

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 382**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)
C12P 19/34 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
B01F 13/00 (2006.01)
B01L 7/00 (2006.01)
F16K 99/00 (2006.01)
B01F 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2005 E 11153427 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2345739**

54 Título: **Un dispositivo microfluídico para el 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:
31.05.2016

73 Titular/es:

HANDYLAB, INC. (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07147, US

72 Inventor/es:

WU, BETTY

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 572 382 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

Un dispositivo microfluídico para el procesamiento de muestras que contienen polinucleótidos

5 Aplicaciones relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 60/567.174, presentada el 03 de mayo de 2004 y la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 60/645.784, presentada el 21 de enero de 2005.

10 Campo de la invención

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

15 Antecedentes

El análisis de una muestra biológica incluye a menudo la detección de 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 a la determinación de 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 de 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 la 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 a detectar también hacen uso de enzimas. Sin embargo, el funcionamiento de las enzimas utilizadas en tales técnicas se puede inhibir por la presencia de inhibidores presentes junto con el polinucleótido a ser detectado. Los inhibidores pueden interferir con, por ejemplo, la eficacia y/o especificidad de las enzimas. La Solicitud de Patente de Estados Unidos con número de publicación US 2002/0039783 A1 divulga un dispositivo para la lisis de componentes de una muestra de fluido. El dispositivo incluye un cartucho con una cámara de lisis que contiene un soporte sólido para la captura de un analito deseado. El soporte sólido puede incluir perlas.

El documento "Microchip-Based Purification of DNA from Biological Samples" de Breadmore *et al* describe métodos de purificación del ADN a partir de muestras biológicas. Los métodos implican absorber el ADN en perlas de sílice, a continuación, liberar el ADN utilizando un tampón TE de baja fuerza iónica.

El documento "Microfluidic chip for high efficiency DNA extraction" de Yung-Chiang Chung *et al* describe la extracción de ADN a partir de células lisadas utilizando perlas inmovilizadas y una solución fluidica.

La Patente de Estados Unidos número 5.599.667 describe el uso de soportes sólidos poli-catiónicos en la purificación de ácidos nucleicos a partir de soluciones que contienen contaminantes. La misma divulga el uso de poliamidas como soportes sólidos, y el uso de tampones de sal y detergentes en forma de soluciones de elución.

45 Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones independientes a las que se dirige a continuación la referencia. Las características preferidas se exponen en las reivindicaciones dependientes.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo microfluídico. El dispositivo microfluídico comprende una primera región de procesamiento que consiste en un miembro de retención. El miembro de retención se configura para retener preferentemente uno o más inhibidores de la reacción en cadena de polinucleótidos en la muestra, y comprende una pluralidad de partículas de retención de polinucleótidos. La pluralidad de partículas de retención comprende al menos un ligando que comprende una poliamida poli-catiónica. El miembro de retención se configura además para retener polinucleótidos a un primer pH y liberar polinucleótidos a un segundo pH, donde el segundo pH es al menos aproximadamente 10, y el dispositivo se configura para poner en contacto el miembro de retención con el líquido. El dispositivo microfluídico comprende además una segunda región de procesamiento para recibir los polinucleótidos liberados de las partículas de retención en la primera región de procesamiento. La segunda región de procesamiento comprende una o más partículas liofilizadas que contienen uno o más reactivos PCR. El dispositivo microfluídico comprende además una región de detección

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

- Los métodos pueden incluir poner en contacto los polinucleótidos y un compuesto relativamente inmovilizado que se asocia preferentemente con (por ejemplo, retiene) los polinucleótidos en lugar de los inhibidores. Un compuesto ejemplar es una poliamida poli-catiónica (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 los polinucleótidos y los inhibidores se pueden separar, por ejemplo, lavando de la superficie con el compuesto y los polinucleótidos asociados. Tras la separación, la asociación entre el polinucleótido y el compuesto se puede ver interrumpida para liberar (por ejemplo, los polinucleótidos separados) del compuesto y la superficie.
- La superficie (por ejemplo, una superficie de una o más partículas) se puede modificar con una poliamida poli-catiónica, que se puede unir covalentemente a la superficie. La se puede modificar puede incluir al menos una de poli-L-lisina y poli-D-lisina. En algunas realizaciones, la poliamida poli-catiónica (por ejemplo, la al menos una de los poli-L-lisina y poli-D-lisina) tiene un peso molecular medio de al menos aproximadamente 7500 Da. La poliamida poli-catiónica (por ejemplo, la al menos una de poli-L-lisina y poli-D-lisina) puede tener un peso molecular medio inferior a aproximadamente 35.000 Da (por ejemplo, un peso molecular medio inferior a aproximadamente 30.000 Da (por ejemplo, un peso molecular medio de aproximadamente 25.000 Da). la poliamida poli-catiónica (por ejemplo, la al menos una de poli-L-lisina y poli-D-lisina) puede tener un peso molecular medio de al menos aproximadamente 15.000 Da. La poliamida poli-catiónica (por ejemplo, la al menos una de poli-L-lisina y poli-D-lisina) puede tener un peso molecular medio inferior a aproximadamente 25.000 Da (por ejemplo, un peso molecular medio inferior a aproximadamente 20.000 Da (por ejemplo, un peso molecular medio de aproximadamente 20.000 Da).
- También se divulga un dispositivo de preparación de muestras que incluye una superficie que incluye una poliamida poli-catiónica unida a la misma y un paso de introducción de muestras en comunicación con la superficie para poner en contacto la superficie con una muestra fluidica.
- El dispositivo puede incluir una fuente de calor configurada para calentar un líquido acuoso en contacto con la superficie hasta al menos aproximadamente 65 °C.
- El dispositivo puede incluir un reservorio de líquido que tiene un pH de al menos aproximadamente 10 (por ejemplo, de aproximadamente 10,5 o más). El dispositivo se configura para poner en contacto la superficie con el líquido (por ejemplo, mediante el accionamiento de una fuente de presión para mover el líquido).
- La superficie puede comprender superficies de una pluralidad de partículas.
- La poliamida poli-catiónica puede incluir poli-L-lisina y/o poli D-lisina.
- Otros métodos se refieren al procesamiento de 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 retener preferentemente los polinucleótidos en comparación con los inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa. Sustancialmente todo el líquido en la mezcla se retira del miembro de retención. Los polinucleótidos se liberan del miembro de retención.
- El polinucleótido puede tener un tamaño inferior a aproximadamente 7,5 Mbp.
- El líquido puede ser un primer líquido y la retirada de sustancialmente todo el líquido del miembro de retención pueden incluir poner en contacto el miembro de retención con un segundo líquido.
- La puesta en contacto del miembro de retención con un segundo líquido puede incluir el accionamiento de una fuente de presión térmicamente accionada para aplicar una presión en el segundo líquido. La puesta en contacto del miembro de retención con un segundo líquido puede incluir la apertura de una válvula térmicamente accionada para poner el segundo líquido en comunicación fluida con el miembro de retención.
- El segundo líquido puede tener un volumen inferior a aproximadamente 50 microlitros.
- El miembro de retención puede incluir una superficie que tiene un compuesto configurado para unirse a los polinucleótidos preferentemente a los inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa (por ejemplo, hemoglobina, péptidos, compuestos fecales, ácidos húmicos, compuestos mucosol, proteínas de unión de ADN, o un sacárido).
- La superficie puede incluir una poli-lisina (por ejemplo, poli-L-lisina y/o poli-D-lisina).
- 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, a aproximadamente 65 °C). La temperatura puede ser insuficiente para hervir el líquido en presencia del miembro de retención durante el calentamiento. La temperatura puede ser de 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 realizar sin centrifugación del miembro de retención.

5 Los inhibidores de la PCR se pueden eliminar rápidamente de las muestras clínicas para crear una muestra lista para la PCR. El método puede comprender preparar una muestra que contiene polinucleótidos que esté sustancialmente libre de inhibidores. Las muestras se pueden preparar a partir de, por ejemplo, lisados crudos resultantes de otras técnicas de lisis térmicas, químicas, ultrasónicas, mecánicas y electrostáticas. Las muestras se pueden preparar sin centrifugación. Las muestras se pueden preparar utilizando dispositivos microfluídicos o en una escala más grande.

15 Otro aspecto se refiere a un miembro de retención, por ejemplo, una pluralidad de partículas tales como perlas, que comprende poli-lisina, unida por ejemplo, poli-L-lisina, y los métodos y sistemas relacionados. El miembro de retención se une preferentemente a los polinucleótidos, por ejemplo, ADN, en comparación con los inhibidores. El miembro de retención se puede utilizar para preparar muestras de polinucleótidos para su posterior procesamiento, tales como la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa.

20 Más del 90 % de un polinucleótido presente en una muestra se puede unir al miembro de retención, liberarse, y recuperarse.

Un polinucleótido se puede unir al miembro de retención, liberarse, y recuperarse, en menos de 10 minutos, menos de 7,5 minutos, menos de 5 minutos, o menos de 3 minutos.

25 Un polinucleótido se puede unir a un miembro de retención, liberarse, y recuperarse sin someter el polinucleótido, el miembro de retención, y/o los inhibidores a centrifugación.

30 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).

35 El dispositivo microfluídico puede incluir un canal, una primera masa de una sustancia sensible al calor (TRS) dispuesta en un primer lado del canal, una segunda masa de una TRS dispuesta en un segundo lado del canal opuesto al primer lado del canal, una fuente de presión de gas asociada con la primera masa de TRS. El accionamiento de la fuente de presión de gas conduce la primera masa de TRS en la segunda masa de TRS y obstruye el canal.

40 El dispositivo microfluídico puede incluir una segunda fuente de presión de gas asociada con la segunda masa de TRS. El accionamiento de la segunda fuente de presión de gas conduce la segunda masa de TRS en la primera masa de TRS.

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

45 También se divulga un método para obstruir un canal de un dispositivo microfluídico. Una masa de una TRS se calienta y conduce a través del canal (por ejemplo, mediante la presión de gas) en una segunda masa de TRS. La segunda masa de TRS se puede conducir también (por ejemplo, mediante la presión de gas) hacia la primera masa de TRS.

50 El dispositivo microfluídico puede incluir un accionador. El accionador incluye un canal, una cámara conectada al canal, al menos un reservorio de líquido encapsulado dispuesto en la cámara, y un gas que rodea el reservorio dentro de la cámara. El calentamiento de la cámara expande el reservorio de líquido encapsulado y presuriza el gas. Normalmente, 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 menos.

55 El líquido se puede encapsular por un polímero.

El accionador puede incluir múltiples reservorios de líquido encapsulados dispuestos en la cámara.

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

60 Los múltiples reservorios se pueden disponer dentro de un recinto flexible (por ejemplo, un saco flexible).

Los métodos pueden incluir presurizar un gas dentro de una cámara de un dispositivo microfluídico para crear una presión de gas suficiente para mover un líquido dentro de un canal del dispositivo microfluídico. La presurización del gas expande normalmente el al menos un reservorio de líquido encapsulado dispuesto dentro de la cámara.

65 La expansión del al menos un reservorio puede incluir calentar la cámara.

La presurización del gas puede incluir expandir múltiples reservorios de líquido encapsulado.

También se divulgan métodos para combinar (por ejemplo, mezcla) el primer y segundo líquidos y los dispositivos relacionados. El dispositivo puede incluir una masa de una sustancia sensible a la temperatura (TRS) que separa el primer y segundo canales del dispositivo. El dispositivo se puede configurar para mover un primer líquido a lo largo del primer canal de manera que una porción (por ejemplo, una porción medial) del primer líquido está adyacente a la TRS y mover un segundo líquido a lo largo del segundo canal de modo que una porción (por ejemplo, una porción medial) del segundo líquido está adyacente a la TRS. Una fuente de calor se puede accionar para mover la TRS (por ejemplo, por fusión, dispersión, fragmentación). Las porciones mediales del primer y segundo líquidos se combinan normalmente sin separarse por una interfaz de gas. Normalmente, solo un subconjunto del primer líquido y un subconjunto del segundo líquido se combinan. Los líquidos se mezclan después de moverse a lo largo de un canal de mezcla.

También se divulga una partícula de reactivo liofilizado y el método de realizar la partícula.

Las partículas liofilizadas pueden incluir múltiples partículas más pequeñas que tienen, cada una, una pluralidad de ligandos que se asocian preferentemente con polinucleótidos en comparación con inhibidores de la PCR. Las partículas liofilizadas pueden también (o como alternativa) incluir reactivos de lisis (por ejemplo, enzimas) configurados para lisar las células para liberar polinucleótidos. Las partículas liofilizadas pueden también (o como alternativa) incluir enzimas (por ejemplo, proteasas) que degradan las proteínas.

Las células se pueden lisar mediante la combinación de una solución de las células con las partículas liofilizadas para reconstituir las partículas. Los reactivos de lisis reconstituidos lisar las células. Los polinucleótidos se asocian con ligandos de las partículas más pequeñas. Durante la lisis, la solución se puede calentar (por ejemplo, radiativamente utilizando una lámpara (por ejemplo, una lámpara de calor).

Las partículas liofilizadas pueden incluir reactivos (por ejemplo, cebadores, plásmidos de control, enzimas de polimerasa) para realizar una reacción de PCR.

También se divulga un método para la fabricación de partículas liofilizadas que incluye formar una solución de reactivos de la partícula y un crioprotector (por ejemplo, un azúcar o poli-alcohol). La solución se deposita gota a gota sobre una superficie hidrófoba enfriada (por ejemplo, una película de diamante o superficie de politetrafluoroetileno). Las partículas se congelan y se someten a presión reducida (normalmente mientras están todavía congeladas) durante un tiempo suficiente para eliminar (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).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista en perspectiva de un dispositivo microfluídico.
 La Figura 2 es una vista en sección transversal de una región de procesamiento para la retención de polinucleótidos y/o la separación de los 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 microfluídico.
 La Figura 5 es una vista lateral en sección transversal del dispositivo microfluídico de la Figura 4.
 La Figura 6 es una vista en perspectiva de una red microfluídica del dispositivo microfluídico de la Figura 4.
 La Figura 7 ilustra una serie de fuentes de calor para los componentes de operación del dispositivo microfluídico 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 compuerta de mezcla de la red microfluídica 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 microfluídico.
 La Figura 14 es una sección transversal del dispositivo microfluídico 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 para la PCR de una muestra de la que se habían eliminado los inhibidores y de una muestra de la que no se habían eliminado los inhibidores.
 La Figura 18 ilustra la respuesta para la PCR de una muestra preparada de acuerdo con la invención y de una muestra preparada utilizando un método de extracción de ADN comercial.
 La Figura 19a ilustra un diagrama de flujo que muestra las etapas realizadas durante un método para separar 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 la determinación de si hay uno o más polinucleótidos (por ejemplo, un ADN, ARN, ARNm, o rARN) presentes en la muestra. Por ejemplo, se puede analizar una muestra para determinar si un polinucleótido indicativo de la presencia de un patógeno particular está presente. Normalmente, las muestras biológicas son mezclas complejas. Por ejemplo, una muestra se puede proporcionar como una muestra de sangre, una muestra de tejido (por ejemplo, un hisopo de, por ejemplo, nasal, bucal, anal, o tejido vaginal), un aspirado de biopsia, un lisado, como hongos, o como bacterias. Los polinucleótidos a determinar pueden estar contenidos dentro de partículas (por ejemplo, células (por ejemplo, glóbulos blancos y o glóbulos rojos), fragmentos de tejido, bacterias (por ejemplo, bacterias gram positivas y/o gram negativas), hongos, esporas). Uno o más líquidos (por ejemplo, agua, un tampón, sangre, plasma sanguíneo, saliva, orina, fluido espinal, o disolvente orgánico) es normalmente parte de la muestra y/o se añade a la muestra durante una etapa de procesamiento.

Los métodos para el análisis de muestras biológicas incluyen suministrar 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, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)), y determinar la presencia (o ausencia) del polinucleótido o polinucleótidos amplificados (por ejemplo, mediante la detección fluorescente). Las muestras biológicas, sin embargo, incluyen por lo general inhibidores (por ejemplo, compuestos mucosol, hemoglobina, compuestos fecales, y proteínas de unión a ADN) que pueden inhibir la determinación de la presencia de polinucleótidos en la muestra. Por ejemplo, tales inhibidores pueden reducir la eficacia de amplificación de los polinucleótidos por PCR y otras técnicas enzimáticas para determinar la presencia de polinucleótidos. Si la concentración de los inhibidores no se reduce con relación a los polinucleótidos a determinar, el análisis puede producir falsos resultados negativos.

Se describen métodos y sistemas relacionados con el procesamiento de muestras biológicas (por ejemplo, muestras que tienen uno o más polinucleótidos a determinar). Normalmente, los métodos y sistemas reducen la concentración de inhibidores relativos a la concentración de polinucleótidos a determinar.

Haciendo referencia a la Figura 1, un dispositivo microfluídico 200 incluye primera, segunda, y tercera capas 205, 207, y 209 que definen una red microfluídica 201 que tienen diversos componentes configurados para procesar una muestra que incluye uno o más polinucleótidos a determinar. El dispositivo 200 procesa normalmente la muestra mediante el aumento de la concentración de un polinucleótido a determinar y/o mediante la reducción de la concentración de inhibidores relativos a la concentración del polinucleótido a determinar.

A continuación, se describe la disposición de los componentes de la red 201.

La red 201 incluye una entrada 202 por la que el material de muestra se puede introducir a la red y una salida 236 por la que una muestra procesada se puede retirar (por ejemplo, expulsar o extraer de) la red 201. Un canal 204 se extiende entre la entrada 202 y una unión 255. Una válvula 205 se sitúa a lo largo del canal 204. Un reservorio de canal 240 se extiende entre las salidas 255 y un accionador 244. Las compuertas 242 y 246 se sitúan a lo largo del canal 240. Un canal 257 se extiende entre las salidas 255 y una unión 257. Una válvula 208 se sitúa a lo largo del canal 257. Un reservorio de canal 246 se extiende entre las salidas 259 y un accionador 248. Las compuertas 250 y 252 se sitúan a lo largo del canal 246. Un canal 261 se extiende entre las salidas 259 y una unión 263. Una válvula 210 y un orificio de ventilación hidrófobo 212 se sitúan a lo largo del canal 261. Un canal 256 se extiende entre las salidas 263 y un accionador 254. Una compuerta 258 se sitúa a lo largo del canal 256.

Un canal 214 se extiende entre la unión 263 y una cámara de procesamiento 220, que tiene una entrada 265 y una salida 267. Un canal 228 se extiende entre la salida de cámara de procesamiento 267 y un reservorio de residuos 232. Una válvula 234 se sitúa a lo largo de canal 228. Un canal 230 se extiende entre la salida de cámara de procesamiento 267 y la salida 236.

A continuación se hace referencia a los componentes particulares de la red 201.

Haciendo referencia también 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 bajo un primer conjunto de condiciones (por ejemplo, una primera temperatura y/o primer pH) y liberar los polinucleótidos bajo un segundo conjunto de condiciones (por ejemplo, una segunda temperatura más alta y/o un segundo pH más básico). Normalmente, los polinucleótidos se retienen preferentemente en comparación con los inhibidores que pueden estar presentes en la muestra. Las partículas 218 se configuran como un miembro de retención 216 (por ejemplo, una columna) a través de la que el material de muestra (por ejemplo, los polinucleótidos) debe pasar cuando se mueve entre la entrada 265 y la salida 267 de la región de procesamiento 220.

Un filtro 219 evita que las partículas 218 pasen aguas debajo de la región de procesamiento 220. Un canal 287 conecta el filtro 219 con la salida 267. El filtro 219 tiene un área superficial dentro de la región de procesamiento 220 que es mayor que el área en sección transversal de la entrada 265. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la relación de la superficie del filtro 219 dentro de la región de procesamiento 220 hasta el área en sección transversal

de la entrada 265 (área en sección transversal que es normalmente de aproximadamente igual que el área en 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 en sección transversal de la entrada 265 y/o del canal 214 es de 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). El área superficial más grande presentada por el filtro 219 para el material que fluye a través de la región de procesamiento 220 ayuda a evitar la obstrucción de la región de procesamiento evitando al mismo tiempo un aumento significativo en el volumen de vacíos (descrito a continuación) 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). Normalmente, 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, los polinucleótidos quedan retenidos mientras que los componentes de la solución líquida y otros (por ejemplo, inhibidores) se retienen menos (por ejemplo, no se retienen) y salen de la región de procesamiento. En general, los ligandos para liberar polinucleótidos cuando el pH es de aproximadamente 10 o más (por ejemplo, aproximadamente 10,5 o más, aproximadamente 11,0 o más). En consecuencia, los polinucleótidos se pueden liberar de las partículas modificadas de ligandos en el líquido circundante.

Los ligandos ejemplares incluyen, por ejemplo, poliamida (por ejemplo, poliamidas poli-catiónicas tales como poli-L-lisina, poli-D-lisina, poli-DL-ornitina). Otros ligandos incluyen, por ejemplo, intercaladores, poli-intercaladores, poliamidas aglutinantes de menor ranura (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 medio de al menos aproximadamente 5000 Da (por ejemplo, de al menos aproximadamente 7500 Da, de al menos aproximadamente 15.000 Da). En algunas realizaciones, los ligandos tienen un peso molecular medio de aproximadamente 50.000 Da o menos (por ejemplo, de aproximadamente 35.000, o menos, de aproximadamente 27.500 Da o menos). En algunas realizaciones, el ligando es un ligando de poli-lisina unido a la superficie de partícula mediante un enlace amida.

En ciertas realizaciones, los ligandos son resistentes a la degradación enzimática, tal como la degradación por enzimas de la proteasa (por ejemplo, mezclas de endo- y exo-proteasas tales como pronasa) que degradan enlaces peptídicos. Los ligandos resistentes a la proteasa ejemplares incluyen, por ejemplo, poli-D-lisina y otros ligandos que son enantiómeros de ligandos susceptibles de ataque enzimático.

Las partículas 218 se forman normalmente de un material al que se pueden asociar los ligandos. Ejemplos de materiales a partir de los que se pueden formar las partículas 218 incluyen materiales poliméricos que se pueden modificar para unir un ligando. Los materiales poliméricos convencionales proporcionan o se pueden modificar para proporcionar grupos carboxílicos y/o grupos amino disponibles para unir los ligandos. Materiales poliméricos ejemplares incluyen, por ejemplo, poliestireno, polímeros de látex (por ejemplo, de látex revestidos de policarboxilato), poliacrilamida, óxido de polietileno, y sus derivados. Los materiales poliméricos que se pueden utilizar para formar las partículas 218 se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 6.235.313 de Mathiowitz *et al.* Otros materiales incluyen vidrio, sílice, agarosa, y materiales modificados amino-propil-tri-etoxi-silano (APES).

Las partículas ejemplares que se pueden modificar con ligandos adecuados incluyen partículas de carboxilato (por ejemplo, perlas magnéticas modificadas con carboxilato (perlas magnéticas modificadas con carboxilato Sera-Mag, n.º de parte 3008050250, Seradyn) y microesferas modificadas con carboxilato Polybead disponibles por Polyscience, catálogo n.º 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 relación de 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.

Normalmente, el volumen total de región de procesamiento 220 (incluyendo las partículas 218) entre la entrada 265 y el filtro 219 es de 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 ejemplar, el volumen total de la región de procesamiento 220 es de aproximadamente 2,3 microlitros. En algunas realizaciones, las partículas 218 ocupan al menos aproximadamente 10 por ciento (por ejemplo, al menos aproximadamente 15 por ciento) del volumen total de la región de procesamiento 220. En algunas realizaciones, las partículas 218 ocupan aproximadamente el 75 por ciento o menos (por ejemplo, aproximadamente el 50 por ciento o menos, aproximadamente el 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 es libre para ser ocupado por el líquido (por ejemplo, el volumen de vacíos 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. Normalmente, el volumen de vacíos en la región de procesamiento 220 es de 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 vacíos es de aproximadamente 50 nanolitros o más (por ejemplo, aproximadamente 100 nanolitros o más, aproximadamente 250 nanolitros o más). En una realización ejemplar, el volumen total de la región de procesamiento 220 es de aproximadamente 2,3 microlitros. Por ejemplo, en una realización ejemplar, el volumen total de la región de procesamiento es de aproximadamente 2,3 microlitros, el volumen ocupado por las partículas es de aproximadamente 0,3 microlitros, y el volumen libre para ser ocupado por líquido (volumen de vacíos) es de aproximadamente 2 microlitros.
- Las partículas 218 tienen normalmente 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, un volumen de canal 287 entre el filtro 219 y la salida 267 es sustancialmente menor que el volumen de vacíos en la región de procesamiento 220. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el volumen del canal 287 entre el filtro 219 y la salida 267 es de aproximadamente el 35 % o menos (por ejemplo, aproximadamente el 25 % o menos, aproximadamente el 20 % o menos) del volumen de vacíos. En una realización ejemplar, el volumen del canal 287 entre el filtro 219 y la salida 267 es de aproximadamente 500 microlitros.
- La densidad de las partículas es normalmente de 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 normalmente poros con una anchura menor que el diámetro de las partículas 218. En una realización ejemplar, 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 algunas (por ejemplo, todas) las partículas son magnéticas. En realizaciones alternativas, pocos (por ejemplo, ninguna) partículas son magnéticas.
- En algunas realizaciones, al menos algunas (por ejemplo, todas) las partículas son sólidas. En algunas realizaciones, al menos algunas (por ejemplo, todas) las partículas son porosas (por ejemplo, las partículas pueden tener canales que se extienden al menos parcialmente dentro de las mismas).
- Los canales de la red microfluídica 201 tienen normalmente al menos una dimensión sub-milimétrica en sección transversal. 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 permitiendo que el material pase a lo largo de un canal desde una posición en un lado de la válvula (por ejemplo, aguas arriba de la válvula) hasta una posición en el otro lado de la válvula (por ejemplo, aguas abajo de la válvula). Tras el accionamiento, la válvula cambia a un estado cerrado que evita que el material pase a lo largo del canal de un lado a otro de la válvula. Por ejemplo, la válvula 205 incluye una masa 251 de una sustancia sensible al calor (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 el calentamiento del gas (por ejemplo, aire) en la cámara 253 y el calentamiento de la masa 251 de TRS a la segunda temperatura, la presión de gas dentro de la cámara 253 mueve la masa 251 en el canal 204 obstruyendo el paso de material a lo largo del mismo. Otras válvulas de la red 201 tienen la misma estructura y operan de la misma manera que la válvula 205.
- Una masa de TRS puede ser una masa esencialmente sólida o una aglomeración de partículas más pequeñas que cooperan para obstruir el paso. 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 son suficientemente elevadas como para dañar los materiales, tales como las capas de polímero del dispositivo 200. En general, la segunda temperatura es inferior a aproximadamente 90 °C y la primera temperatura es inferior a la segunda temperatura (por ejemplo, aproximadamente 70 °C o menos).
- Una compuerta es un componente que tiene un estado normalmente cerrado que no permite que el material pase a lo largo de un canal desde una posición en un lado de la compuerta hasta el otro lado de la compuerta. Tras el accionamiento, la compuerta cambia a un estado cerrado donde se permite el paso de material de un lado de la compuerta (por ejemplo, aguas arriba de la compuerta) al otro lado de la compuerta (por ejemplo, aguas abajo de la

compuerta). Por ejemplo, la compuerta 242 incluye una masa 271 de TRS situada para obstruir el paso de material entre la unión 255 y el canal 240. Tras el calentamiento de la masa 271 a la segunda temperatura, la masa cambia de estado (por ejemplo, por fusión, dispersión, fragmentación, y/o disolución) para permitir el paso de material entre la unión 255 y el canal 240.

5 La porción del canal 240 entre las compuertas 242 y 246 forma un reservorio de fluido 279 configurado para contener un líquido (por ejemplo, agua, un líquido orgánico, o combinación de los mismos). Durante el almacenamiento, las compuertas 242 y 246 limitan (por ejemplo, evitan) la evaporación del líquido dentro del reservorio de líquido. Durante la operación del dispositivo 200, el líquido del reservorio 279 se utiliza normalmente como un líquido de lavado para eliminar los inhibidores de la región de procesamiento 220, dejando los polinucleótidos asociados con las partículas 218. Normalmente, el líquido de lavado es una solución que tiene uno o más componentes adicionales (por ejemplo, un tampón, agente quelante, un tensioactivo, un detergente, una base, un ácido, o una combinación de los mismos). Soluciones ejemplares incluyen, por ejemplo, una solución de 10 a 50 mM Tris a pH 8,0; de 0,5 a 2 mM de EDTA; y del 0,5 % - 2 % de SDS, una solución de 10 a 50 mM de Tris a pH 8,0; de 0,5 a 2 mM de EDTA y del 0,5 % - 2 % de Triton X-100.

20 La porción del canal 246 entre las compuertas 250 y 252 forma un reservorio de fluido 281 configurado como el reservorio 279 para contener un líquido (por ejemplo, una solución) con poca o ninguna evaporación. Durante la operación del dispositivo 200, el líquido de reservorio 281 se utiliza normalmente como un líquido de liberación en el que se liberan los polinucleótidos que habían sido retenidos por las partículas 218. Un líquido de liberación ejemplar es una solución de hidróxido (por ejemplo, una solución de NaOH) que tiene una concentración de, por ejemplo, aproximadamente 2mM de hidróxido (por ejemplo, aproximadamente 2 mM de NaOH) y aproximadamente 500 mM de hidróxido (por ejemplo, aproximadamente 500 mM de NaOH). En algunas realizaciones, el líquido en el reservorio 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).

30 Los reservorios 279, 281 tienen normalmente una capacidad de 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 reservorios 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).

35 Un accionador es un componente que proporciona una presión de gas que puede mover el material (por ejemplo, material de muestra y/o material de reactivo) entre una ubicación de red 201 y otra ubicación. Por ejemplo, haciendo referencia a la Figura 3, el accionador 244 incluye una cámara 272 que tiene una masa 273 de material térmicamente expansivo (TEM) en su interior. 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 compuertas 246 y 242 se accionan con el accionador 244. En consecuencia, el gas presurizado conduce el líquido al reservorio de fluido 279 hacia la unión 255. En algunas realizaciones, el accionador 40 244 puede generar una diferencia de presión de más de aproximadamente 3 psi (por ejemplo, al menos aproximadamente 4 psi, al menos aproximadamente 5 psi) entre el accionador y la unión 255.

45 El TEM incluye una pluralidad de reservorios de líquido sellados (por ejemplo, esferas) 275 dispersos dentro de un vehículo 277. Normalmente, el líquido es un líquido de alta presión de vapor (por ejemplo, isobutano y/o isopentano) sellado dentro de una carcasa (por ejemplo, una carcasa polimérica formada de monómeros tales como cloruro de vinilideno, acrilonitrilo y metacrilato de metilo). El vehículo 277 tiene propiedades (por ejemplo, flexibilidad y/o una capacidad de ablandar (por ejemplo, la masa fundida) a temperaturas más altas) que permite la expansión de los reservorios 275 sin permitir que los reservorios pasen a lo largo del 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. Normalmente, los reservorios constituyen al menos aproximadamente el 25 por ciento en peso (por ejemplo, al menos aproximadamente el 35 por ciento en peso, al menos aproximadamente el 50 por ciento en peso) de TEM. En algunas realizaciones, los reservorios representan aproximadamente el 75 por ciento en peso o menos (por ejemplo, aproximadamente el 65 por ciento en peso o menos, aproximadamente el 50 por ciento en peso o menos) de TEM. Los reservorios de líquido sellados adecuados se pueden obtener a partir de Expancel (Akzo Nobel).

55 Cuando se calienta el TEM (por ejemplo, a una temperatura de al menos aproximadamente 50 °C (por ejemplo, hasta al menos aproximadamente 75 °C, al menos aproximadamente 90 °C)), el líquido de vaporiza y aumenta el volumen de cada reservorio de sellado y de la masa 273. El vehículo 277 se ablanda permitiendo que la masa 273 se expanda. Normalmente, el TEM se calienta a una temperatura inferior a 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).

65 Un orificio de ventilación hidrófobo (por ejemplo, orificio de ventilación 212) es una estructura que permite que el gas salga de un canal mientras limita (por ejemplo, evita) que el líquido salga del canal. Normalmente, los orificios de

ventilación 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 verá más adelante, los orificios de ventilación hidrófobos se pueden utilizar para situar una microgota de la muestra en un lugar deseado dentro de la red 201.

5 Los orificios de ventilación hidrófobos tienen normalmente 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 orificio de ventilación hidrófobo es normalmente al menos aproximadamente 5 veces (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces) mayor que una profundidad del canal dentro del orificio de ventilación hidrófobo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la profundidad del canal dentro del orificio de ventilación hidrófobo es de aproximadamente 300 micrómetros o menos (por ejemplo, aproximadamente 250 micrómetros o menos, aproximadamente 200 micrómetros o menos, aproximadamente 150 micrómetros o menos).

15 La profundidad del canal dentro del orificio de ventilación hidrófobo es normalmente de aproximadamente el 75 % o menos (por ejemplo, aproximadamente el 65 % o menos, aproximadamente el 60 % o menos) de la profundidad del canal aguas arriba y aguas abajo del orificio de ventilación hidrófobo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la profundidad del canal dentro del orificio de ventilación hidrófobo es de aproximadamente 150 micrómetros y la profundidad del canal aguas arriba y aguas abajo del orificio de ventilación hidrófobo es de aproximadamente 250 micrómetros.

20 Una anchura del canal dentro del orificio de ventilación hidrófobo es normalmente al menos aproximadamente 25 % más ancha (por ejemplo, al menos aproximadamente 50 % más ancho) que la anchura del canal aguas arriba del orificio de ventilación y aguas abajo del orificio de ventilación. Por ejemplo, en una realización ejemplar, la anchura del canal dentro del orificio de ventilación hidrófobo es de aproximadamente 400 micrómetros y la anchura del canal aguas arriba y aguas abajo del orificio de ventilación es de aproximadamente 250 micrómetros.

30 El dispositivo microfluídico 200 se puede fabricar según se desee. Normalmente, las capas 205, 207, y 209 se forman de un material polimérico. Los componentes de la red 201 se forman normalmente por moldeo (por ejemplo, mediante moldeo por inyección) de las capas 207, 209. La capa 205 es normalmente un material polimérico flexible (por ejemplo, un laminado) que se fija (por ejemplo, con adhesivo y/o térmicamente) a la capa 207 para sellar los componentes de la red 201. Las capas 207 y 209 se pueden fijar entre sí utilizando adhesivo.

35 Durante su uso, el dispositivo 200 se asocia normalmente térmicamente con una serie de fuentes de calor configuradas para operar los componentes (por ejemplo, válvulas, compuertas, accionadores, y la región de procesamiento 220) del dispositivo. En algunas realizaciones, las fuentes de calor son integrales con un sistema operativo, que opera el dispositivo durante su uso. El sistema operativo incluye un procesador (por ejemplo, un ordenador) configurado para accionar las fuentes de calor de acuerdo con un protocolo deseado. Los procesadores configurados para operar los dispositivos de microfluidos se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 2002 143 437. En otras realizaciones, las fuentes de calor son integrales con el propio dispositivo.

40 El dispositivo 200 se puede operar como sigue. Las válvulas de la red 201 se configuran en el estado abierto. Las compuertas de la red 201 se configuran en el estado cerrado. Una muestra de fluido que comprende polinucleótidos se introduce en la red 201 a través de la entrada 202. Por ejemplo, la muestra se puede introducir con una jeringa que tiene un accesorio Luer. La jeringa proporciona presión para mover inicialmente la muestra dentro de la red 201. La muestra pasa a lo largo de los canales 204, 257, 261, y 214 hasta la entrada 265 de región de procesamiento 220. La muestra pasa a través de región de procesamiento 220, sale por la salida 267, y pasa a lo largo del canal 228 hasta la cámara de residuos 232. Cuando el borde de salida (por ejemplo, la interfaz líquido-gas aguas arriba) de la muestra alcanza el orificio de ventilación hidrófobo 212, la presión proporcionada por el dispositivo de introducción (por ejemplo, la jeringa) se libera de la red 201 deteniendo el movimiento adicional de la muestra.

50 Normalmente, la cantidad de muestra introducida es de 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 de aproximadamente 2 microlitros o menos (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 microlitros o menos).

60 Los polinucleótidos que entran en la región de procesamiento 220 pasan a través de intersticios entre las partículas 218. Los polinucleótidos de la muestra se ponen en contacto con el miembro de retención 216 y se retienen preferentemente en comparación con el líquido de la muestra y otros componentes de la muestra (por ejemplo, los inhibidores). Normalmente, el miembro de retención 220 retiene al menos aproximadamente el 50 % de los polinucleótidos (al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %) de los polinucleótidos presentes en la muestra que han entrado 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 de la salida 267 y entran en la cámara de residuos 232. La región de procesamiento está normalmente a una temperatura de aproximadamente 50 °C o menos (por ejemplo, 30 °C o menos) durante la introducción de la muestra.

65

El procesamiento continúa mediante el lavado del miembro de retención 216 con el líquido del reservorio 279 para separar los inhibidores restantes de los polinucleótidos retenidos por el miembro de retención 216. Para lavar el miembro de retención 216, la válvula 206 se cierra y se abren las compuertas 242, 246 del primer reservorio 240. El accionador 244 se acciona y mueve el líquido de lavado dentro del reservorio 279 a lo largo de los canales 257, 261, y 214, a través de región de procesamiento 220, y en el reservorio de residuos 232. El líquido de lavado mueve la muestra que puede haber permanecido dentro de los canales 204, 257, 261, y 214 a través de la región de procesamiento y en la cámara de residuos 232. Una vez que el borde de salida del líquido de lavado alcanza el orificio de ventilación 212, la presión de gas generada por el accionador 244 se ventila y el movimiento adicional del líquido se detiene.

El volumen de líquido de lavado movido por el accionador 244 a través de región de procesamiento 220 es normalmente al menos aproximadamente 2 veces el volumen de vacíos de la región de procesamiento 220 (por ejemplo, al menos aproximadamente 3 veces el volumen de vacíos) y puede ser de aproximadamente 10 veces el volumen de vacíos o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 veces el volumen de vacíos o menos). La región de procesamiento está normalmente a una temperatura de aproximadamente 50 °C o menos (por ejemplo, 30 °C o menos) durante el lavado. Los fluidos de lavado ejemplares incluyen líquidos descritos con respecto a los reservorios 279 y 281.

El procesamiento continúa mediante la liberación de los polinucleótidos del miembro de retención 216. Normalmente, líquido de lavado desde el reservorio 279 se sustituye con líquido de liberación (por ejemplo, una solución de hidróxido) desde el reservorio 281 antes de liberar los polinucleótidos. La válvula 208 se cierra y las compuertas 250, 252 se abren. El accionador 248 se acciona moviendo de este modo el líquido de liberación dentro del reservorio 281 a lo largo de los canales 261, 214 y en la región de procesamiento 220 y en contacto con el miembro de retención 216. Cuando el borde de salida del líquido de liberación del reservorio 281 alcanza el orificio de ventilación hidrófobo 212, la presión generada por el accionador 248 se ventila deteniendo el movimiento adicional de líquido. El volumen de líquido desplazado por el accionador 248 a través de región de procesamiento 220 es normalmente al menos aproximadamente igual al volumen de vacíos de la región de procesamiento 220 (por ejemplo, al menos aproximadamente 2 veces el volumen de vacíos) y puede ser aproximadamente 10 veces el volumen de vacíos o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 veces el volumen de vacíos o menos).

Una vez que el miembro de retención 216 con los polinucleótidos retenidos se ha puesto en contacto con el líquido procedente del reservorio 281, se realiza normalmente una etapa de liberación. Normalmente, la etapa de liberación incluye calentar el líquido de liberación presente dentro de región de procesamiento 216. En general, el líquido se calienta a una temperatura suficiente para hervir el líquido en presencia del miembro de retención. En algunas realizaciones, la temperatura es de 100 °C o menos (por ejemplo, menos de 100 °C, aproximadamente 97 °C o menos). En algunas realizaciones, la temperatura es de 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 ejemplar, 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 normalmente en una cantidad de líquido de liberación que tiene un volumen aproximadamente igual al volumen de vacíos de la región de procesamiento 220). Normalmente, 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 relación entre el volumen de la muestra original movida 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 1.000). En algunas realizaciones, los polinucleótidos de una muestra con un volumen de aproximadamente 2 ml se pueden retener dentro de la región de procesamiento, y se liberan en aproximadamente 4 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 3 microlitros o menos, aproximadamente 2 microlitros o menos, aproximadamente 1 microlitro o menos) de líquido.

El líquido en el que se liberan normalmente los polinucleótidos incluye al menos aproximadamente el 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %) de los polinucleótidos presentes en la muestra que ha entrado en la región de procesamiento 220. La concentración de polinucleótidos presentes en el líquido de liberación puede ser mayor que en la muestra original ya que el volumen de líquido de liberación es normalmente menor que el volumen de la muestra de líquido original que se ha movido a través de la región de procesamiento. Por ejemplo la concentración de 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 polinucleótidos en la muestra introducida en el dispositivo 200. La concentración de inhibidores presentes en el líquido en el que se liberan los polinucleótidos es generalmente menor que la concentración de los inhibidores en la muestra fluidica 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 los polinucleótidos en la región de procesamiento 220 y la liberación de los polinucleótidos en el líquido de liberación es normalmente de 15 minutos o menos (por ejemplo, aproximadamente 10 minutos o menos, aproximadamente 5 minutos o menos).

El líquido que incluye los polinucleótidos liberados se puede retirar de la región de procesamiento 220 de la siguiente manera. Las válvulas 210 y 234 se cierran. Las compuertas 238 y 258 se abren. El accionador 254 se acciona para generar una presión que mueve el líquido y polinucleótidos de la región de procesamiento 220, al canal 230, y hacia la salida 236. El líquido con polinucleótidos se puede retirar mediante, por ejemplo, una jeringa o dispositivo de muestreo automatizado. Dependiendo del líquido en contacto con el miembro de retención 216 durante la liberación de polinucleótido, la solución con polinucleótido liberado se puede neutralizar con una cantidad de tampón (por ejemplo, un volumen igual de 25 – 50 mM de tampón Tris-HCl a pH 8,0).

Si bien la liberación de los polinucleótidos se ha descrito como incluyendo una etapa de calentamiento, los polinucleótidos se pueden liberar sin calentarse. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el líquido del reservorio 281 tiene una fuerza iónica, pH, concentración de tensioactivo, composición, o combinación de los mismos que libera los polinucleótidos del miembro de retención.

Si bien los polinucleótidos se han descrito como liberándose en un solo volumen de líquido presente dentro de la región de procesamiento 220, otras configuraciones se pueden utilizar. 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 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 vacíos de la región de procesamiento 220.

Si bien los reservorios 279, 281 se han descrito como conteniendo líquidos entre la primera y segunda compuertas, otras configuraciones se pueden utilizar. Por ejemplo, el líquido para cada reservorio se puede contener dentro de una bolsa (por ejemplo, un blíster) aislada de la red 201 por una membrana generalmente impermeable. La bolsa se configura de manera que un usuario puede romper la membrana de conducción de líquido en los reservorios 279, 281 donde los accionadores 244, 248 pueden mover el líquido durante su uso.

Si bien que las regiones de procesamiento se han descrito como teniendo dimensiones a escala de microlitros, otras dimensiones se pueden utilizar. Por ejemplo, las regiones de procesamiento con superficies (por ejemplo, partículas) configuradas para retener preferentemente los polinucleótidos en oposición a los 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 banco superior.

Si bien la región 220 de procesamiento se ha descrito como teniendo un miembro de retención formado de múltiples partículas modificadas superficialmente, se pueden utilizar 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 las que pasan los polinucleótidos. Las superficies del miembro poroso se modifican para retener preferentemente polinucleótidos. Las membranas de filtro disponibles, por ejemplo, por Osmonics, se forman de polímeros que se pueden modificar en la superficie y se utilizan 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 tabiques) a través de las que se hace pasar una muestra. Las paredes o tabiques se modifican para retener preferentemente polinucleótidos.

Si bien la región de procesamiento, 220 se ha descrito como un componente de una red microfluidica, otras configuraciones se pueden utilizar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el miembro de retención se puede retirar de una región de procesamiento para el procesamiento en otras ubicaciones. Por ejemplo, el miembro de retención puede estar en contacto con una mezcla que comprende los polinucleótidos y los inhibidores en una ubicación y trasladarse después a otra ubicación en la que los polinucleótidos se eliminan del miembro de retención.

Si bien los reservorios 275 se han mostrado como dispersos dentro de un vehículo, se pueden utilizar otras configuraciones. Por ejemplo, los reservorios 275 se pueden encerrar dentro de un recinto flexible formado por una, por ejemplo, (por ejemplo, una membrana, por ejemplo, un recinto tal como un saco). En algunas realizaciones, los reservorios 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 reservorios 275, pero lo

suficientemente grande como para permitir que el gas salga de la cámara 272.

Los dispositivos microfluídicos con diversos componentes se describen en la Patente de Estados Unidos n.º 7 731 906. (Parunak *et al.*).

5 Si bien el dispositivo microfluídico 300 se ha descrito como configurado para recibir los polinucleótidos ya liberados de las células, los dispositivos de microfluidos se pueden configurar para liberar los polinucleótidos de las células (por ejemplo, mediante la lisis de las células). Por ejemplo, haciendo referencia a las Figuras 4-6, un dispositivo microfluídico 300 incluye una cámara de lisis de muestras 302 en la que se lisan las células para liberar los polinucleótidos en la misma. El dispositivo microfluídico 300 incluye además capas de sustrato L1-L3, una red microfluídica 304 (solo cuyas porciones se observan en la Figura 4), y reservorios de reactivos líquidos R1-R4. Los reservorios de reactivos líquidos R1-R4 contienen reactivos líquidos (por ejemplo, para el procesamiento del material de muestra) y se conectan a la red 304 mediante los puertos de reactivos RP1-RP4.

15 La red 304 se define sustancialmente entre las capas L2 y L3 pero se extiende parcialmente entre las tres capas L1-L3. La red microfluídica 304 incluye múltiples componentes que incluyen canales Ci, válvulas Vi, válvulas dobles Vi', compuertas Gi, compuertas de mezcla MG_i, orificios de ventilación Hi, accionadores de gas (por ejemplo, bombas) Pi, una primera región de procesamiento B1, una segunda región de procesamiento B2, zonas de detección Di, orificios de ventilación de aire AV_i, y zonas de residuos Wi. Los componentes de la red 304 se accionan normalmente térmicamente. Como se observa en la Figura 7, una red de fuente de calor 312 incluye fuentes de calor (por ejemplo, fuentes de calor resistivas) que tienen ubicaciones que corresponden a los componentes de la red microfluídica 304. Por ejemplo, las ubicaciones de las fuentes de calor HP_i corresponden a las ubicaciones de los accionadores Pi, las ubicaciones de las fuentes de calor HG_i corresponden a las ubicaciones de las compuertas Gi y de la compuertas de mezcla, las ubicaciones de las fuentes de calor HV_i se corresponden con las ubicaciones de las válvulas Vi y la válvulas dobles Vi', y las ubicaciones de las fuentes de calor HD1 corresponden a las ubicaciones de las cámaras de procesamiento Di de la red 304. Durante su uso, los componentes del dispositivo 300 se disponen en contacto térmico con las fuentes de calor de la red 312, que normalmente se operan utilizando un procesador como se ha descrito anteriormente para el dispositivo 200. La fuente de calor de la red 312 puede ser integral con o estar separada del dispositivo 300 como se ha descrito en el dispositivo 200.

30 A continuación, se describen los componentes del dispositivo microfluídico 300.

35 Los orificios de ventilación 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 ventile de manera que la acumulación de presión no inhiba el movimiento deseado de los líquidos. Por ejemplo, orificio de ventilación de aire AV2 permite que el líquido se mueva a lo largo del canal C14 y dentro del canal C16 mediante la ventilación del gas aguas abajo del líquido a través del orificio de ventilación AV2.

40 Las válvulas Vi son componentes que tienen un estado normalmente abierto permitiendo que el material pase a lo largo de un canal desde una posición a un lado de la válvula (por ejemplo, aguas arriba de la válvula) hasta una posición al otro lado de la válvula (por ejemplo, aguas abajo de la válvula). Las válvulas Vi pueden tener la misma estructura que las válvulas del dispositivo microfluídico 200.

45 Como se observa en las Figuras 8 y 9, las válvulas dobles Vi' son también componentes que tienen un estado normalmente abierto permitiendo que el material pase a lo largo de un canal desde una posición a lado de la válvula (por ejemplo, aguas arriba de la válvula) hasta una posición al otro lado de la válvula (por ejemplo, aguas abajo de la válvula). Tomando la válvula doble V11' de las Figuras 8 y 9 como ejemplo, las válvulas dobles Vi' incluyen primera y segunda masas 314, 316 de una TRS (por ejemplo, una aleación eutéctica o cera) separadas entre sí a cada lado de un canal (por ejemplo, el canal C14). Normalmente, las masas TRS 314, 316 están desplazadas una respecto a la otra (por ejemplo, por una distancia de aproximadamente el 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 segunda masas de TRS 314, 316. Cada masa de TRS 314, 316 se asocia con una cámara respectiva 318, 320, que normalmente incluye un gas (por ejemplo, aire).

55 Las masas de TRS 314, 316 y las cámaras 318, 320 de válvula doble Vi' están en contacto térmico con una fuente de calor correspondiente HV11' de la red de fuente de calor 312. El accionamiento de la fuente de calor 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 del gas dentro de las cámaras 318, 320. La presión de gas conduce las masa de TRS 314, 316 a través del canal C11 y cierra la válvula HV11' (Figura 9). Normalmente, las masas 314, 316 se combinan al menos parcialmente para formar una masa 322 que obstruye el canal C11.

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

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

- 5 Los accionadores P_i son componentes que proporcionan una presión de gas para mover el material (por ejemplo, material de muestra y/o material de reactivo) entre una ubicación de red 304 y otra ubicación. Los accionadores P_i pueden ser los mismos que los accionadores del dispositivo 200. Por ejemplo, cada accionador P_i incluye una cámara con una masa 273 de TEM que se puede calentar para presurizar el gas dentro de la cámara. Cada accionador P_i incluye una compuerta G_i correspondiente (por ejemplo, compuerta G2 del accionador P_i) que evita
10 que el líquido entre en la cámara del accionador. La compuerta se acciona normalmente (por ejemplo, abre) para permitir que la presión creada en la cámara del accionador entre en la red microfluídica.

- Las cámaras de residuos W_i son componentes que pueden recibir residuos (por ejemplo, desbordamiento) de líquido resultantes de la manipulación (por ejemplo, el movimiento y/o mezcla) de líquidos dentro de la red 304.
15 Normalmente, cada cámara de residuos W_i tiene un orificio de ventilación de aire asociado que permite que el gas desplazado por líquido que entra en la cámara se ventile.

- La primera región de procesamiento B1 es un componente que permite a los polinucleótidos concentrarse y/o separarse de los inhibidores de una muestra. La región de procesamiento B1 se puede configurar y operar como la
20 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 modificadas superficialmente 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 poli-catiónicas tales como poli-L-lisina, poli-D-lisina, poli- DL-ornitina). En algunas realizaciones,
25 las partículas del miembro de retención se disponen en la cámara de lisis 302 y se mueven en 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, material de muestra) se combine con los compuestos (por ejemplo, reactivos) para determinar la presencia de uno o más
30 polinucleótidos. En algunas realizaciones, los compuestos incluyen uno o más reactivos de PCR (por ejemplo, cebadores, plásmidos de control, y enzimas de la polimerasa). Normalmente, los compuestos se almacenan dentro de la región de procesamiento como una o más partículas liofilizadas (por ejemplo, gránulos). 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
35 región de procesamiento B2 disuelve (por ejemplo, reconstituye) los compuestos liofilizados.

- Normalmente, 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 ejemplar 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 uno o más polinucleótidos incluyen normalmente múltiples compuestos. En algunas realizaciones, las partículas liofilizadas incluyen uno o más compuestos utilizados 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 por PCR. A continuación se describen partículas liofilizadas ejemplares que incluyen reactivos ejemplares para la amplificación de polinucleótidos asociados con bacterias estreptococos del grupo B (GBS). En algunas realizaciones, las partículas liofilizadas incluyen un crioprotector, una o más sales, uno o más cebadores (por ejemplo, GBS Cebador F y/o GBS Cebador R), una o más sondas (por ejemplo, GBS Sonda - FAM), uno o más plásmidos de control interno, uno o más controles de especificidad (por ejemplo, Estreptococos pneumoniae del ADN como un control para PCR de GBS), uno o más reactivos de PCR (por ejemplo, dNTPs y/o dUTPs), uno o más de agentes de bloqueo o de carga (por ejemplo, proteínas sin especificar (por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA), ARNasa, o gelatina), y una polimerasa (por ejemplo, Taq polimerasa sin glicerol). Por supuesto, otros componentes (por ejemplo, otros cebadores y/o controles de especificidad) se pueden utilizar para la amplificación de otros polinucleótidos.
50
55

- Los crioprotectores ayudan por lo general a aumentar la estabilidad de las partículas liofilizadas y ayudan a evitar el daño a otros compuestos de las partículas (por ejemplo, mediante la prevención de 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, melicitosa, rafnosa)) y/o uno o más poli-alcoholes (por ejemplo, manitol, sorbitol).
60

- Las partículas liofilizadas se pueden preparar como se desee. Normalmente, los compuestos de las partículas liofilizadas se combinan con un disolvente (por ejemplo, agua) para preparar una solución, que se coloca a continuación (por ejemplo, en partes alícuotas discretas (por ejemplo, gotas), tal como por pipeta) sobre una
65

superficie hidrófoba refrigerada (por ejemplo, una película de diamante o una superficie de politetrafluoroetileno). En general, la temperatura de la superficie se reduce a aproximadamente 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 un vacío mientras que todavía están congeladas a una presión y tiempo suficiente para eliminar el disolvente (por ejemplo, por sublimación) de los gránulos.

En general, las concentraciones de los compuestos en la solución a partir de la que se realizan las partículas son más altas que cuando se reconstituye en el dispositivo microfluídico. Normalmente, la relación de la concentración de la solución con respecto a la concentración reconstituida es de al menos aproximadamente 3 (por ejemplo, al menos aproximadamente 4,5). En algunas realizaciones, la relación es de aproximadamente 6.

Una solución ejemplar para la preparación de gránulos liofilizados para su uso en la amplificación de polinucleótidos indicativos de la presencia de GBS se pueden hacer mediante la combinación de un crioprotector (por ejemplo, 120 mg de trehalosa como polvo seco), una solución tampón (por ejemplo, 48 microlitros de una solución de 1 M de Tris a pH 8,4; 2,5 M de KCl, y 200 mM de MgCl₂), un primer cebador (por ejemplo, 1,92 microlitros de 500 micromolar de GBS Cebador F (Invitrogen)), un segundo cebador (por ejemplo, 1,92 microlitros de 500 micromolar de GBS Cebador R (Invitrogen)), una sonda (por ejemplo, 1,92 microlitros de 250 micromolar de GBS sonda - FAM (IDT/Biosearch Technologies)), una sonda de control (por ejemplo, 1,92 microlitros de 250 micromolar de Cal Orange 560 (Biosearch Technologies)), un plásmido patrón (por ejemplo, 0,6 microlitros de una solución de 10⁵ copias de plásmido por microlitro), un control de especificidad (por ejemplo, 1,2 microlitros de una solución de 10 nanogramos por microlitro (por ejemplo, aproximadamente 5 millones de copias por microlitro) *Streptococcus pneumoniae* del ADN (ATCC)), reactivos de PCR (por ejemplo, 4,8 microlitros de una solución de 100 milimolar de dNTPs (Epicenter) y 4 microlitros de una solución de dUTPs de 20 milimolar (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 Taq polimerasa libre de glicerol (Invitrogen/Eppendorf)) y un disolvente (por ejemplo, agua) para hacer aproximadamente 400 microlitros de solución. Aproximadamente 200 partes alícuotas de aproximadamente 2 microlitros de cada uno de esta solución se congelan y desolvatan como se ha descrito anteriormente para hacer 200 gránulos. Cuando se reconstituye, las 200 partículas hacen una solución de reactivo de PCR con un volumen total de aproximadamente 2,4 mililitros.

Como se observa en la Figura 5, los reservorios de reactivos Ri se configuran para contener los reactivos líquidos (por ejemplo, agua, solución tampón, solución de hidróxido) separados de la red 304 hasta que estén listos para su uso. Los reservorios R1 incluyen un recinto 329 que define un espacio sellado 330 para contener líquidos. Cada espacio 330 se separa del puerto de reactivo RPi y de la red 304 por una pared inferior 33 del recinto 329. Una porción del recinto 329 se forma como un miembro de perforación 331 orientado hacia la pared inferior 333 de cada recinto. Cuando el dispositivo 300 se va a utilizar, los reservorios de reactivos Ri se accionan presionando el miembro de perforación 331 para perforar la pared 333. El miembro de perforación 331 se puede presionar por un usuario (por ejemplo, con un pulgar) o por el sistema operativo utilizado para operar el dispositivo 300.

Cuando la pared 333 se perfora, fluido procedente del reservorio entra en la red 333. Por ejemplo, como se observa en las Figuras 5 y 6, el líquido procedente del reservorio R2 entra en la red 304 por el puerto RP2 y viaja a lo largo de un canal C2. La compuerta G3 evita que el líquido pase a lo largo del canal C8. El exceso de líquido pasa a lo largo del canal C7 y en la cámara de residuos W2. Cuando el borde de salida de líquido procedente del reservorio R2 pasa por el orificio de ventilación hidrófobo H2, la presión creada dentro del reservorio se ventila deteniendo el movimiento adicional del líquido. En consecuencia, la red 304 recibe una parte alícuota de reactivo líquido que tiene un volumen definido por el volumen del canal C2 entre una unión J1 y una unión J2. Cuando se acciona el accionador P1, esta alícuota de reactivo se mueve más dentro de la red 304. Los reservorios de reactivos R1, R3 y R4 se asocian con los canales correspondientes, los orificios de ventilación hidrófobos, y los accionadores.

En la configuración mostrada, el reservorio de reactivo R1 contiene normalmente un líquido de liberación (por ejemplo, una solución de hidróxido como se ha descrito anteriormente para el dispositivo 200) para la liberación de los polinucleótidos retenidos dentro de la región de procesamiento B1. El reservorio de reactivo R2 contiene normalmente un líquido de lavado (por ejemplo, una solución tampón como se ha descrito anteriormente para el dispositivo 200) para la eliminación de compuestos no retenidos (por ejemplo, inhibidores) de la región de procesamiento B1 antes de la liberación de los polinucleótidos. El reservorio de reactivo R3 contiene normalmente un tampón de neutralización (por ejemplo, 25 - 50 mM de tampón Tris-HCl a pH 8,0). El reservorio de reactivo R4 contiene normalmente agua desionizada.

La cámara de lisis 302 se divide en una cámara de lisis primaria 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 porción de la red 304. La cámara de lisis primaria 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 a la red 304, y un reactivo liofilizado LP que interactúa con material de muestra dentro de la cámara 306 como veremos a continuación. El puerto de entrada SP1 incluye una válvula de una vía que permite que el material (por ejemplo, material de muestra y el gas) entre en la cámara 306 pero limita (por ejemplo, evita) que el material salga de la cámara 308 por el puerto SP1.

Normalmente, el puerto SP1 incluye un accesorio (por ejemplo, un adaptador Luer) configurado para acoplarse con un dispositivo de introducción de muestras (por ejemplo, una jeringa) para formar un cierre estanco a gas. La cámara primaria 306 tiene normalmente un volumen de aproximadamente 5 mililitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 4 mililitros o menos). Antes de su uso, la cámara primaria 306 está normalmente llena de un gas (por ejemplo, aire).

La cámara de residuos 308 incluye una porción de residuos W6 por la que el líquido puede entrar en la cámara 308 desde la red 304 y un orificio de ventilación 310 mediante el que el gas desplazado por la cámara de introducción de líquido 308 puede salir.

Las partículas de reactivo liofilizado LP de la cámara de lisis 302 incluyen uno o más compuestos (por ejemplo, reactivos) configurados para liberar los polinucleótidos de las células (por ejemplo, mediante la lisis de las células). Por ejemplo, las partículas LP pueden incluir una o más enzimas configuradas para reducir (por ejemplo, desnaturalizar), las proteínas (por ejemplo, proteinasas, proteasas (por ejemplo, pronasa), tripsina, proteinasa K, de enzimas líticas fago (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 normalmente como alternativa o adicionalmente componentes para retener polinucleótidos en comparación con inhibidores. Por ejemplo, las partículas LP pueden incluir múltiples partículas 218 modificadas superficialmente con ligandos como se ha descrito anteriormente para el dispositivo 200. Las partículas LP pueden incluir enzimas que reducen los polinucleótidos que podrían competir con un polinucleótido a determinar por los sitios de unión de las partículas modificadas superficialmente. Por ejemplo, para reducir el RNA que podría competir con el ADN a determinar, las partículas LP puede incluir una enzima tal como una ARNasa (por ejemplo, ARNasa ISC BioExpress (Amresco)).

En una realización ejemplar, las partículas de las células 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 de propano líquido 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 ejemplar, 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 como se desee. Normalmente, las partículas se preparan utilizando un crioprotector y una superficie hidrófoba enfriada como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, una solución para la preparación de partículas LP se puede preparar mediante la 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 poli-D-ligandos de lisina), una proteasa (por ejemplo, 400 miligramos de pronasa), una ARNasa (por ejemplo, 30 miligramos de ARNasa (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 hacer aproximadamente 20 mililitros. Aproximadamente 1000 partes alícuotas de aproximadamente 20 microlitros de cada uno de esta solución se congelan y desolvatan como se ha descrito anteriormente para hacer 1000 gránulos. Cuando se reconstituye, los gránulos se utilizan normalmente para hacer un total de aproximadamente 200 mililitros de solución.

Durante su uso, el dispositivo 300 puede operar de la siguiente manera. Las válvulas Vi y Vi' de la red 304 se configuran en el estado abierto. Las compuertas Gi y las compuertas de mezcla MGi de la red 304 se configuran en el estado cerrado. Los puertos de reactivos R1-R4 se deprimen para introducir reactivos líquidos en la red 304 como se ha descrito anteriormente. Una muestra se introduce en la cámara de lisis de 302 a través del puerto SP1 y se combina con las partículas liofilizadas LP dentro de la cámara de lisis primaria 306. Normalmente, la muestra incluye una combinación de partículas (por ejemplo, células) y una solución tampón. Por ejemplo, una muestra ejemplar incluye aproximadamente 2 partes de sangre entera a aproximadamente 3 partes de solución tampón (por ejemplo, una solución de 20 mM de Tris a pH 8,0; 1 mM de EDTA, y 1 % SDS). Otra muestra ejemplar incluye estreptococos del grupo B y una solución tampón (por ejemplo, una solución de 20 mM de Tris a pH 8,0; 1 mM de EDTA, y 1 % de Triton X-100).

Por lo general, el volumen de la muestra introducida es menor que el volumen total de la cámara de lisis primaria 306. Por ejemplo, el volumen de la muestra puede ser de aproximadamente el 50 % o menos (por ejemplo, aproximadamente el 35 % o menos, aproximadamente el 30 % o menos) del volumen total de la cámara 306. Una muestra típica tiene un volumen de aproximadamente 3 mililitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 1,5 mililitros o menos). Un volumen de gas (por ejemplo, aire) se introduce generalmente en la cámara primaria 306 junto con la muestra. Normalmente, el volumen de gas introducido es de aproximadamente el 50 % o menos (por

ejemplo, aproximadamente el 35 % o menos, aproximadamente el 30 % o menos) del volumen total de la cámara 306. El volumen de la muestra y el gas se combinan para presurizar el gas ya presente dentro de la cámara 306. La válvula 307 del puerto SP1 evita que el gas salga de la cámara 306. Debido a que las compuertas G3, G4, G8, y G10 se encuentran 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 lisis reconstituidos (por ejemplo, ReadyLyse, mutanolisina) comienzan a lisar las células de la muestra liberando los polinucleótidos. Otros reactivos (por ejemplo, enzimas proteasas tales como pronasa) comienzan a reducir o desnaturalizar los inhibidores (por ejemplo, proteínas) dentro de la muestra. Los polinucleótidos de la muestra comienzan a asociarse con (por ejemplo, se unen a) ligandos de las partículas 218 liberados de las partículas LP. Normalmente, la muestra dentro de la cámara 306 se calienta (por ejemplo, hasta al menos aproximadamente 50 °C, a al menos aproximadamente 60 °C) durante un período de tiempo (por ejemplo, durante aproximadamente 15 minutos o menos, aproximadamente 10 minutos o menos, aproximadamente 7 minutos o menos), mientras que se produce lisis. En algunas realizaciones, la energía óptica se utiliza al menos en parte para calentar el contenido de la cámara de lisis 306. Por ejemplo, el sistema operativo que se utiliza para operar el dispositivo 300 puede incluir una lámpara (por ejemplo, una lámpara que emite luz principalmente infrarroja) dispuesta en contacto térmico y óptico con la cámara 306. La cámara 306 incluye un sensor de temperatura TS que se utilizan para supervisar la temperatura de la muestra dentro de la cámara 306. La salida de la lámpara aumenta o disminuye basándose en la temperatura determinada con el sensor TS.

Continuando con la operación del dispositivo 300, G2 se acciona (por ejemplo, abre) proporcionando una trayectoria entre el puerto SP2 de la cámara de lisis primaria 306 y el puerto W6 de la cámara de residuos de lisis 308. La trayectoria se extiende a lo largo del canal C9, el canal C8, a través de la región de procesamiento B1, y el canal C11. La presión dentro de la cámara 306 acciona el material de muestra lisada (que contiene lisado, polinucleótidos unidos a las partículas 218, y otros componentes de muestra) a lo largo de la vía. Las partículas 218 (con polinucleótidos) se retienen dentro de la región de procesamiento B1 (por ejemplo, por un filtro), mientras que los componentes líquidos y otros de la muestra fluyen en la cámara de residuos 308. Después de un período de tiempo (por ejemplo, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 minutos), La presión en la cámara de lisis 306 se ventila abriendo la compuerta G1 para crear una segunda vía entre los puertos SP2 y W6. Las válvulas dobles V1' y V8' se cierran para aislar la cámara de lisis 302 de la red 304.

La operación del dispositivo 300 continúa accionando la bomba P1 y abriendo las compuertas G2, G3 y G9. La bomba P1 acciona el líquido de lavado en el canal C2 aguas abajo de la unión J1 a través de la región de procesamiento B1 y en la cámara de residuos W5. El líquido de lavado elimina los inhibidores y otros compuestos que no fueron aceptados por las partículas 218 de la región de procesamiento B1. Cuando el borde de salida del líquido de lavado (por ejemplo, la interfaz aguas arriba) pasa por el orificio de ventilación hidrófobo H14, la presión del accionador P1 se ventila de la red 304, deteniendo el movimiento adicional del líquido. Las válvulas dobles V2' y V9' se cierran.

La operación continúa accionando la bomba P2 y abriendo las compuertas G6, G8 y G4 para mover el líquido de liberación del reservorio de reactivo R1 en la región de procesamiento B1 y en contacto con las partículas 218. El orificio de ventilación de aire AV1 ventila la presión antes de mover el líquido de liberación. El orificio de ventilación hidrófobo H6 ventila la presión detrás del borde de salida del líquido de liberación deteniendo el movimiento adicional del líquido de liberación. Las válvulas dobles V6" y V10 se cierran.

La operación continúa calentando la región de procesamiento B1 (por ejemplo, calentando 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. Normalmente, el líquido de liberación incluye aproximadamente 15 mM de hidróxido (por ejemplo, solución de NaOH) y las partículas se calientan a aproximadamente 70 °C durante aproximadamente 2 minutos para liberar los polinucleótidos de las partículas 218.

La operación continúa accionando la bomba P3 y abriendo las compuertas G5 y G10 para mover el líquido de liberación de la región de procesamiento B1 aguas abajo. El orificio de ventilación AV2 ventila la presión del gas aguas abajo del líquido de liberación permitiendo que el líquido se mueva en el canal C16. El orificio de ventilación hidrófobo H8 ventila la presión de aguas arriba del líquido de liberación deteniendo el movimiento adicional. La válvula doble V11' y la válvula V14 se cierran.

Haciendo referencia a las Figuras 10A-10D, la compuerta de mezcla MG11 se utiliza para mezclar una porción del líquido de liberación que incluye los polinucleótidos liberados de las partículas 218 y el tampón de neutralización del reservorio de reactivo R3. La Figura 10A muestra la región de la compuerta de mezcla MG11 antes de la depresión del reservorio de reactivo R3 para introducir el tampón de neutralización en la red 304. La Figura 10B muestra la región de la compuerta de mezcla MG11, después de que el tampón de neutralización se haya introducido en los canales C13 y C12. La válvula doble V13' se cierra para aislar la red 304 del reservorio de reactivo R3. La válvula doble V12' se cierra para aislar la red 304 de la cámara de residuos W3. El tampón de neutralización se pone en contacto con un lado de una masa 324 de TRS de compuerta MG11.

La Figura 10c muestra la región de la compuerta de mezcla MG11 después de que el líquido de liberación se ha movido en el canal C16. Las dimensiones de la red microfluidica 304 (por ejemplo, las dimensiones de canal y la posición del orificio de ventilación hidrófobo H8) se configuran de modo que la porción de líquido de liberación situada entre las uniones J3 y J4 de los canales C16 y C14 se corresponde aproximadamente con el volumen de líquido en contacto con las partículas 218 durante la etapa de liberación. En algunas realizaciones, el volumen de líquido situado entre las uniones J3 y J4 es menor que aproximadamente 5 microlitros (por ejemplo, aproximadamente 4 microlitros o menos, aproximadamente 2,5 microlitros o menos). En una realización ejemplar el volumen de líquido de liberación entre las uniones J3 y J4 es de aproximadamente 1,75 microlitros. Normalmente, el líquido entre las uniones J3 y J4 incluye al menos aproximadamente el 50 % de los polinucleótidos (al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %) de los polinucleótidos presentes en la muestra que ha entrado en la región de procesamiento B1. La válvula V14 se cierra para aislar la red 304 del orificio de ventilación de aire AV2.

Antes de accionar la compuerta de mezcla MG11, el líquido de liberación en la unión J4 y el tampón de neutralización en la unión J6 entre los canales C13 y C12 se separan solo por la masa 324 de TRS (por ejemplo, los líquidos no se separan por un volumen de gas). Para combinar el líquido de liberación y el tampón de neutralización, la bomba P4 y las compuertas G12, G13, y MG11 se accionan. La bomba P4 conduce 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 en la mezcla de canal C15 (Figura 10D). La masa 324 de TRS se dispersa y/o se derrite normalmente permitiendo que los dos líquidos se combinen. Los líquidos combinados incluyen una interfaz aguas abajo 335 (formada por la unión J3) y una interfaz aguas arriba (formada por la unión J5). La presencia de estas interfaces permite una mezcla más eficaz (por ejemplo, la recirculación del líquido combinado) que si las interfaces no estuviesen presentes. Como se observa en la Figura 10D, la mezcla comienza normalmente cerca de la interfaz entre los dos líquidos. El canal de mezcla C15 es normalmente al menos aproximadamente tan largo (por ejemplo, al menos aproximadamente el doble de largo) que una longitud total de los líquidos combinados dentro del canal.

El volumen de tampón de neutralización que se combina con el líquido de liberación se determina por las dimensiones del canal de unión entre J5 y J6. Normalmente, 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 situado entre las uniones J5 y J6 es menor que aproximadamente 5 microlitros (por ejemplo, aproximadamente 4 microlitros o menos, aproximadamente 2,5 microlitros o menos). En una realización ejemplar el volumen de líquido de liberación entre las uniones J5 y J6 es de aproximadamente 2,25 microlitros (por ejemplo, el volumen total de líquido de liberación y tampón de neutralización es de aproximadamente 4 microlitros).

Volviendo a la Figura 6, el líquido de liberación y el tampón de neutralización combinados se mueven a lo largo del canal de mezcla C15 y en el canal C32 (con ventilación aguas abajo del orificio de ventilación de aire AV8). El movimiento continúa hasta que la interfaz aguas arriba de los líquidos combinados pasa por el orificio de ventilación hidrófobo H11, que ventila la presión del accionador P4 deteniendo el movimiento adicional de los líquidos combinados.

Siguiendo con la operación del dispositivo 300, el accionador P5 y las compuertas G14, G15 y G17 se accionan para disolver las partículas para PCR liofilizadas presentes en la segunda región de procesamiento B2 en el agua del reservorio de reactivo R4. El orificio de ventilación hidrófobo H10 ventila la presión aguas arriba del accionador P5 del agua deteniendo el movimiento adicional. La disolución se produce normalmente en aproximadamente 2 minutos o menos (por ejemplo, en aproximadamente 1 minuto o menos) para disolver el gránulo de reactivos para PCR. La válvula V17 se cierra.

Siguiendo con la operación del dispositivo 300, el accionador P6 y la compuerta G16 se accionan para conducir a los compuestos disueltos de la partícula liofilizada desde la región de procesamiento B2 al canal C31, donde la mezcla de los reactivos disueltos forma una solución de partículas liofilizadas disuelta homogénea. El accionador P6 mueve la solución en los canales C35 y C33 (con ventilación aguas abajo del orificio de ventilación de aire AV5). El orificio de ventilación hidrófobo H9 ventila la presión generada por aguas arriba del accionador P6 de la solución deteniendo el movimiento adicional. Las válvulas V18, V19, V20' y V22' se cierran.

Siguiendo con la operación del dispositivo 300, el accionador P7 y las compuertas G18, MG20 y G22 se accionan para combinar (por ejemplo, mezclar) una porción de líquido de liberación neutralizado en el canal 32 entre las compuertas MG20 y la compuerta G22 y una porción de la solución de partículas liofilizadas disuelta en el canal C35 entre las compuertas G18 y MG20. Los líquidos combinados viajan largo de un canal de mezcla C37 y en la región de detección D2. Un orificio de ventilación de aire AV3 ventila la presión del gas aguas abajo de los líquidos combinados. Cuando la interfaz aguas arriba de los líquidos combinados pasa por el orificio de ventilación hidrófobo H13, la presión del accionador P7 se ventila y los líquidos combinados se colocan dentro de la región de detección D2.

El accionador P8 y las compuertas MG2, G23, y G19 se accionan para combinar una porción de agua del reservorio de reactivo R4 entre las compuertas MG2 y G23 con una segunda porción de la solución de partículas liofilizadas disuelta en el canal C33 entre las compuertas G19 y MG2. Los líquidos combinados viajan largo de un canal de

mezcla C41 y en la región de detección D1. Un orificio de ventilación hidrófobo de aire AV4 ventila la presión del gas aguas abajo de los líquidos combinados. Cuando la interfaz aguas arriba de los líquidos combinados pasa por el orificio de ventilación hidrófobo H12, la presión del accionador P8 se ventila y los líquidos combinados se sitúan dentro de la región de detección D1.

5 Siguiendo con la operación del dispositivo 300, las válvulas dobles V26' y V27' se cierran para aislar la región de detección D1 de la red 304 y las válvulas dobles V24' y V25' se cierran para aislar la región de detección D2 de la red 304. El contenido de cada región de detección (líquido de liberación neutralizado con polinucleótidos de la muestra en la región de detección D2 con reactivos para PCR de una solución de partículas liofilizadas disuelta y agua desionizada con reactivos para PCR de una solución de partículas liofilizadas disuelta en la región de detección D1) se somete a etapas de calentamiento y enfriamiento para amplificar los polinucleótidos (si están presentes en la región de detección D2). Las válvulas dobles de cada región de detección evitan la evaporación del contenido de la región de detección durante el calentamiento. Los polinucleótidos amplificados se detectan utilizando normalmente detección fluorescente.

15 Haciendo referencia a la Figura 11, un dispositivo 700 se configura para procesar una muestra que contiene polinucleótido, tal como para preparar la muestra para la amplificación de polinucleótidos. El dispositivo 700 incluye un reservorio de muestra 704, un reservorio 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 modificadas superficialmente con un ligando, por ejemplo, poli-L-lisina y/o poli-D-lisina). El miembro de retención 705 y las perlas 705 pueden compartir alguna o todas las propiedades de miembro de retención 216 y de las partículas modificadas superficialmente 218. El dispositivo 700 incluye también una abertura 716 y una válvula, por ejemplo, una válvula térmicamente accionada 714 para abrir y cerrar la abertura 716.

25 Durante su uso, se añade una muestra que contiene polinucleótido al reservorio de muestra 704. Normalmente las cantidades de muestra varían de aproximadamente 100 l a aproximadamente 2 ml, aunque se pueden utilizar cantidades más grandes o más pequeñas.

30 El reservorio de reactivo 706 se puede proporcionar a los usuarios del dispositivo 700 con el reactivo pre-cargado. Como alternativa, 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 de tampón tales como cualquiera de tales soluciones descritas en la presente memoria.

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

40 Con referencia también a la Figura 12, un operador 718 se configura para operar dispositivo 700. El operador 718 incluye una primera fuente de calor 720 y una segunda fuente de calor 722. La primera fuente de calor 720 calienta la muestra presente dentro de reservorio de muestra 704, tal como para lisar células de la muestra que contiene polinucleótidos para preparar polinucleótidos libres.

45 El dispositivo 700 puede incluir también un reservorio de enzima 712 que comprende una enzima, por ejemplo, una proteasa tal como pronasa, configurado para degradar enlaces peptídicos de los polipéptidos presentes en la muestra que contiene polinucleótidos. El reservorio de enzima 712 se puede proporcionar a los usuarios del dispositivo 700 con la enzima precargada. Como alternativa, el dispositivo 700 se puede configurar de modo que los usuarios añadan la enzima a un dispositivo 700.

50 El Dispositivo 700 se puede utilizar para reducir la cantidad de inhibidores presentes en relación con la cantidad de polinucleótidos a determinar. Por lo tanto, 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 con respecto a los inhibidores como se ha descrito en la presente memoria. Con la válvula 714 en el estado abierto, los constituyentes de la muestra que no fueron retenidos en la región de procesamiento 702 salen del dispositivo 700 a través de la abertura.

55 Una vez que la muestra que contiene polinucleótidos se ha eluido a través de región de procesamiento 702, una cantidad de reactivo, por ejemplo, una solución de lavado, por ejemplo, un tampón tal como Tris-EDTA a pH 8,0 con 1 % de Triton X 100 se eluye a través de la región de procesamiento 702. La solución de lavado se almacena generalmente en el reservorio 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 restante inhibidores sin eluir los polinucleótidos retenidos.

60 Una vez que los inhibidores se han separado 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 tampón o solución de NaOH con un pH diferente del de la solución de lavado. Como alternativa, o en combinación, las perlas 705 con los polinucleótidos retenidos se

65

calientan, tal como mediante el uso de segunda fuente de calor 722 del operador 718. Cuando se utiliza el calor para liberar los polinucleótidos, la solución de liberación puede ser idéntica a la solución de lavado.

5 El generador de presión de gas 708 se puede utilizar para expulsar una cantidad de solución de liberación con polinucleótidos liberados desde el dispositivo 700. El generador de presión de gas y/u operador 718 puede incluir una fuente de calor para calentar el gas presente dentro del generador 708. El gas que se expande y se calienta proporciona la presión de gas para expulsar la muestra. En algunas realizaciones, y si se utiliza o no la presión de gas generada térmicamente, el generador de presión de gas 708 se configura para expulsar un volumen predeterminado de material. Normalmente, la cantidad de solución expulsada es inferior a aproximadamente 500 l, inferior a aproximadamente 250 l, inferior a aproximadamente 100 l, inferior a aproximadamente 50 l, por ejemplo, inferior a aproximadamente 25 ml.

Ejemplos

15 Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Preparación del miembro de retención

20 Las perlas magnéticas superficiales de carboxilato (Sera-Mag Magnetic Carboxylate modified, Parte N.º 3008050250, Seradyn) a una concentración de aproximadamente 1011 ml^{-1} fueron activadas durante 30 minutos utilizando N-hidroxisuccinimida (NHS) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) a un pH 6,1, 500 mM de una solución tampón de 2-(N-Morfolinio) -etanosulfónico (MES). Las perlas activadas se incubaron con poli-L-lisina (PLL) con un peso molecular medio de 3.000 Da o 300.000 Da. Después de 2 lavados para eliminar la PLL no unida, las perlas estaban listas para su uso.

25

Dispositivo microfluídico

30 Haciendo referencia a las Figuras 13 y 14, un dispositivo microfluídico 300 se fabricó para demostrar la separación de los polinucleótidos de los inhibidores. El dispositivo 300 comprende primera y segunda porciones de sustrato 302', 304', que comprenden respectivamente primera y segunda capas 302a', 302b' y 304a', 304b'. La primera y segunda capas 302a', 302b' definen un canal 306' que comprende una entrada 310' y una salida 312'. La primera y segunda capas 304a', 304b' definen un canal 308' que comprende una entrada 314' y una salida 316'. La primera y segunda porciones de sustrato 302', 304' se unieron con adhesivo 324' de modo que la salida 312' se comunicó con la entrada 314' con un filtro 318' situado entre las mismas. Una porción de salida 312' se llenó con las perlas activadas preparadas anteriormente para proporcionar una región de procesamiento 320' que comprendía un miembro de retención (las perlas). Una pipeta 322' (Figura 14) fijada por adhesivo 326' facilitó introducción de la muestra.

35

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

45

Retención de ADN

50 La retención de polinucleótidos por las perlas de poli-L-lisina modificadas del dispositivo 300' se demostró mediante la preparación de dispositivos respectivos que comprendían regiones de procesamiento con un volumen de aproximadamente $1 \mu\text{l}$ incluyendo aproximadamente 1000 perlas. Las perlas fueron modificadas 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 (alrededor $20 \mu\text{l}$ de la muestra con una concentración de aproximadamente 20 mg/ml) poniendo así las perlas y el líquido en contacto. Después de que el líquido y las perlas se habían puesto en contacto durante 10 minutos, el líquido se retiró de cada región de procesamiento y se sometió a una PCR en tiempo real cuantitativa para determinar la cantidad ADN de esperma de arenque presente en el líquido.

55

60 Se realizaron dos controles. En primer lugar, una región de procesamiento idéntica de otro modo se cargó con perlas sin modificar, es decir, perlas que eran idénticas a las perlas de poli-L-lisina, excepto para 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 dejó reposar durante 10 minutos, se retiró, y se sometió a PCR en tiempo real cuantitativa. En segundo lugar, el líquido que comprendía el ADN de esperma de arenque ("el líquido sin procesar") se sometió a una PCR en tiempo real cuantitativa.

65 Haciendo referencia a la Figura 15, el primer y segundo controles exhibieron respuestas esencialmente idénticas indicativas de la presencia de ADN de esperma de arenque en el líquido en contacto con las perlas sin modificar y en el líquido sin procesar. El líquido que se había puesto en contacto con las perlas de poli-L-lisina de 3.000 Da

exhibió una menor respuesta indicativa de que las perlas modificadas habían retenido sustancialmente todo el ADN de esperma de arenque. La respuesta de la 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 era al menos aproximadamente 50 % mayor que para las perlas de 3.000 Da indicando que la modificación de la superficie de peso molecular más bajo fue más eficaz en la retención del ADN de esperma de arenque.

Datos de liberación a partir de perlas modificadas con poli-L-lisina

Los dispositivos con regiones de procesamiento se cargaron con perlas modificadas con poli-L-lisina de 3.000 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 anteriormente para el ADN de esperma de arenque. Este líquido se había obtenido sometiendo aproximadamente 10.000 bacterias GBS en 10 µl de 20 mM de Tris a pH 8, 1 mM de EDTA, una solución tampón de 1 % de Triton X-100 para la lisis térmica a 97 °C durante 3 min.

Después de 1,0 minutos, el líquido en contacto con las perlas se eliminó haciendo fluir aproximadamente 10 µl de solución de lavado (Tris-EDTA pH 8,0 con 1 % de Triton X 100) a través de la región de procesamiento. Posteriormente, se añadió aproximadamente 1 µl de solución de 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 separó por elución de la región de procesamiento con un volumen de solución igual a tres veces el volumen de vacíos de la región de procesamiento.

Haciendo referencia a la Figura 16, cinco partes alícuotas de solución se sometieron a amplificación de PCR en tiempo real cuantitativa. Cada una de las partes alícuotas E1, E2, y E3 contenían aproximadamente 1 µl de líquido. La parte alícuota L correspondía al líquido de la muestra original que había pasado a través de la región de procesamiento. La alícuota W era el líquido obtenido a partir de la solución de lavado sin calentamiento. La alícuota E1 correspondía al volumen muerto del dispositivo 300, aproximadamente igual al volumen de canal 308. Por lo tanto, 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 comprendía el líquido presente dentro de la región de procesamiento y en contacto con las perlas durante el calentamiento. La alícuota E3 comprendía el líquido utilizado para eliminar la alícuota E2 de la región de procesamiento.

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

Separación de los polinucleótidos e inhibidores

Las células bucales de la membrana de las mejillas proporcionan una fuente de material genético humano (ADN) que puede utilizarse para la detección de polimorfismo nucleótido único (SNP). Una muestra que comprende células bucales se sometió a lisis térmica para liberar el ADN dentro de las células. El dispositivo 300 se utilizó para separar el ADN de inhibidores concomitantes como se ha descrito anteriormente. Una muestra limpia correspondiente a la parte alícuota E2 de la Figura 16 se sometió a reacción en cadena de la polimerasa. Una muestra de control o bruta obtenida de la lisis térmica se amplificó también.

Haciendo referencia a la Figura 17, la muestra limpia exhibió sustancialmente mayor respuesta a la PCR en menos ciclos que la muestra de control. Por ejemplo, la muestra limpia excedió una respuesta de 20 en 32 ciclos mientras que la muestra de control requirió aproximadamente 45 ciclos para lograr la respuesta de la muestra.

La sangre actúa como una matriz de muestra en una diversidad de pruebas de diagnóstico que incluyen la detección de agentes patógenos infecciosos, marcadores de cáncer y otros marcadores genéticos. La hemoglobina presente en muestras de sangre es un potente inhibidor documentado de la PCR. Dos 5 ml de muestras de sangre se lisaron en 20 mM de Tris a pH 8, 1 mM de EDTA, 1 % de tampón SDS y se introdujeron en los dispositivos respectivos 300, que fueron operados como se ha descrito anteriormente para preparar dos muestras limpias. Una tercera muestra de sangre de 5 ml se lisó y se preparó utilizando un método de extracción de ADN comercial Puregene, Gentra Systems, MN. La muestra y las muestras limpias respectivas sometidas al método de extracción comercial se utilizaron para un análisis de discriminación alélica (reactivos CYP2D6*4, Applied Biosystems, CA). Cada muestra contenía una cantidad de ADN correspondiente a aproximadamente 1 ml de sangre.

Haciendo referencia a la Figura 18, las muestras limpias y extraídas comercialmente exhibieron una respuesta a la PCR similar que demuestra que la región de procesamiento del dispositivo 300 eliminó eficazmente los inhibidores de las muestras de sangre.

Miembro de retención resistente a la proteasa

- La preparación de muestras de polinucleótidos para su posterior procesamiento incluye a menudo someter las muestras a tratamiento con proteasas en el que una proteasa degrada enlaces peptídicos de las proteínas en la muestra. Una proteasa ejemplar es pronasa, una mezcla de endo- y exo- proteasas. La pronasa degrada enlaces más peptídicos. Ciertos ligandos, tales como poli-L-lisina son susceptibles a la ruptura por pronasa y otras proteasas. Por lo tanto, si las muestras no se someten generalmente a tratamiento con proteasas en presencia del miembro de retención si los ligandos unidos a las mismas son susceptibles a las proteasas.
- La poli-D-lisina, el enantiómero dextro de poli lisina resiste la degradación por 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 somete a un tratamiento con proteasas.
- Se prepararon ocho (8) muestras. Un primer grupo de 4 muestras contenía 1.000 células GBS en 10 µl de tampón. Un segundo grupo de 4 muestras contenían 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 GBS. Cuatro (4) conjuntos de muestras fueron creados a partir de las muestras calientes. Cada conjunto muestra contenía 1 muestra de cada uno de los grupos primero y segundo. Las muestras de cada uno de los grupos de muestras se trataron de la siguiente manera.
- Haciendo referencia a la Figura 19a, las muestras del conjunto de muestras 1 se sometieron a una incubación con pronasa para preparar muestras de proteína degradada respectivas, que se calentaron a continuación para inactivar las proteasas. Las muestras calientes, de proteína degradada se pusieron en contacto con los miembros de retención respectivos que comprendían cada uno un conjunto de perlas modificadas con poli-L-lisina. Después de 5 minutos, los respectivos conjuntos de perlas se lavaron con 5 microlitros de una solución de 5 mM NaOH para separar los inhibidores y los productos de degradación de proteína del ADN unido. Los respectivos conjuntos de perlas se pusieron en contacto con cada una segunda parte alícuota de la solución de NaOH y calentaron a 80 (ochenta) °C durante 2 minutos para liberar el ADN. Las soluciones con ADN liberado se neutralizaron con un volumen de tampón igual. Se analizaron las soluciones neutralizadas para determinar la eficacia de la recuperación de ADN. Los resultados se promedian y se muestran en la Figura 19b.
- Las muestras del conjunto de muestras 2 se sometieron a una incubación con pronasa para preparar muestras de proteína degradada respectivas, que se calentaron a continuación para inactivar las proteasas. Las muestras calientes, de proteína degradada se pusieron en contacto con los miembros de retención respectivos que comprendían cada uno un conjunto de perlas modificadas con poli-D-lisina. Después de 5 minutos, los respectivos conjuntos de perlas se lavaron con 5 microlitros de una solución de 5 mM NaOH para separar los inhibidores y los productos de degradación de proteína del ADN unido. Los respectivos conjuntos de perlas se pusieron en contacto con cada una segunda parte alícuota de la solución de NaOH y calentaron a 80 (ochenta) °C durante 2 minutos para liberar el ADN. Las soluciones con ADN liberado se neutralizaron con un volumen de tampón igual. Se analizaron las soluciones neutralizadas para determinar la eficacia de la recuperación de ADN. Los resultados se promedian y se muestran en la Figura 19b.
- Las muestras del conjunto de muestras 3 se sometieron a una incubación con pronasa para preparar muestras de proteína degradada respectivas. Las proteasas no se desactivaron ni térmica ni químicamente. Las muestras de proteína degradada se pusieron en contacto con los miembros de retención respectivos que comprendían cada uno un conjunto de perlas modificadas con poli-L-lisina. Después de 5 minutos, los respectivos conjuntos de perlas se lavaron con 5 microlitros de una solución de 5 mM NaOH para separar los inhibidores y los productos de degradación de proteína del ADN unido. Los respectivos conjuntos de perlas se pusieron en contacto con cada una segunda parte alícuota de la solución de NaOH y calentaron a 80 (ochenta) °C durante 2 minutos para liberar el ADN. Las soluciones con polinucleótidos liberados se neutralizaron cada una con un volumen de tampón igual. Se analizaron las soluciones neutralizadas para determinar la eficacia de la recuperación de ADN. Los resultados se promedian y se muestran en la Figura 19b.
- Las muestras del conjunto de muestras 4 se sometieron a una incubación con pronasa para preparar muestras de proteína degradada respectivas. Las proteasas no se desactivaron ni térmica ni químicamente. Las muestras de proteína degradada se pusieron en contacto con los miembros de retención respectivos que comprendían cada uno un conjunto de perlas modificadas con poli-D-lisina. Después de 5 minutos, los respectivos conjuntos de perlas se lavaron con 5 microlitros de una solución de 5 mM NaOH para separar los inhibidores y los productos de degradación de proteína del ADN unido. Los respectivos conjuntos de perlas se pusieron en contacto con cada una segunda parte alícuota de la solución de NaOH y calentaron a 80 (ochenta) °C durante 2 minutos para liberar el ADN. Las soluciones con polinucleótidos liberados se neutralizaron cada una con un volumen de tampón igual. Se analizaron las soluciones neutralizadas para determinar la eficacia de la recuperación de ADN. Los resultados se promedian y se muestran en la Figura 19b.
- Como se observa en la Figura 19b, un promedio de más del 80 % de ADN de las células de GBS se recuperó utilizando el conjunto de muestras 4 donde se pusieron en contacto las muestras con las perlas modificadas con poli-D-lisina y se sometieron una 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 de dos veces tan elevada para cualquiera de las otras muestras. Específicamente, las eficacias de recuperación para los conjuntos de muestra 1, 2, 3 y 4, fueron del 29 %, 32 %, 14 % y 81,5 %, respectivamente. Las eficacias demuestran que altas eficacias de recuperación se pueden obtener para las muestras sometidas a la incubación con proteasa en presencia de un miembro de retención que retiene ADN.

Lo siguiente se describirá en más detalle por referencia a los siguientes párrafos numerados:

1a. Un dispositivo de preparación de muestras, que comprende:

una superficie que comprende una poliamida poli-catiónica unida a la misma; y
un paso de introducción de muestras en comunicación con la superficie para poner en contacto la superficie con una muestra fluidica.

2a. El dispositivo de preparación de muestras del apartado 1a, que comprende además una fuente de calor configurada para calentar un líquido acuoso en contacto con la superficie hasta al menos aproximadamente 65 °C.

3a. El dispositivo de preparación de muestras del apartado 1a, que comprende además un reservorio de líquido que tiene un pH de al menos aproximadamente 10, donde el dispositivo se configura para poner en contacto la superficie con el líquido.

4a. El dispositivo de preparación de muestras del apartado 1a, donde la superficie comprende superficies de una pluralidad de partículas.

5a. El dispositivo de preparación de muestras del apartado 1a, donde la superficie se puede retirar del dispositivo.

6a. El dispositivo de preparación de muestras del apartado 1a, donde la poliamida poli-catiónica comprende al menos una de poli-L-lisina y poli-D-lisina.

7a. Un método para procesar una muestra, que comprende:

proporcionar una mezcla que comprende un líquido y una cantidad de polinucleótidos;
poner en contacto un miembro de retención con la mezcla, el miembro de retención configurado para retener preferentemente polinucleótidos en comparación con los inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa;
separar sustancialmente todo el líquido en la mezcla del miembro de retención; y
liberar los polinucleótidos retenidos por el miembro de retención del mismo.

8a. El método del apartado 7a, donde el polinucleótido tiene un tamaño inferior a aproximadamente 7,5 Mbp.

9a. El método del apartado 7a, donde el líquido es un primer líquido y la separación sustancialmente de todo el líquido comprende poner en contacto con el miembro de retención con un segundo líquido.

10a. El método del apartado 9a, donde poner en contacto el miembro de retención con un segundo líquido comprende accionar una fuente de presión térmicamente accionada para aplicar una presión en el segundo líquido.

11a. El método del apartado 10a, donde poner en contacto el miembro de retención con un segundo líquido comprende abrir una válvula térmicamente accionada para colocar el segundo líquido en comunicación fluida con el miembro de retención.

12a. El método del apartado 10a, donde el segundo líquido tiene un volumen inferior a aproximadamente 50 microlitros.

13a. El método del apartado 10a, donde el miembro de retención comprende una superficie que comprende un compuesto configurado para unir preferentemente los polinucleótidos a inhibidores de la reacción cadena de la polimerasa.

14a. El método del apartado 13a, donde los inhibidores comprenden al menos uno de hemoglobina, péptidos, compuestos fecales, ácidos húmicos, los compuestos mucosol, proteínas de unión a ADN, o un sacárido.

15a. El método del apartado 13a, donde la superficie comprende una poli-lisina.

16a. El método del apartado 15a, donde la poli-lisina comprende al menos una de poli-L-lisina y poli-D-lisina.

17a. El método del apartado 15a, donde la separación comprende repetir el primer líquido con un segundo líquido.

18a. El método del apartado 17a, donde el segundo líquido comprende un detergente.

19a. El método del apartado 9a, donde la liberación comprende calentar el miembro de retención a una temperatura de al menos aproximadamente 50 °C.

5 20a. El método del apartado 19a, donde el miembro de retención se calienta en presencia de un líquido y la temperatura no es suficiente para hervir el líquido en presencia del miembro de retención durante el calentamiento.

21a. El método del apartado 20a, donde la temperatura es de 100 °C o menos.

10 22a. El método del apartado 19a, donde la temperatura se mantiene durante menos de aproximadamente 10 minutos.

23a. El método del apartado 19a, donde el método no comprende la centrifugación del miembro de retención.

Adicionalmente, se describe en más detalle haciendo referencia a los siguientes apartados numerados:

- 15 1b. Un dispositivo microfluídico, que comprende:
- una región de procesamiento, la región de procesamiento que consiste en una entrada, un miembro de retención, un filtro, y una salida;
- 20 estando dicho miembro de retención configurado para retener preferentemente uno o más polinucleótidos en una muestra, en comparación con los inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa en la muestra, donde dicho miembro de retención comprende una pluralidad de partículas de unión a polinucleótidos, y teniendo dicha pluralidad de partículas superficies que comprenden una poliamida poli-catiónica unida a la misma, donde además el miembro de retención se configura para retener los polinucleótidos de una muestra más preferentemente que los inhibidores de la muestra a medida que la muestra pasa a través del miembro de retención desde la entrada de la región de procesamiento hasta la salida de la región de procesamiento;
- 25 donde el filtro se configura para evitar que la pluralidad de partículas de unión pasen aguas abajo de la región de procesamiento;
- una entrada del dispositivo en comunicación con, y aguas arriba de, la región de procesamiento;
- 30 una salida del dispositivo en comunicación con, y aguas abajo de, la región de procesamiento; y
- una región de detección en comunicación fluida con, y aguas abajo de, el miembro de retención.
- 2b. El dispositivo microfluídico del apartado 1b, donde la pluralidad de partículas tiene un volumen inferior a 5 microlitros.
- 35 3b. El dispositivo microfluídico del apartado 1b, donde la muestra tiene un volumen de 0,5 microlitros a 3 mililitros.
- 4b. El dispositivo microfluídico del apartado 1b, donde la poliamida poli-catiónica comprende al menos una de poli-17L-ornitina, poli-L-lisina y poli-D-lisina.
- 40 5b. El dispositivo microfluídico del apartado 1b, donde el filtro se dispone entre el miembro de retención y la salida de región de procesamiento.
- 6b. El dispositivo microfluídico del apartado 1b, que comprende además al menos un canal tiene al menos una dimensión transversal sub-milimétrica.
- 45 7b. El dispositivo microfluídico del apartado 1b, que comprende además un reservorio de fluido configurado para contener un líquido.
- 50 8b. El dispositivo microfluídico del apartado 1b, que tiene tres capas de material polimérico.
- 9b. El dispositivo microfluídico del apartado 1b, donde las partículas se realizan de un material polimérico seleccionado del grupo que consiste en: poliestireno, polímeros de látex, poli-acrilamida, y óxido de polietileno.
- 55 10b. El dispositivo microfluídico del apartado 1b, donde las partículas tienen un diámetro medio entre aproximadamente 4 micrómetros y aproximadamente 20 micrómetros.
- 11b. El dispositivo microfluídico del apartado 1b, donde las partículas están presentes en una densidad de aproximadamente 10^8 partículas por mililitro.
- 60 12b. El dispositivo microfluídico del apartado 1b, donde al menos algunas de las partículas son magnéticas.
- 13b. El dispositivo microfluídico del apartado 7b, donde el líquido tiene un pH de al menos aproximadamente 10.
- 65 14b. El dispositivo microfluídico del apartado 7b, donde el dispositivo se configura para poner en contacto el miembro de retención con el líquido.

15b. El dispositivo microfluídico del apartado 1b, asociado térmicamente con una serie de fuentes de calor, donde al menos una de las fuentes de calor se configura para calentar un líquido acuoso en contacto con el miembro de retención hasta al menos aproximadamente 65 °C.

- 5 16b. El dispositivo microfluídico del apartado 1b, que comprende además uno o más reactivos de lisis almacenados como una o más partículas liofilizadas, donde las partículas liofilizadas tienen un volumen medio de aproximadamente 5 microlitros o menos.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo microfluídico, que comprende:
 - 5 una primera región de procesamiento; estando dicho miembro de retención configurado para retener preferentemente uno o más polinucleótidos en una muestra, en comparación con los inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa en la muestra, donde dicho miembro de retención comprende una pluralidad de partículas de retención de polinucleótidos, y comprendiendo dicha pluralidad de retención al menos un ligando que comprende una poliamida poli-catiónica,
 - 10 donde además el miembro de retención se configura para retener polinucleótidos a un primer pH y liberar polinucleótidos a un segundo pH, donde el segundo pH es al menos aproximadamente 10; un reservorio de fluido que comprende un líquido de liberación que tiene un pH de al menos aproximadamente 10, donde el dispositivo se configura para poner en contacto el miembro de retención con el líquido;
 - 15 una segunda región de procesamiento para recibir los polinucleótidos liberados de las partículas de retención en la primera región de procesamiento, comprendiendo la segunda región de procesamiento una o más partículas liofilizadas que contienen uno o más reactivos de la PCR; y una región de detección.
 2. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, donde la muestra tiene un volumen de 0,5 microlitros a 3
 - 20 mililitros.
 3. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la poliamida poli-catiónica comprende al menos una de poli-DL-ornitina, poli-L-lisina y poli-D-lisina.
 4. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además al menos un canal
 - 25 que tiene al menos una dimensión en sección transversal sub-milimétrica.
 5. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene tres capas de material polimérico.
 6. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las partículas se realizan a partir de
 - 30 un material polimérico seleccionado del grupo que consiste en: poliestireno, polímeros de látex, poliacrilamida, y óxido de polietileno.
 7. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde las partículas tienen un diámetro
 - 35 medio entre aproximadamente 4 micrómetros y aproximadamente 20 micrómetros, o donde las partículas están presentes en una densidad de aproximadamente 10^8 partículas por mililitro.
 8. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde al menos algunas de las partículas
 - 40 son magnéticas.
 9. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, asociado térmicamente con una serie de
 - fuentes de calor, donde al menos una de las fuentes de calor se configura para calentar un líquido acuoso en contacto con el miembro de retención hasta al menos aproximadamente 65 °C.
 10. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además uno o más
 - 45 reactivos de lisis almacenados como una o más partículas liofilizadas.
 11. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde los polinucleótidos amplificados
 - 50 en la región de detección se detectan utilizando detección fluorescente.
 12. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además un contenedor
 - de residuos.
 13. El dispositivo microfluídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la región de detección
 - 55 comprende:
 - una entrada;
 - una salida; y
 - una válvula de entrada y una válvula de salida, las válvulas de entrada y salida configuradas para aislar la región
 - 60 de detección.

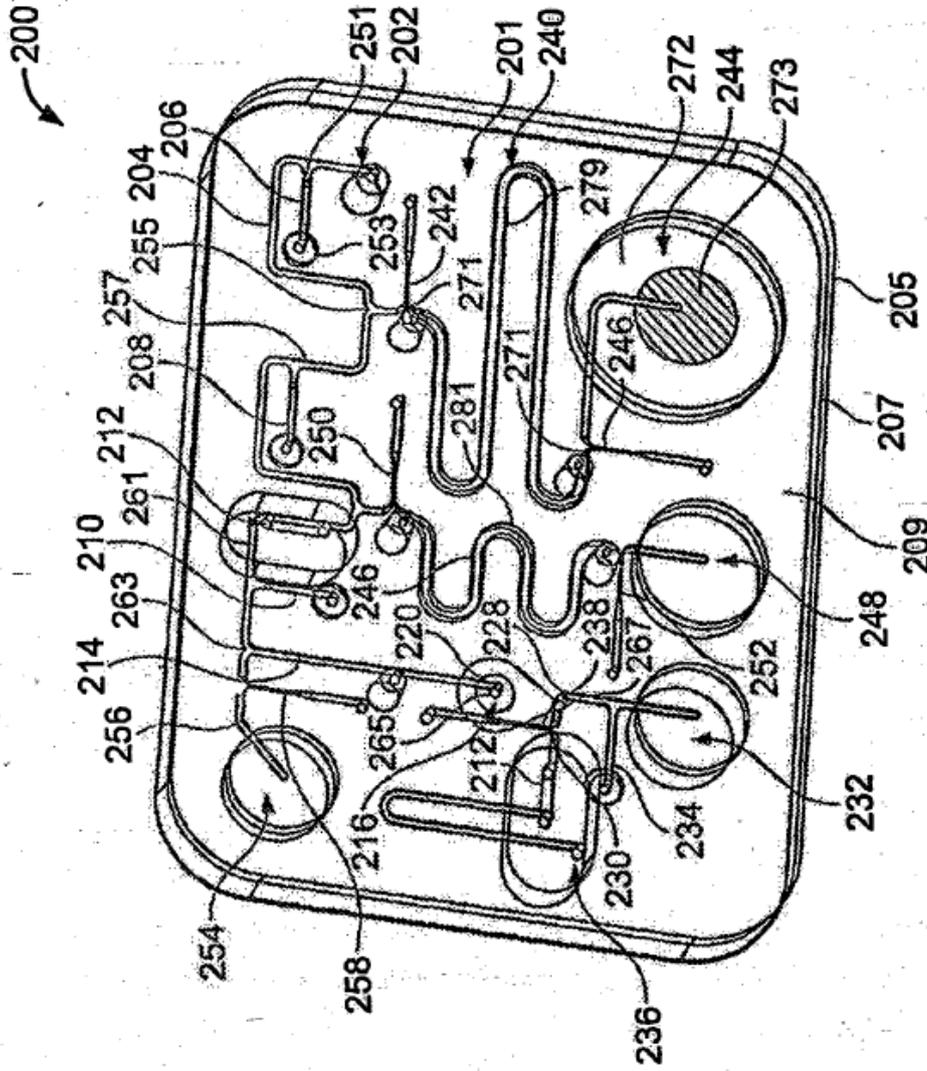


FIG. 1

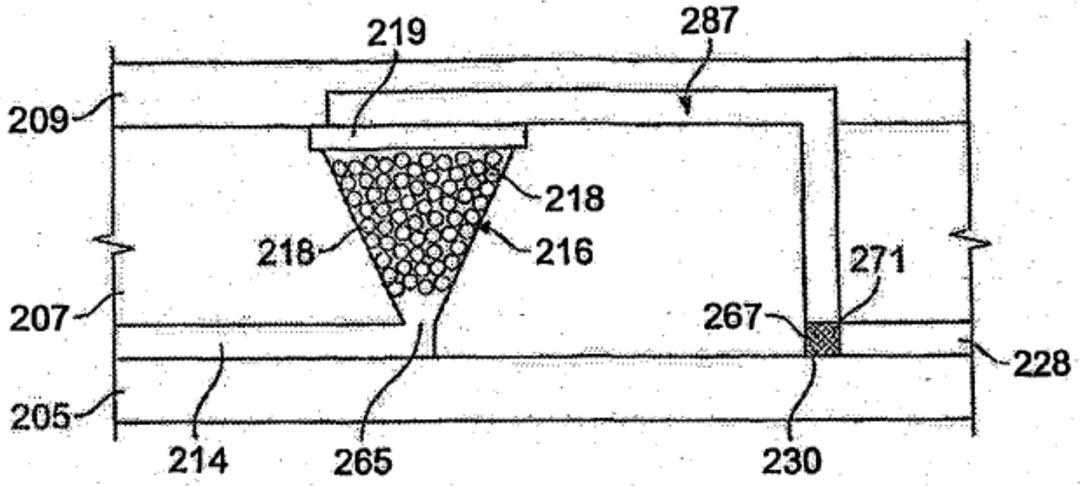


FIG. 2

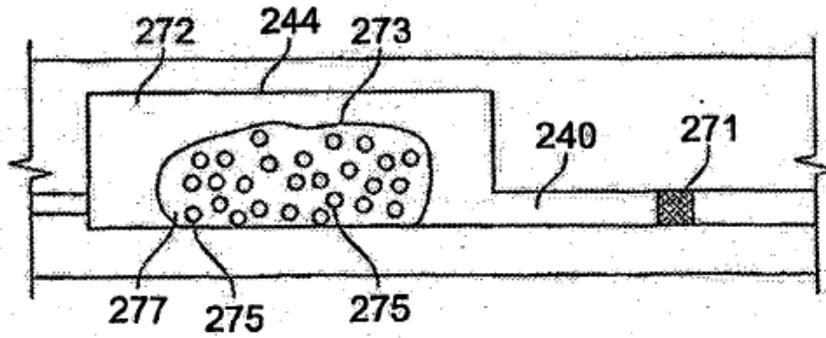


FIG. 3

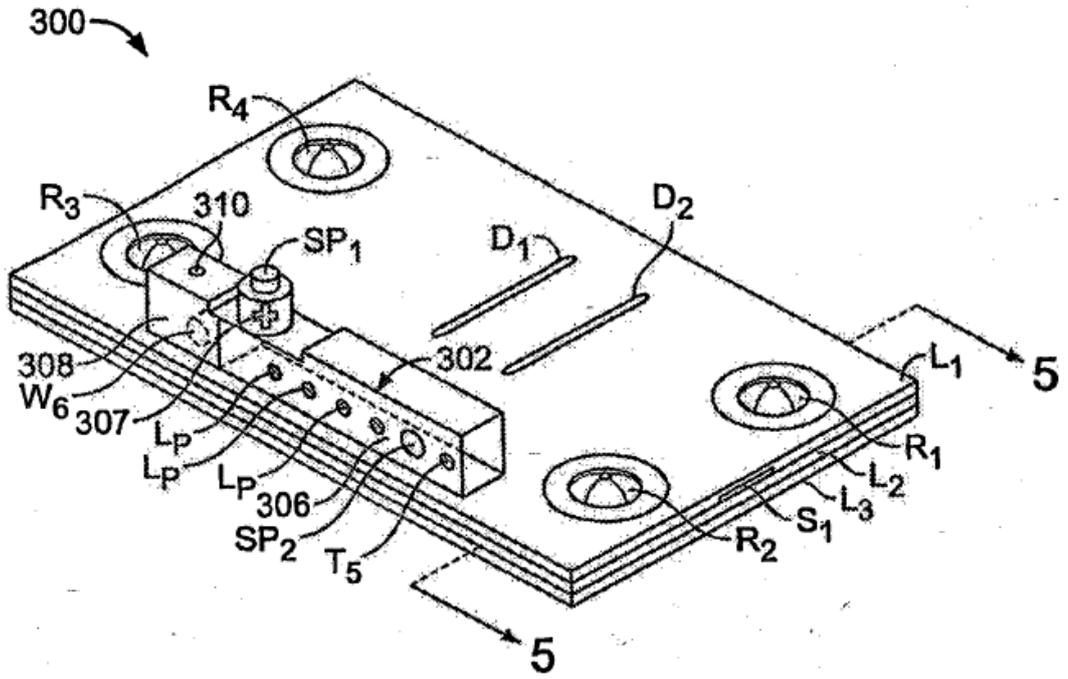


FIG. 4

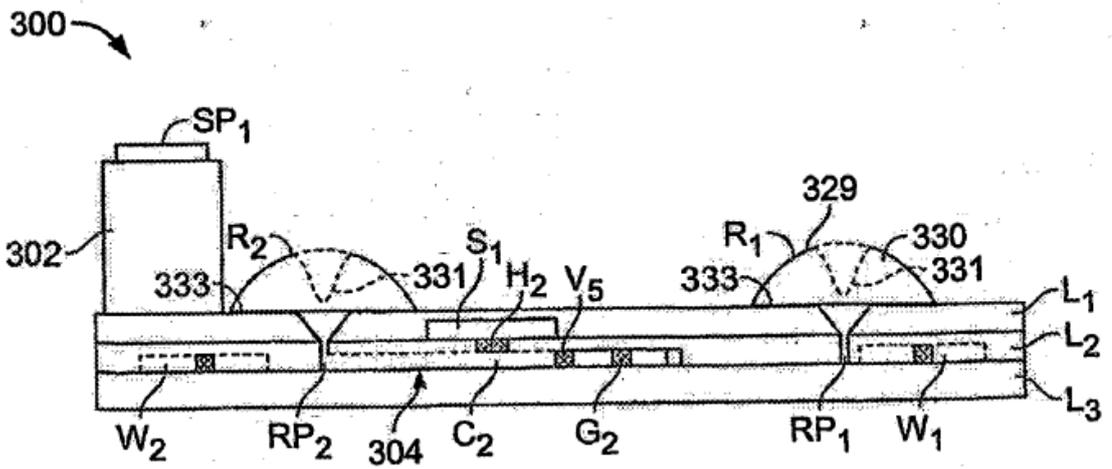


FIG. 5

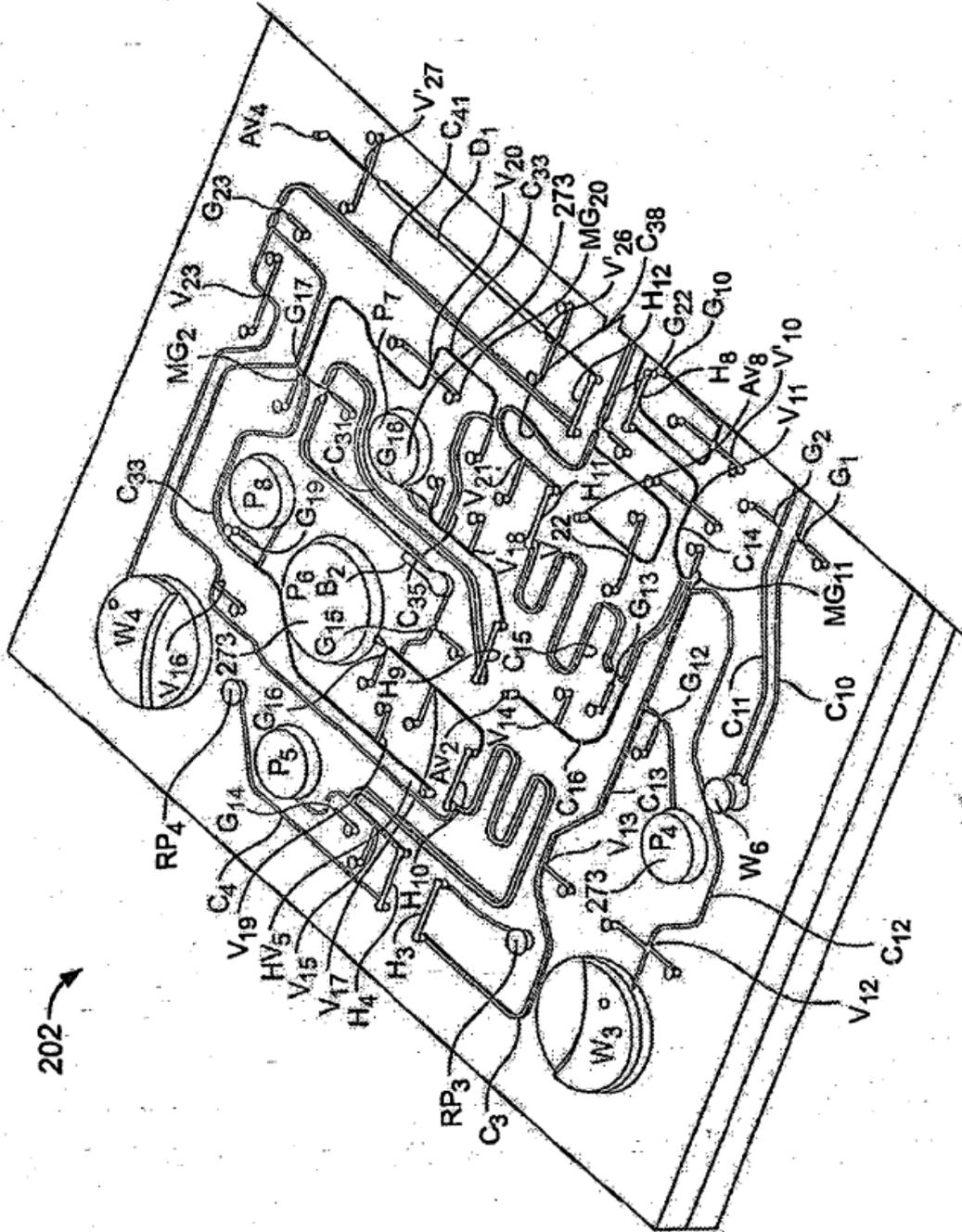


FIG. 6A

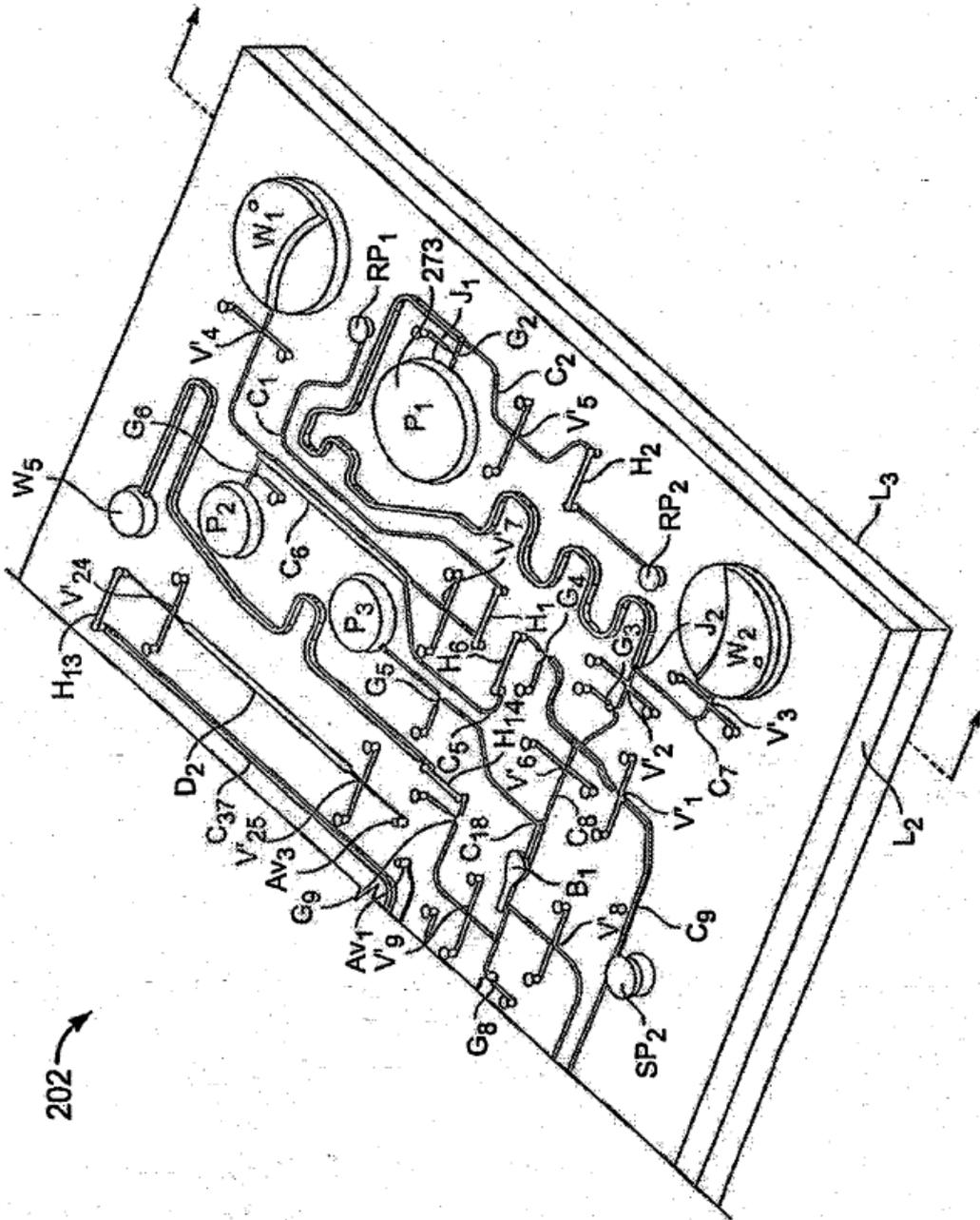


FIG. 6B

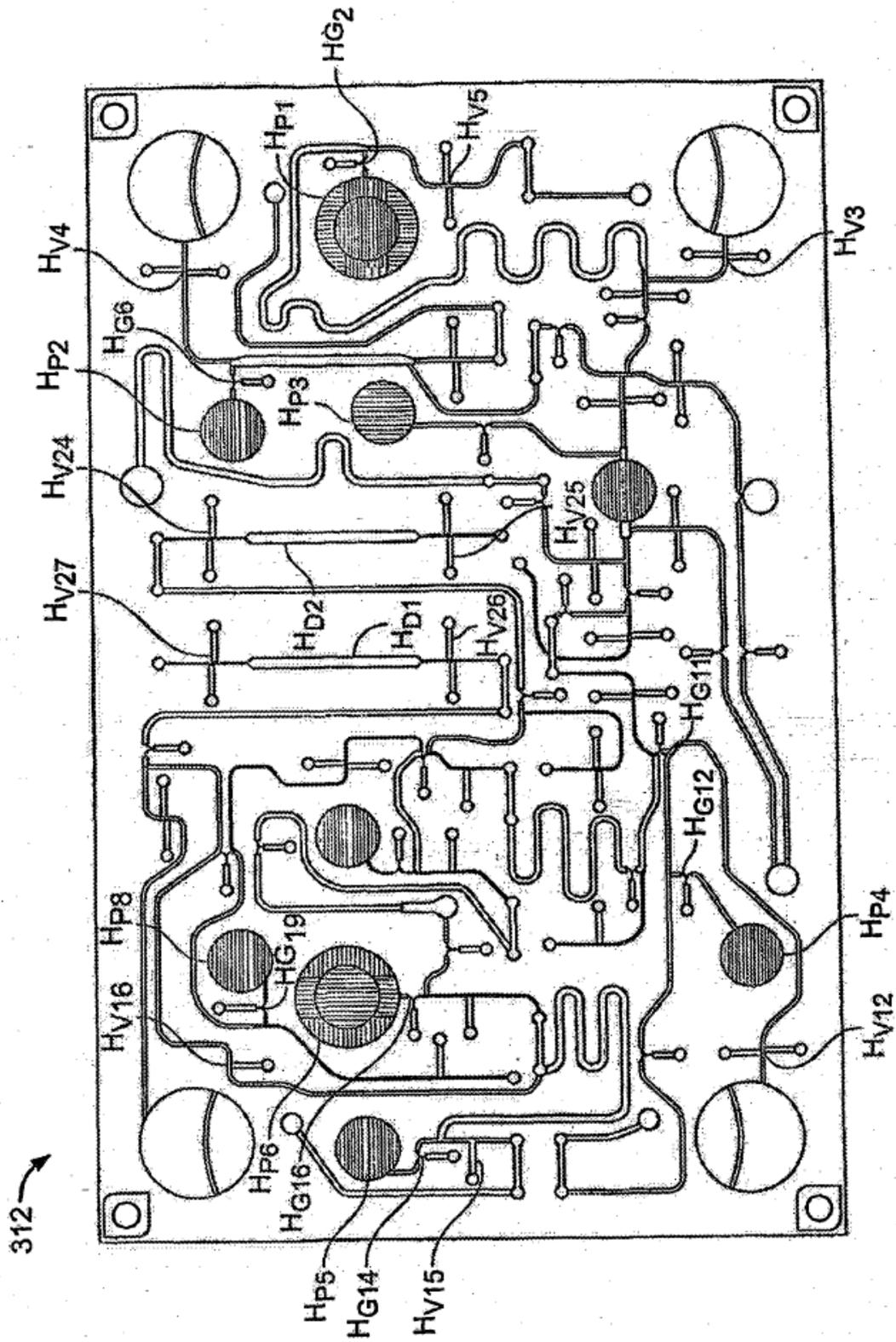


FIG. 7

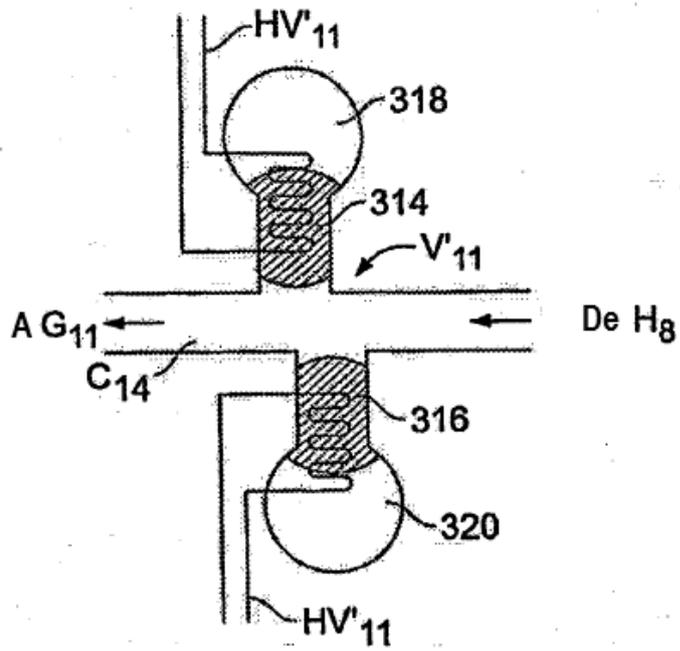


FIG. 8

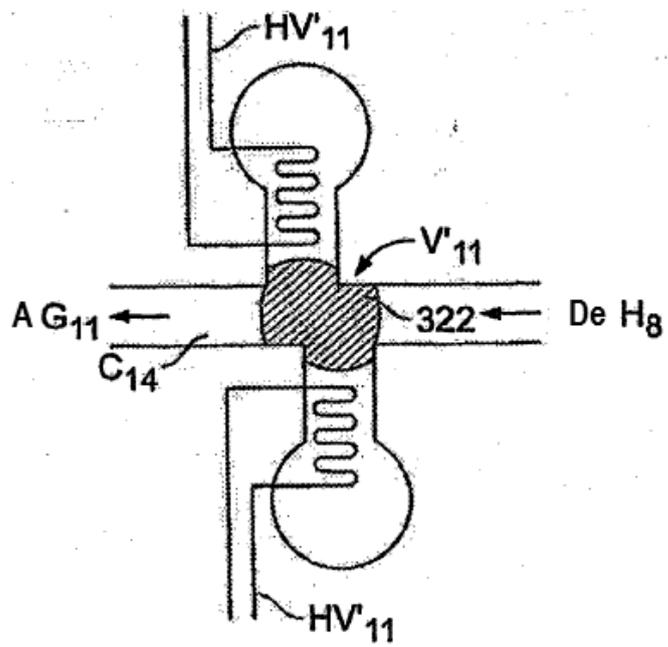


FIG. 9

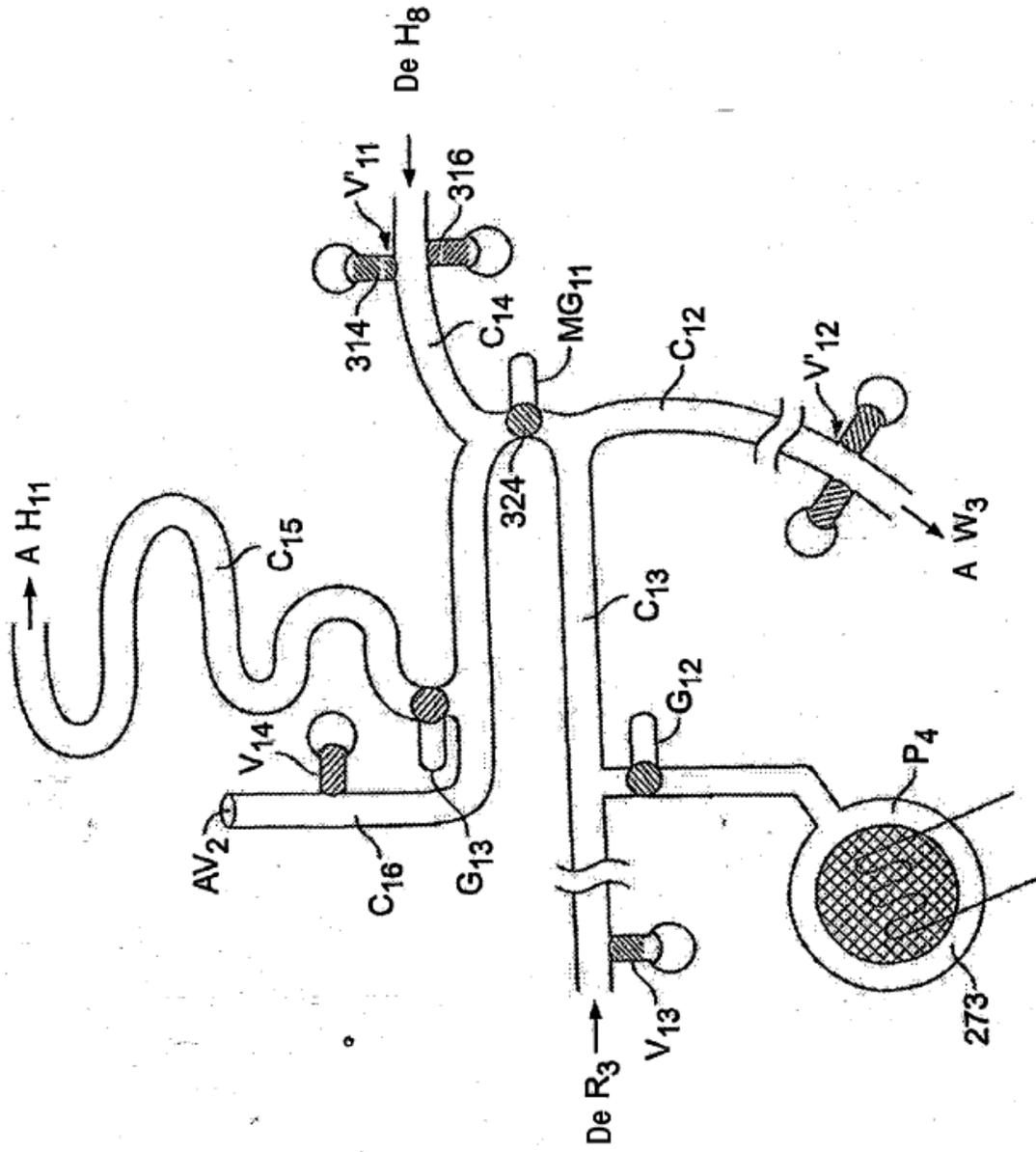


FIG. 10A

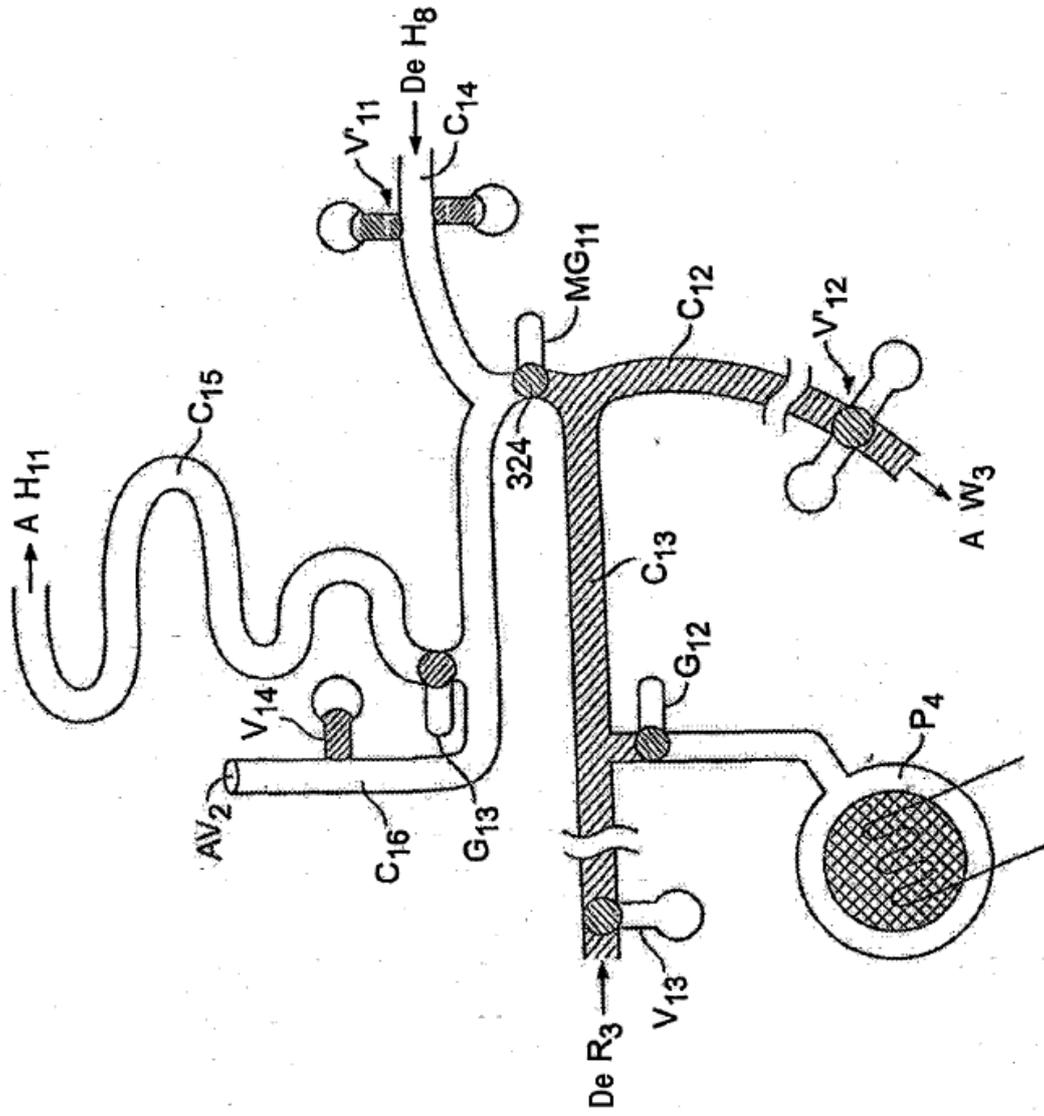


FIG. 10B

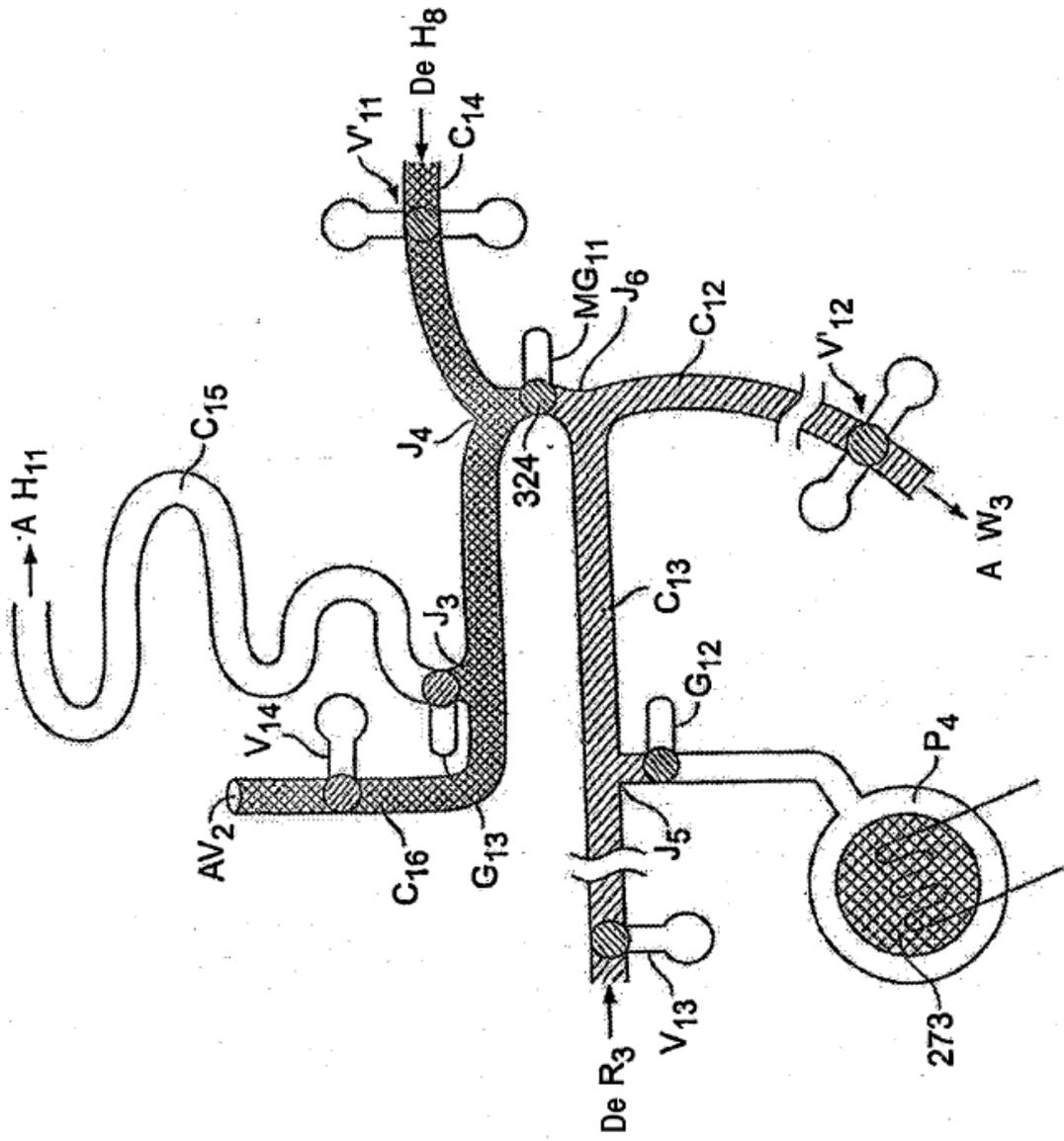


FIG. 10C

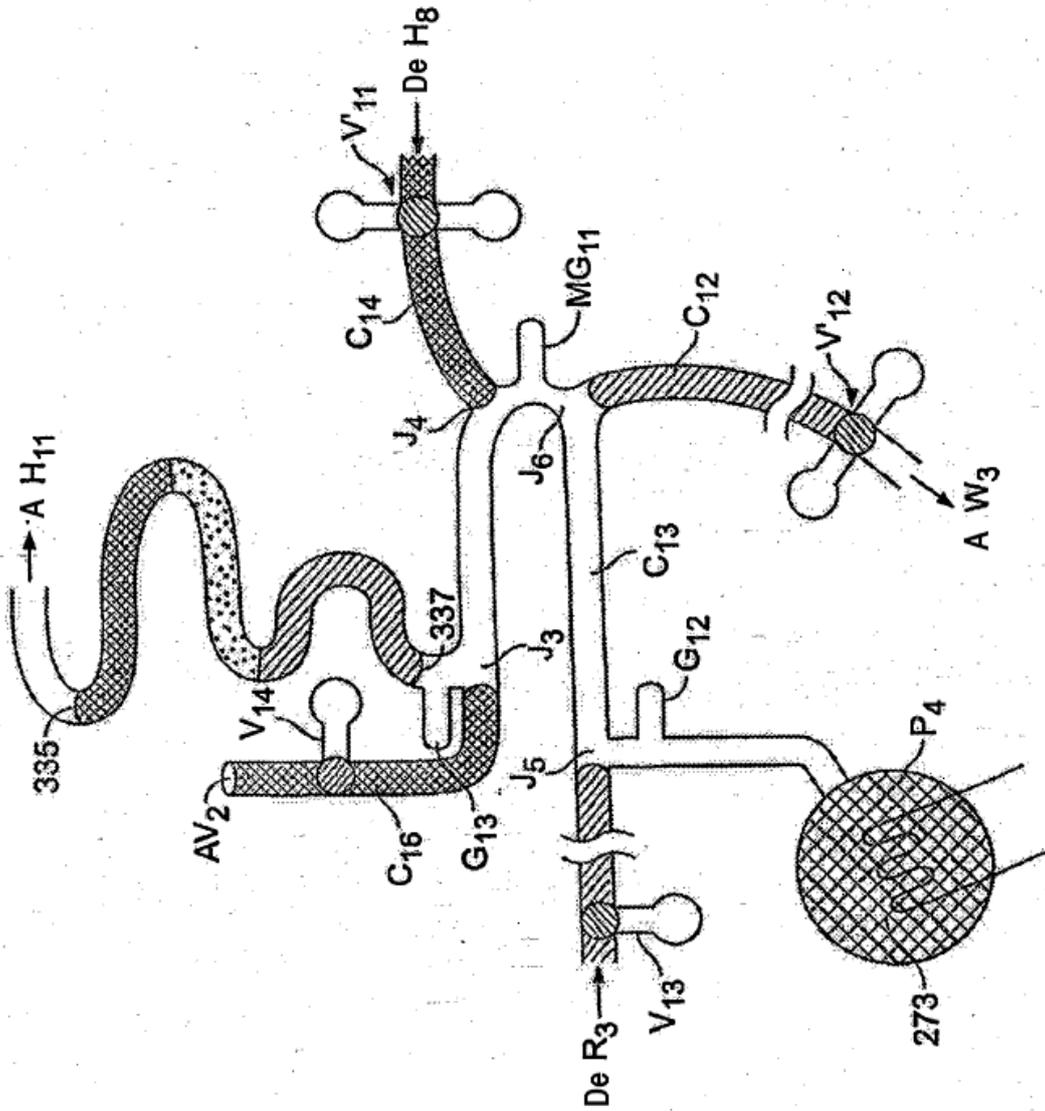


FIG. 10D

700

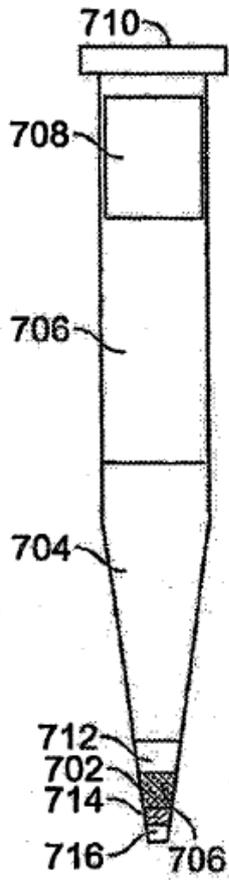


FIG. 11

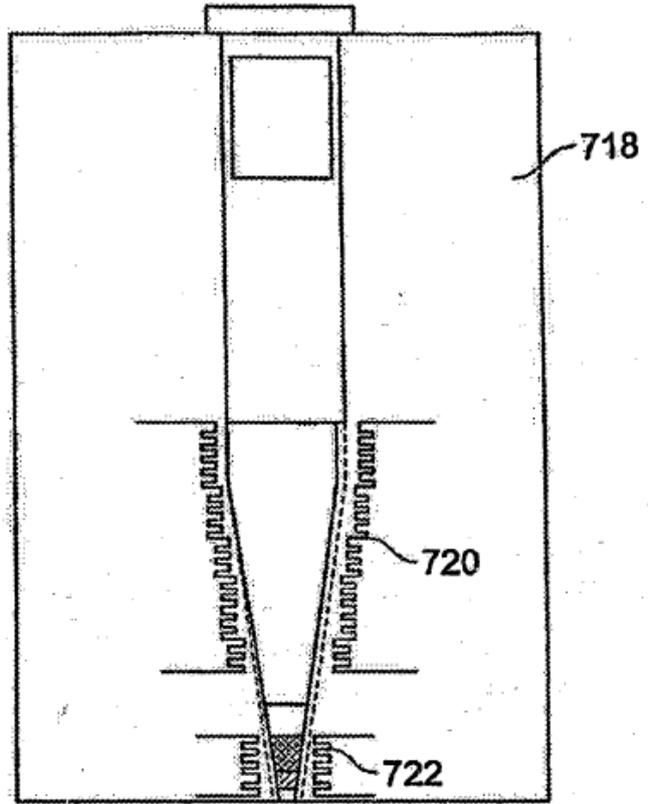


FIG. 12

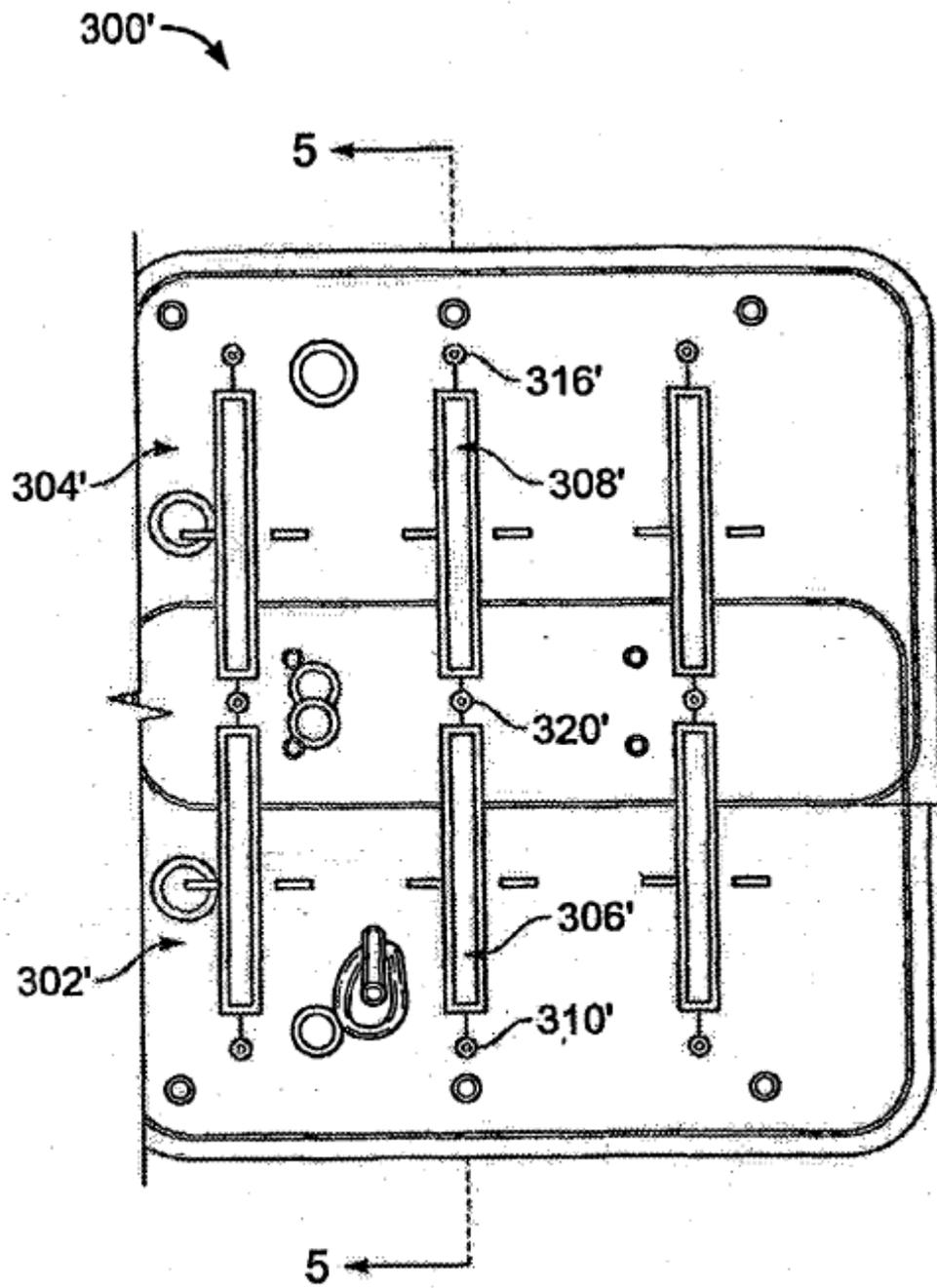


FIG. 13

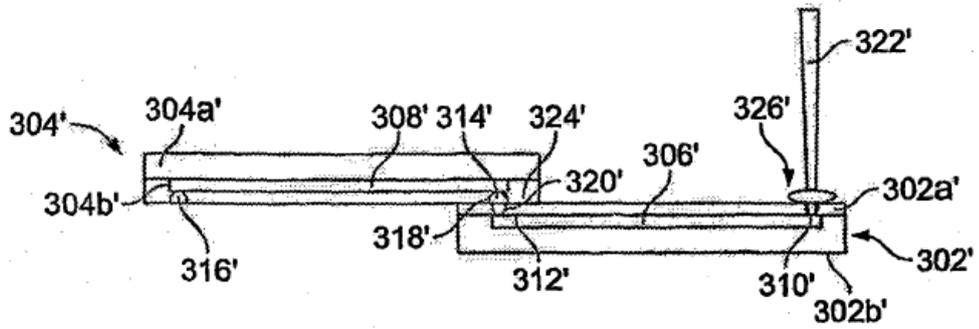


FIG. 14

Captura de ADN por Perlas de Poli-L-Lisina

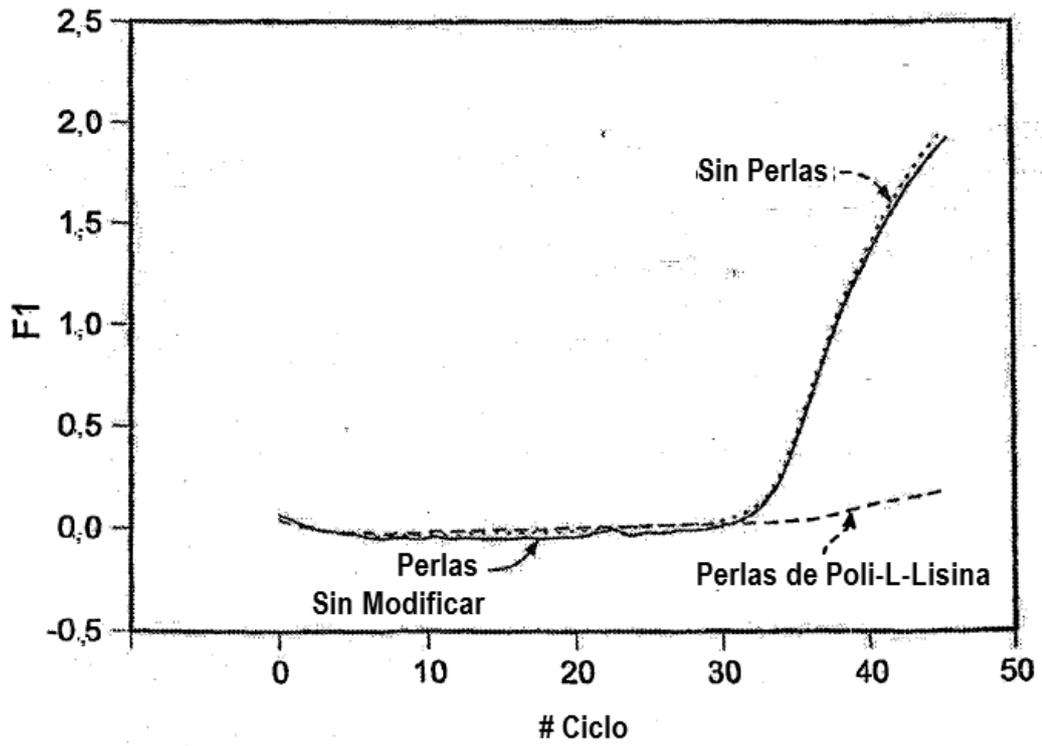


FIG. 15

Captura en Microplaca y Liberación de los Filtros PLL
(ADN de GBS en Cultivo)

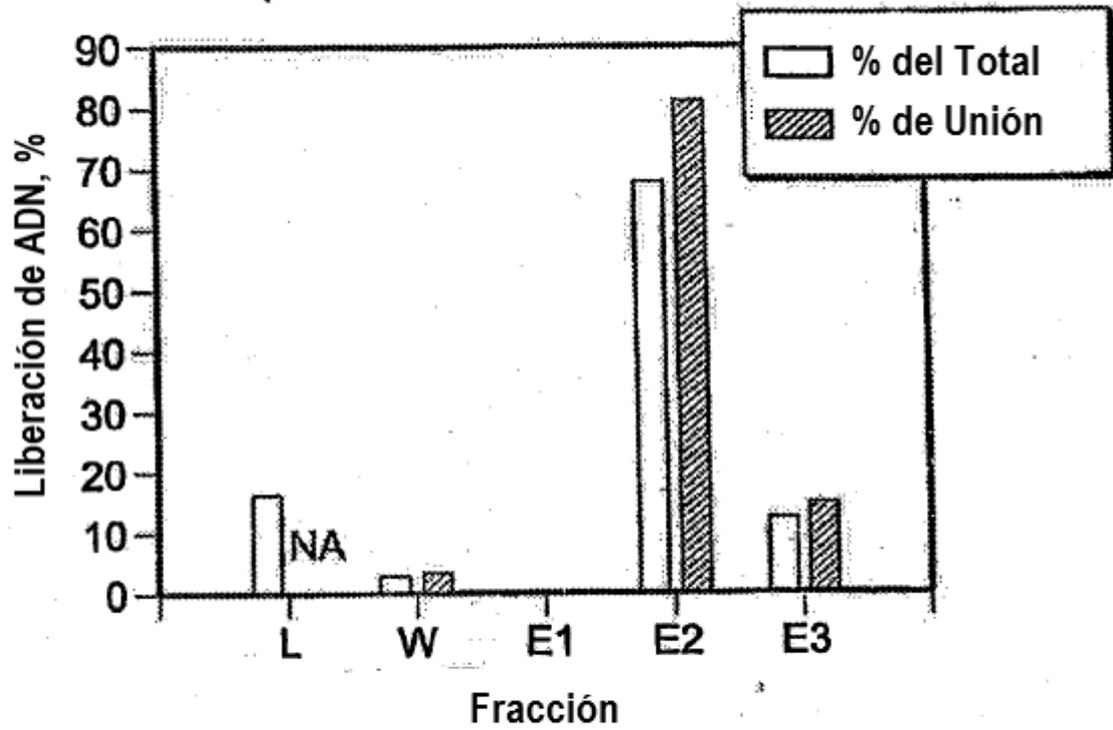


FIG. 16

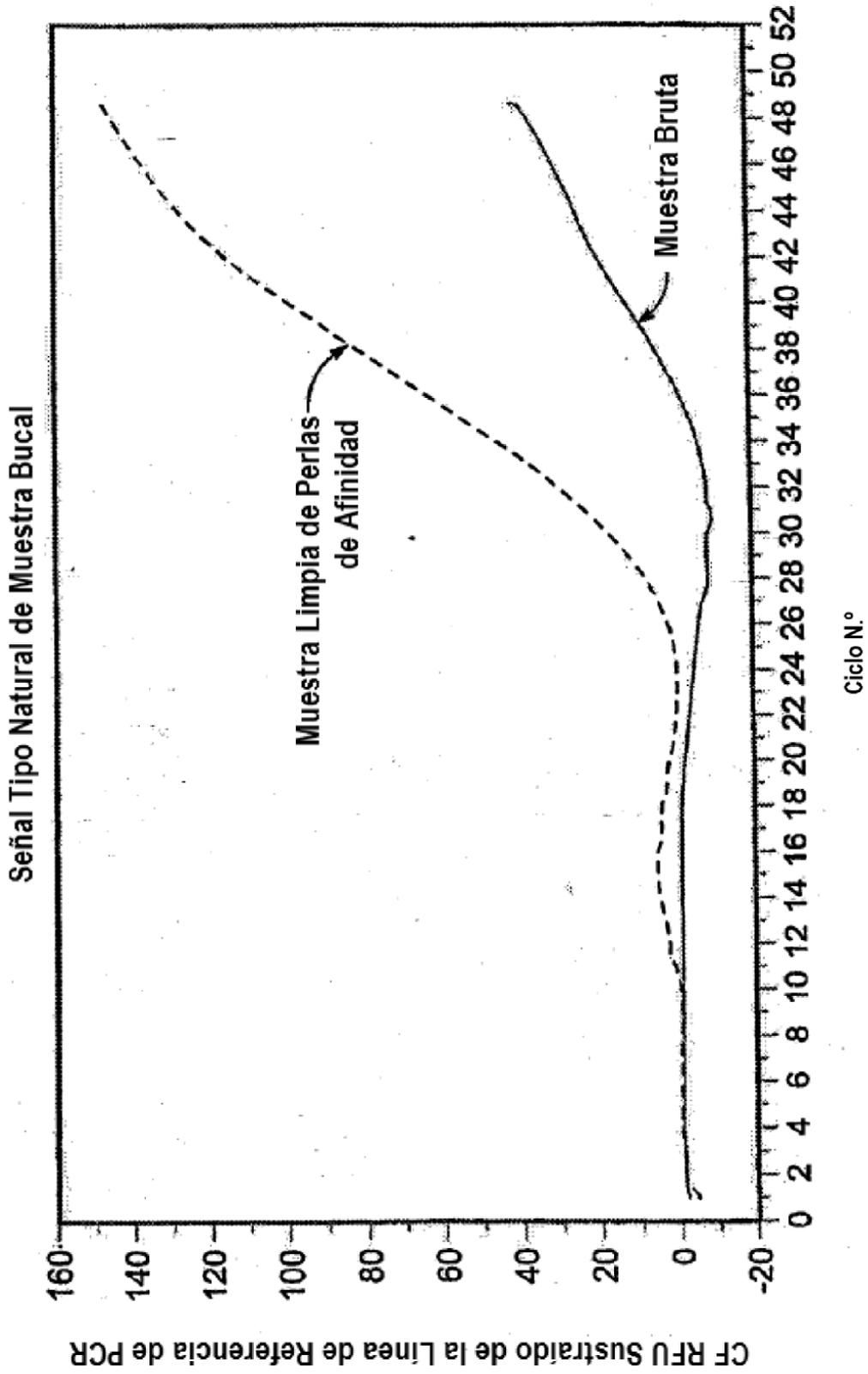
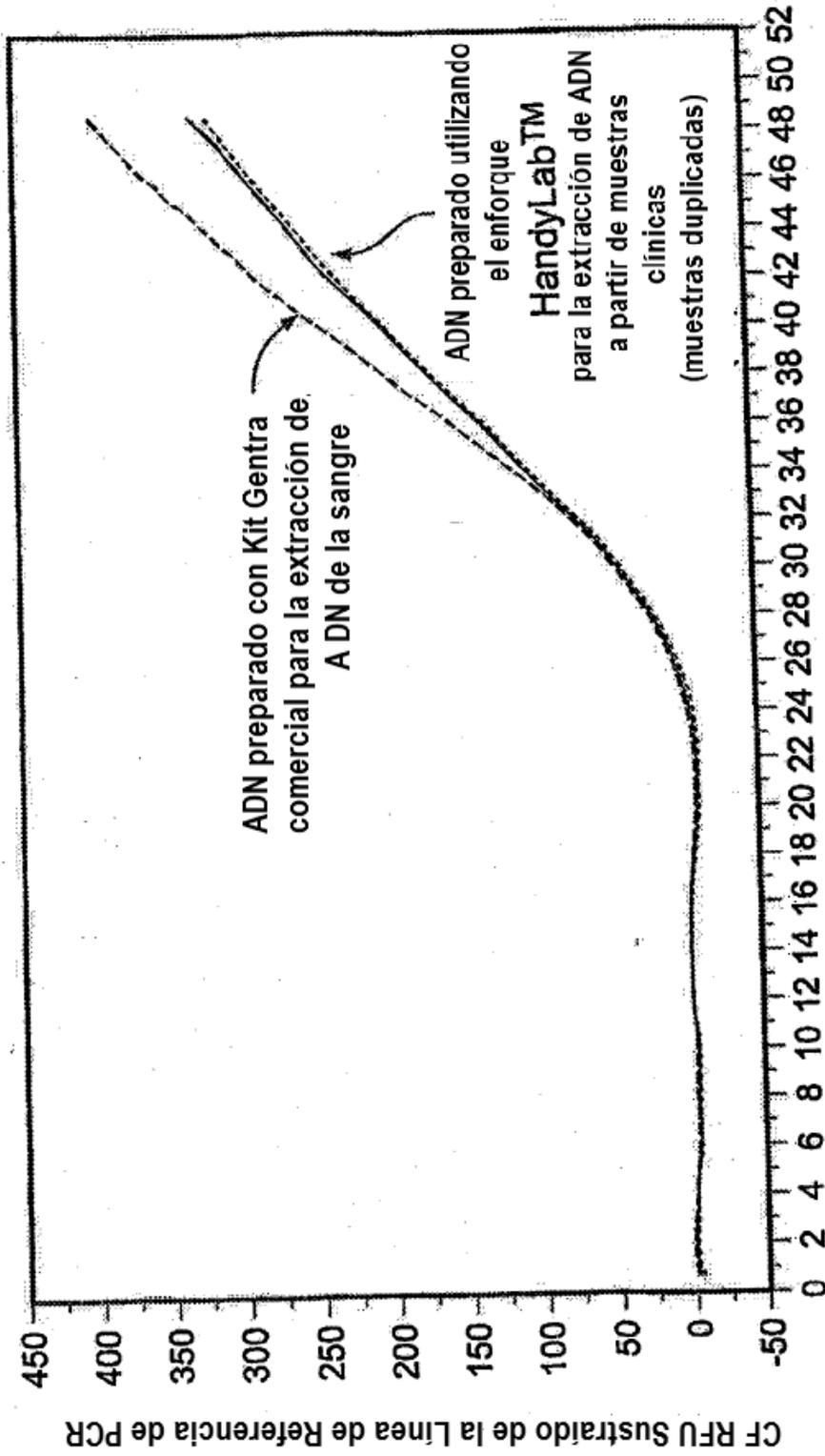


FIG. 17



Ciclo

FIG. 18

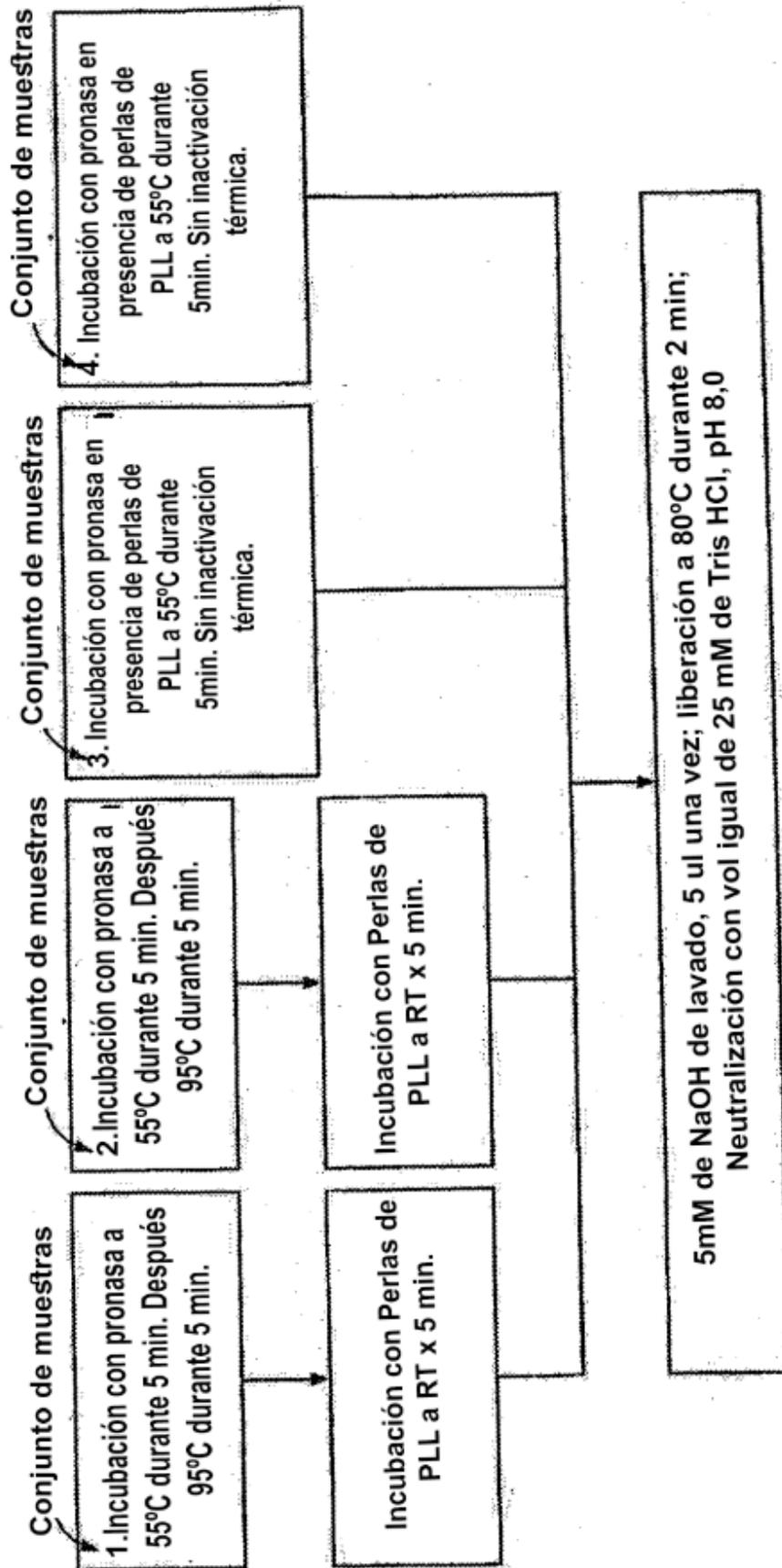


FIG. 19A

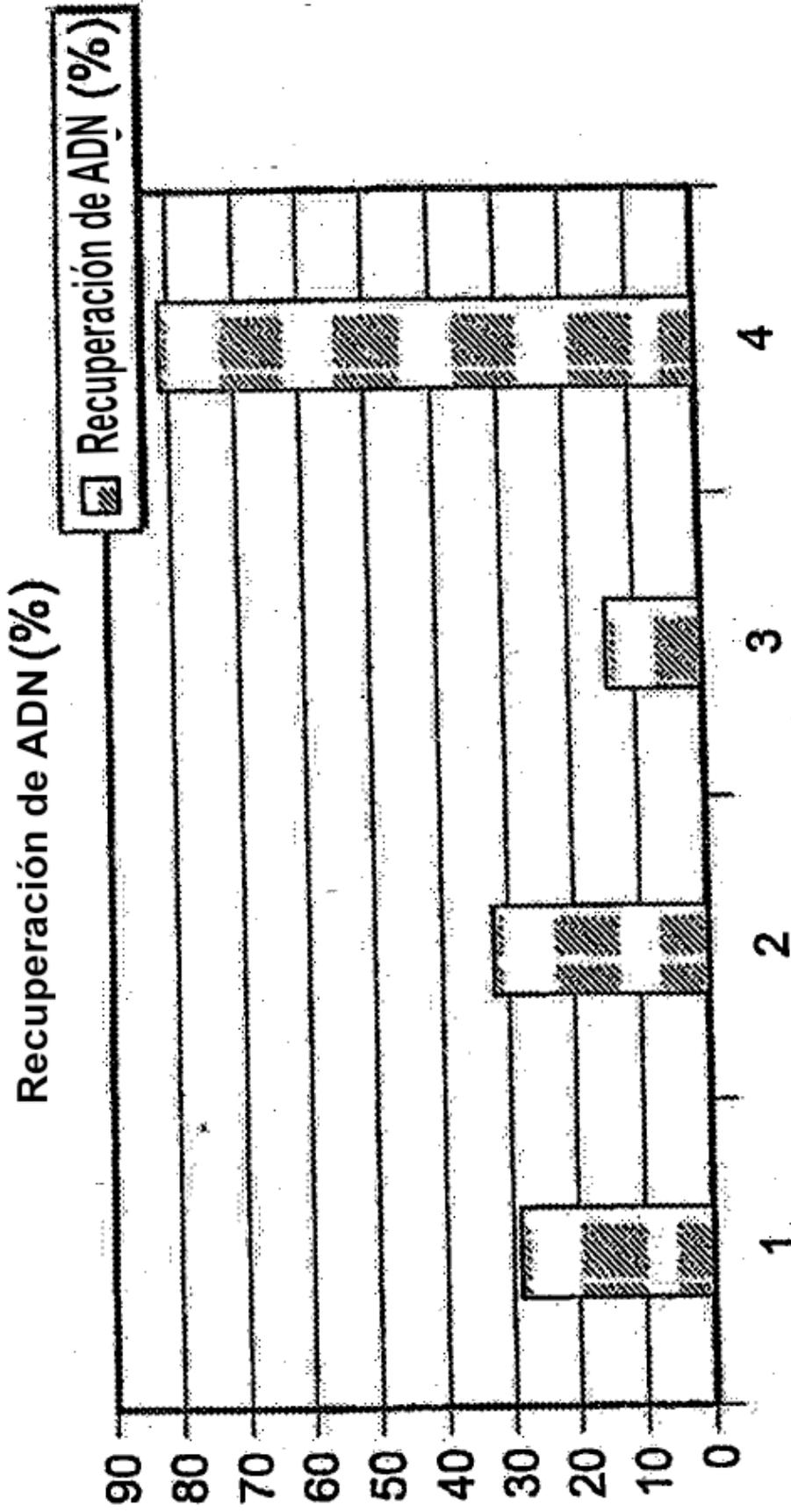


FIG. 19B