

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 386**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B01L 7/00 (2006.01)

C12Q 1/6825 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2016 PCT/EP2016/000259**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2016 WO16131538**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2016 E 16706800 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3259063**

54 Título: **Cartucho microfluídico para la detección de biomoléculas**

30 Prioridad:

20.02.2015 DE 102015001998

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

05.12.2019

73 Titular/es:

**FRIZ BIOCHEM GESELLSCHAFT FÜR
BIOANALYTIK MBH (100.0%)
Floriansbogen 2-4
82061 Neuried, DE**

72 Inventor/es:

**HARTWICH, GERHARD;
PERSIKE, NORBERT y
JOHNSEN, PHILIP**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 734 386 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

Cartucho microfluídico para la detección de biomoléculas

La invención se refiere a un cartucho microfluídico para la detección de biomoléculas en una solución de muestra y a un procedimiento de detección asociado.

- 5 Numerosos interrogantes de la investigación y diagnóstico en biología molecular requieren la determinación de la cantidad o la concentración de biomoléculas específicas, por ejemplo, ciertos ácidos nucleicos en una muestra. En el contexto de esta descripción el término ácido nucleico también abarca secuencias de ácido nucleico.

10 Los procedimientos de detección eficientes y rápidos emplean una tecnología de matriz que usa los llamados chips de ADN, que permiten una detección sensible en superficie de los eventos de hibridación de oligómeros de ácido nucleico. A menudo, la detección real, ya en si altamente sensible, está precedida por una etapa de amplificación en la que los ácidos nucleicos a detectar se reproducen de manera que finalmente están presentes en una concentración que se encuentra por encima del límite de detección del procedimiento de detección seleccionado.

15 Para tal amplificación específica de ácidos nucleicos, se conocen diversos procedimientos en el estado de la técnica, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se usa en casi todas las áreas de la ciencia y la medicina, incluida la medicina forense, el diagnóstico prenatal, la oncología y, no menos importante, el diagnóstico microbiológico. La PCR es una reacción enzimática para la amplificación de ácidos nucleicos, que se desarrolla esencialmente en una mezcla de reacción acuosa o líquida con volúmenes muy pequeños. En la mezcla de reacción se encuentra una muestra que contiene ácido nucleico y los cebadores, nucleótidos y una polimerasa que también son necesarios para la reacción. Añadiendo reguladores de pH y preferiblemente iones divalentes, la mezcla de reacción se ajusta para que prevalezcan las condiciones de reacción óptimas para el tipo de aplicación respectivo.

20 La PCR se basa en un ciclo de repetición múltiple de tres pasos de desnaturalización, hibridación y extensión que transcurren a diferentes temperaturas. En cada ciclo, la cantidad de ácidos nucleicos que se amplifican se duplica aproximadamente, de modo que se puede lograr una amplificación significativa con un pequeño número de ciclos. Para más detalles y antecedentes sobre la PCR en general, sobre la PCR en tiempo real, en la que se determina la cantidad de ácido nucleico mientras transcurre la reacción de la PCR, y sobre los procedimientos preferidos para la detección electroquímica de los eventos de hibridación de oligómeros de ácido nucleico en las secciones de ensayo de un chip de ADN, se hace referencia a la publicación DE 10 2011 056 606 B3 de la solicitante.

Un dispositivo microfluídico para tratar biopartículas se conoce, por ejemplo, por la publicación DE 10 2010 043 030 A1 y la publicación US 2013/0137591 A1.

- 30 A partir de esto, el objetivo fundamental de la invención es proporcionar un dispositivo microfluídico que sea económico de fabricar y permita una detección de biomoléculas simple y rápida.

Este objeto se resuelve con las características de las reivindicaciones independientes. Otros desarrollos de la invención son objeto de las reivindicaciones dependientes.

35 La invención proporciona un cartucho microfluídico para la detección de biomoléculas en una solución de muestra, con

- una cámara de detección, a la que se puede suministrar la solución de muestra a través de un canal de suministro, y de la cual se puede derivar la solución de muestra examinada a través de un canal de salida,

40 -un microchip basado en tecnología CMOS que tiene una zona de sensor dispuesta en la cámara de detección y un área de contacto separada de la cámara de detección de una manera hermética a los líquidos, que se separa de la cámara de detección de una manera hermética a los líquidos por medio de un anillo de goma o un anillo de masa de relleno circunferencial,

- donde la zona del sensor del microchip contiene una matriz de sitios de ensayo funcionalizados para la detección electroquímica de biomoléculas en la solución de muestra, y

45 - cada sitio de ensayo de la zona del sensor está equipado con un modulador sigma-delta propio para la conversión analógica-digital de señales eléctricas generadas en los sitios de ensayo durante la detección electroquímica.

50 Los moduladores sigma-delta son preferiblemente moduladores sigma-delta de primer orden que, como una señal digitalizada, suministran un flujo de bits que es insensible al ruido y la diafonía. Se entiende que el flujo de bits proporcionado por los moduladores sigma-delta sigue tratándose adecuadamente para la conversión completa de analógico-digital de acuerdo con los principios de la técnica sigma-delta para proporcionar las señales de salida convertidas en los sitios de contacto de la zona de contacto.

En un desarrollo de la invención, el cartucho microfluídico tiene además una cámara de reacción, principalmente para la amplificación de ácidos nucleicos en la solución de muestra, desde la cual la solución de muestra se puede suministrar a la cámara de detección a través del canal de suministro.

5 Preferiblemente, la solución de la muestra en la cámara de reacción puede calentarse a una temperatura de referencia cercana a sus puntos de ebullición normales y la cámara de reacción se conecta a través de un canal de compensación de manera fluida con una cámara de presión libre de líquido en la funcionamiento normal, que puede calentarse a una temperatura por encima del punto de ebullición normal de la solución de muestra, y que está diseñado para evaporar una cantidad de líquido de muestra empujado por burbujas de gas en la solución de muestra a través del canal de compensación a la cámara de presión y, de esta manera, generar una contrapresión de
10 reducción de burbujas de gas sobre la solución de muestra presente en la cámara de reacción.

El cartucho microfluídico también tiene ventajosamente un dispositivo de bombeo integrado que está en unión fluida con la cámara de reacción y la cámara de detección y que está configurado para transferir la solución de muestra a la cámara de reacción y de allí en volúmenes definidos de solución de muestra a la cámara de detección. El dispositivo de bombeo está ventajosamente configurado además para suministrar un líquido de trabajo puesto en el
15 dispositivo de bombeo a un sistema de muestras externo y, después de enriquecer el líquido de trabajo con biomoléculas que van a detectarse en el sistema de muestras externo, devolver la solución de muestra así formada al cartucho, principalmente a la cámara de reacción y desde allí, en volúmenes predeterminados de solución de muestra, a la cámara de detección.

De modo conveniente, el cartucho microfluídico está equipado con una conexión para un sistema de muestras externo, que está diseñado principalmente como una conexión Luer. Una conexión Luer es un sistema de conexión estandarizado para sistemas de tubos en el sector médico en el que el sellado de la conexión se logra mediante un diseño cónico de las piezas de conexión, el llamado cono Luer. El cono Luer puede tener una rosca con una tuerca de unión para asegurar la unión y también se denomina cierre Luer. La conexión se cierra y se abre con media vuelta. El término conector Luer también incluye la unión segura a través de un cierre Luer.

25 En el cartucho microfluídico, se forma ventajosamente un sistema de microcanales, que se extiende desde el dispositivo de bombeo a través de la cámara de detección y la cámara de reacción hasta la conexión para el sistema de muestras externo. Los microcanales o canales microfluídicos tienen en el contexto de esta solicitud, principalmente, un diámetro o una extensión transversal máxima de 0,5 mm a 3,2 mm.

Para permitir que se lleve a cabo una PCR en una cámara de reacción del cartucho, el cartucho microfluídico, incluido el dispositivo de bombeo opcionalmente integrado, en un desarrollo ventajoso, se forma a partir de un plástico adecuado para la PCR, principalmente policarbonato. El cartucho puede formarse en este caso, por ejemplo, mediante un procedimiento de fabricación adicional, tal como impresión 3D, mediante un procedimiento de conformación, tal como estampado en caliente o más preferiblemente mediante un procedimiento de moldeo por inyección.

35 En un desarrollo preferido, el dispositivo de bombeo está diseñado como una jeringa doble para suministrar un líquido de trabajo a un sistema de microcanales del cartucho. La doble jeringa incluye aquí:

- una cámara exterior cilíndrica que determina un depósito para alojar el líquido de trabajo,
- una cámara interior cilíndrica dispuesta dentro de la cámara exterior y que tiene en su área de cubierta de cilindro distal una abertura de salida para la unión al sistema de microcanales del cartucho y que se encuentra en unión
40 fluida con la cámara exterior a través de orificios pasantes,
- un pistón interno que se puede mover axialmente en la cámara interior y que cierra los orificios pasantes en el lado de la cámara interior en una posición cerrada y en una posición de liberación libera los orificios pasantes y permite que el fluido fluya desde la cámara exterior hacia la cámara interior, y
- un pistón anular movable axialmente en la cámara exterior hacia el extremo distal de la cámara exterior,

45 i) que cierra el espacio de almacenamiento para el líquido de trabajo en una posición de almacenamiento proximal,

ii) mediante su movimiento hacia el extremo distal, un líquido de trabajo puesto en el espacio de almacenamiento es forzado a través de los orificios pasantes hacia la cámara interior, cuando el pistón interno se encuentra en su posición de liberación, y

50 iii) que en una posición de cierre distal cierra los orificios pasantes desde el lado de la cámara exterior y, de esta manera, permite que el líquido se extraiga del sistema de microcanales del cartucho hacia la cámara interior mediante un movimiento axial del pistón interno hacia el extremo proximal.

La invención también contiene un procedimiento para detectar biomoléculas en una solución de muestra por medio de un cartucho del tipo descrito, en el que

- la solución de muestra se suministra a través de un canal de suministro a la cámara de detección y se arrastra al área del sensor dispuesto en la cámara de detección del microchip basado en tecnología CMOS, y

- se detecta una señal generada en los sitios de ensayo funcionalizados durante la detección electroquímica de las biomoléculas y se evalúa para la detección de las biomoléculas en la solución de la muestra.

5 Otras etapas ventajosas del procedimiento de acuerdo con la invención pueden deducirse de la siguiente descripción de las figuras, principalmente la descripción de las Figuras 1 y 2.

Las ventajas de la invención y otros ejemplos de realización a modo de ejemplo se explican a continuación por medio de las figuras, en cuya representación, para aumentar la claridad, se ha prescindido de una reproducción fiel a escala y en proporción.

10 Se muestra:

Fig. 1: una representación esquemática del principio de la detección de ácidos nucleicos en una muestra mediante un sistema de detección de acuerdo con la invención,

Fig. 2: esquemáticamente un cartucho microfluídico para la detección de biomoléculas en una solución de muestra según un ejemplo de realización de la invención,

15 Fig. 3: esquemáticamente una sección transversal del cartucho de la figura 2 en la zona del microchip a lo largo de la línea III-III.

Fig. 4: una sección de un cartucho microfluídico según la invención en la zona de la cámara de detección y la cámara de PCR en una vista en perspectiva.

20 Fig. 5: una sección de un dispositivo microfluídico para el tratamiento de biomoléculas en una solución de muestra con control de temperatura.

Fig. 6: esquemáticamente en sección transversal una jeringa doble que se puede usar como dispositivo de bombeo en un cartucho microfluídico.

Fig. 7: en (a) a (c) la jeringa doble de la Fig. 6 en diferentes estados en el suministro / retorno de un líquido, y

25 Fig. 8: en (a) a (e) una jeringa doble de líquidos múltiples en diferentes estados durante el suministro / retorno de líquidos.

La Figura 1 ilustra el principio de detección de determinados ácidos nucleicos en una muestra 92 presente en un sistema de muestras 90 mediante un sistema de detección 10. La muestra 92 puede ser, por ejemplo, una muestra de frotis de un paciente que se encuentra presente en el extremo de un palillo-hisopo en un tubo de muestra 90 y que ha de ser investigada microbiológicamente para cepas de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina).

30 El sistema de detección 10 contiene un dispositivo de bombeo 20 con un líquido de trabajo 22 que se suministra a la muestra 92 a través de un sistema de microcanal 30 y una válvula abierta 80 en una etapa de suministro (dirección de flujo 32). En su camino a través del sistema de microcanal 30, el líquido de trabajo 22 pasa por una zona de almacenamiento 70, en la que recibe los productos químicos 72 introducidos allí, en el ejemplo de realización, por ejemplo, para exponer el ADN de la muestra 92. La cámara de detección 40, la cámara de reacción 50 y la cámara de presión 60 del sistema de detección 10 no desempeñan ningún papel en esta etapa de suministro.

35 Luego, en un paso de retorno, la solución de muestra resultante de la lisis de la muestra 92 en el sistema de muestra 90 es devuelta por el dispositivo de bombeo 20 al sistema de detección 10 (dirección de flujo 34). En este caso, la solución de muestra generalmente se extrae en el dispositivo de bombeo 20 para asegurar que al menos la cámara de reacción 50 del sistema de detección 10 esté llena de solución de muestra. Después de la etapa de retorno, la válvula 80 se cierra al sistema de muestra externa 90 para tener un volumen definido de fluido en el sistema de detección 10 y para obtener un sistema aislado.

40 Para amplificar los ácidos nucleicos que van a detectarse, se lleva a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la cámara de reacción 50. Los productos químicos 52 requeridos para este propósito se confeccionan presentes, protegidos, inicialmente bajo una capa de cera. Para comenzar la amplificación, la capa de cera se funde por un aumento de la temperatura y, de esta manera, los productos químicos de PCR 52 se agregan a la solución de muestra en la cámara de reacción 50. Durante la PCR, la cera fundida permanece líquida o es captada por múltiples depósitos en la periferia de la cámara de reacción 50 para garantizar que no haya cera solidificada que obstruya los microcanales adyacentes 30.

50 El perfil de temperatura cíclico en la cámara de reacción 50 requerido para la PCR se genera con ayuda de un dispositivo de calentamiento / enfriamiento (no mostrado) asociado con la cámara de reacción 50. El transcurso controlado de la PCR, que no es evidente en los sistemas microfluídicos, se asegura en el sistema de detección 10

mediante una cámara de presión 60 en unión fluida con la cámara de reacción 50 a través de un canal de compensación 38. Como se explica con más detalle a continuación, la cámara de presión 60 está libre de líquido en funcionamiento normal y se mantiene a una temperatura muy por encima del punto de ebullición normal de la solución de muestra, por ejemplo, $T_{DK} = 120 \text{ }^\circ\text{C}$, por un calentador asociado con la cámara de presión (no se muestra).

Eventualmente las burbujas de gas resultantes en la cámara de reacción 50 en la etapa de desnaturalización a $T \approx 96 \text{ }^\circ\text{C}$ presionan una pequeña cantidad del líquido de muestra a la cámara de presión 60, donde se evapora inmediatamente debido a la elevada temperatura de la cámara de presión. Debido al gran volumen de gas generado durante la evaporación, se genera rápidamente una contrapresión en la cámara de presión 60 sobre la solución de muestra presente en la cámara de reacción 50, lo que reduce considerablemente el número y tamaño de las burbujas de gas. La cámara de reacción 50 y la cámara de presión 60 forman así un subsistema autorregulado para suprimir las burbujas de gas no deseadas en la cámara de reacción 50 y garantizan de esta manera un transcurso bien controlado de la PCR.

En concreto, en el sistema de detección 10 se realiza un tipo particular de la PCR, que se denomina PCR en tiempo real, ya que en tal caso se determina la cantidad de ácido nucleico presente en la solución de la muestra mientras transcurre la reacción. La PCR en tiempo real permite una determinación más exacta de la concentración de ácido nucleico en la solución de la muestra que una determinación de punto final puro al final de una PCR. En la PCR en tiempo real realizada en el sistema de detección 10, primero se lleva a cabo un primer número predeterminado de ciclos de la reacción de amplificación, por ejemplo, 15 ciclos para aumentar la concentración de ácido nucleico en el intervalo de medición.

Posteriormente, con la ayuda del dispositivo de bombeo 20, un volumen definido de solución de muestra con ácidos nucleicos amplificados se transfiere desde la cámara de reacción 50 a la cámara de detección 40 (flujo 36). En la cámara de detección, se dispone la zona del sensor 42 de un microchip basado en tecnología CMOS, que tiene una matriz de sitios de ensayo funcionalizados para la detección electroquímica de los ácidos nucleicos en la solución de muestra. En la detección electroquímica, cada uno de los sitios de ensayo genera una señal eléctrica cuya magnitud es una medida de la concentración de ácido nucleico en el volumen de detección transferido. Un procedimiento de detección electroquímica preferido se describe en el documento DE 10 2011 056 606 B3.

Posteriormente, se lleva a cabo repetidamente un ciclo de PCR adicional en cada caso para aumentar aún más la concentración de ácido nucleico y después de cada ciclo se transfiere un volumen definido de solución de muestra con ácidos nucleicos amplificados desde la cámara de reacción 50 a la cámara de detección 40 y la concentración de ácido nucleico se determina electroquímicamente. De esta manera, por ejemplo, se pueden realizar un total de 30 a 40 ciclos de PCR. Al final del procedimiento, se puede sacar un mayor volumen final de solución de muestra en la cámara de detección 40 para la determinación del punto final, y la concentración de ácido nucleico puede detectarse electroquímicamente.

Como una realización concreta de un sistema de detección 10, la figura 2 muestra esquemáticamente una forma de realización a modo de ejemplo en forma de un cartucho microfluídico 100 para la detección de biomoléculas en una solución de muestra, que se construye de acuerdo con los principios explicados en relación con la figura 1.

El cartucho 100 está formado completamente de policarbonato, excepto los productos químicos y el microchip 142, por ejemplo, mediante un procedimiento de fabricación aditivo o mediante moldeo por inyección. El cartucho 100 es un cartucho desechable para la detección económica de ácidos nucleicos deseados, por ejemplo, en un cribado de MRSA.

Para la conexión a un sistema de muestra, el cartucho 100 tiene una conexión Luer 110 a la cual, por ejemplo, se puede conectar un tubo de muestra 90 con una muestra de hisopo 92 para examinar.

Formado dentro del cartucho 100 hay un sistema de microcanal 120 que se extiende desde un dispositivo de bombeo 200 a través de una cámara de detección 140, una cámara de PCR 150 con productos químicos de PCR 152 protegidos con una capa de cera y una zona de almacenamiento 170 de productos químicos de lisis 172 hasta la conexión Luer 110. En otros diseños, los productos químicos de lisis 172 se proporcionan en otro sitio, como en la conexión Luer o el tubo de muestra 90.

El dispositivo de bombeo está configurado en la forma de la doble jeringa 200 que se explica con más exactitud a continuación y forma parte integral del cartucho de policarbonato 100. Una cámara exterior 204 de la doble jeringa 200 es, en este caso, estable durante el almacenamiento con un líquido de trabajo deseado 202, de modo que el cartucho 100 contiene sustancialmente todos los componentes necesarios para la detección deseada, excepto el dispositivo de calentamiento / enfriamiento.

Para determinar la concentración de los ácidos nucleicos en la solución de muestra, el cartucho contiene un microchip 142 basado en tecnología CMOS, cuyo contorno se muestra en líneas discontinuas en la FIG. 2. El microchip 142 tiene una zona de sensor 144 dispuesta en la cámara de detección 140 y una zona de contacto 146 separada de la cámara de detección de manera estanca a los líquidos. Para una explicación más exacta, la figura 3

muestra esquemáticamente una sección transversal del cartucho 100 en la zona del microchip 142 a lo largo de la línea III-III de la figura 2.

La zona del sensor 144 del microchip 142 contiene una matriz de, por ejemplo, 109 sitios de ensayo 130 funcionalizados en una disposición octagonal para la detección electroquímica de los ácidos nucleicos a detectar en la solución de muestra. Un procedimiento de detección adecuado se describe, por ejemplo, en el documento DE 10 2011 056 606 B3.

Para obtener un resultado de lectura particularmente bueno, cada uno de los sitios de ensayo 130 de la zona del sensor 144 está equipado con su propio modulador sigma-delta 132 de primer orden para la conversión AD de las señales eléctricas generadas en los sitios de ensayo 130. Los moduladores sigma-delta 132 proporcionan como señal digitalizada un flujo de bits que es insensible al ruido y la diafonía, pero que, sin embargo, se trata adicionalmente para la conversión completa de AD de acuerdo con los principios conocidos de la técnica sigma-delta en un circuito de tratamiento 134 para generar las señales de salida definitivas. Las señales de salida pueden captarse en las almohadillas de contacto 136 de la zona de contacto 146 del microchip 142 y suministrarse de manera conocida a una unidad de evaluación y visualización.

Como se muestra en la Figura 3, la zona de contacto 146 del microchip 142 se separa de manera estanca a los líquidos, por ejemplo, por medio de un anillo de goma 138 o de una masa de relleno, de la cámara de detección 140 con la solución de muestra contenida allí en la aplicación.

Para examinar una muestra 92, el cartucho 100 se conecta primero al sistema de muestra 90 a través de la conexión Luer 110 y la válvula 180 se abre, si no está ya abierta. Ahora, levantando 220 ligeramente el pistón interno 216 de la jeringa doble 200 con un vástago de pistón asociado (FIG. 7 (b)), se pueden liberar los orificios pasantes 218 entre la cámara exterior y la cámara interior 206. Al presionar 230 hacia abajo el anillo de goma 214, el líquido de trabajo 202 suministrado se suministra a la muestra 92 a través del sistema de microcanales 120, y el líquido de trabajo en la zona de almacenamiento 170 recibe los productos químicos de lisis 172.

El anillo de goma 214 comprimido hacia abajo cierra los orificios pasantes 218 desde el lado de la cámara exterior de modo que, mediante un movimiento axial adicional del pistón interno 216 con el vástago del pistón, la solución de muestra como resultado de la lisis de la muestra 92 puede retirarse al sistema de microcanales 120 del cartucho 100 en la cámara interior 206 de la jeringa doble 200. En este estado, el sistema de canales 120 que incluye la cámara de PCR 150 y la cámara de detección 140 se llena con la solución de muestra. Por el contrario, la cámara de presión 160, que está en unión fluida con la cámara de PCR 150 a través del canal de compensación 122, permanece sustancialmente libre de líquido. Luego, la válvula 180 se cierra al sistema de muestra externo 90 para tener un volumen de líquido atrapado definido en el sistema de detección para la PCR posterior.

Para llevar a cabo la PCR, el cartucho 100 se puede usar, por ejemplo, en un termociclador, que proporciona medios de calentamiento / enfriamiento para los pasos de temperatura de los ciclos de PCR. Principalmente, en la cámara de PCR 150 al fundir la capa de cera, los productos químicos de PCR 152 se agregan a la solución de muestra y la PCR se realiza generando el perfil de temperatura cíclica deseado. Además, como se describe con más exactitud a continuación, el calentamiento de la cámara de presión 160 a una temperatura T_{DK} por encima del punto de ebullición de la solución de muestra suprime una formación de burbujas de gas en la cámara de PCR 150, de modo que la PCR puede transcurrir de manera confiable y controlada.

Después de un número predeterminado de ciclos de PCR iniciales, un volumen definido de solución de muestra con ácidos nucleicos amplificados de la cámara de PCR 150 se transfiere a la cámara de detección 140 mediante el levantamiento controlado del pistón interno 216 de la jeringa doble. Los valores de concentración deseados de ácido nucleico en la solución de muestra se determinan por detección electroquímica de los eventos de hibridación de oligómeros de ácido nucleico en los sitios de ensayo 130 del microchip 142, como se describe con más exactitud, por ejemplo, en el documento DE 10 2011 056 606 B3.

Después de respectivamente otro ciclo de PCR, elevando sucesivamente el pistón interno 216, otro volumen definido de otra solución de muestra amplificada se transfiere desde la cámara de PCR 150 a la cámara de detección 140 y se determina la concentración de ácido nucleico. Por ejemplo, la cámara de PCR 150 puede tener un volumen de 30 μ l y un volumen de 1 μ l se transfiere a la cámara de detección 140 después de completar los ciclos de PCR iniciales de 15 a 25 ciclos después de cada ciclo de PCR. Al final del procedimiento, se puede extraer un mayor volumen final de solución de muestra en la cámara de detección 140 y se puede determinar un punto final de concentración. Se entiende que la determinación de la concentración también se puede llevar a cabo en intervalos más largos, por ejemplo, después de cada segundo o cada tercer ciclo de PCR.

Un diseño específico del cartucho 100 en la zona de la cámara de detección 140 y la cámara de PCR 150 se muestra en la Figura 4 para un ejemplo de realización en una vista superior en perspectiva. En este ejemplo de realización, la cámara de PCR 150 se divide en una pluralidad de subcámaras 154 dispuestas sucesivamente, en forma de disco, de las cuales solo la última subcámara 154 se muestra en la figura. Desde la cámara de PCR 150 o la última subcámara 154, un canal de suministro 124 conduce a la cámara de detección 140, desde donde un canal de salida 126 se extiende hacia la doble jeringa 200.

El contorno del microchip basado en tecnología CMOS 142 se muestra nuevamente mediante líneas discontinuas. En este caso, la zona del sensor 144 del microchip 142 está dispuesta con la matriz de sitios de ensayo 130 en la cámara de detección 140 y está separada herméticamente de los líquidos de la zona de contacto 146 con las almohadillas de contacto 136 a través de un anillo de masa de relleno circunferencial 139.

- 5 El subsistema de autorregulación para la supresión de burbujas de gas en la cámara de PCR se explica nuevamente con más exactitud en la FIG. 5. El principio descrito no se limita al uso en una PCR, sino que también se puede usar en otros procedimientos de tratamiento microfluídicos con control de temperatura en los que una solución de muestra debe mantenerse libre de burbujas de gas cerca del punto de ebullición normal de la solución de muestra.

10 La figura 5 muestra una sección de un dispositivo microfluídico 400 para el tratamiento a temperatura controlada de una solución de muestra 410, en este caso para la detección de ácidos nucleicos descrita anteriormente. El dispositivo microfluídico 400 contiene una cámara de reacción 450 en la que la solución de muestra con los ácidos nucleicos se puede calentar mediante un calentador / enfriador 452 a una temperatura de referencia cercana al punto de ebullición normal de la solución de muestra 410. Por ejemplo, en la PCR en tiempo real mencionada anteriormente, la solución de muestra 410 se calienta a aproximadamente 96 ° C en la etapa de desnaturalización.

15 En los dispositivos microfluídicos, las burbujas de gas no solo pueden conducir a grandes diferencias de temperatura en la solución de muestra en la cámara de reacción 450, sino también a exprimir la solución de muestra fuera de la cámara de reacción y a una fuerte oscilación del fluido en el sistema microfluídico. Para suprimir la formación de burbujas de gas en los sistemas de PCR microfluídicos, se han propuesto varias medidas como, por ejemplo, un diseño estructural especial de la cámara de reacción, un tratamiento de la superficie de las paredes de la cámara de
20 reacción, un sellado de la cámara de reacción a presión elevada, una desgasificación de la solución de muestra y la adición de reactivos con alto punto de ebullición.

En la solución ventajosa usada aquí, las burbujas de gas en la cámara de reacción 450 se suprimen mediante un acoplamiento fluido de la cámara de reacción 450 a una cámara de presión 460 que está libre de líquido en funcionamiento normal con una temperatura superior al punto de ebullición normal de la solución de muestra 410.
25 Como se muestra en la Figura 5, la cámara de reacción 450 está en comunicación fluida a través de un canal de equilibrio 422 con una cámara de presión 460 que se calienta mediante un calentador 462 a una temperatura T_{DK} muy por encima del punto de ebullición normal de la solución de muestra. En el ejemplo de realización, la temperatura de la cámara de presión está entre 110 ° C y 130 ° C, por ejemplo, a $T_{DK} = 125$ ° C. Dado que la temperatura de la cámara de presión está por encima del punto de ebullición, la cámara de presión 460 está libre de líquido en la funcionamiento normal.
30

Sin querer ligarse a una explicación determinada, el mecanismo de supresión de burbujas de gas se entiende actualmente de la siguiente manera: si se surgen burbujas de gas 454 en la cámara de reacción 450 durante el tratamiento de las biomoléculas a temperatura controlada como, por ejemplo, la etapa de desnaturalización por PCR mencionada anteriormente, entonces se presiona una pequeña cantidad de líquido de muestra 464 a través del
35 canal de ecualización 422 a la cámara de presión 460 por las burbujas de gas que se forman primero, donde se evapora inmediatamente debido a la alta temperatura que prevalece en la cámara de presión 460. El volumen de gas producido por la evaporación es 1000 a 2000 veces mayor que el volumen del líquido vaporizado, lo que resulta en un gran aumento de la presión en la cámara de presión 460, lo que a su vez conduce a un aumento de la presión en la cámara de reacción 450 y, con esto, a una reducción en el número y tamaño de las burbujas de gas y
40 contrarresta la formación de otras burbujas de gas. Los principales efectos, como se entiende actualmente, son el aumento de la presión de vapor y la compresión de los volúmenes de gas existentes.

Dado que la potencia de la contrapresión generada aumenta con la cantidad de líquido evaporado y, por lo tanto, con el volumen del líquido 464 desplazado por las burbujas de gas, este planteamiento da como resultado la autorregulación de las burbujas de gas 454 en la solución de muestra 410. La cámara de presión 460 puede integrarse fácilmente en un sistema microfluídico y no requiere interpretaciones complejas de la cámara de reacción,
45 adiciones a la solución de muestra u otras medidas complejas para la supresión de la formación de burbujas de gas, que en general, o en todo caso, pueden evitar solo una nucleación de burbujas de gas en las paredes del reactor o, como en el caso de las adiciones a la solución de muestra, pueden afectar el transcurso de la PCR. Para el suministro del líquido de trabajo 202 a un sistema microfluídico como, por ejemplo, el sistema de microcanales 120, 140, 150, 170, 180 de la figura 2, se usa ventajosamente una jeringa doble 200, cuya construcción y principio de funcionamiento se explicarán con más detalle con referencia a la figura 6.
50

La doble jeringa 200 contiene dos cámaras cilíndricas 204, 206 dispuestas concéntricamente, en cada una de las cuales se alojan los pistones 214, 216 axialmente móviles. En esta descripción, el extremo de la jeringa dual 200, que tiene una abertura de salida 210, se denomina extremo distal D de la jeringa, o bien el cilindro, y el extremo opuesto en la dirección axial es el extremo proximal P. Más exactamente, la jeringa doble contiene una cámara exterior cilíndrica 204 que define un espacio de depósito 208 para el líquido de trabajo 202. Concéntricamente, en la
55 cámara exterior 204, se dispone una cámara interior cilíndrica 206, que se cierra en su extremo distal con la cámara exterior 204. La abertura de salida 210 de la jeringa doble está dispuesta en la superficie de cubierta 212 del cilindro distal de la cámara interior 206. Las dos cámaras del cilindro 204, 206 están en comunicación fluida entre sí a través

de una serie de orificios pasantes 218, que se forman circunferencialmente en la pared del cilindro 205 común de las cámaras interior y exterior en la zona extrema distal de las cámaras 204, 206 a la misma altura axial.

5 En la cámara interior 206 se aloja un pistón interno 216 axialmente móvil que tiene en su lado proximal un elemento de agarre 222, que puede agarrarse desde el exterior con un vástago de pistón 240 adaptado, separado (Figura 7(b)), para poder mover axialmente arriba y abajo el pistón interno 216 - (flechas 220). En lugar del elemento de agarre 222, por ejemplo, también se puede formar una cavidad en el lado proximal del pistón interno 216, en la cual se engancha el extremo distal configurado de manera correspondiente de un vástago de pistón.

10 Si el pistón interno 216 está ubicado en el extremo distal de la cámara interna 206, entonces el pistón interno 216 cierra los orificios pasantes 218 desde el lado de la cámara interna con un sello circunferencial 224, por ejemplo, un sello de goma, de modo que no sea posible un flujo de fluido desde el espacio de depósito 208 de la cámara exterior 204 a la abertura de salida 210. Por lo tanto, esta posición del pistón interno 216 se denomina posición cerrada y se muestra en la Fig. 7 (a).

15 Si el pistón interno 216 se mueve, por ejemplo, hacia la dirección proximal, es decir, se levanta en la orientación de la figura 6, libera los orificios pasantes 218 y permite un flujo de fluido desde la cámara exterior 204 a través de la cámara interior 206 a la abertura de salida 210. Por lo tanto, tal posición del pistón interno 216 se denomina posición de liberación y se muestra en la Fig. 7 (b).

20 En la cámara exterior 204, se aloja un pistón externo anular sellante que rodea la cámara interior 206, aquí en forma de un anillo de goma 214, que se puede mover axialmente hacia el extremo distal D de la cámara exterior (flechas 230). En una posición de suministro proximal, el anillo de goma 214 cierra el espacio de almacenamiento 208 del líquido de trabajo 202, tal como se muestra en la figura 7(a). En una posición de oclusión distal mostrada en la figura 7(c), el anillo de goma 214 sella los orificios pasantes 218 desde el lado de la cámara exterior 204, y permite así una retracción de líquido del sistema microfluídico a la cámara interna 206 por un movimiento axial del pistón interno 216 hacia el extremo proximal P de la jeringa.

25 En el lado proximal del pistón interno 216, se puede proporcionar un depósito 226 para recibir productos químicos. Los productos químicos se fijan primero en el espacio de depósito 226, pero se pueden liberar mediante una función de liberación, por ejemplo una cubierta de cera fundible o una capa de cubierta de partículas magnéticas en el momento deseado.

30 El modo de funcionamiento de la doble jeringa 100 se explicará ahora con más detalle por medio de las figuras 7(a) a 7(c), en las que un líquido de trabajo 202 introducido en la cámara exterior 204 de la doble jeringa 200 se suministra a un sistema microfluídico, no mostrado.

En el estado inicial de la figura 7(a), el pistón interno 216 se encuentra en su posición de cierre distal y el anillo de goma 214 está en su posición de almacenamiento proximal. El espacio de almacenamiento 208 de la cámara exterior 206 está precargado con el líquido de trabajo 202 deseado de una manera estable al almacenamiento.

35 Si el líquido de trabajo 202 se debe suministrar al sistema microfluídico, entonces el elemento de agarre 222 del pistón interno 216 se sujeta con un vástago de pistón 240 adaptado y se levanta a la posición de liberación que se muestra en la Figura 7(b), en el que los orificios pasantes 218 liberan el flujo de fluido desde el depósito 208 de la cámara exterior 204 a la abertura de salida 210. Al presionar hacia abajo el anillo de goma 214, el líquido de trabajo 202 puede ser bombeado completamente al sistema microfluídico (flujo 242).

40 Como se muestra en la Fig. 7 (c), el anillo de goma 214 y la posición de los orificios pasantes 218 en la pared del cilindro 205 se emparejan entre sí, de modo que el anillo de goma 214 en su posición distal cerrada cierra los orificios pasantes 218 desde el lado de la cámara exterior. En este estado, la jeringa doble se puede usar como una jeringa normal moviendo el vástago del pistón 240 hacia arriba y hacia abajo en la cámara interior 206 y el líquido se mueve en ambas direcciones. Principalmente, se puede extraer líquido del sistema microfluídico hacia la cámara interna 206 (flujo 244) mediante una elevación adicional, es decir, un movimiento axial del pistón interno 216 hacia el extremo proximal.

45 De esta manera, por ejemplo, en el ejemplo de realización de la Figura 2, la solución de muestra resultante por lisis de la muestra 92 se retira del tubo de muestra 90 al sistema de microcanales del cartucho 100 y finalmente a la cámara interior 206 de la jeringa doble. Incluso durante la realización de la PCR, pequeños volúmenes sucesivos de líquido se transfieren desde la cámara de PCR 150 a la cámara de detección 140 después de cada ciclo de PCR mediante el levantamiento controlado del vástago de pistón 240.

50 Con una jeringa doble de este tipo, se pueden suministrar dos o más líquidos a un sistema microfluídico con un diseño adecuado. La figura 8 muestra una jeringa doble de múltiples fluidos de este tipo, que se diseña a modo de ejemplo para alimentar $n = 2$ líquidos en un sistema microfluídico. La ampliación al suministro de tres o más líquidos resulta de la siguiente presentación sin compromiso.

La jeringa doble 300 de 2 líquidos de la figura 8 también contiene dos cámaras de cilindros 304, 306 dispuestas concéntricamente y, por lo tanto, representa una jeringa doble. La cámara exterior cilíndrica 304 define $n = 2$ espacios de almacenamiento 308-1, 308-2 para recibir los líquidos 302-1, 302-2 que deben suministrarse.

5 Concéntricamente, en la cámara exterior 304, se dispone una cámara interior 306 cilíndrica que se cierra en su extremo distal con la cámara exterior 304. La abertura de salida 310 de la doble jeringa 300 está dispuesta en la superficie de cubierta del cilindro distal de la cámara interior 306.

10 Las dos cámaras de cilindros 304, 306 están en comunicación fluida entre sí a través de $n = 2$ grupos, espaciados en dirección axial, de agujeros pasantes 318-1, 318-2. Cada grupo de orificios pasantes 318-1, 318-2 consiste en una serie de orificios pasantes formados a la misma altura axial circunferencialmente en la pared del cilindro 305 común de la cámara interna y externa.

15 En la cámara interior 306 se aloja un pistón interno 316 axialmente móvil, que tiene en su lado proximal un elemento de agarre 322 que puede agarrarse desde el exterior con un vástago de pistón adaptado separado para poder mover el pistón interno 316 axialmente hacia arriba y hacia abajo (flechas 320). Aquí también, en lugar del elemento de agarre 322, por ejemplo, se puede formar una cavidad en el lado proximal del pistón interno 316, en el cual se engancha el extremo distal configurado de manera correspondiente de un vástago de pistón.

20 Si el pistón interno 316 se encuentra en el extremo distal de la cámara interna 306 como en la posición inicial que se muestra en la figura 8(a), el pistón interno 316 cierra con un sello de goma circunferencial $n = 2$ grupos de orificios pasantes 318-1, 318-2 del lado de la cámara interior, de modo que no sea posible el flujo de fluido desde los espacios depósito de la cámara exterior 304 a la abertura de salida 310. Esta posición del pistón interno 316 se denomina, por lo tanto, la posición cerrada.

25 Si el pistón interno 316 se mueve un poco de manera proximal, inicialmente libera solo el primer grupo de orificios pasantes 318-1 y permite que el fluido fluya del primer fluido 302-1 desde la cámara exterior 304 a través de la cámara interna 306 hacia la abertura de salida 310. Esta posición del pistón interno 316 se designa como la primera posición de liberación y se ilustra en la Fig. 8(b). Mediante un movimiento proximal adicional del pistón interno 316 se alcanza la segunda posición de liberación, en la que también se libera el segundo grupo de orificios pasantes 318-2 desde el lado de la cámara interior (véase Fig. 8(d)).

En el caso general, hay n posiciones de liberación espaciadas axialmente en las que el pistón interno 316 libera sucesivamente un número creciente $k = 1, \dots, n$ de grupos de orificios pasantes y permite un flujo de fluido correspondiente desde la cámara exterior hacia la cámara interior.

30 En la cámara exterior 304, rodeando la cámara interior 306, están alojados $n = 2$ anillos de caucho 314-1, 314-2, espaciados axialmente, cada uno de ellos axialmente móvil hacia el extremo distal D de la cámara exterior (flechas 330-1, 330-2). En una posición de almacenamiento proximal, los anillos de goma 314-1, 314-2 cierran cada uno un depósito para uno de los fluidos de suministro 302-1, 302-2, como se muestra en la figura 8 (a).

35 En una posición cerrada distal, el primer anillo de goma 314-1 cierra el primer grupo de orificios pasantes 318-1 (ver Figura 8 (c)) mientras que el segundo anillo de goma 314-2 cierra el segundo grupo de orificios pasantes 318-2 en su posición distal cerrada (ver Fig. 8 (e)). Si el pistón interno 316 se encuentra en su primera o segunda posición de liberación, entonces, como resultado del movimiento de los dos anillos de goma 314-1, 314-2 o solo del segundo anillo de goma 314-2 hacia el extremo distal, el líquido introducido en el primer o segundo depósito pueden presionarse a la cámara interior 306 a través del primer y segundo grupo de agujeros pasantes 318-1, 318-2, sucesivamente. Si ambos anillos de goma 314-1, 314-2 se colocan en su posición distal cerrada, todos los orificios pasantes se cierran y el líquido puede extraerse del sistema microfluido a la cámara interior 306 mediante un movimiento proximal del pistón interno 316.

45 A partir del estado inicial de la Fig. 8 (a), el elemento de agarre 322 del pistón interno 316 se sujeta con un vástago de pistón adaptado y se eleva a la primera posición de liberación (Fig. 8 (b)). Al presionar hacia abajo los dos anillos de goma 314-1, 314-2, el primer líquido de trabajo 302-1 puede ser bombeado completamente al sistema microfluido (dirección de flujo 342). Debido a la incompresibilidad de los fluidos, es suficiente presionar activamente, en dirección distal, el anillo superior de los n anillos de goma; aquí, el anillo de goma 314-2. La presión ejercida se transfiere al primer anillo de goma 314-1 a través del segundo líquido de trabajo 302-2 incompresible, de manera que los dos anillos de goma se mueven distalmente a la misma distancia y el volumen del espacio de almacenamiento 308-2 permanece sin cambios cuando se suministra el primer líquido de trabajo 302-1 (compárense las Figuras 8 (a) y 8 (c)).

El primer anillo de goma 314-1 y la posición del primer grupo de aberturas de paso 318-1 en la pared del cilindro 305 se emparejan entre sí, de manera que el primer anillo de goma 314-1, en su posición distal cerrada, cierra el primer grupo de orificios pasantes 318-1 desde el lado de la cámara exterior, como se muestra en la Fig. 8 (c).

55 Ahora, el pistón interno 316 puede elevarse aún más a la segunda posición de liberación (figura 8 (d)), y apretando hacia abajo el segundo anillo de goma 314-2, el segundo líquido de trabajo 302-2 se bombea completamente al sistema microfluido (dirección de flujo 344). En este caso, el segundo anillo de goma 314-2 y la posición del

segundo grupo de orificios de paso 318-2 en la pared del cilindro 305 se emparejan entre sí de tal manera que el segundo anillo de goma 314-2 en su posición de cierre distal cierra el segundo grupo de orificios pasantes 318-1 desde el lado de la cámara exterior, como se muestra en la figura 8 (e).

- 5 Dado que todos los anillos de goma 314-1, 314-2 están ahora en su posición cerrada distal, la jeringa doble 300 se puede usar moviendo axialmente el pistón interno 316 hacia arriba y hacia abajo con la varilla del pistón como una jeringa normal y el fluido se mueve en ambas direcciones. Principalmente, mediante un levantamiento adicional, es decir, un movimiento axial del pistón interno 316 hacia el extremo proximal, se puede extraer fluido del sistema microfluídico hacia la cámara interna 306 (dirección de flujo 246).
- 10 En una jeringa doble multi-fluido con n pistones de anillo, los primeros $n-1$ pistones de anillo distal no necesariamente tienen que estar sellados. Por ejemplo, el pistón anular 314-1 de la jeringa doble 300 puede estar diseñado para reducir la fricción con cierta holgura en las paredes del cilindro de la cámara interior o exterior, mientras que el pistón anular proximal 314-2 está formado de manera sellada para completar los depósitos para los líquidos 302-1, 302- 2 de manera estable durante almacenamiento. En la práctica, la difusión o mezcla de los líquidos no tiene lugar sobre un espacio de juego estrecho del pistón anular 314-1 o, por lo menos, es insignificante.
- 15 En un diseño más simple, tampoco tiene que haber n grupos espaciados axialmente de orificios pasantes y n posiciones de liberación espaciadas axialmente. Más bien, es suficiente si la cámara interna por medio de uno o más grupos espaciados axialmente de orificios pasantes se encuentra en unión fluida con la cámara exterior y el pistón interno está en una posición cerrada que cierra uno o más grupos de orificios pasantes en el lado de la cámara interior y en una o más posiciones de liberación permite un flujo de fluido de la cámara exterior a la cámara interior.
- 20 Incluso en este tipo de diseño más simple se puede presionar un líquido cargado en el k -ésimo depósito sucesivamente mediante el movimiento del pistón anular en la cámara exterior hacia el extremo distal a través de los orificios en la cámara interior si el pistón interno se encuentra en una posición de liberación correspondiente. Si hay menos de n grupos de orificios pasantes, no todos los n pistones anulares deben cerrar un grupo de orificios pasantes, simplemente debe asegurarse de que los n pistones anulares en su posición de cierre distal juntos cierren uno o más grupos de orificios pasantes desde el lado de la cámara exterior, de manera que se habilite una retracción del líquido del sistema microfluídico hacia la cámara interna mediante un movimiento axial del pistón
- 25 interno hacia el extremo proximal si todos los n pistones anulares se llevan a su posición cerrada distal.

REIVINDICACIONES

1. Cartucho microfluídico para la detección de biomoléculas en una solución de muestra, con
- 5 - una cámara de detección, a la que se puede suministrar la solución de muestra a través de un canal de suministro, y de la cual se puede derivar la solución de muestra examinada a través de un canal de salida,
- un microchip basado en tecnología CMOS que tiene una zona de sensor dispuesta en la cámara de detección y una zona de contacto separada de la cámara de detección de una manera hermética a los líquidos, que se separa de la cámara de detección de una manera hermética a los líquidos por medio de un anillo de goma o un anillo de masa de relleno circunferencial;
- 10 - donde la zona del sensor del microchip contiene una matriz de sitios de ensayo funcionalizados para la detección electroquímica de biomoléculas en la solución de muestra, y
- donde cada sitio de ensayo de la zona del sensor está equipado con su propio modulador sigma-delta para la conversión analógica-digital de señales eléctricas generadas en los sitios de ensayo durante la detección electroquímica.
- 15 2. Cartucho microfluídico según la reivindicación 1, **caracterizado porque** el cartucho tiene una cámara de reacción, principalmente para la amplificación de ácidos nucleicos en la solución de muestra, desde la cual se puede alimentar la solución de muestra a través del canal de suministro de la cámara de detección.
3. Cartucho microfluídico según la reivindicación 2, **caracterizado porque** la solución de muestra en la cámara de reacción puede calentarse a una temperatura nominal cercana a su punto de ebullición normal y la cámara de
- 20 reacción se encuentra en unión fluida a través de un canal de compensación con una cámara de presión libre de fluido en funcionamiento normal, que puede calentarse a una temperatura superior al punto de ebullición normal de la solución de muestra, y está diseñada para evaporar una cantidad de líquido de muestra presionada, por medio del canal de compensación en la cámara de presión, mediante burbujas de gas en la solución de muestra y de esta manera generar una contrapresión de reducción de burbujas de gas en la solución de muestra presente en la
- 25 cámara de reacción.
4. Cartucho microfluídico según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el cartucho tiene un dispositivo de bombeo integrado, que se encuentra en unión fluida con la cámara de reacción y la cámara de detección, y que está configurado para transferir la solución de muestra a la cámara de reacción y de allí a la cámara de detección en volúmenes de solución de muestra definidos.
- 30 5. Cartucho microfluídico según la reivindicación 4, **caracterizado porque** el dispositivo de bombeo está además configurado para suministrar un líquido de trabajo cargado en el dispositivo de bombeo a un sistema de muestras externo y después del enriquecimiento del líquido de trabajo con biomoléculas, que van a ser detectadas en el sistema de muestras externo, retirar la solución de la muestra formada así en el cartucho, principalmente en la cámara de reacción y de allí a la cámara de detección en volúmenes de solución de muestra definidos.
- 35 6. Cartucho microfluídico según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el cartucho tiene una conexión para un sistema de muestras externo, que está diseñado principalmente como una conexión Luer.
7. Cartucho microfluídico según las reivindicaciones 1, 2, 4 y 6, **caracterizado porque** en el cartucho se forma un sistema de microcanales, que se extiende desde el dispositivo de bombeo pasando por la cámara de detección y la cámara de reacción hasta la conexión para el sistema de muestras externo.
- 40 8. Cartucho microfluídico según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el cartucho, incluyendo el dispositivo de bombeo opcionalmente integrado, está hecho de un plástico adecuado para la PCR, principalmente de policarbonato.
9. Cartucho microfluídico según una de las reivindicaciones 4 a 8, **caracterizado porque** el dispositivo de bombeo está diseñado como una jeringa doble para el suministro de un líquido de trabajo a un sistema de microcanales del
- 45 cartucho, donde la jeringa doble presenta:
- una cámara exterior cilíndrica que define un depósito para recibir el líquido de trabajo,
- una cámara interior cilíndrica dispuesta dentro de la cámara exterior que tiene en su superficie de cubierta del cilindro distal una abertura de salida para la unión al sistema de microcanal del cartucho y la cual se encuentra en unión fluida a través de orificios pasantes con la cámara exterior,

- un pistón interno axialmente móvil en la cámara interna que en una posición cerrada cierra los orificios pasantes en el lado de la cámara interior y en una posición de liberación libera los orificios pasantes y permite un flujo de fluido desde la cámara exterior hacia la cámara interior, y

- un pistón anular movable axialmente en la cámara exterior hacia el extremo distal de la cámara exterior,

5 i) que cierra el espacio de almacenamiento para el líquido de trabajo en una posición de almacenamiento proximal,

ii) por su movimiento hacia el extremo distal, un líquido de trabajo cargado en el espacio de almacenamiento es empujado a través de los orificios pasantes a la cámara interior, si el pistón interno está en su posición de liberación, y

10 iii) que en una posición de cierre distal cierra los orificios pasantes desde el lado de la cámara exterior, lo que permite que el líquido se retire del sistema de microcanales del cartucho hacia la cámara interior mediante un movimiento axial del pistón interno hacia el extremo proximal.

10. Un procedimiento para detectar biomoléculas en una solución de muestra por medio de un cartucho de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que

15 - se suministra la solución de muestra a través de un canal de suministro a la cámara de detección y se arrastra a la zona del sensor, dispuesta en la cámara de detección, del microchip basado en tecnología CMOS, y

- se registra una señal generada en los sitios de ensayo funcionalizados durante la detección electroquímica de las biomoléculas y se evalúa para constatar la presencia de las biomoléculas en la solución de la muestra.

20

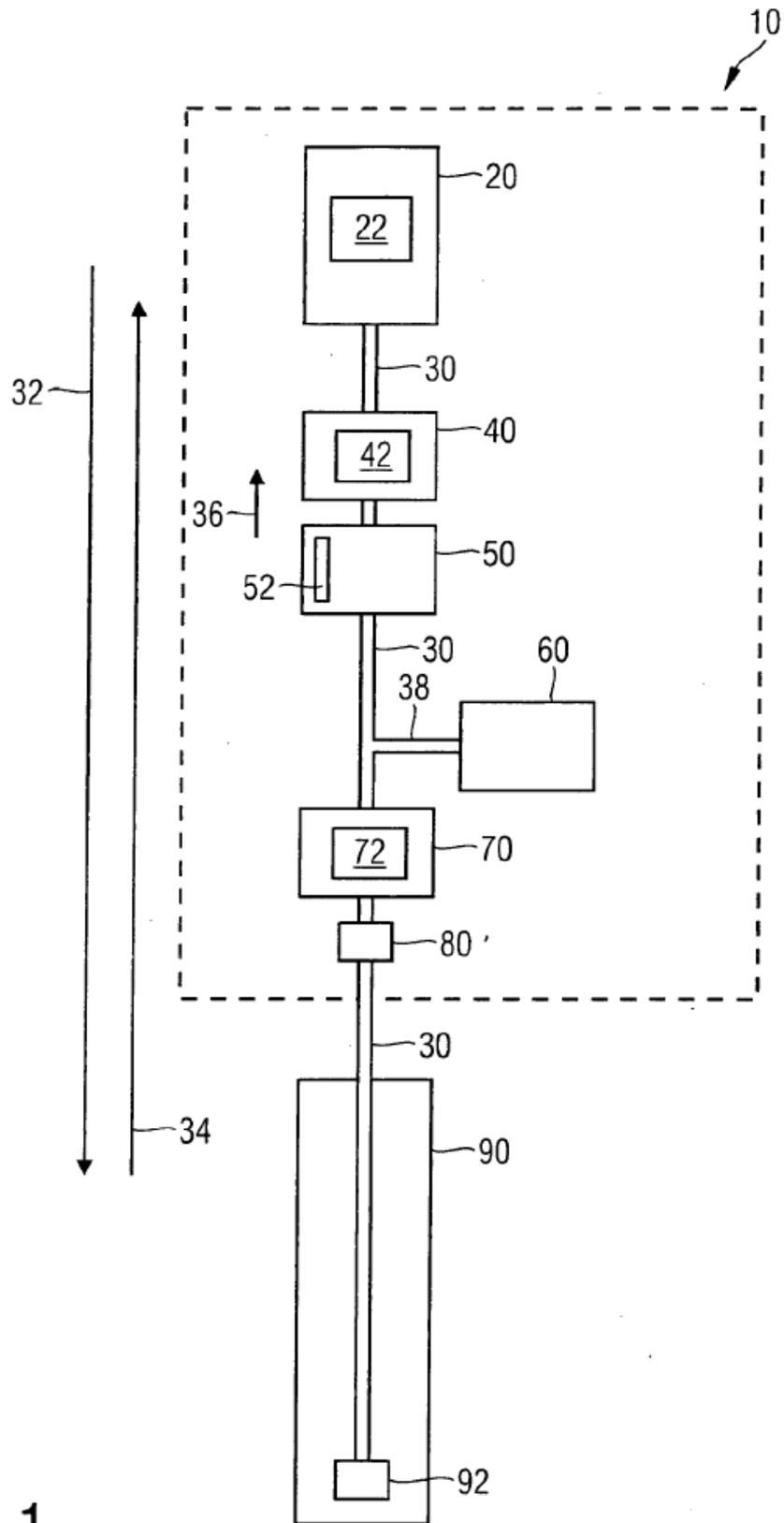


Fig. 1

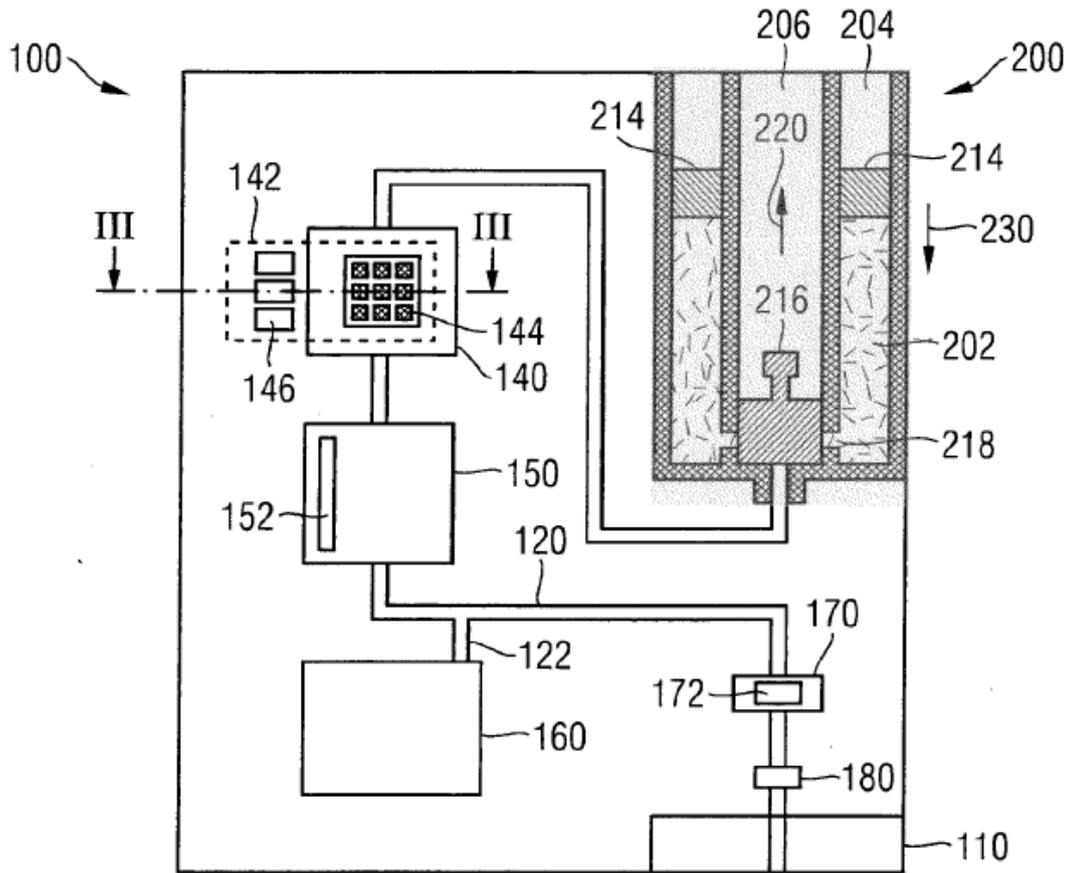


Fig. 2

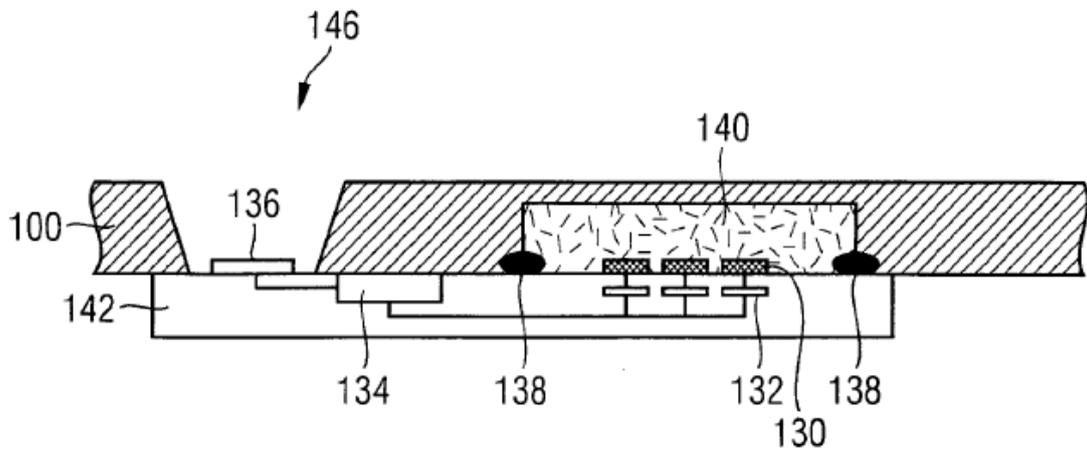


Fig. 3

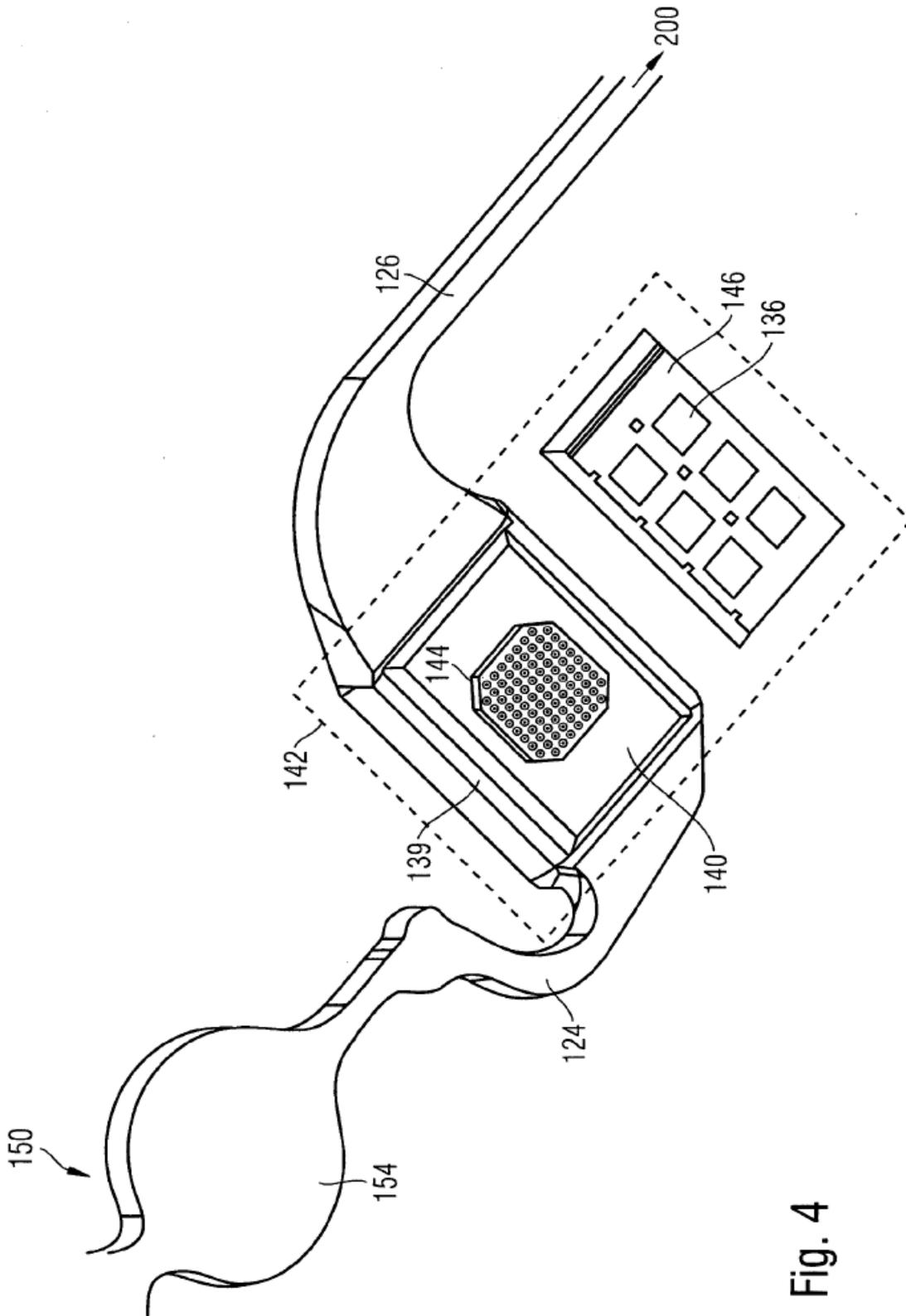


Fig. 4

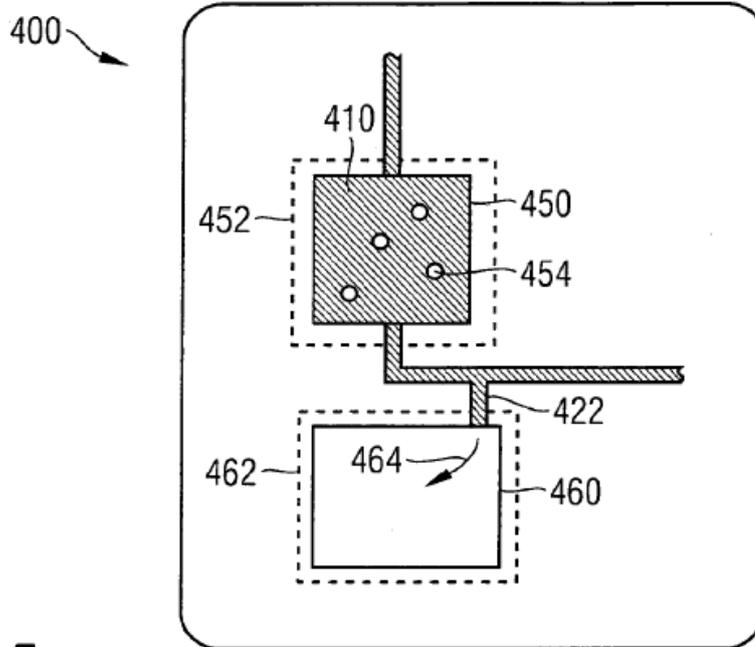


Fig. 5

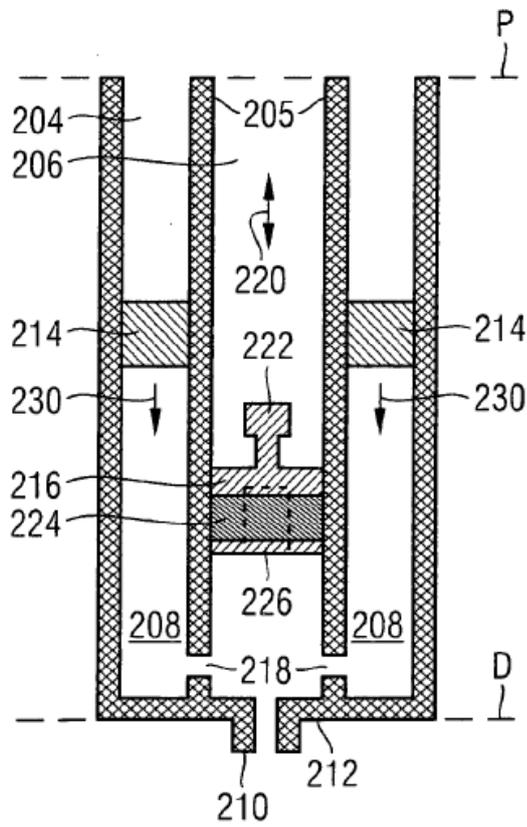


Fig. 6

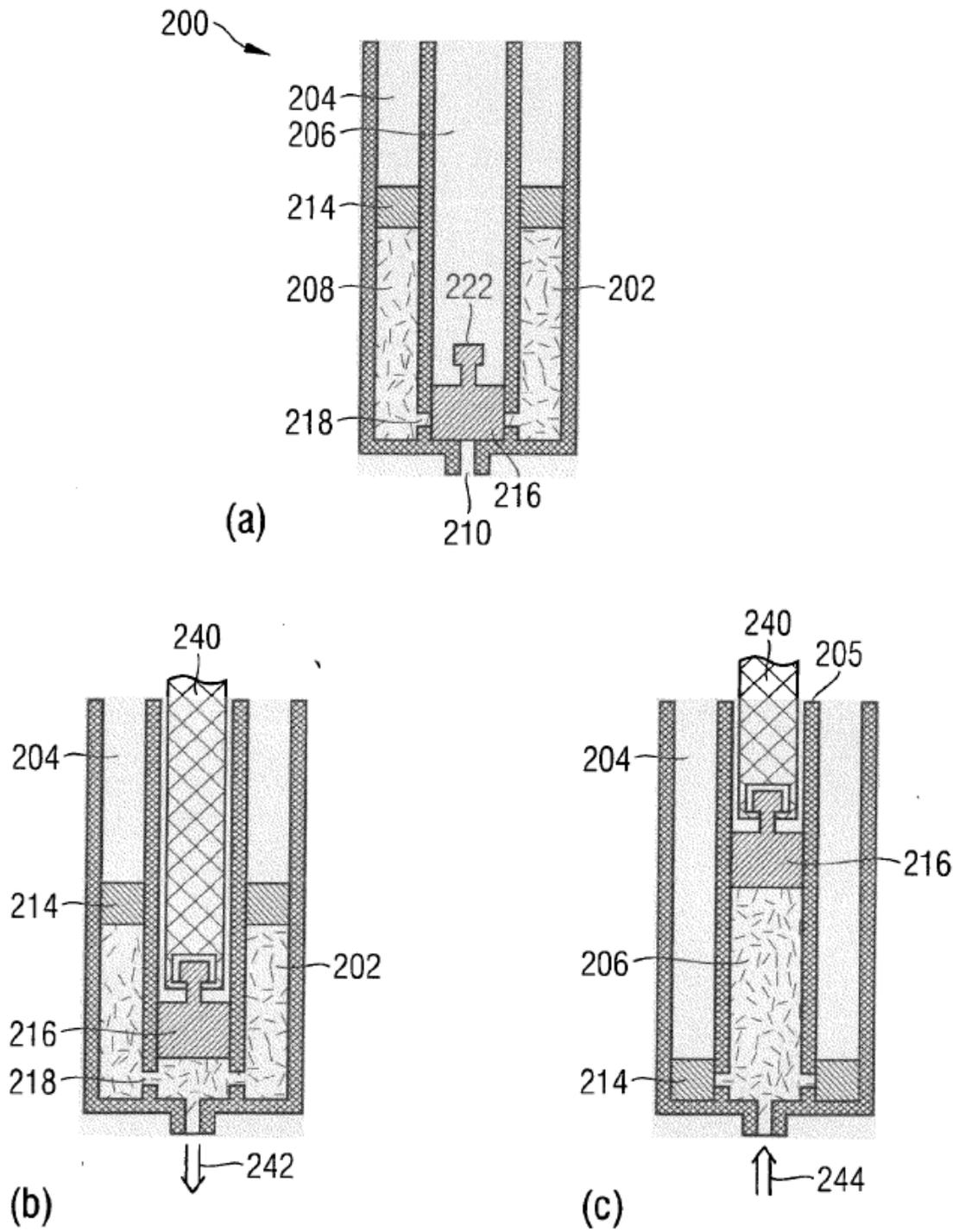


Fig. 7

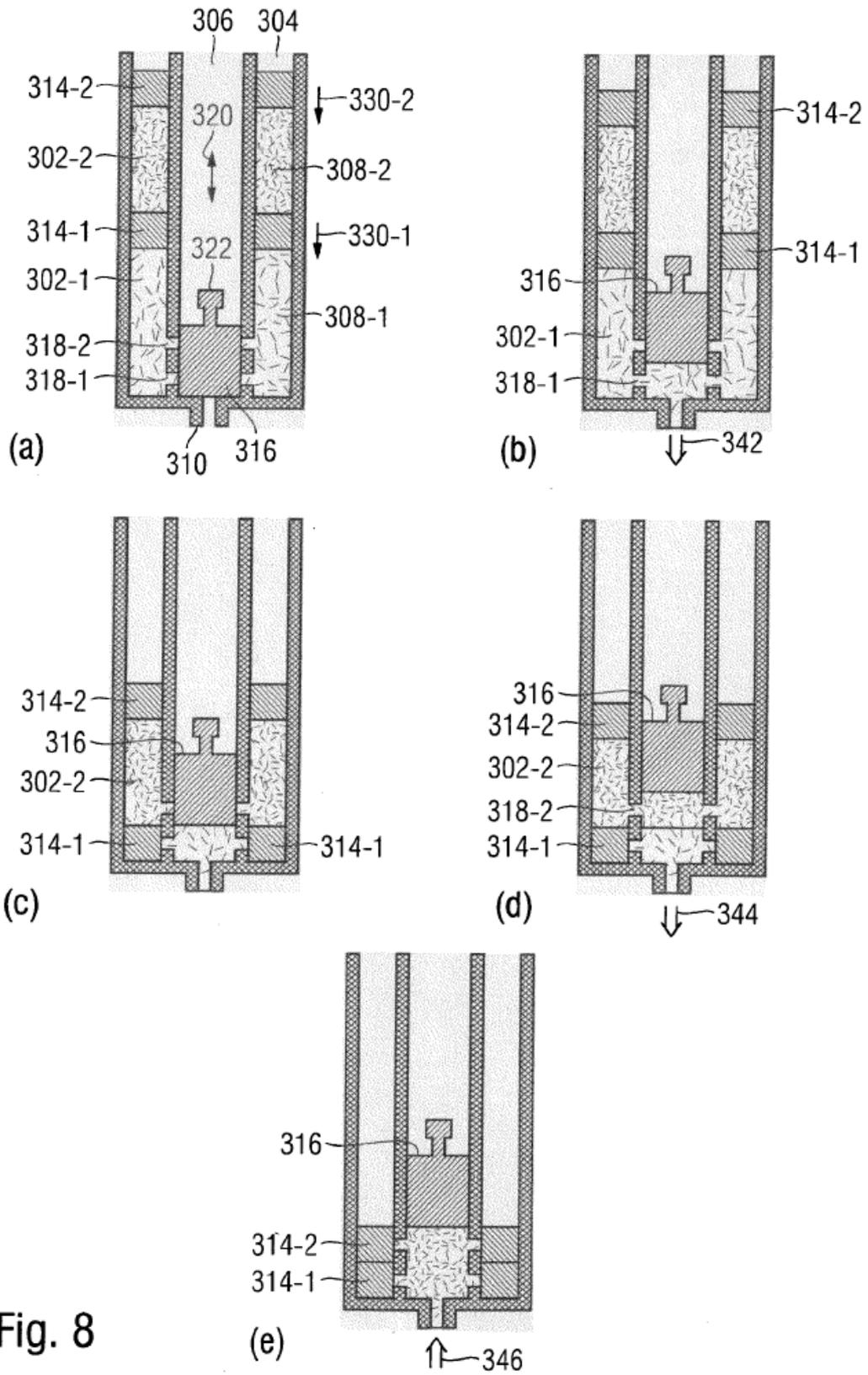


Fig. 8