

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 015**

51 Int. Cl.:

G01N 33/487 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2016 E 16159932 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 3073264**

54 Título: **Procedimiento para la operativa de un dispositivo de secuenciación**

30 Prioridad:

25.03.2015 DE 102015205435

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

31.01.2018

73 Titular/es:

ROBERT BOSCH GMBH (100.0%)

Postfach 30 02 20

70442 Stuttgart, DE

72 Inventor/es:

HOFFMANN, JOCHEN y

LEMUTH, KARIN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 652 015 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la operativa de un dispositivo de secuenciación

Estado de la técnica

5 La presente invención se basa en un procedimiento según el género de la reivindicación independiente. La decodificación del código genético recibe también el nombre de secuenciación de ADN y se emplea ampliamente en ciencia, medicina y en la medicina forense. Hasta ahora, es imprescindible para la secuenciación realizar una amplia preparación de las muestras, como lisis y purificación, para obtener ácidos nucleicos suficientemente puros para la secuenciación.

10 De los documentos US 2010/0292101, US 2006/0240543 A1 y DE 10 2013 217 694 A1 se conocen unos dispositivos y procedimientos microfluídicos para el análisis de moléculas o células.

Descripción de la invención

15 Ante estos antecedentes, con el planteamiento aquí presentado se presenta un procedimiento para la operativa de un dispositivo de secuenciación conforme a la reivindicación principal. Mediante las medidas mencionadas en las reivindicaciones dependientes son posibles perfeccionamientos y mejoras ventajosas del procedimiento expuesto en la reivindicación independiente.

Se utiliza un dispositivo de secuenciación que presenta al menos un canal de secuenciación, que conecta fluidicamente una primera ranura a una segunda ranura, en donde el canal de secuenciación en la zona de la primera ranura está configurado como una cavidad y en la zona de la segunda ranura está configurado como un poro, en donde el poro presenta una sección transversal menor que la cavidad.

20 Por dispositivo de secuenciación puede entenderse un dispositivo para determinar una secuencia de ADN. La secuencia de ADN puede analizarse mediante una instalación de análisis convencional. Una ranura puede ser un canal para guiar un medio o para guiar varios medios. La primera ranura puede estar configurada en particular mediante una separación entre un cuerpo base del dispositivo y un primer sustrato plano. La segunda ranura puede estar configurada mediante una separación entre el cuerpo base y un segundo sustrato plano. A este respecto los
25 sustratos pueden estar dispuestos en lados opuestos del cuerpo base. Los sustratos pueden estar dispuestos fundamentalmente en paralelo unos respecto a los otros. Un canal de secuenciación puede atravesar o abrir el cuerpo base. Una cavidad puede recibir el nombre de depresión (ancha) en un cuerpo base con un paso fluido en el poro (estrecho), en donde el poro también forma una abertura del cuerpo base. La cavidad puede recibir también el nombre de pocillo. La sección transversal del poro es (bastante) menor que la sección transversal de la cavidad,
30 por ejemplo en un orden de magnitud menor que la sección transversal de la cavidad. Por sección transversal puede entenderse de forma visible una superficie de sección transversal o una separación entre dos bordes opuestos de la cavidad y/o del poro en la zona de la formación de la sección transversal. La sección transversal puede conformar también un diámetro del canal de secuenciación, si el canal de secuenciación presenta una superficie base circular. El poro puede presentar a este respecto una longitud que se corresponda fundamentalmente con una profundidad
35 de la cavidad.

En el caso del de secuenciación mono-molecular, el modo de ejemplo aquí utilizado, puede prescindirse de una amplificación clonal de las moléculas de ADN o ácidos nucleicos a secuenciar, con lo que no se produce ningún sesgo en la secuenciación (del inglés sequencing-bias). Del mismo modo no se precisa ninguna amplificación en puente (del inglés bridge-amplification). Además de esto puede prescindirse de una laboriosa preparación de
40 muestras.

Se utiliza un entorno micro-fluídico, que hace posible disgregar individualmente células de una solución de muestras, purificar ADN y secuenciar individualmente el mismo directamente a continuación en poros posconectados.

45 El sistema aquí utilizado hace posible una verdadera secuenciación de células aisladas. De este modo se hace posible, mediante la utilización de varios canales de secuenciación, determinar la heterogeneidad genética de una solución de muestras que contenga células. Se obtiene una elevada sensibilidad de todo el sistema, ya que puede prescindirse de una purificación por ejemplo a través de una columna, con elevadas pérdidas de purificación en el caso de pequeñas concentraciones de ADN.

50 El sistema aquí utilizado permite además el análisis de unas cantidades de células mínimas, ya que cada célula puede disgregarse por sí misma en un pocillo del conjunto de la matriz (del inglés array) de micro-pocillos y alimentarse a la secuenciación de nano-poros.

Ya no se necesita una purificación de muestras específica para una secuenciación, y todos los pasos individuales o procedimientos individuales pueden reproducirse y llevarse a cabo en un único entorno micro-fluídico. De este modo descienden la propensión a las averías de todo el sistema y la complejidad temporal.

5 En el sistema aquí utilizado queda descartada una contaminación de ADN foráneo del ADN a analizar o de las células a secuenciar, ya que las lisis celulares se alimentan de forma automatizada e integrada en el verdadero proceso de secuenciación, con lo que se evitan transmisiones de ADN y contaminaciones, que podrían influir negativamente en el resultado de la secuenciación.

10 La cavidad puede estar configurada para alojar una única célula. Para ello la cavidad puede ser tan pequeña que encaje justo una única célula. La cavidad puede presentar en particular una sección transversal de entre un micrómetro y trescientos micrómetros. La cavidad puede presentar en particular una sección transversal de entre tres micrómetros y 30 micrómetros.

15 La primera ranura y alternativa o complementariamente la segunda ranura pueden presentar una anchura de ranura de entre dos micrómetros y un milímetro. La primera ranura y alternativa o complementariamente la segunda ranura pueden presentar en particular una anchura de ranura de entre cinco micrómetros y 500 micrómetros. En función de los medios utilizados para preparar la secuenciación y para la propia secuenciación puede adaptarse la anchura de ranura. La anchura de ranura puede estar optimizada para un flujo laminar en las ranuras. En el poro puede estar dispuesto un tramo de la electroforesis. De este modo el dispositivo de secuenciación aquí presentado puede utilizarse directamente para una electroforesis.

20 El dispositivo de secuenciación puede presentar al menos otro canal de secuenciación. En particular puede estar dispuesto un gran número de canales de secuenciación formando una matriz. La matriz puede presentar en particular una densidad de entre 1×10^3 y 25×10^6 canales de secuenciación por centímetro cuadrado. Mediante muchos canales de secuenciación pueden llevarse a cabo simultáneamente muchas secuenciaciones. Conforme a la invención se presenta un procedimiento para la operativa de un dispositivo de secuenciación micro-fluídico, que presenta al menos un canal de secuenciación micro-fluídico, que conecta una primera ranura micro-fluídica a una
25 segunda ranura micro-fluídica, en donde el canal de secuenciación está configurado en la zona de la primera ranura como una cavidad y está configurado en la zona de la segunda ranura como un poro, en donde el poro presenta una sección transversal menor que la cavidad, en donde el procedimiento presenta los pasos siguientes:

alimentación de una solución de muestras en la primera ranura, para introducir una célula en la cavidad;

lisis de la célula en sus componentes celulares, para liberar ADN celular de la célula;

30 lavado de la primera ranura, para extraer de la cavidad y/o de la primera ranura componentes celulares indeseados de la célula y aislar el ADN en la cavidad;

llenado de la primera ranura y de la segunda ranura con un tampón de secuenciación; y

secuenciación del ADN en el poro.

Como solución de muestras puede alimentarse una solución acuosa, que contenga células.

35 En el paso de la alimentación puede llevarse a cabo además una centrifugación, una sedimentación y alternativa o complementariamente un tratamiento de vacío, para introducir la célula en la cavidad. De este modo las células aisladas pueden secuenciarse con disolución local y acelerarse el proceso de secuenciación.

40 En el paso de la lisis puede llevarse a cabo p.ej. una lisis química, una lisis enzimática, una lisis eléctrica, una lisis ultrasónica y alternativa o complementariamente una lisis térmica, para liberar el ADN celular. En el dispositivo de secuenciación aquí presentado puede llevarse a cabo y/o combinarse diferentes procedimientos de lisis. De esta forma pueden lisarse diferentes células.

En el paso de la lisis puede introducirse una fase orgánica (es decir un líquido) en la primera ranura. La fase orgánica puede introducirse en particular con un flujo laminar en la primera ranura. La fase orgánica puede presentar una solubilidad reducida en la solución acuosa. Mediante un flujo laminar pueden evitarse arremolinamientos.

45 En el paso del lavado puede introducirse un líquido de lavado en la primera ranura. El líquido de lavado puede introducirse en particular con un flujo laminar en la primera ranura. El líquido de lavado puede extraer o desplazar bien un líquido de lisis. El propio líquido de lavado puede extraerse bien de la ranura. Mediante el flujo laminar pueden evitarse arremolinamientos.

En el paso de la secuenciación puede aplicarse una tensión eléctrica entre un primer sustrato, que delimita la primera ranura, y un segundo sustrato que delimita la segunda ranura. Mediante un campo eléctrico resultante puede secuenciarse el ADN utilizando la electroforesis.

5 Este procedimiento puede implementarse por ejemplo en software o hardware o en una forma mixta entre software y hardware, por ejemplo en un aparato de control.

En los dibujos se han representado unos ejemplos de realización de la invención, que se explican con más detalle en la siguiente descripción. Aquí muestran:

la fig. 1 una exposición de un dispositivo de secuenciación;

10 la fig. 2 un diagrama de desarrollo de un procedimiento para la operativa de un dispositivo de secuenciación conforme a un ejemplo de realización;

la fig. 3 una exposición de una alimentación de una solución de muestras en un dispositivo de secuenciación conforme a un ejemplo de realización;

la fig. 4 una exposición de una lisis de células en un dispositivo de secuenciación conforme a un ejemplo de realización;

15 la fig. 5 una exposición de ADN aislado en un dispositivo de secuenciación conforme a un ejemplo de realización; y

la fig. 6 una exposición de una secuenciación de ADN en un dispositivo de secuenciación conforme a un ejemplo de realización.

20 En la siguiente descripción de unos ejemplos de realización favorables de la presente invención se utilizan, para los elementos representados en las diferentes figuras y que actúan de forma similar, unos símbolos de referencia iguales o similares, en donde se prescinde de una descripción repetida de estos elementos.

25 La fig. 1 muestra una exposición de un dispositivo de secuenciación 100. El dispositivo de secuenciación 100 presenta un gran número de canales de secuenciación 120. En el plano de exposición aquí elegido se han representado unos junto a otros un primer canal de secuenciación 102a, un segundo canal de secuenciación 102b, un tercer canal de secuenciación 102c, un cuarto canal de secuenciación 102d, un quinto canal de secuenciación 102e y un sexto canal de secuenciación 102f. Los canales de secuenciación 102 están contruidos de la misma forma. Los canales de secuenciación 102 están configurados en un cuerpo base 106 en forma de placa. Cada uno de los canales de secuenciación 102 representa una conexión fluídica entre una primera ranura 108 en un primer lado del cuerpo base 106 y una segunda ranura 110 en un segundo lado opuesto del cuerpo base 106.

30 El canal de secuenciación 102 está configurado en la zona de la primera ranura 108 como una cavidad 112. En la zona de la segunda 110 el canal de secuenciación 102 está configurado como un poro 114. A este respecto el poro 114 presenta una sección transversal (bastante) menor que la cavidad 112. La cavidad 112 está configurada en particular para alojar una única célula a secuenciar. Por ejemplo la sección transversal o el diámetro de la cavidad es de 100 a 100.000 veces mayor que la sección transversal o el diámetro del poro.

35 La primera ranura 108 está configurada entre el cuerpo base 106 y un sustrato de cubierta 116 y presenta una anchura de ranura, que está configurada para hacer posible un flujo laminar en la primera ranura 108.

La segunda ranura 110 está configurada aquí entre el cuerpo base 106 y un sustrato inferior 118. La segunda ranura 110 presenta también una anchura de ranura, que está configurada para hacer posible un flujo laminar o no laminar en la segunda ranura 108.

40 El sustrato de cubierta 116 presenta una primera conexión eléctrica 120 para el contactado eléctrico del sustrato de cubierta 116.

El sustrato inferior 118 presenta una segunda conexión eléctrica 122 para el contactado eléctrico del sustrato inferior 118.

Entre los dos contactos 120, 122 puede aplicarse una tensión eléctrica para generar un campo eléctrico entre el sustrato de cubierta 116 y el sustrato inferior 118.

45 Se ha representado una sección transversal mediante un híbrido 100 entre micro-pocillo y nanoporo. El conjunto de la matriz de micro-pocillos 104 presenta unas cavidades 112 abiertas hacia la superficie del conjunto de la matriz de

micro-pocillos 104. Las cavidades 112 pueden recibir el nombre de pocillos 112. Al lado inferior de los pocillos 112 se conecta respectivamente un poro 114 o nanoporo 114.

5 Entre la superficie del micro-pocillo y un sustrato de cubierta 116 existe una ranura micro-fluídica 108 con unas dimensiones de entre dos y 1.000 μm , de forma preferida de cinco a 500 μm . Entre el lado inferior del conjunto de la matriz de micro-pocillos 104 y el sustrato inferior 118 existe también una ranura micro-fluídica 110 con unas dimensiones de entre dos y 1.000 μm , de forma preferida de cinco a 500 μm . La separación se ha elegido de tal manera que se favorece una circulación laminar. Entre el sustrato de cubierta 116 y el sustrato inferior 118 puede aplicarse un campo eléctrico.

10 En el caso del conjunto de la matriz de micro-pocillos 104 aquí presentado las dimensiones de un pocillo 112 pueden ser de entre 500 nm y 300 μm , de forma preferida entre un μm y 30 μm . La densidad del pocillo 112 en el conjunto de la matriz de micro-pocillos 104 puede ser de entre 1×10^3 y 25×10^6 pocillos por cm^2 .

El planteamiento aquí presentado puede utilizarse para sistemas analíticos, en particular para sistemas de laboratorio en chip (del inglés lab-on-chip) para el análisis del medio ambiente o la diagnosis médica.

15 La fig. 2 muestra un diagrama de desarrollo de un procedimiento 200 para la operativa de un dispositivo de secuenciación conforme a un ejemplo de realización. El procedimiento 200 puede llevarse a cabo en un dispositivo de secuenciación, como se ha representado en la fig. 1. Para ello el dispositivo de secuenciación está conectado a un dispositivo para la operativa del dispositivo de secuenciación. El dispositivo de secuenciación está construido en particular como un cartucho de un solo uso, que está conectado al dispositivo a través de unos adaptadores para hacerlo funcionar.

20 El procedimiento 200 presenta un paso 202 de la alimentación, un paso 204 de la lisis, un paso 206 del lavado, un paso 208 del llenado y un paso 210 de la secuenciación. En el paso 202 de la alimentación se inserta una solución de muestras en la primera ranura, para introducir una célula aislada al menos en una de las cavidades. Por ejemplo para la alimentación se establece una baja presión en la primera ranura, para aspirar la solución de muestras en la primera ranura y con ello en las cavidades. La solución de muestras puede también introducirse a presión en la primera ranura mediante una sobrepresión. Alternativamente puede atraerse la solución de muestras hasta la ranura mediante una sobrepresión. En el paso 204 de la lisis se descompone la al menos una célula dentro de su cavidad en sus componentes celulares, para liberar ADN celular de la célula. La lisis puede realizarse de diferentes formas. En el paso 204 de la lisis puede llevarse a cabo por ejemplo una lisis química, una lisis enzimática, una lisis eléctrica, una lisis ultrasónica y alternativa o complementariamente una lisis térmica, para liberar el ADN celular. En el paso 206 del lavado se lava la primera ranura, para extraer de la cavidad y alternativa o complementariamente de la primera ranura componentes celulares indeseados de la célula y aislar el ADN en la cavidad. En particular puede conducirse un fluido de lavado a través de la primera ranura, que extrae selectivamente todos los componentes celulares menos el ADN desde la cavidad. En el paso 208 del llenado se llenan la primera ranura y de la segunda ranura con un tampón de secuenciación. Como en el paso 202 de la alimentación el tampón de secuenciación puede aspirarse, respectivamente atraerse y/o presionarse en la ranura. En el paso 210 de la secuenciación se secuencia el ADN en el poro.

En el paso 202 puede llevarse a cabo además una centrifugación, una sedimentación y alternativa o complementariamente un tratamiento de vacío, para introducir la célula en la cavidad.

40 La fig. 3 muestra una exposición de una centrifugación de una solución de muestras 300 en un dispositivo de secuenciación 100 conforme a un ejemplo de realización. El dispositivo de secuenciación 100 se corresponde a este respecto fundamentalmente con el dispositivo de secuenciación en la fig. 1. La alimentación representa un paso de un procedimiento para la operativa del dispositivo de secuenciación, como se describe en la fig. 2.

45 Aquí se inserta en la primera ranura 108 una solución acuosa 300, que contiene unas células 302. Las cavidades 112 se humedecen a este respecto igualmente con la solución acuosa 300. Mediante una centrifugación, una sedimentación y alternativa o complementariamente un tratamiento de vacío, se insertan las células 302 en las cavidades 112. En una cavidad 112 encaja a este respecto respectivamente solo una célula 302. De este modo se aíslan las células 302 individuales unas de las otras.

50 Se ha representado un ejemplo de realización para una limpieza o purificación del ADN celular. Aquí se emplea una extracción miniaturizada de fenol-cloroformo. Para ello se introducen las células 302 a analizar en agua, respectivamente una solución de muestras 300 que contiene las células 302 en el chip 100.

La fig. 4 muestra una exposición de una lisis de células 302 en un dispositivo de secuenciación 100 conforme a un ejemplo de realización. El dispositivo de secuenciación 100 se corresponde a este respecto fundamentalmente con el dispositivo de secuenciación de la fig. 1. La lisis representa un paso de un procedimiento para la operativa del dispositivo de secuenciación, como se ha descrito en la fig. 2.

5 A este respecto se llena la primera ranura 108 con un líquido de lisis 400. El líquido de lisis 400 produce una lisis de las células 302, con ello se descomponen las células en sus componentes celulares. Alternativamente las células pueden lisarse eléctricamente mediante la aplicación de un campo eléctrico entre 120 y 122. El líquido de lisis 400 penetra por ejemplo, a causa de su tensión superficial, solo de forma poca significativa en las cavidades 112. En cada una de las cavidades 112 permanece un resto de la solución acuosa 300.

10 A continuación de la introducción se llena la ranura micro-fluídica 108 con una fase orgánica 400, aquí fenol en una relación 1:1. El DNA, los fragmentos celulares y los cuerpos interiores celulares contenidos en la solución acuosa 300 se separan a causa de sus diferentes solubilidades. El DNA permanece en la solución acuosa 300, y todos los otros componentes se transforman mediante difusión en la fase orgánica 400. Mediante el enjuague a continuación de la fase orgánica 400, por ejemplo con cloroformo y alcohol isoamílico, por ejemplo en una relación de 24:1, se extraen estos componentes del chip 100.

En otras palabras, las figuras 3 y 4 muestran unas ilustraciones como estadios intermedios en un desarrollo de una preparación de muestras para una secuenciación de nanoporos conforme al planteamiento aquí presentado.

15 Para la preparación de muestras se inserta en la fig. 3 una solución de muestras, que contiene células, en la ranura micro-fluídica. Las células se introducen en los pocillos mediante centrifugación, sedimentación o apoyadas mediante un vacío. A continuación se realiza una lisis de las células en la fig. 4. Para ello pueden emplearse métodos conocidos, como una lisis química, una lisis enzimática, una lisis eléctrica, una lisis ultrasónica y alternativa y/o una lisis térmica.

20 La fig. 5 muestra una exposición del ADN aislado 500 en un dispositivo de secuenciación 100 conforme a un ejemplo de realización. El dispositivo de secuenciación 100 se corresponde con ello fundamentalmente con el dispositivo de secuenciación de la fig. 1. Aquí se extrae de la primera ranura 108 el líquido de lisis o un líquido de lavado de la fig. 4 introducido a continuación en la primera ranura 108. En cada cavidad 112 está dispuesto el resto de la solución acuosa 300 con el DNA 500.

25 Se ha representado el chip 100 después de la purificación. Aquí está disponible el ADN celular 500 en los respectivos pocillos 112, aislado en una solución acuosa 300.

La fig. 6 muestra una exposición de una secuenciación del ADN 500 en un dispositivo de secuenciación 100 conforme a un ejemplo de realización. El dispositivo de secuenciación 100 se corresponde a este respecto fundamentalmente con el dispositivo de secuenciación 1 de la fig. 1. La secuenciación representa un paso de un procedimiento para la operativa del dispositivo de secuenciación, como se describe en la fig. 2.

30 Aquí se ha introducido un medio de secuenciación 600 en la primera ranura 108 y la segunda ranura 110. Los poros 114 están también llenos del medio de secuenciación 600. En las cavidades 112 está dispuesta a este respecto en primer lugar la solución acuosa 300. La solución acuosa se mezcla mediante difusión con el medio de secuenciación. Como resultado de ello las cavidades están llenas del medio de secuenciación (la solución acuosa se ha extraído por dilución). Se ha conectado una fuente de corriente continua 602 entre las conexiones eléctricas 120, 122. De este modo se configura un campo eléctrico entre el sustrato de cubierta 116 y el sustrato inferior 118. El campo eléctrico atrae el ADN a través de los poros 114, en donde puede analizarse una velocidad de desplazamiento del ADN 500 o de partes del ADN 500 en el medio de secuenciación 600.

40 Se ha representado un ejemplo de realización de una secuenciación. Para ello se llenan las ranuras micro-fluídicas 108, 110 con un tampón de secuenciación 600. Los poros 114 presentan un tramo de electroforesis, por ejemplo el mismo tampón 600 con el que también están llenas las ranuras 108, 110 o un gel de agarosa.

Si se aplica una tensión al sustrato de cubierta 116 y al sustrato inferior 118, se conduce el ADN celular 500 de cada pocillo 112 a través de los poros 114 conectado a los pocillos 112.

45 La longitud de fragmento del ADN 500 y/o la detección con precisión de la base pueden realizarse con métodos conocidos. La detección puede realizarse por ejemplo eléctrica, electromecánica u ópticamente. En función del método de detección pueden emplearse diferentes tampones 600. Puede emplearse por ejemplo una solución salina 1M KCl con Tris-HCl 10mM y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1mM, pH 8.0 a temperatura ambiente o una solución 3M KCl pH 10.4, con 1mM EDTA para la detección eléctrica mediante un nanoporo de estado sólido.

50 Si un ejemplo de realización comprende un enlace "y/o" entre una primera característica y una segunda característica, esto debe leerse de tal manera que el ejemplo de realización conforme a una primera forma de realización presente tanto la primera característica como la segunda característica y, conforme a otra forma de realización, solo la primera característica o bien solo la segunda característica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento (200) para la operativa de un dispositivo de secuenciación (100) micro-fluídico, que presenta al menos un canal de secuenciación (102) micro-fluídico, que conecta fluídicamente una primera ranura (108) micro-fluídica a una segunda ranura (110) micro-fluídica, en donde el canal de secuenciación (102) en la zona de la primera ranura (108) está configurado como una cavidad (112) y en la zona de la segunda ranura (110) está configurado como un poro (114), en donde el poro (114) presenta una sección transversal menor que la cavidad (112), en donde el procedimiento (200) presenta los pasos siguientes:
- alimentación (202) de una solución de muestras (300) en la primera ranura (108), para introducir una célula (302) en la cavidad (112);
- 10 lisis (204) de la célula (302) en sus componentes celulares, para liberar ADN celular (500) de la célula (302);
- lavado (206) de la primera ranura (108), para extraer de la cavidad (112) y/o de la primera ranura (108) componentes celulares indeseados de la célula (302) y aislar el ADN (500) en la cavidad (112);
- llenado (208) de la primera ranura (108) y de la segunda ranura (110) con un tampón de secuenciación (600); y
- secuenciación (210) del ADN (500) en el poro (114).
- 15 2. Procedimiento (200) conforme a la reivindicación 1, en el que en el paso (202) de la alimentación como solución acuosa (300) puede alimentarse una solución acuosa (300), que contenga células (302).
3. Procedimiento (200) conforme a una de las reivindicaciones anteriores, en el que en el paso de la alimentación (202) se lleva a cabo además una centrifugación, una sedimentación y/o un tratamiento de vacío, para introducir la célula (302) en la cavidad (102).
- 20 4. Procedimiento (200) conforme a una de las reivindicaciones anteriores, en el que en el paso (204) de la lisis se lleva a cabo una lisis química, una lisis enzimática, una lisis eléctrica, una lisis ultrasónica y/o una lisis térmica, para liberar el ADN celular (500).
5. Procedimiento (200) conforme a una de las reivindicaciones anteriores, en el que en el paso (204) de la lisis se introduce una fase orgánica (300) en la primera ranura (108), en particular con un flujo laminar en la primera ranura (108).
- 25 6. Procedimiento (200) conforme a una de las reivindicaciones anteriores, en el que en el paso (206) del lavado se introduce un líquido de lavado en la primera ranura (108), en donde el líquido de lavado se introduce en particular con un flujo laminar en la primera ranura (108).
- 30 7. Procedimiento (200) conforme a una de las reivindicaciones anteriores, en el que en el paso de la secuenciación se aplica una tensión eléctrica entre un primer sustrato (116), que delimita la primera ranura (108), y un segundo sustrato (118) que delimita la segunda ranura (110), para secuenciar el ADN (500) en el poro (114).

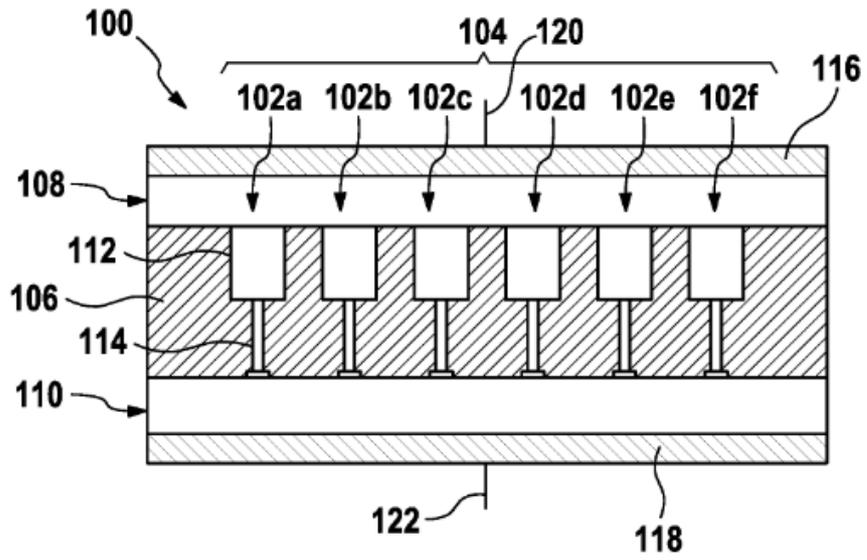


FIG. 1

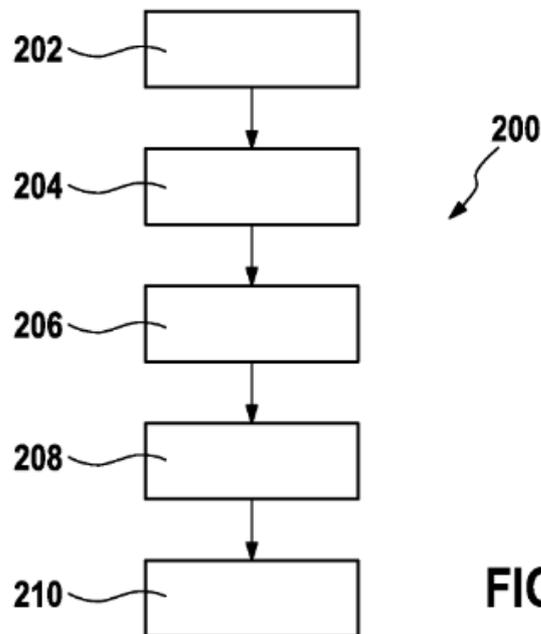


FIG. 2

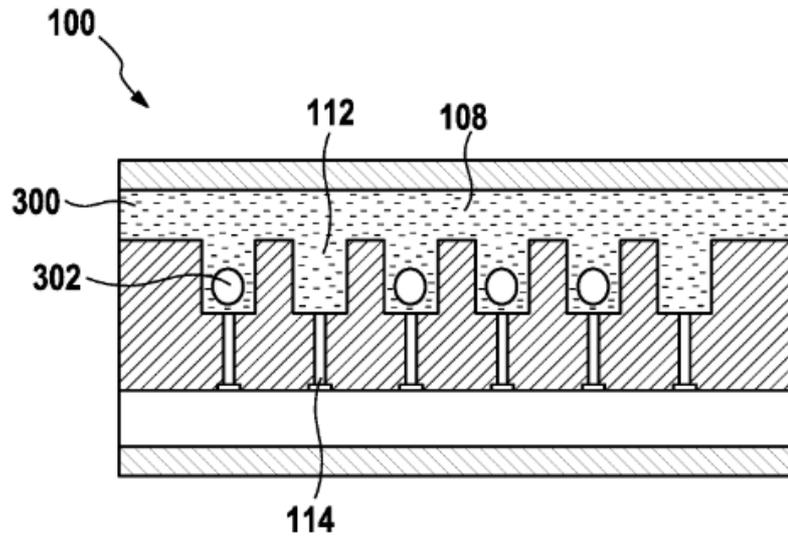


FIG. 3

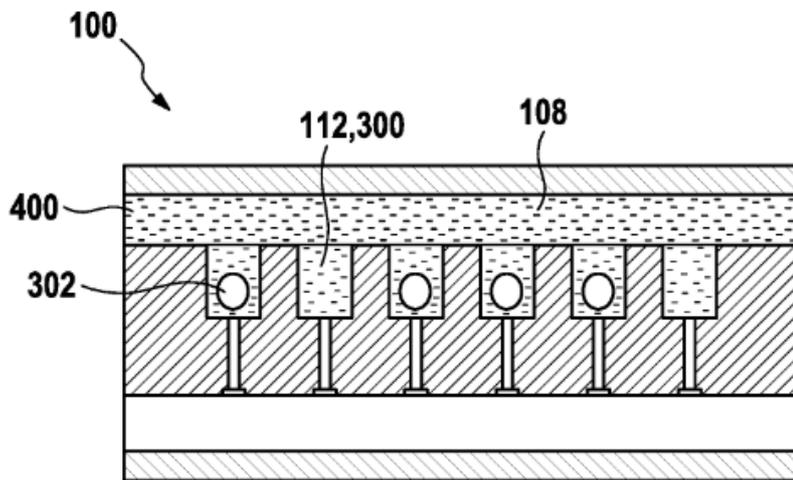


FIG. 4

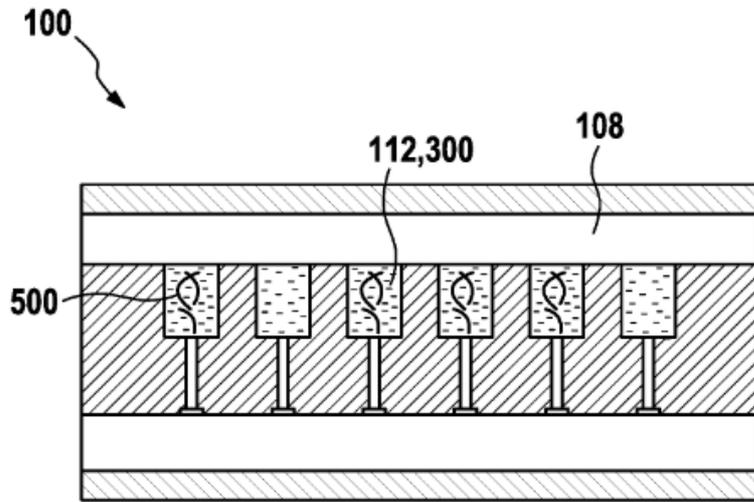


FIG. 5

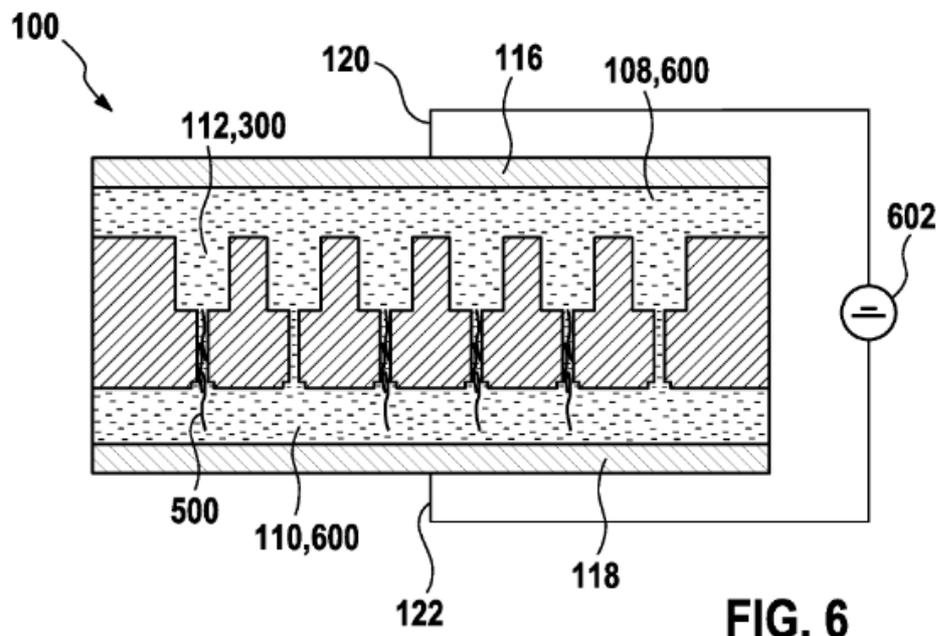


FIG. 6