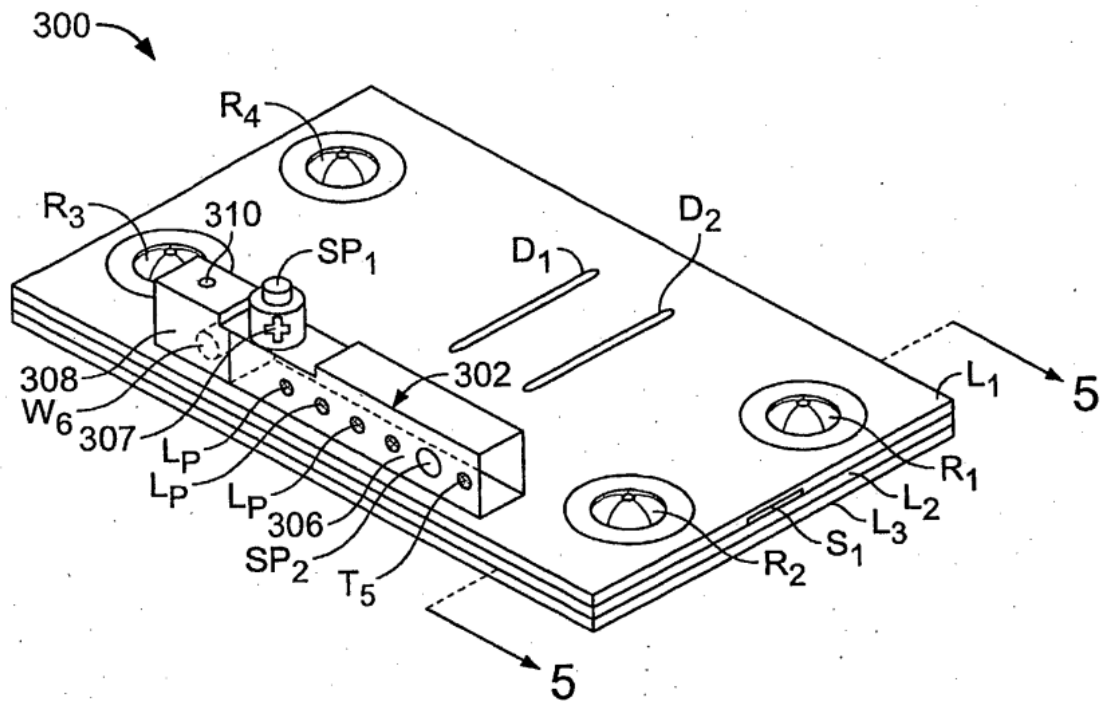


FIG. 4

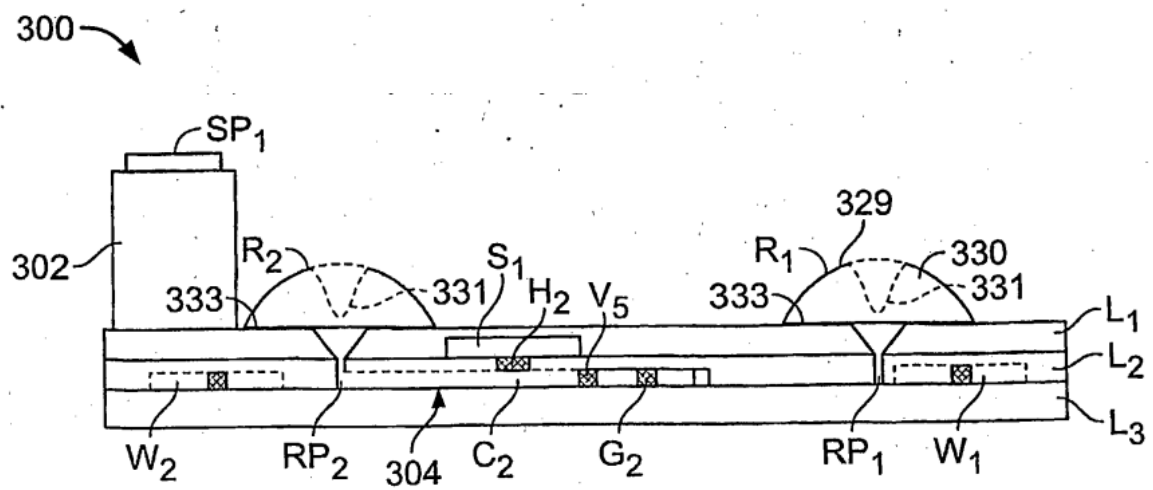


FIG. 5

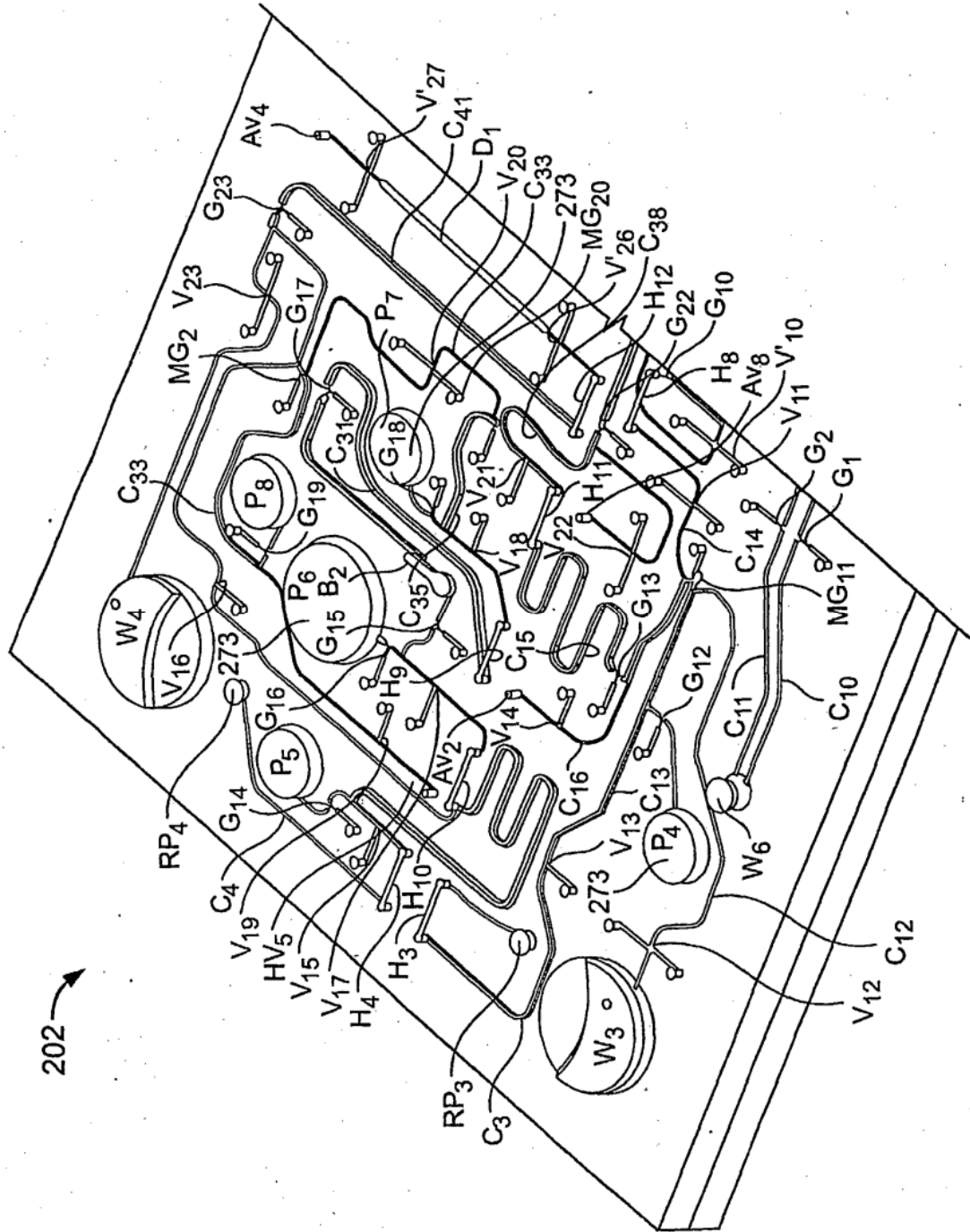
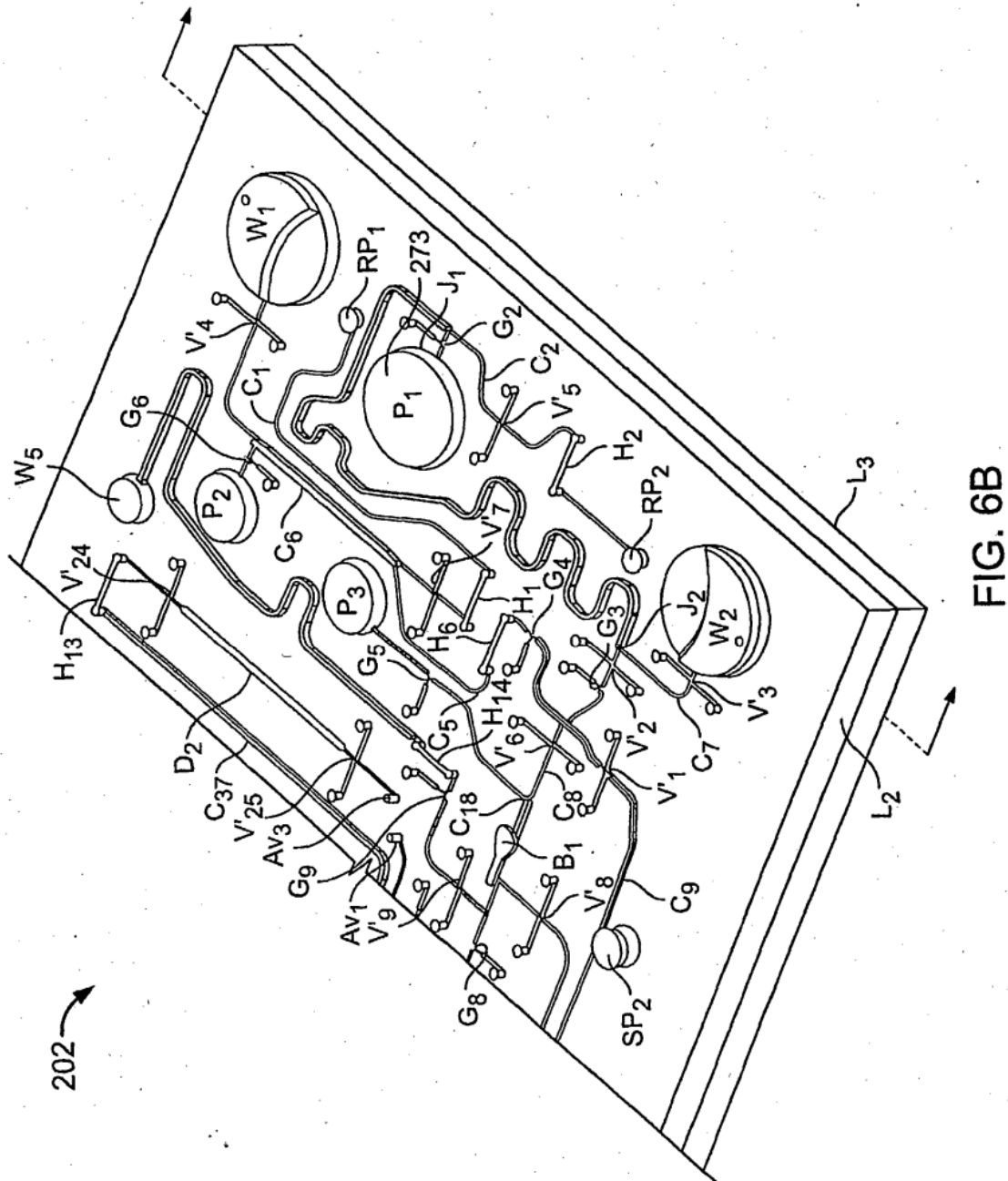


FIG. 6A



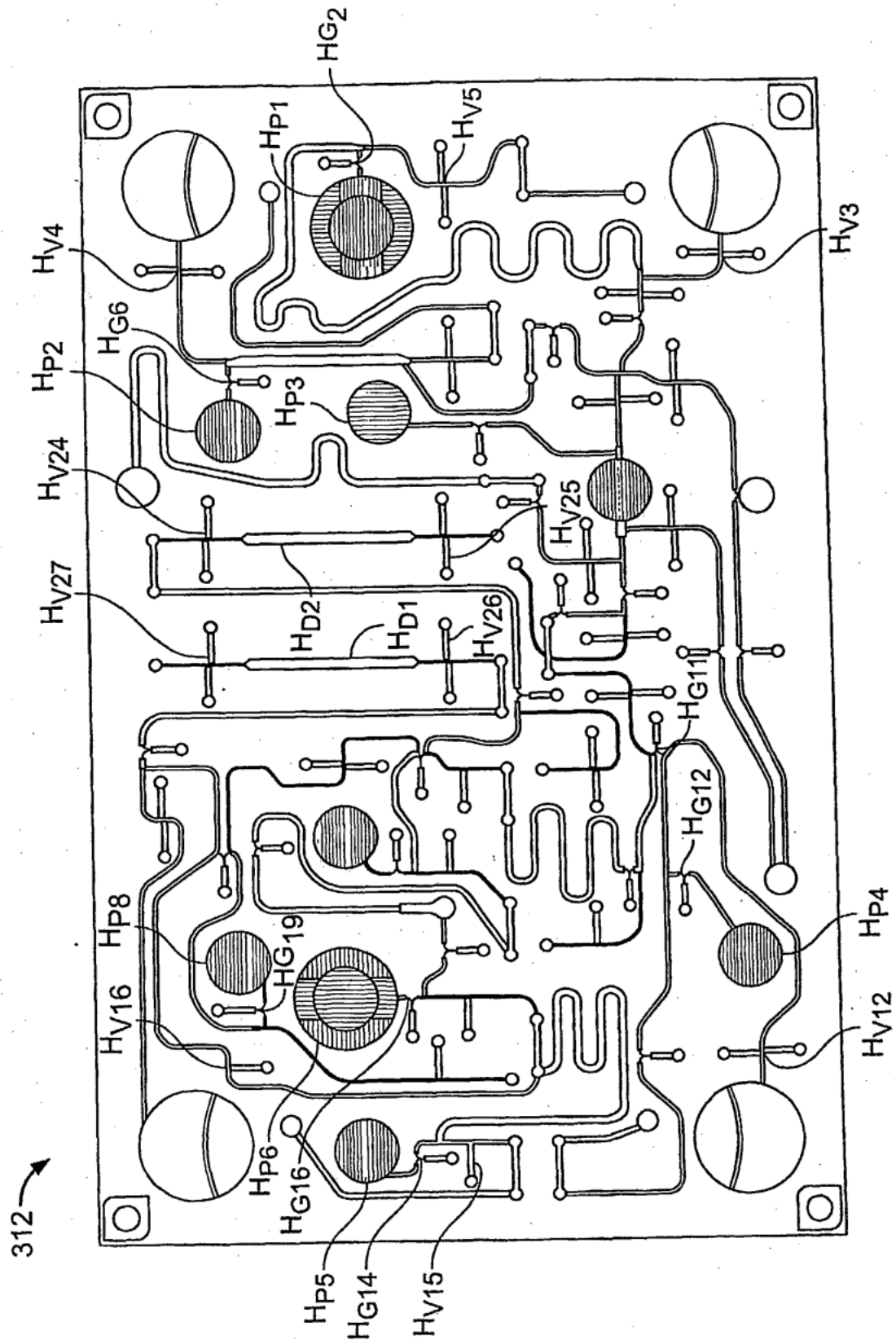


FIG. 7

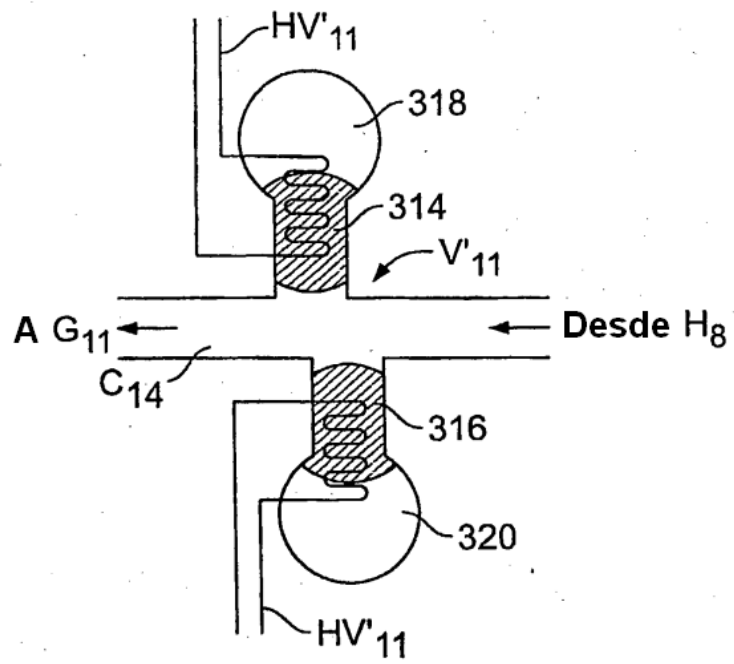


FIG. 8

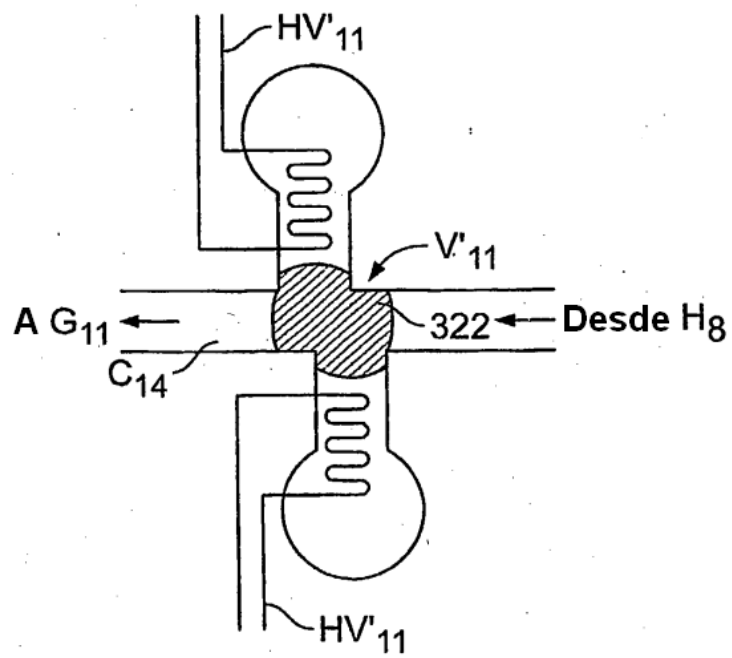


FIG. 9

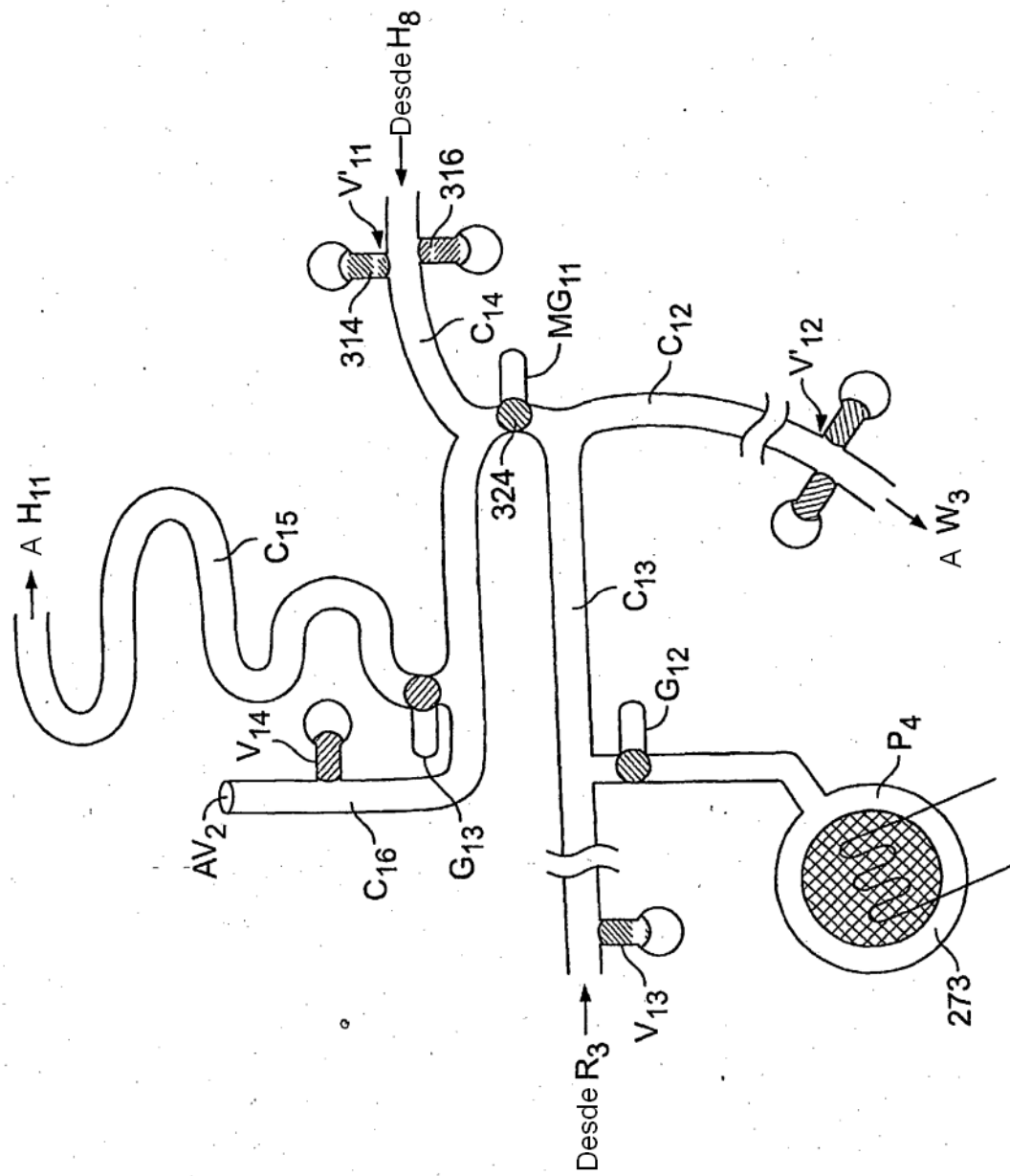


FIG. 10A

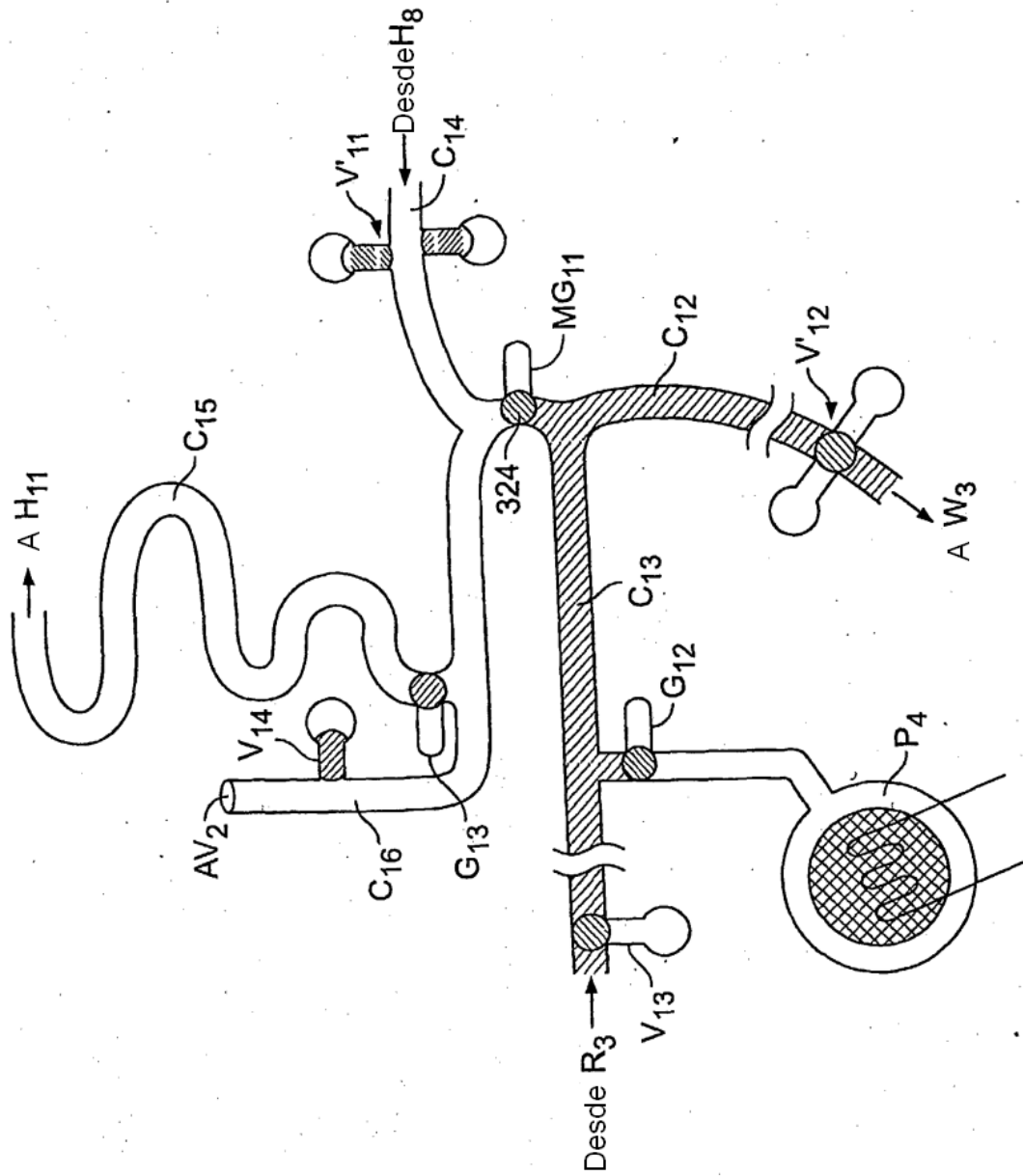


FIG. 10B

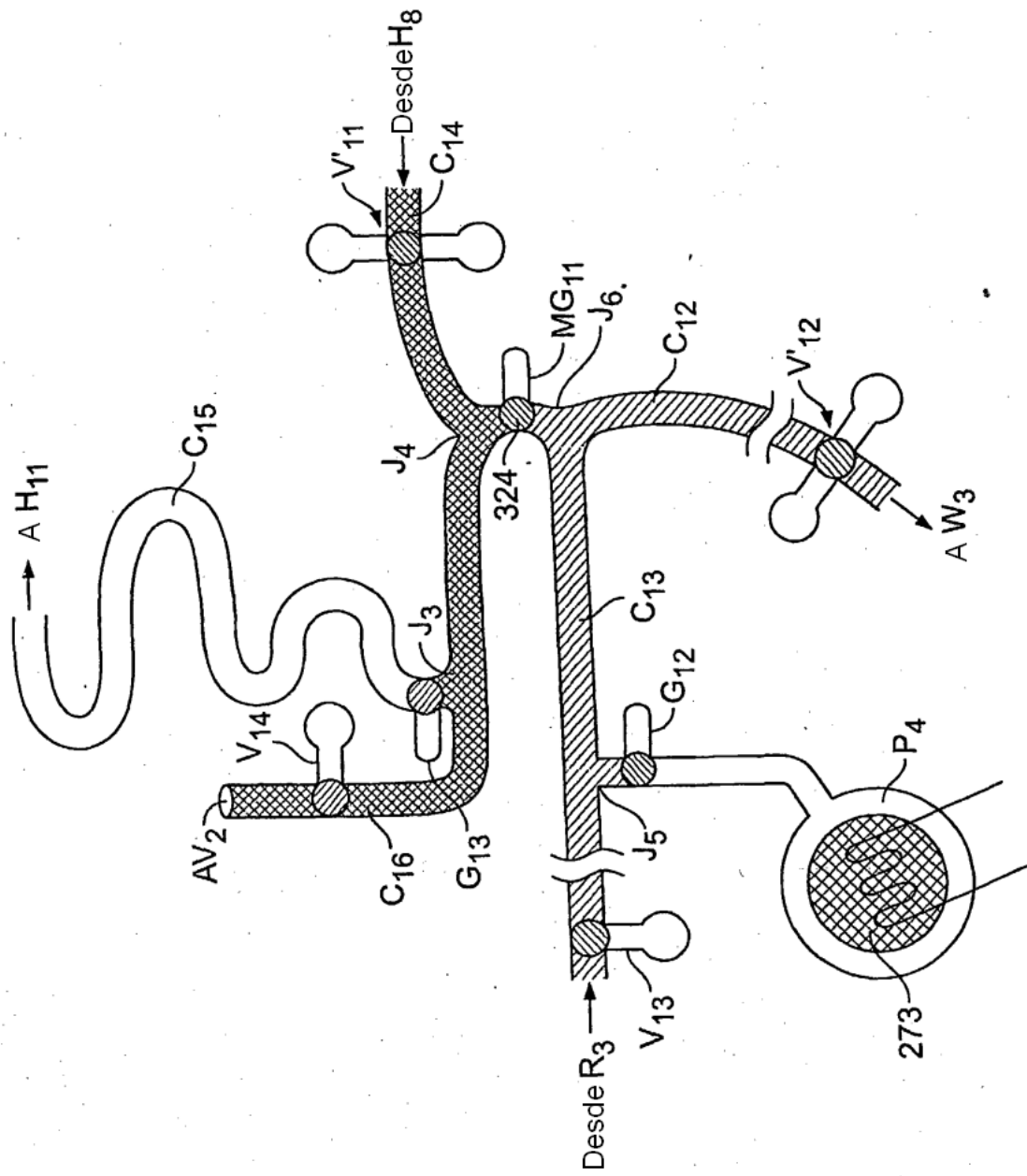


FIG. 10C

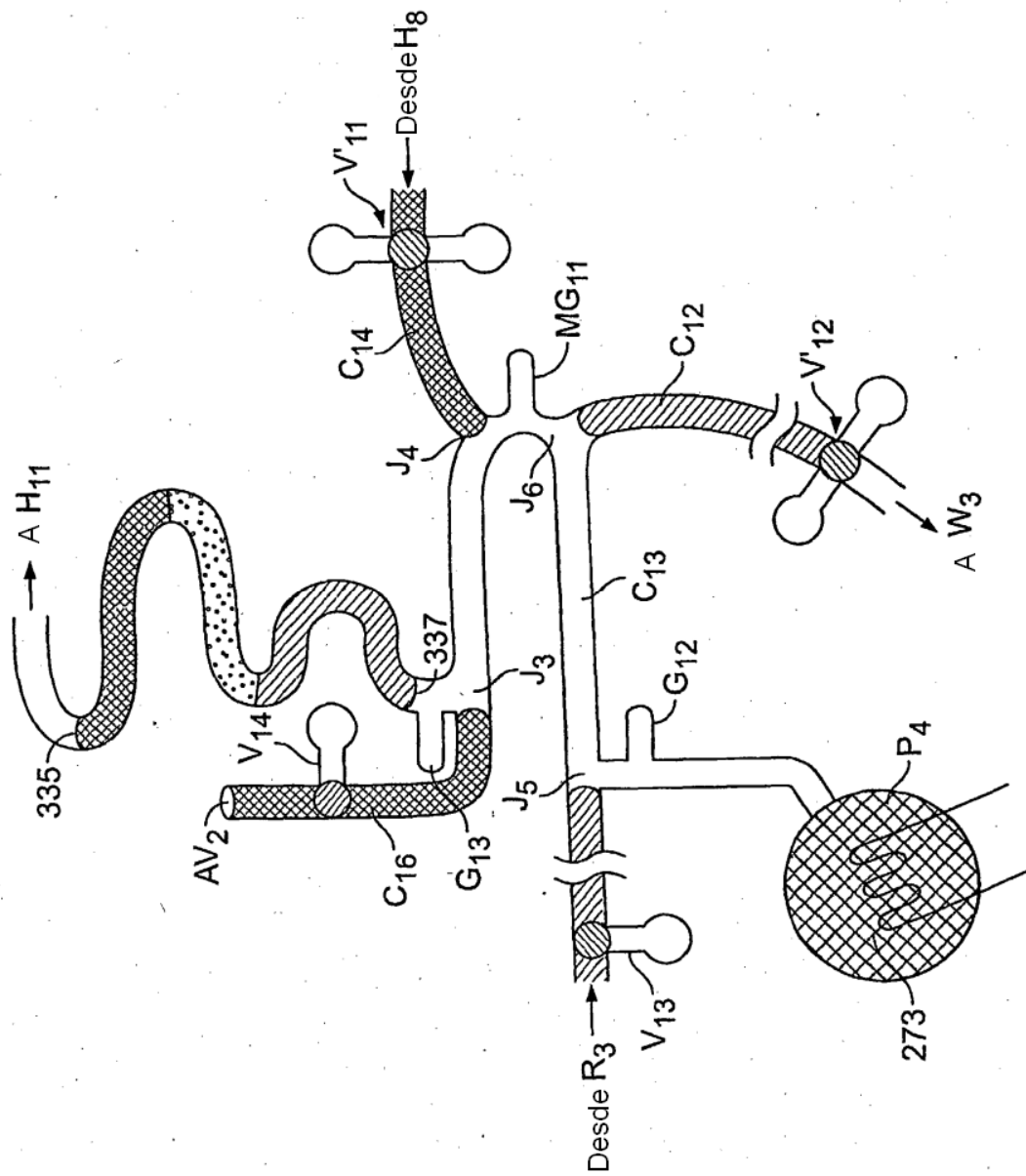


FIG. 10D

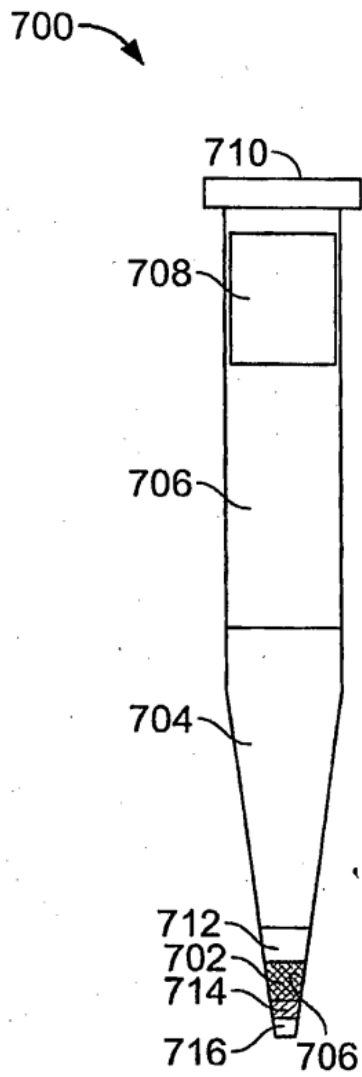


FIG. 11

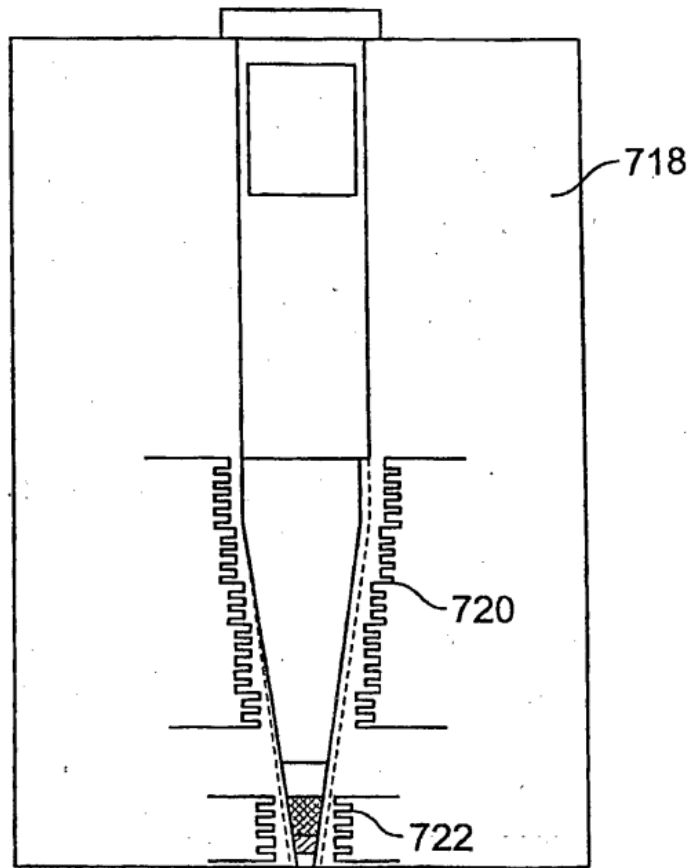


FIG. 12

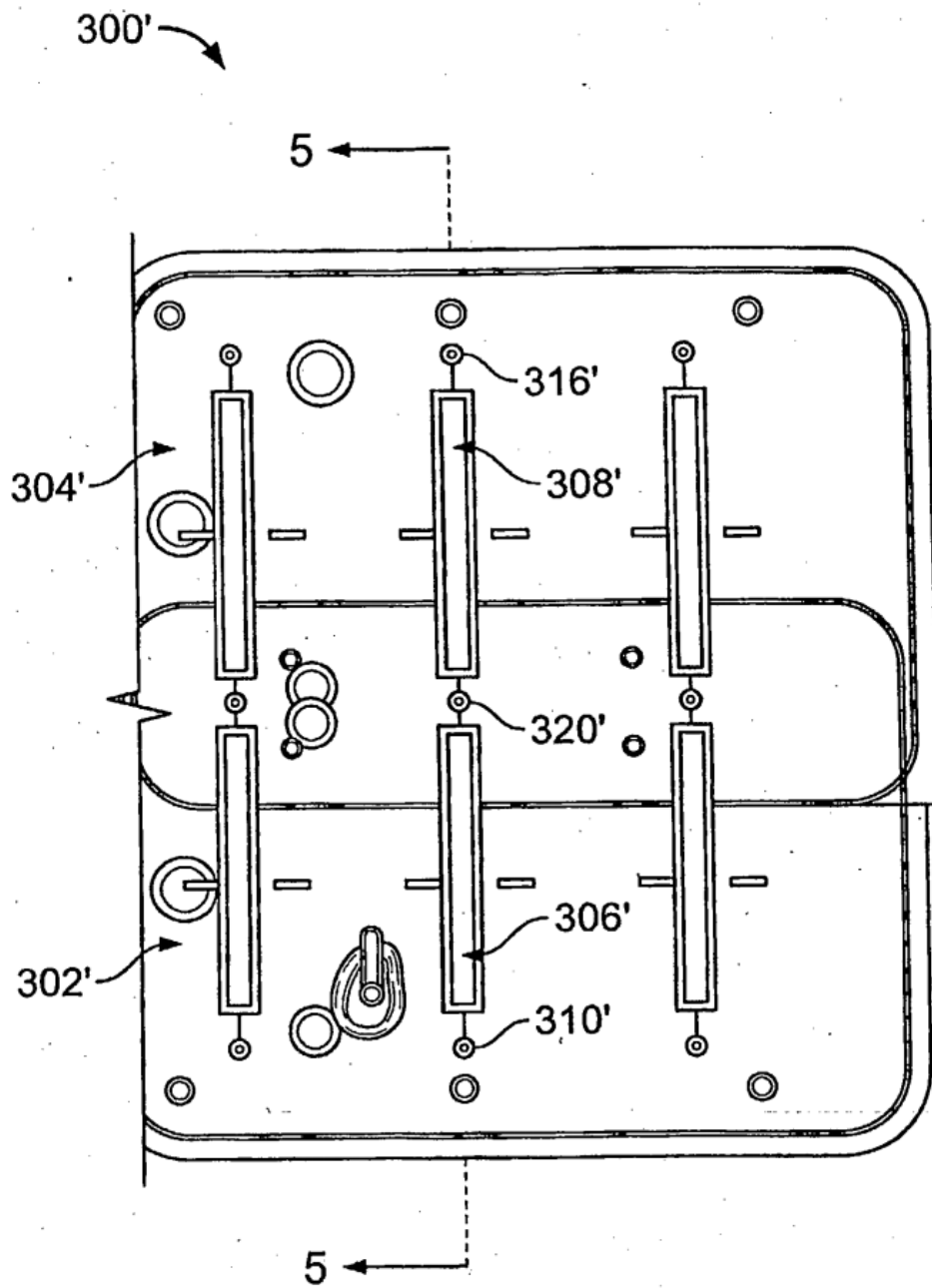


FIG. 13

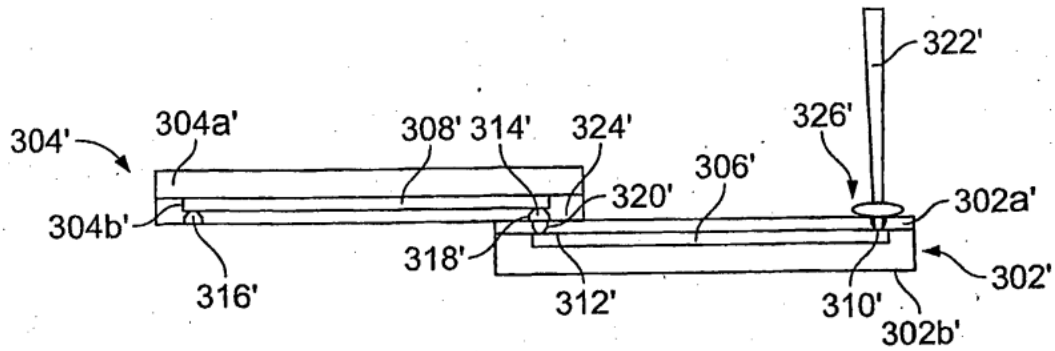


FIG. 14

Captura de ADN mediante perlas de poli-L-lisina

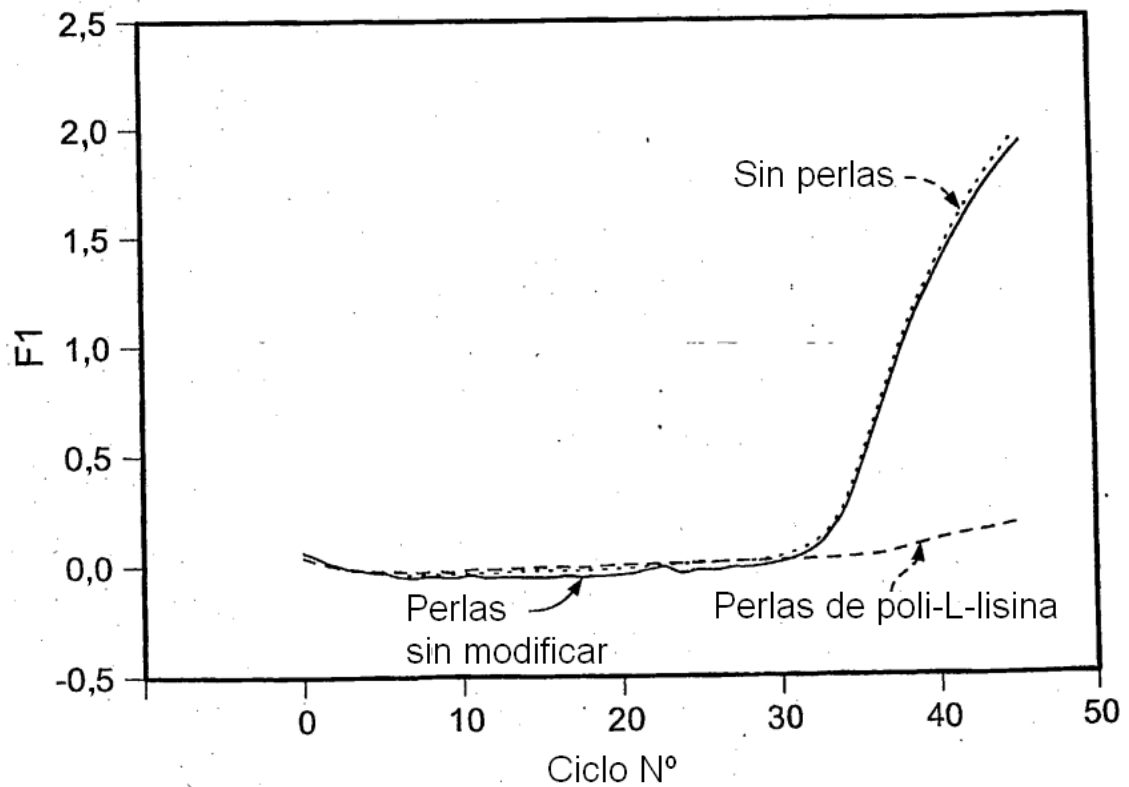


FIG. 15

Captura en chip y liberación de filtros de PLL
(ADN de GBS en cultivo)

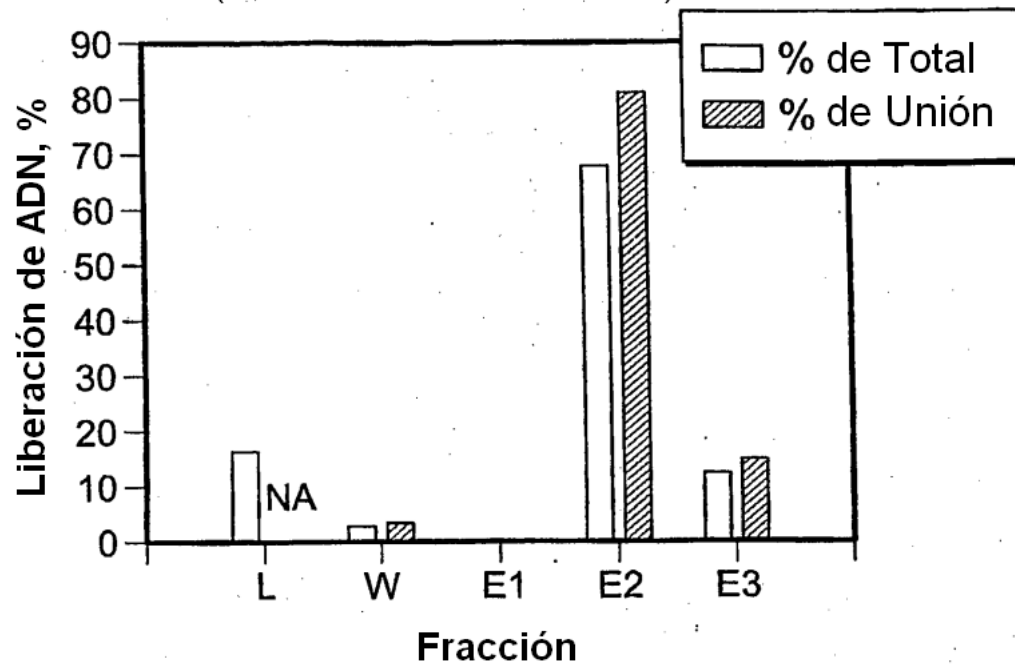


FIG. 16

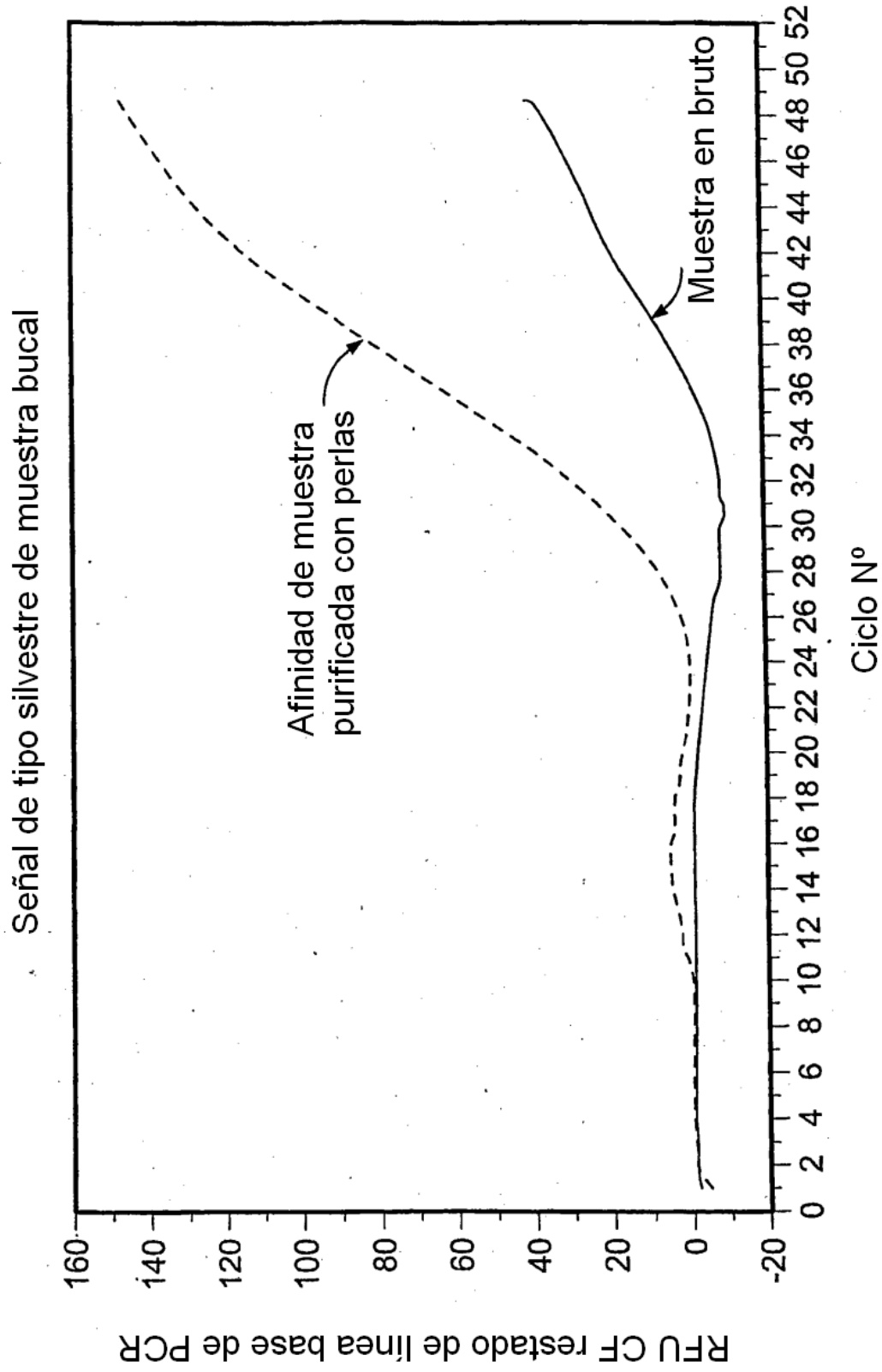


FIG. 17

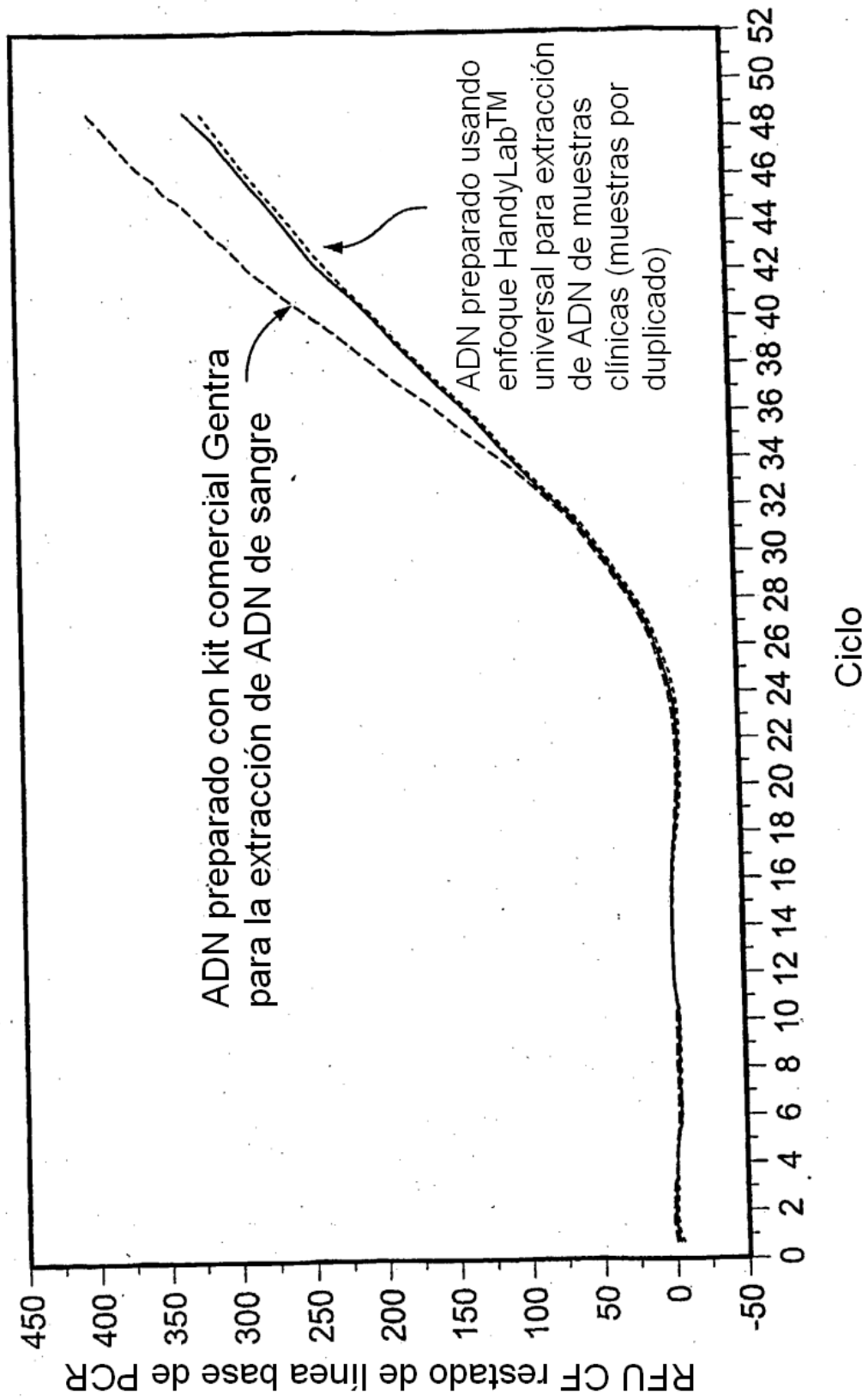


FIG. 18

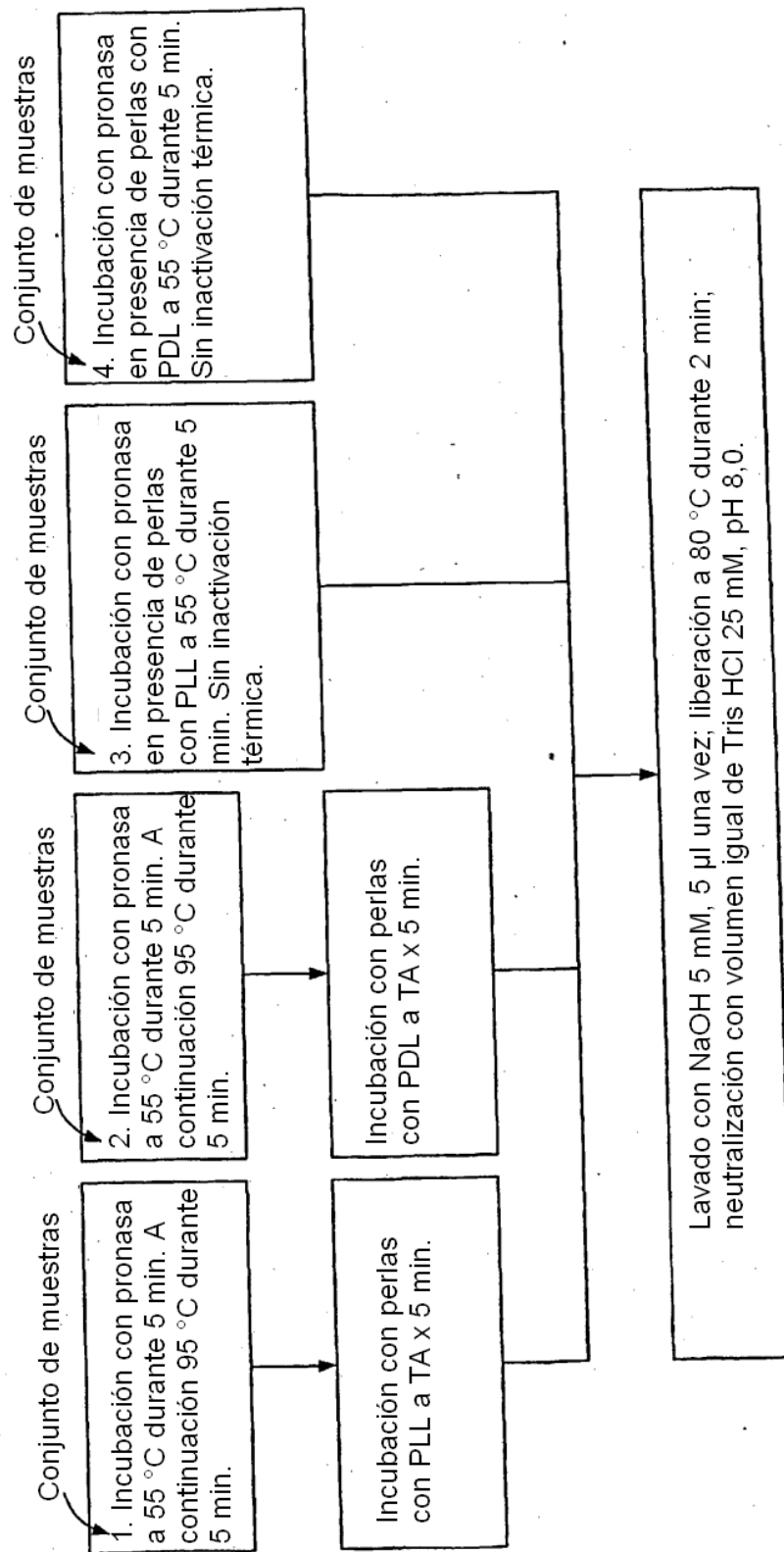


FIG. 19A

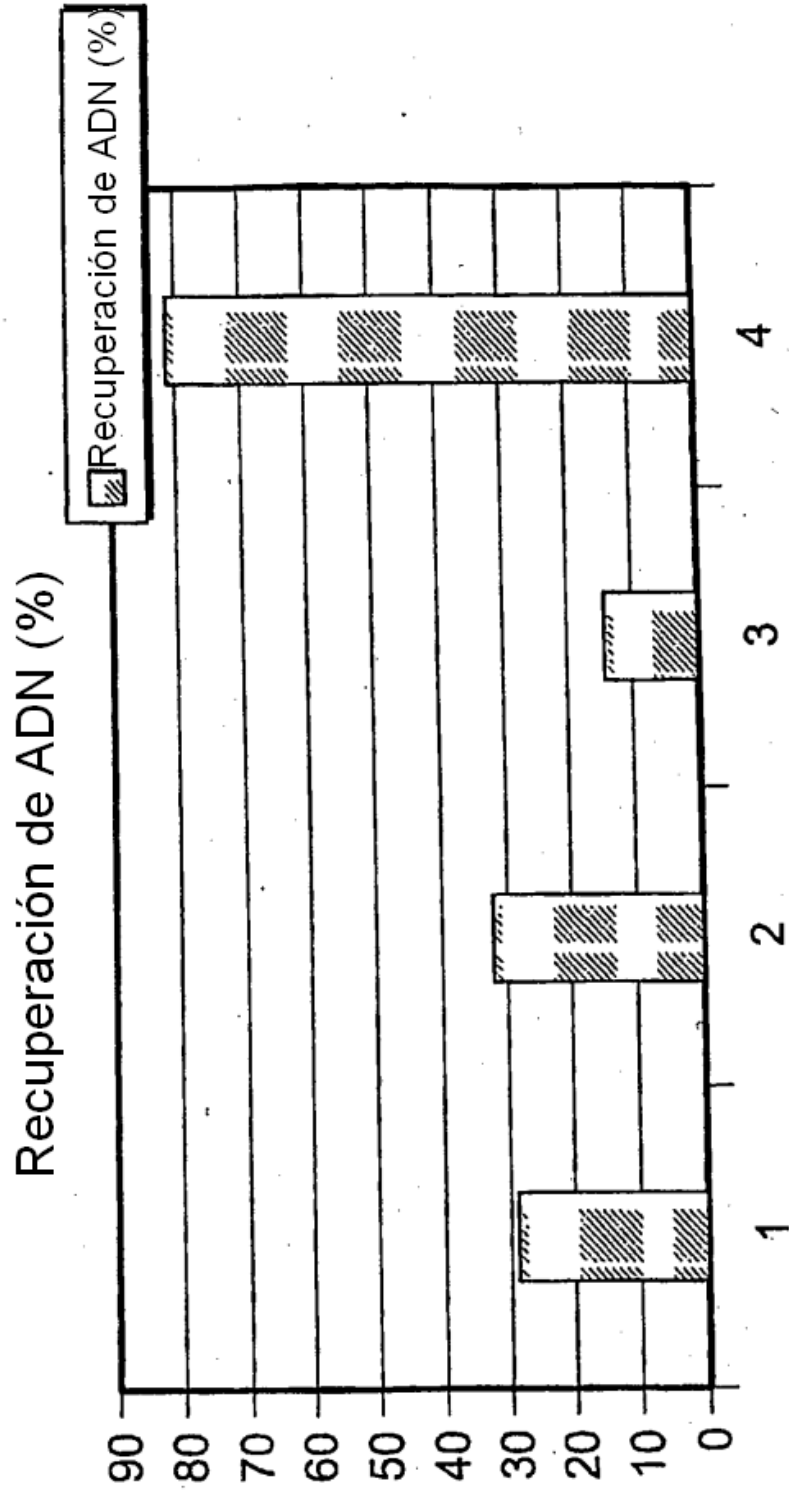


FIG. 19B