

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 324**

51 Int. Cl.:

G01N 1/40 (2006.01)

G01N 1/04 (2006.01)

H01J 49/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2011 E 11009640 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2466290**

54 Título: **Preparación de muestras para ionización mediante desorción láser asistida por matriz**

30 Prioridad:

15.12.2010 DE 102010054581

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

13.02.2020

73 Titular/es:

**BRUKER DALTONIK GMBH (100.0%)
Fahrenheitstrasse 4
28359 Bremen, DE**

72 Inventor/es:

MAIER, THOMAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 742 324 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

Preparación de muestras para ionización mediante desorción láser asistida por matriz

Campo de la solicitud

5 La invención se refiere a un método para la preparación de muestras para ionización mediante desorción láser asistida por matriz.

Técnica anterior

10 La espectrometría de masas MALDI con detección de masas por tiempo de vuelo se usa a menudo en microbiología clínica para la identificación de microorganismos, particularmente aquellos que causan enfermedades infecciosas en seres humanos. El principio de desorción e ionización láser asistida por matriz (MALDI) se ha descrito anteriormente en detalle en otros documentos (véase, por ejemplo, M. Karas *et al.* "Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization mass spectrometry", 1990, Analytica Chimica Acta, 241, 175-185). Para explicarlo muy brevemente: en una versión ampliamente utilizada de la preparación de muestras para MALDI, las moléculas de analito solubles se insertan en una estructura de matriz cristalina que tiene una alta capacidad de absorción de la luz láser. Si la estructura de la matriz cristalina se expone a pulsos de radiación láser, se vaporiza de forma explosiva y libera las moléculas de analito insertadas. Durante este proceso de ablación muy energético las moléculas de analito también se ionizan. Por lo tanto, estas moléculas están disponibles para un análisis espectrométrico de masas posterior. Para este análisis, generalmente los iones de los analitos se aceleran en campos eléctricos a diferentes velocidades dependiendo de sus masas m y su número de cargas z , y después de haber pasado por una larga trayectoria de vuelo, que los separa por sus velocidades, se alimentan a un detector con un multiplicador de electrones secundarios. Los intervalos de tiempo transcurridos desde la desorción con láser del material de muestra, o desde un pulso de aceleración en un espectrómetro de masas ortogonal de tiempo de vuelo, hasta que las diferentes señales de corriente de los iones llegan al detector dan, a través de una transformación de tiempo a masa, las relaciones de masa/carga m/z de los iones del analito.

25 En microbiología clínica, los microorganismos de muestras clínicas, tales como los frotis de mucosa, se cultivan específicamente para proporcionar el número mínimo de microorganismos requeridos para el límite de detección del método de detección particular, y para poder repetir las investigaciones que requieren consumir muestra, cuando sea necesario. Con este fin, la muestra clínica a menudo se aplica en un medio nutritivo como el agar. Bajo condiciones de cultivo adecuadas, por ejemplo a temperatura y humedad controladas, crecen en el medio de cultivo colonias distinguibles de los microorganismos.

30 El método habitual de preparación de muestras para MALDI es recoger manualmente el material biológico de una sola colonia en un medio nutritivo con un hisopo de inoculación y transferirlo a un sitio de muestra de un soporte de muestra como analito. El material biológico así aplicado se humedece posteriormente con una disolución de la matriz. La disolución de la matriz contiene moléculas disueltas de la sustancia de la matriz, que, a medida que avanza el proceso de secado, forman los cristales en los que están incrustadas las moléculas de analito. La disolución de la matriz también contiene un disolvente que destruye la estructura biológica del microorganismo, particularmente la pared celular. El proceso de descomposición hace que el material soluble del microorganismo, tal como las proteínas o los péptidos, se libere y se lleve a disolución; éstas son las moléculas de analito de interés real y se detectan en el análisis espectrométrico de masas. Aparte de estas moléculas de analito, los residuos celulares también permanecen después de la descomposición. Éstos son insolubles y, por lo tanto, impiden la cristalización del material de la matriz.

40 Debido a estos residuos celulares omnipresentes, la cantidad de material biológico que se transfiere con el hisopo de inoculación al sitio de la muestra ha de ser muy pequeña y con márgenes de tolerancia de cantidad muy estrechos para un análisis espectrométrico de masas. Una cantidad óptima está entre alrededor de 10.000 y 100.000 células, que usualmente ocupan alrededor de una milésima de milímetro cúbico. Tal cantidad es muy difícil de ver a simple vista. Los residuos celulares insolubles que permanecen después de la descomposición celular como un tipo de pulpa fibrosa pueden impedir la formación de una estructura cristalina homogénea del material de la matriz, especialmente una que está libre de defectos. Pero la estructura cristalina de la matriz debe tener una cierta calidad, especialmente para garantizar que tenga las características deseadas de absorción de la luz láser de una cierta longitud de onda. Si no, el rendimiento de la ionización mediante la desorción con láser es demasiado bajo para proporcionar espectros de masas de tiempo de vuelo informativos. En la práctica, la única solución hasta ahora ha sido garantizar que se aplica una cantidad adecuada en el sitio de la muestra cuando se deposita el material biológico a mano. Esto exige una gran habilidad del técnico que prepara la muestra, que tiene que juzgar la cantidad de material biológico a simple vista para garantizar que, por un lado, la muestra preparada sea suficientemente abundante en términos de moléculas de analito mientras que, por otro lado, no se obstruya por una cantidad demasiado grande de residuos celulares inadecuados después de la descomposición. Por lo general, se tarda mucho tiempo en que un técnico aprenda a evaluar cuánto

material biológico es adecuado para la preparación de muestras MALDI.

El problema de los componentes celulares insolubles restantes que impiden la formación de cristales de la matriz podría evitarse si el material celular descompuesto se filtra o centrifuga. En particular, cuando los microorganismos se cultivan en un medio nutritivo líquido, como sangre o cultivo en caldo, la filtración o centrifugación se realiza varias veces para separar, entre otras cosas, los residuos celulares insolubles. A diferencia de un medio de cultivo plano con colonias que pueden restringirse espacialmente, los microorganismos en crecimiento en el medio nutritivo líquido están espacialmente dispersos. Como regla general, después de la fase de crecimiento de los microorganismos, los componentes originales del medio nutritivo líquido, por ejemplo, los glóbulos rojos, se descomponen selectivamente y luego se separan de las células del microorganismo, aún en gran parte intactas, con la ayuda de una primera filtración o centrifugación. Los microorganismos se destruyen posteriormente en un agente de extracción o disolvente. Con una filtración o centrifugación adicional, los componentes celulares insolubles o los residuos celulares de los microorganismos se eliminan después de tal forma que solo queden y estén disponibles para la preparación de la muestra los componentes celulares solubles que se liberaron durante la destrucción. Sin embargo, este método de preparación de muestras requiere mucho tiempo.

Surge otro problema si el material biológico a analizar requiere un tiempo largo de descomposición. Las levaduras son un ejemplo de esta situación. En este caso, el agente de extracción debe actuar sobre el microorganismo durante un período largo no únicamente para destruir la subestructura de las resistentes membranas celulares externas, sino también para liberar las subestructuras del interior de la célula que son de interés. Si el material biológico se deposita en un sitio de muestra de un soporte de muestra y luego se humedece con una disolución de la matriz que está destinada a efectuar la descomposición de las células contenidas en el material biológico, el tiempo disponible para que la disolución de la matriz actúe sobre las células está limitado por la vaporización del disolvente. Cuando el disolvente de la disolución de la matriz se ha evaporado, el proceso de descomposición termina, posiblemente antes de que se haya extraído el interior de la célula. En principio, la disolución de la matriz con la que se humedece el material biológico se puede dosificar de manera que garantice que las células se descompongan completamente antes del secado. Sin embargo, las cantidades de disolución de la matriz requeridas para ello se consideran demasiado grandes para ser depositadas en los sitios de muestra que generalmente cubren un área de unos pocos milímetros cuadrados. Aumentar el área del sitio de la muestra mientras se mantiene el método de preparación actual significaría que una cantidad muy pequeña, posiblemente poco perceptible, de material biológico tendría que ser aplicada en un área desproporcionadamente grande en comparación, lo que hace más difícil el posicionamiento del material biológico, particularmente si se deposita manualmente.

En principio, cuando el material biológico es altamente resistente contra la descomposición, puede contrarrestarse con disolventes más concentrados, por ejemplo ácidos fuertes. Sin embargo, generalmente los disolventes fuertes también impiden la formación de una estructura cristalina de la matriz homogénea, que se requiere para un proceso de desorción de alto rendimiento. Para evitar este problema, la descomposición se puede llevar a cabo en dos etapas. En una primera etapa, se agrega un agente de extracción fuerte a la muestra de material biológico en el sitio de la muestra; esto descompone completamente la estructura celular y posteriormente se elimina por evaporación. Después, las moléculas de analito solubles pueden disolverse nuevamente de la costra restante de componentes celulares solubles e insolubles en el sitio de la muestra agregando la disolución de la matriz convencional, que no descompone tan fuertemente, y se incrustan en la matriz que se está formando en el sitio de muestra. Sin embargo, tal preparación en dos etapas es un procedimiento largo, y nuevamente tiene la desventaja de que los componentes celulares insolubles dificultan la formación de una capa homogénea de cristales de la matriz en el sitio de la muestra, donde tienen lugar tanto la descomposición como la cristalización de la matriz.

El documento US2008/0156983 A1 describe una disposición de "laboratorio en un chip" donde las gotas de muestra se pueden mover entre varias placas de diferente funcionalidad por medio de voltajes eléctricos aplicados a los electrodos correspondientes en el chip.

El documento US2002/0151040 A1 presenta aparatos para contener múltiples muestras de volumen micrométrico y realizar múltiples reacciones químicas y bioquímicas simultáneas de volumen micrométrico en un formato de matriz.

En vista de lo anterior, se necesita una preparación de muestra simplificada en un soporte de muestra para ionización mediante desorción láser asistida por matriz con la que se puedan evitar los problemas con la cristalización de matriz descritos anteriormente.

Resumen de la invención

El siguiente resumen se incluye para proporcionar una comprensión básica de algunos aspectos y características de la descripción. Este resumen no es una visión general extensa de la invención y, como tal, no pretende identificar particularmente elementos clave o críticos de la invención o delinear el alcance de la invención. Su único propósito es

presentar algunos conceptos de la invención de forma simplificada como preludeo a la descripción más detallada que se presenta a continuación.

5 La invención se refiere a un método para la preparación de muestras para ionización mediante desorción láser asistida por matriz que se puede usar para superar los problemas mencionados en la introducción, donde se deposita un material analito en un sitio de deposición; se proporciona un sitio de muestra que está separado (o distanciado) del sitio de deposición como el sustrato para una preparación de analito-matriz, y se genera una comunicación líquida entre el sitio de deposición y el sitio de muestra. Por medio de la comunicación líquida, se facilita una transferencia de moléculas de analito solubles de interés desde el sitio de deposición al sitio de muestra, mientras que generalmente impide que los componentes insolubles se transfieran desde el sitio de deposición al sitio de muestra. Después de un
10 cierto período de tiempo, la comunicación líquida se detiene.

15 La invención se basa en el descubrimiento de que una comunicación líquida entre un sitio de deposición y un sitio de muestra permite que las moléculas de analito de interés se separen de los residuos celulares insolubles en el sitio de deposición, luego se transfieran al sitio de muestra, donde la cristalización del material de la matriz, con la incrustación asociada de las moléculas de analito en la estructura cristalina de la matriz, no se ve impedida, al menos no por los residuos celulares insolubles, y por lo tanto puede proceder de manera más homogénea. La separación entre el sitio de deposición y el sitio de muestra se selecciona particularmente de manera que los componentes celulares insolubles del material analito en el sitio de deposición no pueden influir, afectar negativamente o impedir la cristalización de la matriz en el sitio de muestra. A continuación se mencionan simplemente como una matriz una o varias capas de material de la matriz cristalina, posiblemente con moléculas incrustadas. La idea general consiste en la separación
20 espacial por una parte de la provisión de un material analito, descompuesto o aún por descomponer, y por otra parte la incrustación de las moléculas de analito solubles resultantes de la descomposición en la estructura cristalina de la matriz. Las moléculas de analito solubles se extraen del material analito descompuesto y se difunden, a través de la comunicación líquida, al sitio de muestra real para la desorción mediante láser, o pueden ser transportadas hasta él por un líquido en expansión que contiene las moléculas de analito.

25 La comunicación líquida como se define en esta invención puede ser cualquier tipo de conexión líquida que permita que los componentes celulares disueltos, tales como las moléculas del analito de interés y otras moléculas solubles, se transfieran a través del volumen de líquido de la conexión líquida. La transferencia tiene lugar por difusión debido al gradiente de concentración en los volúmenes de líquido de comunicación, o por el flujo de un líquido que contiene las moléculas de analito disueltas de un sitio a otro. En el sitio de muestra, el volumen de líquido de la conexión de líquido puede comunicarse con el volumen de líquido de una disolución de la matriz que se depositó en el sitio de muestra antes o después de que se estableciera la comunicación líquida. Adicional, o alternativamente, puede comunicarse en el sitio de deposición con el volumen de líquido de un agente de extracción que descompone o ha descompuesto las estructuras celulares.
30

35 Cabe destacar que no se deben ejercer fuerzas impulsoras adicionales sobre las moléculas de analito de interés disueltas para transferirlas desde el sitio de deposición al sitio de la muestra. Por ejemplo, se conoce cómo separar diferentes sustancias disueltas por medio de fuerzas electro-osmóticas que se producen, en un proceso de electroforesis capilar, mediante la aplicación de voltajes a un medio de separación, como un gel o, a veces, también un líquido. Sin embargo, el uso de campos de separación eléctrica requiere que las sustancias disueltas de interés estén presentes en forma ionizada. Por el contrario, la presente invención no se basa en ninguno de estos medios, sino que explota los procesos moleculares siempre presentes en líquidos, tales como la difusión. También cabe
40 mencionar que, de acuerdo con la presente invención, las moléculas de analito de interés no tienen que estar presentes como iones en la disolución.

45 Las muestras preparadas mediante el método de acuerdo con la invención tienen una elevación de matriz muy uniforme a través del soporte de la muestra con solo pequeñas diferencias de altura. Esto significa que la nube de moléculas de analito liberadas durante la desorción mediante láser es más pequeña que en el caso de una matriz con mayores diferencias de altura. De este modo, la energía puede transferirse de manera uniforme y reproducible a los iones en la región de aceleración en el espectrómetro de masas.

50 Se ha encontrado que el número de moléculas de analito solubles que se transfieren a través de la comunicación líquida desde el sitio de deposición al sitio de la muestra es suficiente para una señal de corriente iónica en el detector de espectrometría de masas que es lo suficientemente diferente del ruido de fondo. Este resultado se mantiene en gran medida independientemente de la cantidad de material biológico descompuesto o que aún no se haya descompuesto, por lo que se puede depositar una cantidad abundante en el sitio de deposición. El método también permite aumentar el número de moléculas de analito para cada muestra preparada porque se pueden generar cantidades significativamente mayores de moléculas de analito para una muestra que con los métodos de preparación
55 utilizados hasta ahora. La concentración de iones de analito requerida para superar el límite de detección es, por lo tanto, más fácil de alcanzar. Además, la comunicación líquida puede lograr una distribución casi uniforme de los

componentes celulares disueltos en los volúmenes de líquido, por ejemplo, la comunicación líquida y la disolución de la matriz en el sitio de la muestra, por lo que las moléculas de analito se distribuyen de manera muy uniforme en la matriz después de la cristalización. Este efecto de nivelación significa que las concentraciones de la molécula de analito apenas difieren en la matriz, lo que simplifica la búsqueda de la región objetivo al alinear el láser de desorción en los sitios de muestra que se han preparado de esta manera.

Esto facilita particularmente la preparación manual de la muestra de material biológico como analito en un soporte de muestra, porque el técnico que realiza la preparación puede depositar una mayor cantidad del material biológico en el sitio de deposición sin tener que preocuparse de que esto tenga un efecto negativo sobre la cristalización del material de la matriz. El método también es apropiado para automatizar la preparación de la muestra porque el depósito de la cantidad de material analito ya no requiere una gran precisión, y por ejemplo, se pueden reducir las exigencias sobre los robots de deposición apropiados, que aplican el material biológico en un sitio de deposición, controlado por un programa de ordenador.

Especialmente cuando las moléculas de analito se distribuyen en función de un gradiente de concentración, la comunicación líquida se mantiene preferiblemente tanto como sea necesario para asegurar que la concentración de moléculas de analito solubles en los volúmenes comunicantes de líquidos se iguale completamente entre el sitio de deposición y el sitio de muestra. El tiempo requerido para esto puede determinarse empíricamente, y generalmente depende de la cantidad de disolución de la matriz depositada en el sitio de la muestra y la cantidad de líquido que produce la comunicación líquida, por ejemplo, la sección transversal del flujo que se forma en ella. Es ventajoso mantener el volumen de líquido involucrado en la comunicación líquida pequeño en comparación con los volúmenes líquidos de un agente de extracción en el sitio de deposición y/o el disolvente en el sitio de la muestra para asegurar que no haya transferencia difusiva o convectiva de componentes insolubles del material analito, como hebras de fibra individuales, desde el sitio de deposición hasta el sitio de la muestra.

En la introducción, se nombra MALDI como el tipo preferido de ionización, donde los iones se crean en la nube de desorción generada por un rayo láser pulsado. Sin embargo, es obvio que en la presente invención la desorción con láser es importante únicamente para transferir las moléculas de analito a la fase gaseosa. Por lo tanto, el método de preparación no solo sirve para proporcionar muestras MALDI. Más bien, el tipo de ionización puede seleccionarse libremente según sea necesario para adaptarse a la aplicación. La desorción mediante láser se puede combinar con la ionización química (LDCI), por ejemplo, pero también se pueden usar otros tipos de ionización. El término ionización mediante desorción láser asistida por matriz debe entenderse en un sentido amplio.

El material analito en el sitio de deposición puede humedecerse con un agente de extracción antes de que se establezca la comunicación líquida, lo que provoca una descomposición al menos parcial del material analito. Esto puede ser una desintegración bioquímica. Las fuerzas osmóticas, por ejemplo, pueden hacer que un disolvente con contenido reducido de sal penetre en el interior de las células del material biológico que se ha de desintegrar, que tiene una mayor concentración de sal. En este caso, las paredes celulares no pueden soportar la presión resultante y explotan. Otra versión de la desintegración bioquímica es la descomposición de la membrana celular por la acción de enzimas o ácidos.

Para establecer la comunicación líquida, se puede producir un puente líquido entre el sitio de deposición y el sitio de muestra a partir de la disolución de la matriz, el agente de extracción o una combinación de ambos. Esta forma sencilla de establecer una comunicación líquida utiliza los disolventes o agentes de extracción que ya se están utilizando, y por lo tanto no hay necesidad de considerar especialmente si los líquidos que se van a usar son compatibles entre sí. Es obvio que el agente de extracción y la disolución de la matriz pueden tener los mismos disolventes. De esta manera no es necesario proporcionar varios disolventes o agentes de extracción para llevar a cabo el método. Sin embargo, el agente de extracción y el disolvente de la matriz también pueden ser diferentes.

En una versión que sirve de ejemplo, la proporción entre la cantidad de material analito y la cantidad y/o resistencia del agente de extracción con el que se humedece el material analito es tal que el material analito está casi completamente descompuesto. En el caso de un ácido, por ejemplo, la acidez es un criterio adecuado para la resistencia del agente de extracción. Por lo tanto, también es posible analizar materiales de analito, como las levaduras, que tienen una pared celular muy resistente y cuya descomposición es difícil, por lo que puede requerirse un largo tiempo de descomposición, por ejemplo, para identificar los componentes del interior de la célula. Al separar la deposición del material analito de la incrustación de las moléculas de analito en una estructura de matriz cristalina, es posible permitir que el proceso de descomposición tenga el tiempo suficiente para liberar las moléculas de analito solubles tales como proteínas o péptidos sin interferir con el proceso de cristalización de la matriz.

La comunicación líquida se puede detener después de un período de tiempo predeterminado secando la disolución de la matriz, el agente de extracción o ambos. Cuando se termina la comunicación líquida, se detiene la difusión de moléculas de analito a lo largo de un gradiente de concentración en la dirección del sitio de la muestra. Es preferible

que el tiempo de secado sea suficiente para permitir que la concentración de las moléculas de analito se iguale completamente, lo que significa una distribución aproximadamente igual de las moléculas de analito en los diferentes volúmenes de líquido en comunicación. Este intervalo de tiempo se puede determinar empíricamente. Alternativamente, se puede estimar de acuerdo con la regla de Fick, teniendo en cuenta el volumen de líquido depositado y las diferencias en la concentración.

El secado se puede controlar, en particular, calentando la región del sitio de la muestra (el calentamiento es un ejemplo de una transferencia de energía que se puede producir, por ejemplo, exponiendo el sitio a radiación térmica, a un flujo de gas de secado en caliente o similar), cambiando las condiciones de presión de vapor sobre el sitio de la muestra (por ejemplo, mediante ventilación), o una combinación de ambos. Los componentes volátiles de los líquidos se pueden vaporizar más rápido aplicando calor, por ejemplo. Para este fin, es posible colocar elementos de calentamiento o una fuente de luz infrarroja en el sitio de muestra y/o en el sitio de deposición. En una versión, es posible intercambiar continuamente la atmósfera sobre el sitio de la muestra, en particular extrayéndola con la ayuda de un dispositivo de extracción, como un ventilador o una bomba, en el sitio de la muestra y/o el sitio de deposición con el fin de incrementar la tasa de vaporización y así acelerar el proceso de secado.

En una realización adicional, el sitio de deposición y el sitio de muestra se pueden proporcionar en diferentes estructuras de soporte. Esta separación espacial proporciona una forma más flexible de depositar un material analito e incrustar las moléculas de analito solubles extraídas por descomposición en una estructura de matriz cristalina.

La comunicación líquida se puede establecer y detener moviendo las dos estructuras portadoras entre sí. El movimiento relativo puede consistir, por ejemplo, en un movimiento lineal de las dos estructuras de soporte entre sí, con los frentes de las dos estructuras de soporte enfrentados entre sí.

El material analito puede contener microorganismos en forma no tratada, por ejemplo, material biológico que se toma de una colonia en un medio nutriente o microorganismos lisados. No es obligatorio que el material biológico se descomponga en el sitio de deposición. Por el contrario, esto puede ocurrir con anterioridad. Las ventajas de la invención intervienen especialmente si el material analito depositado en el sitio de deposición todavía contiene una cantidad tal de residuos celulares no interesantes solubles y/o insolubles que podría impedir una cristalización homogénea del material de la matriz.

De acuerdo con una realización preferida, el material analito puede depositarse en el sitio de deposición en una disolución que contiene una sustancia matriz. Con esta realización, es posible depositar todos los líquidos que se utilizarán en el método en el soporte de muestra en una sola etapa, lo que simplifica el método.

La descripción también contiene un método para la preparación de muestras para ionización mediante desorción láser asistida por matriz en un soporte de muestra, con el que se pueden superar los problemas planteados en la introducción y que no están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas como tal, cuando un material analito en forma de microorganismos se deposita en forma no tratada, por ejemplo células cultivadas en o sobre un medio nutriente, como las de una colonia en una placa de agar, en un sitio de deposición en el soporte de muestra; el material del analito se humedece con un agente de extracción o disolvente, que produce al menos una descomposición parcial, y al menos una porción del líquido sobrenadante del agente de extracción o disolvente se transfiere desde el sitio de deposición a un sitio de muestra distante del sitio de deposición en el soporte de muestras. La transferencia se puede llevar a cabo con una pipeta, por ejemplo, que recoge al menos una porción del líquido sobrenadante del agente de extracción o disolvente que se encuentra en el sitio de deposición. Luego, la pipeta se desplaza al sitio de la muestra ubicado en el mismo soporte de muestra, donde nuevamente libera la cantidad de agente de extracción o disolvente absorbido, en el cual están en disolución algunas de las moléculas de analito extraídas del material analito por la descomposición. En una versión preferida, un material de matriz ya se puede disolver en el agente de extracción o disolvente.

La descripción comprende adicionalmente un dispositivo para preparar muestras para ionización mediante desorción láser asistida por matriz que puede usarse para superar los problemas mencionados en la introducción y no está dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas como tales. El dispositivo incluye una unidad de deposición con un primer soporte para una estructura de soporte. Además, tiene una unidad de muestra que tiene un segundo soporte para un soporte de muestra para ionización mediante desorción láser asistida por matriz. Se ha diseñado un dispositivo de posicionamiento para al menos mover el primer soporte y el segundo soporte uno respecto al otro. Además, el dispositivo incluye un sistema de control, diseñado para controlar el funcionamiento del dispositivo de posicionamiento.

El modo de funcionamiento del dispositivo de posicionamiento puede involucrar la unión del primer y el segundo soporte al menos a una distancia de contacto en respuesta a una señal de control del sistema de control, por lo que la parte frontal de una estructura de soporte ubicada en el primer soporte y la parte frontal de un soporte de muestra para ionización mediante desorción láser asistida por matriz ubicado en el segundo soporte se unen de manera que

5 sus frentes se enfrentan el uno al otro. No es absolutamente necesario provocar un contacto directo entre los frentes de la estructura de soporte y el soporte de muestra, como se explica más adelante en relación con las realizaciones de ejemplo. Lo crucial es que el dispositivo de posicionamiento está diseñado para unir a los dos soportes de manera que sus dos frentes entren en contacto si el movimiento de posicionamiento continúa. La distancia de contacto se define especialmente en función de la posibilidad de establecer una comunicación líquida.

10 La unidad de deposición está provista preferiblemente de un primer dispositivo de pipeteo para la deposición automática de líquido sobre una estructura de soporte ubicada en el primer soporte. Adicional o alternativamente, la unidad de muestra puede estar equipada con un segundo dispositivo de pipeteo para la deposición automática de líquido sobre un soporte de muestra para ionización mediante desorción láser asistida por matriz ubicada en el segundo soporte. El sistema de control está especialmente diseñado para controlar el funcionamiento del primer dispositivo de pipeteo y/o el segundo dispositivo de pipeteo.

El primer dispositivo de pipeteo y el segundo dispositivo de pipeteo pueden diseñarse para la deposición múltiple simultánea de líquido. Este diseño puede acelerar el procedimiento de preparación.

15 Una realización adicional del dispositivo contiene sensores que preferiblemente se comunican con el sistema de control para monitorizar la comunicación líquida o la separación entre una estructura de soporte ubicada en el primer soporte y un soporte de muestra ubicado en el segundo soporte. El plural "sensores" se usa aquí solo por simplicidad lingüística. El dispositivo también puede estar equipado con un solo sensor. El sistema de control puede utilizar los datos de medición del sensor o sensores para controlar el posicionamiento del soporte de la unidad de deposición y el soporte de la unidad de muestra entre sí. Los ejemplos de sensores adecuados incluyen sensores de proximidad, tales como sensores ultrasónicos o sensores ópticos que trabajan con luz infrarroja, por ejemplo.

20 La descripción también se refiere a un soporte de muestra para la deposición de muestras preparadas para la ionización mediante desorción láser asistida por matriz que tiene regiones hidrófilas rodeadas por regiones hidrófobas en la superficie, que se pueden usar para superar los problemas mencionados en la introducción, y que no está dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas como tales. Soportes de muestra de este tipo se han descrito en la memoria descriptiva de patente DE 197 54 978 C1 (o los equivalentes GB 2 332 273; US 6,287,872), por ejemplo. En la práctica, el material del analito se deposita en pequeñas zonas de anclaje hidrófilas en un entorno hidrófobo. En particular, las gotitas pipeteadas con sustancia de matriz disuelta y las moléculas de analito disueltas se adhieren a estas zonas de anclaje y cristalizan allí de manera más uniforme de lo que lo harían sin anclajes. En estas zonas de anclaje hidrófilas, los conglomerados de cristal se unen bastante estrechamente a la superficie del soporte de la muestra. Con una preparación cuidadosa, se puede lograr una sensibilidad uniformemente reproducible.

25 De acuerdo con la descripción, los soportes de muestra conocidos se desarrollan adicionalmente de modo que al menos una primera región hidrófila está conectada con al menos una región hidrófila adicional a través de un puente hidrófilo en la superficie del soporte de muestra. Con este diseño, una comunicación líquida entre un sitio de deposición y un sitio de muestra que toman la forma de regiones hidrófilas es particularmente fácil de establecer porque está soportada por las propiedades hidrófilas del puente. Las propiedades hidrófilas hacen que el líquido que se deposita en uno de los sitios fluya hacia la región del puente en la superficie del soporte de la muestra y, por lo tanto, mantenga la comunicación del líquido incluso durante un período prolongado.

30 Las regiones hidrófilas tienen preferiblemente diámetros de entre 100 micrómetros y varios milímetros. El puente hidrófilo, por el contrario, puede tomar la forma de una banda hidrófila estrecha entre el sitio de deposición y el sitio de la muestra en la superficie del soporte de la muestra.

35 El término superficie "hidrófoba" se usa aquí para referirse a una superficie que no es fácil de humedecer con un disolvente y repele a los disolventes, incluso si no se trata (excepcionalmente) de un disolvente acuoso. En el caso de un disolvente de base oleosa, por lo tanto, debería ser correspondientemente una superficie lipófila. Normalmente las moléculas de analito tienen la mejor solubilidad en agua, sin embargo, algunas veces con la adición de disolventes orgánicos solubles en agua. Consecuentemente, se considera que una superficie "hidrófila" es una superficie que se humedece fácilmente por el tipo de disolvente o agente de extracción utilizado, incluso si no se trata de una disolución acuosa.

40 Es preferible que la primera región hidrófila esté conectada con varias regiones hidrófilas adicionales a través de un puente hidrófilo en cada caso. Para ello se puede seleccionar una disposición en forma de estrella. Una región hidrófila puede actuar así como un sitio de deposición desde el cual las moléculas de analito disueltas pueden transferirse a través de puentes hidrófilos a varios sitios de muestra por medio de comunicación líquida. Esto puede ser útil si una muestra de origen microbiano se analiza en diferentes condiciones de desorción con láser tales como la fluencia variable, la duración de la irradiación o la potencia del láser.

45 En un diseño preferido adicional, las regiones hidrófilas se pueden dividir en sitios de deposición y sitios de muestra,

donde los sitios de deposición ocupan un área más grande en la superficie del soporte de muestra que los sitios de muestra, y cada sitio de deposición está conectado con al menos un sitio de muestra a través de un puente hidrófilo en cada caso. El área más grande ocupada por los sitios de deposición significa que se puede usar una mayor cantidad de agente de extracción, y por lo tanto se puede lograr una descomposición más completa para los materiales de analito resistentes a la descomposición fundamental, como las células de levadura, que se depositan en estos sitios de deposición. Además, el sitio de deposición y el sitio de muestra en la superficie de soporte de muestra pueden diferir entre sí por sus diferentes propiedades de superficie. Un sitio de deposición con una superficie rugosa proporciona un mejor sustrato de adhesión para componentes celulares insolubles, por ejemplo, y puede así dificultar la formación y distribución de, al menos, las partículas suspendidas individuales (tales como hebras de fibra individuales) en los volúmenes de comunicación de líquidos.

Descripción breve de las ilustraciones

La invención se puede entender mejor refiriéndose a las figuras siguientes. Los componentes de las figuras no están necesariamente a escala, sino que se hace hincapié en ilustrar los principios de la invención (a menudo de forma esquemática). En las figuras, los números de referencia similares designan las partes correspondientes en las diferentes vistas. El dibujo muestra en:

Figura 1 un ejemplo de realización de un método para la preparación de muestras según la invención.

Figura 2 una realización de ejemplo adicional de un método para la preparación de muestras según la invención.

Figura 3 un ejemplo de realización de un método adicional para la preparación de muestras.

Figura 4 un ejemplo de realización de un dispositivo para la preparación de muestras.

Figura 5 un diagrama de flujo de un procedimiento de ejemplo, y

Figura 6 un ejemplo de realización de un soporte de muestra.

Ejemplos de realizaciones preferidas

La Figura 1 muestra un ejemplo de realización de un procedimiento para la preparación de muestras para la ionización mediante desorción láser asistida por matriz. En la Figura 1A, la primera etapa es proporcionar un soporte de muestra 2, que en esta representación simplificada tiene un sitio de deposición 4 y un sitio de muestra 6 (la flecha de dos puntas indica la dimensión). El sitio de deposición 4 y el sitio de muestra 6 están dispuestos a una distancia entre sí en diferentes regiones en el frente 2* del soporte de muestra. La separación entre el sitio de deposición 4 y el sitio de muestra 6 es preferiblemente aproximadamente la misma que la separación entre dos sitios de muestra en soportes de muestra MALDI convencionales, en particular unos pocos milímetros. Esta separación tiene la consecuencia ventajosa de que los componentes celulares insolubles de un material analito descompuesto en el sitio de deposición 4 no pueden impedir la cristalización de la matriz en el sitio de muestra 6. El sitio de deposición 4 y el sitio de muestra 6 pueden diferir no solo en su separación espacial sino también en el hecho de que ocupan áreas de diferente tamaño y/o diferentes propiedades de superficie en la superficie del soporte de muestra 2.

En la Figura 1B, el material biológico tal como el material analito 10 se deposita en el sitio de deposición 4 utilizando un hisopo de inoculación 8. Por ejemplo, se puede untar manualmente mediante un movimiento adecuado del hisopo de inoculación 8. A diferencia de la práctica actual, en la que se impide la cristalización si se supera una cierta cantidad de material biológico, que puede ser difícilmente visible para el ojo humano, el método según la invención no requiere que se respete una cierta dosis del material analito 10 adherida. Puede aplicarse en cantidades muy grandes, por ejemplo, en tal caso el gran número de moléculas de analito, y por lo tanto de iones de analito, disponibles permite que sea más fácil exceder el límite de detección en el análisis espectrométrico de masas posterior. De esta manera se facilita particularmente la deposición manual del material biológico.

En la Figura 1C, se deposita un agente de extracción 12, que provoca la descomposición del material analito 10, sobre el material analito 10 en el sitio de deposición 4. La subestructura de las células del material biológico se libera en forma de moléculas de analito 14 (estrellas) en la representación, y estas moléculas comienzan a distribuirse de acuerdo con el gradiente de concentración en el volumen de líquido formado por el agente de extracción 12 en el sitio de deposición 4. Esto se puede ver en la parte izquierda de la Figura 1D. El lado derecho de la Figura 1D muestra cómo se deposita una disolución de la matriz 18 en el sitio de muestra 6 con una pipeta 16. La disolución de la matriz 18 contiene un disolvente y la sustancia de la matriz disuelta, que forma una estructura cristalina después de que el disolvente se haya secado. El disolvente de la disolución de la matriz 18 y el agente de extracción 12 pueden tener la misma composición o composiciones diferentes. En esta etapa del método el volumen de líquido de la disolución de la matriz 18 en el sitio de muestra 6 no contiene ninguna molécula de analito 14.

Para transferir las moléculas de analito 14 del volumen de líquido del agente de extracción 12 en el sitio de deposición 4 al sitio de muestra 6, se establece una comunicación líquida entre los dos volúmenes de líquidos a través del soporte de muestra 2. Esta comunicación líquida se produce en el ejemplo que se muestra en la Figura 1E mediante un puente de líquido 20 entre los dos volúmenes de líquido. Se puede producir un puente de líquido 20, por ejemplo, desplazando la punta de una pipeta desde el volumen de líquido en el sitio de muestra 6 al volumen de líquido en el sitio de deposición 4, o viceversa, mientras se libera un líquido y así se dibuja un rastro de líquido en el soporte de muestra 2. Esto se puede realizar de forma manual o automatizada en el sentido de una operación activa. El puente líquido 20 no requiere necesariamente un volumen adicional de líquido. En su lugar, uno de los líquidos ya presentes en el sitio de deposición 4 y/o el sitio de muestra 6 se puede usar ejecutando un movimiento de barrido para producir el puente líquido 20. Estas versiones sirven como ejemplos, no exhaustivos, para producir activamente una comunicación líquida. Para producir el puente líquido 20 pueden usarse en particular la disolución de la matriz 18, el agente de extracción 12 o una combinación de ambos. Dado que no hay moléculas de analito disueltas 14 en el volumen de líquido en el sitio de la muestra 6, por ejemplo proteínas o péptidos, algunas de las moléculas de analito 14 en el volumen de líquido en el sitio de deposición 4 siguen el gradiente de concentración a través del puente de líquido 20. En este proceso, las proporciones de concentración de las especies moleculares individuales disueltas presentes en el volumen de líquido en el sitio de deposición 4 se reproducen en gran parte a escala real en el volumen de líquido en el sitio de muestra 6. Los residuos celulares insolubles que quedan después de la descomposición permanecen en el sitio de deposición 4. Como se ilustra, el volumen de líquido del puente líquido 20 es pequeño en comparación con los volúmenes de líquido del agente de extracción 12 en el sitio de deposición 4 y la disolución de la matriz 18 en el sitio de muestra 6 (especialmente si se tiene en cuenta la dimensión del puente líquido perpendicular al plano de proyección, que suele ser más pequeño que la dimensión de una gota de líquido). De esta manera, se puede minimizar la probabilidad de que, por ejemplo, las fibras individuales del material biológico descompuesto del material analito 10 se transfieran por medio de procesos de difusión y/o convección (como partículas suspendidas) desde el sitio de deposición 4 a través del puente líquido 20 al sitio de la muestra 6, donde su presencia hace que la formación de la matriz sea menos homogénea, al menos a pequeña escala.

El puente líquido 20 se mantiene preferiblemente hasta que la concentración de las moléculas de analito disueltas 14 en los volúmenes de comunicación de líquido se haya igualado. La comunicación líquida se puede detener por secado (como se muestra en la Figura 1F; negro). El secado se puede controlar calentando la región del sitio de muestra 6 (no se muestra), disminuyendo las condiciones de presión de vapor sobre el sitio de muestra 6 o una combinación de ambos; en particular, se puede acelerar después de un tiempo predeterminado.

El método descrito con referencia a la Figura 1 también es adecuado para la preparación de material biológico que tiene una alta resistencia a la descomposición y en el que el agente de extracción tiene que actuar durante un largo período de tiempo para liberar los componentes de interés desde el interior de la célula, o en el que se debe usar un agente de extracción muy fuerte. En contraste con el procedimiento habitual hasta ahora -según el cual el material biológico se deposita directamente en el sitio de la muestra y se descompone a través de la acción de un agente de extracción o disolvente, después de lo cual los componentes celulares disueltos se incrustan en la estructura cristalina en formación en un proceso de secado- el proceso de descomposición y el proceso de incrustación en la estructura cristalina de la matriz se pueden separar espacialmente entre sí. Por lo tanto, el secado de la disolución de la matriz en el sitio de la muestra ya no representa un límite de tiempo para la descomposición del material biológico. Sobredosificando o mejorando la capacidad de descomposición del agente de extracción o disolvente correspondientemente, es posible esperar hasta que el material biológico se haya descompuesto completamente antes de que se retiren los componentes solubles del material descompuesto, en forma de moléculas de analito, entre otras cosas, y se incrusten en la matriz de la estructura cristalina en formación en el sitio de muestra proporcionado para la desorción mediante láser.

La Figura 2 muestra un ejemplo de realización adicional de ejemplo de un método para la preparación de muestras. La Figura 2A muestra cómo se proporciona una estructura de soporte 102 con dos sitios de deposición 104a, 104b, y ambos sitios de deposición 104a, 104b se recubren con un material biológico tal como el material analito 108 con la ayuda de un hisopo de inoculación 106. Esto puede automatizarse o llevarse a cabo manualmente. El material biológico dispuesto en los dos sitios de deposición 104a, 104b puede ser el mismo o puede ser diferente. La estructura de soporte 102 puede ser una placa portátil, por ejemplo. Tal como se puede ver en la Figura 2B, se aplica un agente de extracción al material biológico para digerirlo. La descomposición libera los componentes de interés del interior de la célula, tales como las proteínas y/o los péptidos, como moléculas de analito 112 (estrellas) y estos se dispersan a través de los volúmenes de líquido en los sitios de deposición 104a, 104b (Figura 2C).

En este ejemplo, los componentes volátiles del agente de extracción 110 se vaporizan. Los componentes celulares o los residuos celulares insolubles, por lo tanto, permanecen en los sitios de deposición 104a, 104b y forman un tipo de corteza (gris) en los sitios de deposición 104a, 104b (Figura 2D), junto con los componentes solubles tales como las moléculas de analito de interés 112. En paralelo se puede proporcionar un soporte de muestra 114. El número y la disposición de los sitios de muestra 116a, 116b en este soporte de muestra 114 son preferiblemente idénticos al

número y la disposición de los sitios de deposición 104a, 104b en la estructura de soporte 102. Una disolución de la matriz 118, que contiene moléculas de la sustancia de la matriz en disolución (no se muestra) además del disolvente, se deposita en los sitios de muestra 116a, 116b del soporte de muestra 114 por medio de una pipeta (no se muestra), por ejemplo. La estructura de soporte 102 y el soporte de muestra 114 se colocan con los frentes 102*, 114* uno frente al otro, de modo que cada sitio de deposición 104a, 104b esté opuesto a un sitio de muestra 116a, 116b (Figura 2E). Es preferible colocar la estructura de soporte 102 boca abajo, ya que la gravedad no puede deformar la corteza seca del material celular descompuesto.

Con un movimiento relativo (flecha de dos puntas), el soporte de muestra 114 y la estructura de soporte 102 se acercan hasta que los volúmenes de líquido en los sitios de muestra 116a, 116b entran en contacto con la corteza de los componentes celulares secos en los sitios de deposición 104a, 104b (Figura 2F) y, por lo tanto, se establece una comunicación líquida. En particular, el disolvente en la disolución de la matriz 118 hace que la corteza se disuelva parcialmente en este proceso, y los componentes celulares solubles en la porción disuelta se dispersan a través de los volúmenes de líquido en los sitios de muestra 116a, 116b. Las proporciones de concentración de las moléculas de analito individuales se reproducen en gran parte a escala porque -como se muestra en la Figura 2C- los componentes celulares solubles pueden dispersarse libremente en los volúmenes de líquido del agente de extracción 110 en los sitios de deposición 104a, 104b.

Un movimiento adicional (flecha de dos puntas) del soporte de muestra 114 y la estructura de soporte 102 entre sí puede detener el contacto nuevamente después de un cierto tiempo (Figura 2G). Algunas moléculas de analito 112 que se encontraban en la porción disuelta de la corteza en los sitios de deposición 104a, 104b se han transferido a los sitios de muestra 116a, 116b, donde se incrustan en la estructura de matriz cristalina (negro) que se forma en el proceso de secado posterior. La proporción de contacto requerida para asegurar un igualamiento en gran medida completa de la concentración de las moléculas de analito 112 en los volúmenes de líquido en los sitios de muestra 116a, 116b puede determinarse empíricamente, por ejemplo. El proceso de secado también puede controlarse de acuerdo con esta realización por medio de calentamiento dirigido o cambiando las condiciones de presión de vapor (no se muestra). Por lo tanto, es posible preparar un soporte de muestra 114 para la ionización mediante desorción láser asistida por matriz con una estructura de matriz cristalina en gran parte homogénea que es particularmente adecuada para la desorción por láser y que contiene un número suficiente de moléculas de analito 112 para el análisis espectrométrico de masas.

La Figura 3 ilustra una etapa alternativa para la continuación del método de preparación representado en las Figuras 1A a 1C, que se puede usar en lugar del que se muestra en las Figuras 1D a 1F. Aquí se usa una pipeta 16 para coger una porción del líquido sobrenadante del agente de extracción 12 que contiene las moléculas de analito disueltas 14 del sitio de deposición 4; la pipeta se mueve luego al sitio de muestra 6 separado (véanse flechas), donde se libera la cantidad de agente de extracción 12 que se había cogido. En este método simple, se evita la interferencia con la cristalización de la matriz separando espacialmente el sitio donde se descompone el material analito del sitio donde se cristaliza la matriz. Esto es efectivo porque los componentes celulares insolubles o los residuos celulares solo están presentes en el líquido sobrenadante del agente de extracción 12 en cantidades despreciables y, por lo tanto, no son absorbidos por la pipeta 16, o lo son prácticamente nada. Dado que el sitio de deposición 4 y el sitio de muestra 6 están separados, aunque se encuentran muy cerca en el mismo soporte de muestra 2, el método que se muestra en la Figura 3 es particularmente adecuado para la preparación manual de muestras en el laboratorio. Sin embargo, también se pueden concebir soluciones automatizadas con sistemas apropiados de posicionamiento de pipetas.

La figura 4 muestra un ejemplo de realización para un dispositivo 200 para la preparación de muestras para ionización mediante desorción láser asistida por matriz. El dispositivo 200, como se muestra en la Figura 4A, tiene una unidad de deposición 202, que aquí está equipada con una placa de soporte 204 como soporte. Una estructura de soporte 206 se puede colocar y fijar en la placa de soporte 204. La estructura de soporte 206 se puede sujetar a la placa de soporte 204, por ejemplo. La placa de soporte 204 descansa sobre un pivote 208 ubicado en el centro de la placa de soporte 204, de modo que la placa de soporte 204 puede girar. El pivote 208 está conectado a una columna de soporte 212 a través de un brazo 210. El extremo del brazo en la columna de soporte 212 está en conexión operativa con un accionador que puede ejecutar un movimiento lineal en una ranura 214 ubicada en la columna de soporte 212. En el ejemplo mostrado, el pivote 208 y el accionador lineal forman el dispositivo de posicionamiento del dispositivo 200. La altura del brazo 210 con la placa de soporte 204 y, si es necesario, con la estructura de soporte 206 ubicada en la placa de soporte 204 puede ser ajustada mediante el accionador.

El dispositivo también tiene una unidad de muestra 216, que está ubicada en el extremo inferior de la columna de soporte 212 en forma de una placa base 218. La placa base 218 comprende un soporte para un soporte de muestra 220, por un lado y, por otro lado, contribuye a la estabilización del dispositivo 200, que comprende la unidad de deposición 202, la unidad de muestra 216 y el dispositivo de posicionamiento. El sistema de control 222, que se comunica al menos con los componentes del dispositivo de posicionamiento -es decir, con el pivote 208 y el accionador en el ejemplo mostrado- también se encuentra en la columna de soporte 212. Puede operar sobre los componentes

del dispositivo de posicionamiento transmitiendo señales de control y detectar su estado de movimiento al recibir señales de retroalimentación. El sistema de control 222 puede tener un microprocesador programado adecuadamente, por ejemplo.

5 En una versión, un material analito 224 o cantidades de líquido, por ejemplo un agente de extracción o disolvente 226, se pueden depositar manualmente sobre una estructura de soporte 206 que se encuentra en la placa de soporte 204. También es posible depositar una disolución de la matriz manualmente en los sitios de muestra de un soporte de muestra 220 ubicado en la placa base 218. En este caso, es preferible mover la placa de soporte 204 lo más lejos posible de la placa base 218 por medio del accionador. Alternativamente, también puede haber dispositivos de pipeteo para la deposición automática de líquido sobre la estructura de soporte 206 o el soporte de muestra 220 ubicado en los soportes. En la Figura 4, dicho dispositivo de pipeteo está indicado por una fila de puntas de pipeta 228, que son adecuadas para la deposición simultánea múltiple de líquidos en varios sitios de muestra. Esto hace posible acelerar la deposición de una disolución de la matriz en los sitios de muestra, por ejemplo. La fila de pipetas 228 se puede colocar sobre un soporte de muestra 220 ubicado en la placa base 218 y se puede mover hacia un lado después de que se haya depositado el líquido (véase la flecha discontinua de dos puntas). Dicha operación automatizada está también preferiblemente coordinada por el sistema de control 222, con el que los dispositivos de pipeteo pueden comunicarse para este propósito. Sin embargo, también es concebible un control separado de los dispositivos de pipeteo.

20 Con referencia a las Figuras 2E y 2F, la Figura 4B muestra un ejemplo de modo de operación que se utiliza para reunir la estructura de soporte 206 y el soporte de muestra 220. Para este fin, el accionador mueve el brazo 210 verticalmente (flechas discontinuas) hacia la placa base 218 y el soporte de muestra 220 ubicado en él. Al mismo tiempo, la placa de soporte 204 con la estructura de soporte 206 fijada a ella se gira 180° mediante el pivote 208, de manera que el frente 206* de la estructura de soporte 206 y el frente 220* del soporte de muestra 220 estén enfrentados entre sí. También es posible realizar el movimiento lineal y el movimiento de rotación por separado. Lo importante es que la rotación de 180° se termina antes de que los frentes 206*, 220* se muevan juntos a una distancia de contacto, que se define preferiblemente mediante el establecimiento de una comunicación líquida. La última parte de la reunión se hace preferiblemente a través de un movimiento lineal preciso del accionador. La unión puede ser asistida por sensores (no se muestran) ubicados en la placa base 218 y/o la placa de soporte 204. En una versión, los sensores pueden detectar el acercamiento de la estructura de soporte 206 y el soporte de muestra 220. Pueden usarse sensores ultrasónicos o sensores ópticos (como los que emiten luz infrarroja) como sensores de proximidad, por ejemplo. En otra versión, los sensores también pueden monitorizar el establecimiento de la comunicación líquida entre los sitios de muestra en el soporte de muestra 220 y los sitios de deposición en la estructura de soporte 206. Pueden usarse para este propósito sensores de capacitancia o resistencia, por ejemplo.

35 Una vez establecida la comunicación líquida, para la cual no se requiere contacto directo entre las superficies 206* y 220*, si no solo la suficiente proximidad y el suficiente tiempo para que transcurra la transferencia de los componentes celulares solubles del material analito a las gotas de disolución de la matriz en los sitios de muestra, la comunicación líquida se puede detener mediante el levantamiento controlado por el accionador de la placa de soporte 204 hacia afuera de la placa base 218. Si es necesario, se puede realizar el ciclo de posicionamiento explicado con la ayuda de la Figura 4B a la inversa. El residuo de la disolución de la matriz enriquecido con las moléculas de analito durante la comunicación líquida y mantenido en los sitios de muestra ahora se puede vaporizar. La muestra en el sitio de muestra está en principio lista para la desorción con láser.

40 La figura 5 muestra un diagrama de flujo de una realización de un método según la invención. Primero se deposita un material analito en un sitio de deposición. Luego se proporciona un sitio de muestra que se encuentra a una distancia del sitio de deposición y está diseñado como un soporte para una matriz. En una versión, se puede depositar una disolución de la matriz en el sitio de muestra. Finalmente, se establece una comunicación líquida entre el sitio de deposición y el sitio de muestra. La comunicación líquida puede consistir en un puente líquido. En una versión adicional, el material analito en el sitio de deposición se puede humedecer con un agente de extracción antes de que se establezca la comunicación líquida, lo que provoca al menos una descomposición parcial. En una versión adicional, la comunicación líquida se puede detener secando la disolución de la matriz, el agente de extracción o una combinación de los dos. En una versión adicional, el secado puede controlarse calentando la región del sitio de la muestra, cambiando las condiciones de presión de vapor sobre el sitio de la muestra o una combinación de ambos.

50 La Figura 6 es una representación esquemática de un ejemplo de realización de un soporte de muestra 300 con varios sitios 302 (en una superficie de soporte esencialmente plana), que puede actuar como sitio de deposición o sitio de muestra. Los sitios 302 se caracterizan por el hecho de que tienen propiedades hidrófilas, a diferencia de la superficie restante del soporte de muestra 300, que es hidrófoba. Estas propiedades permiten que los sitios localicen y se unan a líquidos acuosos, en particular. La sección ampliada V muestra dos sitios hidrófilos adyacentes 302a, 302b en la superficie del soporte de muestra 300 que están conectados entre sí por un puente hidrófilo 304. Esta ilustración no está realizada a escala, y solo pretende ilustrar el principio. Si una gota de un líquido (no se muestra), por ejemplo, un

5 disolvente o agente de extracción, se deposita en uno de los sitios, puede distribuirse por toda el área hidrófila del sitio 302a o 302b y también puede extenderse a la región del puente hidrófilo 304, desde donde también puede llegar al otro sitio, situado a una distancia. Por lo tanto, se puede establecer una comunicación líquida muy fácilmente entre los sitios separados 302a y 302b, y solo es necesario depositar un líquido en uno de los sitios 302a y 302b. En la práctica además, puede resultar útil, para ayudar a la comunicación líquida, la adición de una cantidad adicional de líquido, como dibujar una traza de líquido de un sitio 302a al otro 302b usando una pipeta. La sección V muestra una conexión simple en forma de un puente estrecho entre dos sitios 302a y 302b. También es posible conectar un sitio seleccionado 302a o 302b con varios otros sitios a través de un puente hidrófilo 304. Una conexión múltiple de este tipo puede comprender una conexión en forma de estrella a los sitios seleccionados inmediatamente adyacentes, por ejemplo.

10 Además, es posible proporcionar algunos sitios seleccionados con un área más grande que otros (no se muestra). Estos pueden servir preferiblemente como sitios de deposición si se requiere una gran cantidad de un agente de extracción o disolvente para descomponer las células de un microorganismo.

15 Se entiende que se pueden cambiar diversos aspectos o detalles de la invención, o que se pueden combinar fácilmente diferentes aspectos descritos en conjunto con diferentes realizaciones de la invención, si es posible, sin apartarse del alcance de la invención. Además, la descripción anterior es solo con fines ilustrativos, y no con el fin de limitar la invención, que se define únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de muestras para ionización mediante desorción láser asistida por matriz, que comprende las etapas:
- 5 a) Depositar un material analito (10; 108) que contiene moléculas de analito solubles (14; 112) de interés y componentes insolubles en un sitio de deposición (4; 104a, 104b);
- b) Proporcionar un sitio de muestra (6; 116a, 116b) que se encuentra a una distancia del sitio de deposición (4; 104a, 104b) y está pensado como un sustrato para una capa de matriz cristalina;
- 10 c) Establecer una comunicación líquida entre el sitio de deposición (4; 104a, 104b) y el sitio de muestra (6; 116a, 116b), promoviendo así una transferencia de moléculas de analito solubles (14; 112) de interés desde el sitio de deposición (4; 104a, 104b) al sitio de muestra (6; 116a, 116b) por difusión debido a un gradiente de concentración en los volúmenes comunicantes de líquido en el sitio de deposición (4; 104a, 104b) y el sitio de muestra (6; 116a, 116b) mientras se impide generalmente que los componentes insolubles se transfieran desde el sitio de deposición (4; 104a, 104b) al sitio de muestra (6; 116a, 116b); y
- d) Suspender la comunicación líquida después de un período de tiempo predeterminado.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que se deposita una disolución de la matriz (18; 118) en el sitio de la muestra (6; 116a, 116b) antes o después de que se haya establecido la comunicación líquida.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que, antes de que se establezca la comunicación líquida, el material analito (10; 108) en el sitio de deposición (4; 104a, 104b) se humedece con un agente de extracción (12; 110), que provoca al menos una descomposición parcial del material analito (10; 108) para liberar generalmente las moléculas de analito solubles (14; 112) de interés.
- 20 4. El método según la reivindicación 2 o 3, en el que se establece la comunicación líquida produciendo un puente líquido (20) de la disolución de la matriz (18), un agente de extracción (12) o una combinación de ambos entre el sitio de deposición (4) y el sitio de muestra (6).
5. El método según una de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la comunicación líquida se detiene después de un período de tiempo predeterminado al secar la matriz, un agente de extracción (12) o ambos.
- 25 6. El método según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el sitio de deposición (104a, 104b) y el sitio de muestra (116a, 116b) se proporcionan en diferentes estructuras de soporte (102, 114).
7. El método según la reivindicación 6, en el que la comunicación líquida se establece y se detiene mediante un movimiento de las dos estructuras de soporte (102, 114) entre sí.
- 30 8. El método según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el material analito (10) contiene microorganismos en forma no tratada o microorganismos lisados.
9. El método según una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la comunicación líquida se mantiene hasta que la concentración de moléculas de analito solubles (14; 112) se ha igualado aproximadamente en los volúmenes comunicantes de líquido.
- 35 10. El método según una de las reivindicaciones 3 a 9, en el que la proporción de una cantidad de material analito (10; 108) a una cantidad y/o fuerza de un agente de extracción (12) es tal que el material analito (10; 108) está casi completamente descompuesto.
11. El método según una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el material analito se deposita sobre el sitio de deposición (4) en una disolución que contiene una sustancia de la matriz.
- 40 12. El método según una de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además:
- proporcionar el sitio de deposición en la estructura de soporte (206) sostenida por un primer soporte (204) en una unidad de deposición (202);
- proporcionar el sitio de la muestra en un soporte de muestra (220) para la ionización mediante desorción láser asistida por matriz sostenida por el segundo soporte (218) en una unidad de muestra (216);
- 45 al menos mover el primer soporte (204) y el segundo soporte (218) uno respecto al otro utilizando un dispositivo de posicionamiento (208) para establecer la comunicación líquida entre el sitio de deposición y el sitio de muestra en el

paso c); y

controlar el funcionamiento del dispositivo de posicionamiento (208) utilizando un sistema de control (222).

- 5 13. El método según la reivindicación 12, en donde el modo de funcionamiento del dispositivo de posicionamiento (208) implica reunir al primer soporte (204) y el segundo soporte (218) al menos dentro de una distancia de contacto en respuesta a una señal de control del sistema de control (222), en donde, en este proceso, el frente (206*) de una estructura de soporte (206) ubicada en el primer soporte (204) y el frente (220*) de un soporte de muestra (220) para la ionización mediante desorción láser asistida por matriz ubicada en el segundo soporte (218) se juntan para que se enfrenten entre sí.
- 10 14. El método según la reivindicación 12 o 13, en donde la unidad de deposición (202) tiene un primer dispositivo de pipeteo para la deposición automática de líquido sobre una estructura de soporte (206) que se encuentra en el primer soporte (204), o la unidad de muestra (216) tiene un segundo dispositivo de pipeteo (228) para la deposición automática de líquido sobre un soporte de muestra (220) para ionización mediante desorción láser asistida por matriz que se encuentra en el segundo soporte (218), y el sistema de control (222) está diseñado para controlar el funcionamiento del primer dispositivo de pipeteo y/o el segundo dispositivo de pipeteo (228).
- 15 15. El método según la reivindicación 14, en donde el primer dispositivo de pipeteo o el segundo dispositivo de pipeteo (228) o ambos están diseñados para la deposición múltiple simultánea de líquido.
16. El método según una de las reivindicaciones 12 a 15, en donde los sensores que se comunican con el sistema de control (222) monitorizan la comunicación líquida o un espacio de separación entre una estructura de soporte (206) ubicada en el primer soporte (204) y un soporte de muestra (220) que se encuentra en el segundo soporte (218).

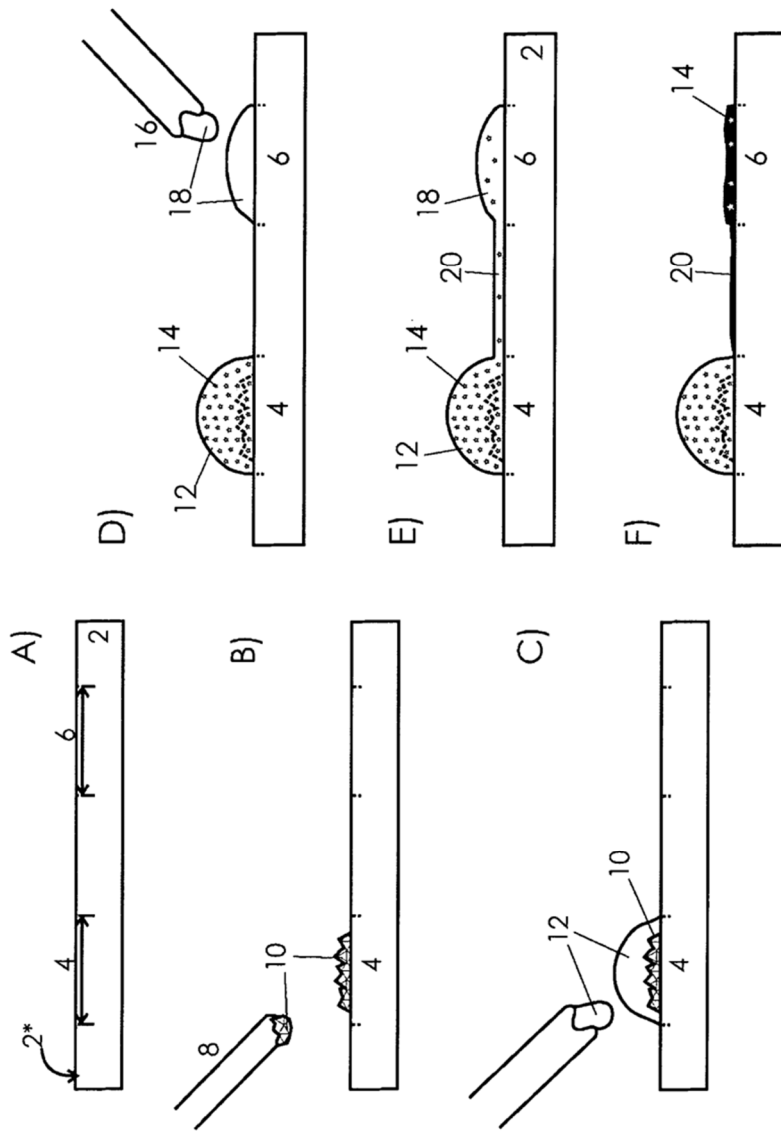


FIGURA 1

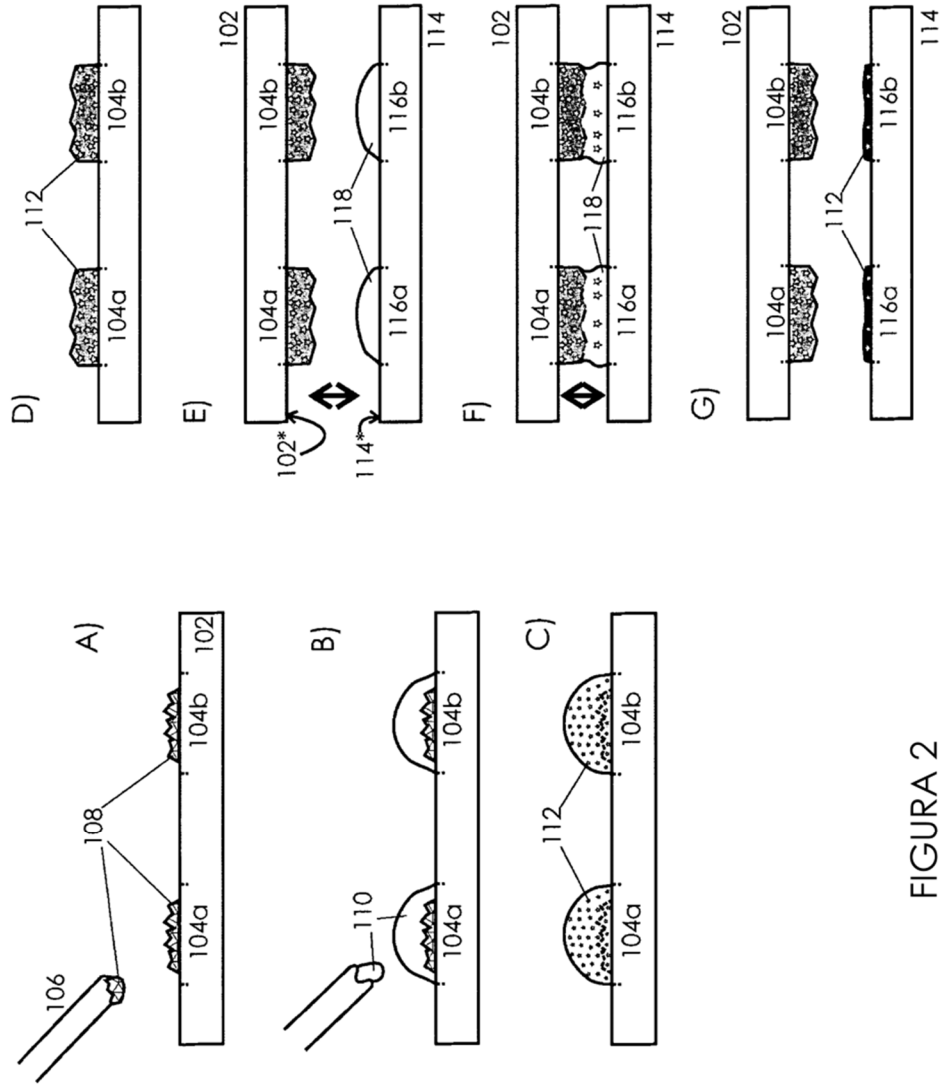


FIGURA 2

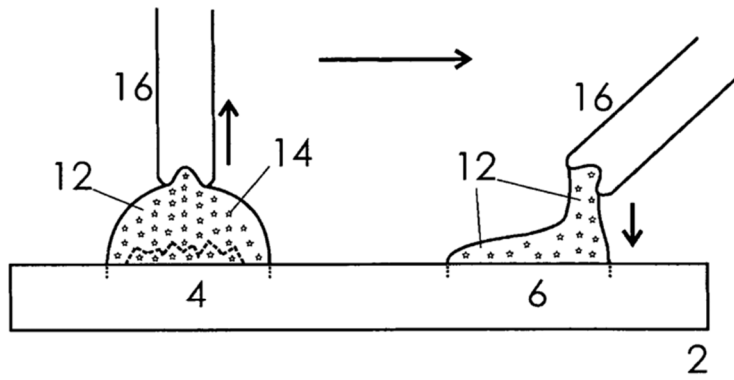


FIGURA 3

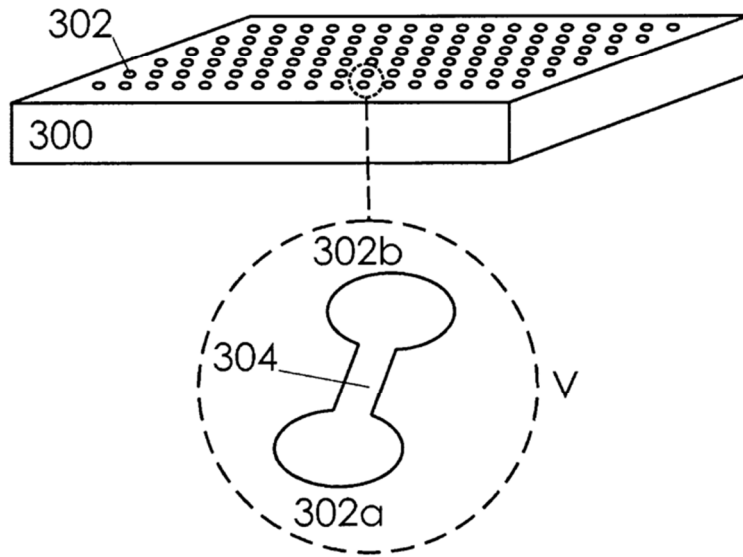


FIGURA 6

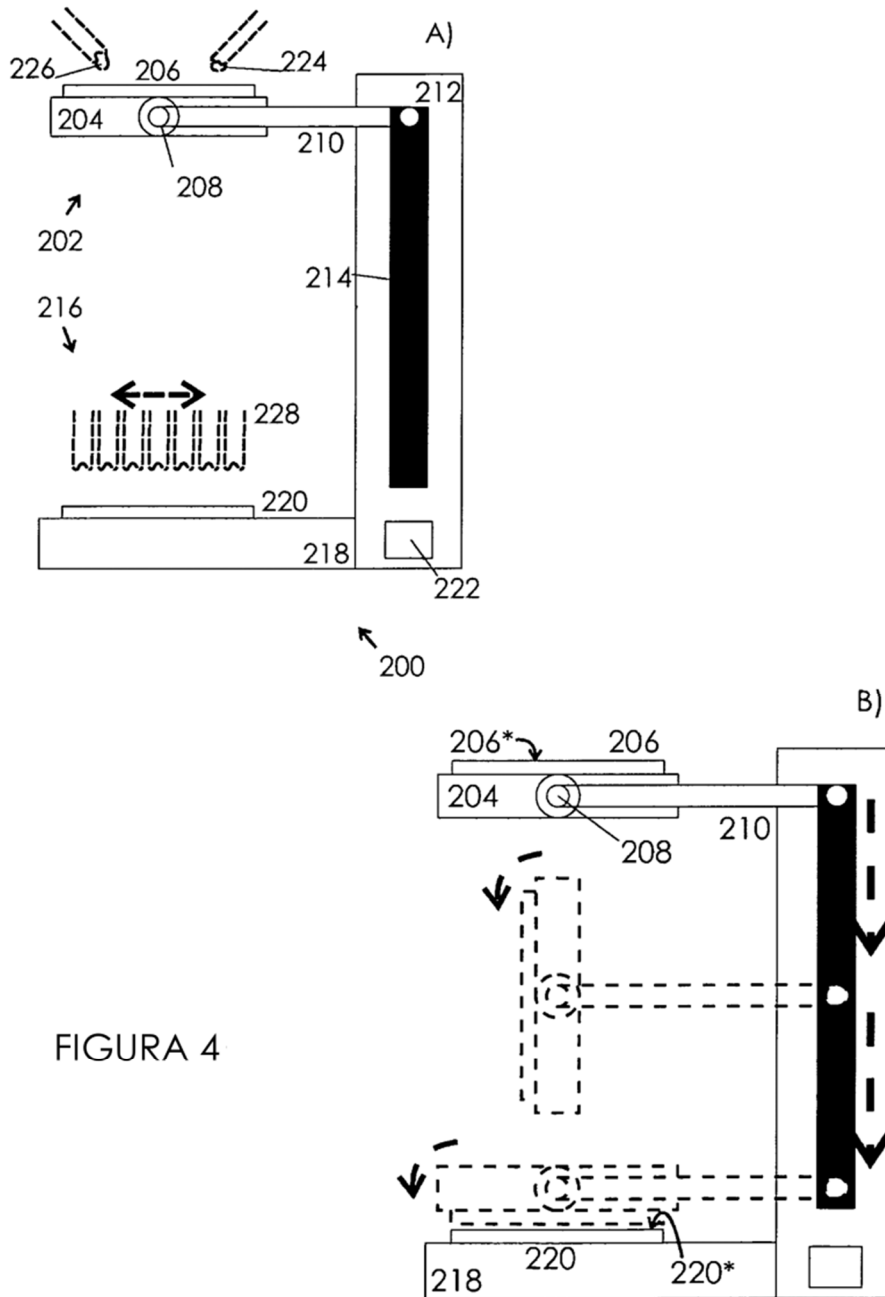


FIGURA 4

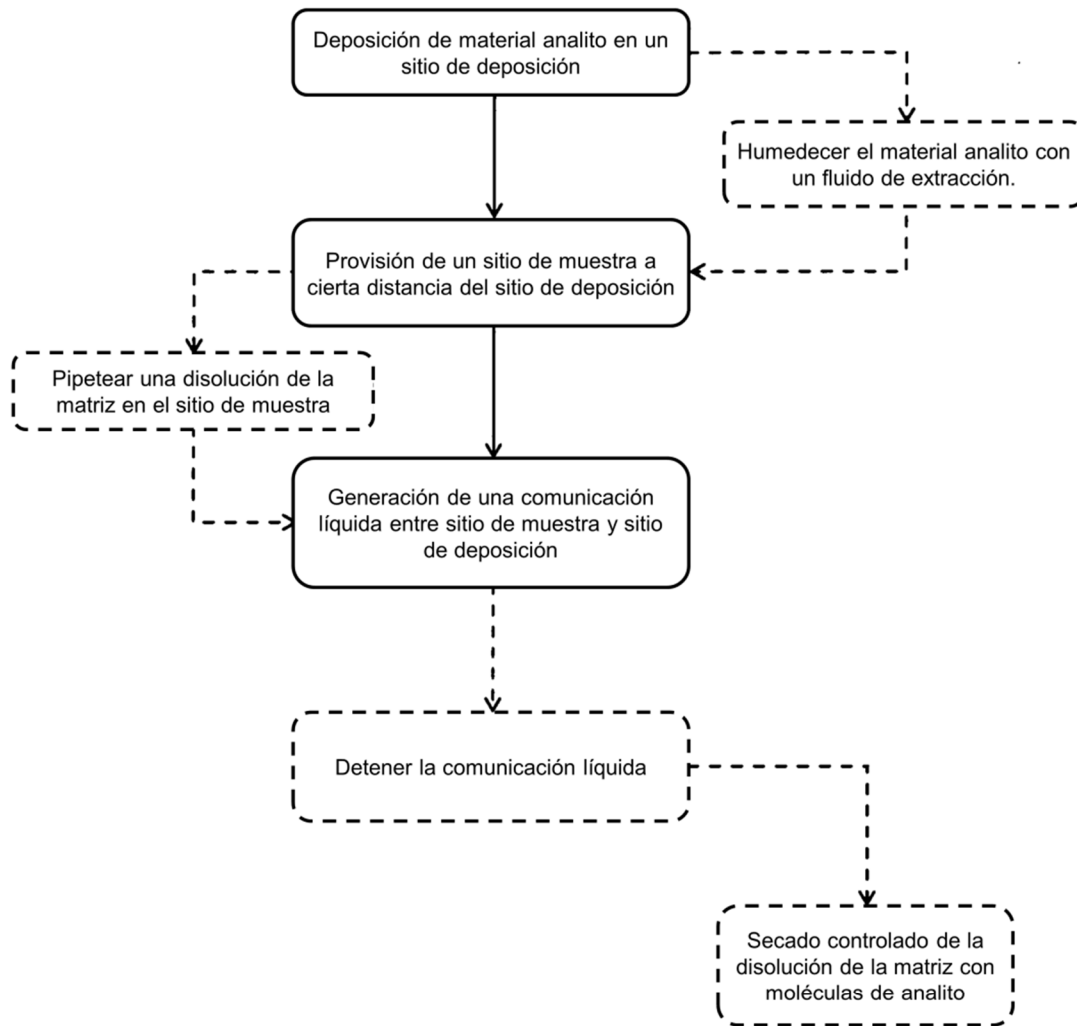


FIGURA 5