

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 134**

51 Int. Cl.:

**B01L 7/00** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2008 PCT/US2008/004487**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2008 WO08124116**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2008 E 08742602 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2155393**

54 Título: **Sistemas para la amplificación múltiple rápida de ácidos nucleicos diana**

30 Prioridad:

**04.04.2007 US 921802 P**

**13.08.2007 US 964502 P**

**12.02.2008 US 28073**

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

**13.03.2020**

73 Titular/es:

**ANDE CORPORATION (100.0%)**

**266 Second Avenue**

**Waltham, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**SELDEN, RICHARD, F.;**

**TAN, EUGENE;**

**LAM, HEUNG, C.;**

**GIESE, HEIDI, S.;**

**KELLOGG, GREGORY, J. y**

**WRIGHT, JOHN, A.**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI , Peter**

ES 2 748 134 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

Sistemas para la amplificación múltiple rápida de ácidos nucleicos diana

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a métodos para la amplificación rápida de uno o más loci dentro de una muestra de ácido nucleico, así como a cicladores térmicos y sistemas útiles para llevar a cabo los métodos.

10 **Antecedentes de la invención**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática que facilita la rápida amplificación exponencial de secuencias de ácido nucleico *in vitro*. En las ciencias forenses, la PCR se puede utilizar para identificar individuos basándose en la amplificación de pequeñas regiones del genoma humano que contienen una clase de ADN repetido conocida como repeticiones cortas en tándem (short tandem repeats, STR). La unidad de longitud de una repetición STR determinada varía entre 2-10 pares de bases, y las STR se encuentran en general dentro de secuencias no codificantes y flanqueantes, pero ocasionalmente dentro de regiones codificantes (Edwards et al., *Am. J. Hum. Genet.* 1991, 49, 746-756). Existen varios cientos de miles de loci STR en el genoma humano, que se encuentran de media cada 6-10 kb (Beckman y Weber, *Genomics* 1992, 12, 627-631) y parece que son altamente polimórficos (Edwards et al., *Trans. Assoc. Am. Physicians* 1989, 102, 185-194). El análisis de las STR se ha convertido en una herramienta principal en el arsenal de los forenses con un conjunto creciente de aplicaciones incluyendo pruebas de paternidad, identificación humana en desastres masivos y tipado de rutina de niños.

Aunque se han desarrollado varios kits de STR disponibles en el mercado para sintetizar los productos de PCR deseados con alta especificidad, hay áreas significativas en las que las tecnologías de STR actuales se pueden mejorar. De manera más importante, el tiempo medio para completar una PCR múltiple utilizando los kits de tipado por PCR comerciales es aproximadamente de 2,14 horas; el consumo de tiempo y la naturaleza de lo trabajoso de estos ensayos ha contribuido a los casos pendientes de los laboratorios forenses. Aunque la llegada de instrumentación automática para procesar múltiples muestras simultáneamente ha ayudado a aliviar el significativo embotellamiento en los resultados de tipado, el creciente número de muestras que se tienen que analizar necesitará una aceleración adicional del procesamiento. Además, existe la necesidad de aumentar la sensibilidad de los ensayos de STR, así como mejorar la detección de los productos amplificados (Gill, *Croat. Med. J.* 2001, 42, 229-32). Los kits de STR disponibles actualmente contienen de nueve a dieciséis loci y hay trabajos en curso en el campo para aumentar el número de loci que se puedan detectar. Ciertas aplicaciones de análisis de STR en el campo se pueden llevar a cabo utilizando 4 o más loci.

También se puede aplicar la PCR en un amplio intervalo de entornos clínicos. Por ejemplo, se puede utilizar la PCR para diagnosticar infecciones bacterianas tales como las causadas por *Streptococcus* del Grupo A resistentes a metilicina, *S. aureus* y *Enterococcus* resistentes a vancomicina y es generalmente más sensible que las técnicas diagnósticas basadas en cultivo. Se puede diagnosticar de manera similar infecciones fúngicas. Se puede utilizar la PCR para diagnosticar virus respiratorios (por ejemplo, virus respiratorio sincitial, adenovirus, y virus de gripe y parainfluenza), virus genito-urinarios (por ejemplo, virus del herpes simple, y virus del tipo papiloma humano), meningitis (por ejemplo, virus del herpes simple, virus de Epstein Barr, virus de varicela-zóster y enterovirus), y hepatitis (por ejemplo, hepatitis B y C). La PCR también es útil en el diagnóstico genético preimplante incluyendo la evaluación de la aneuploidía, así como el diagnóstico de enfermedades hereditarias. De la oncología a la reumatología y de la hematología a la gastroenterología, sería difícil encontrar un área de la medicina en la que la PCR no tenga un impacto.

La PCR se ha aplicado también en una variedad de entornos no clínicos incluyendo la identificación veterinaria (de manera análoga al tipado de STR humano), diagnóstico veterinario, evaluación de seguridad alimentaria, detección de agentes patógenos y farmacogenómica. Una aplicación de creciente importancia se refiere a la identificación de agentes de armas biológicas en muestras clínicas y ambientales. La PCR en tiempo real, pariente cercana de la PCR que permite la cuantificación de la cantidad de producto presente en una reacción a continuación de cada ciclo de amplificación, se utiliza esencialmente en las mismas aplicaciones que la propia PCR (véase, Espy et al., *Clinical Microbiology Reviews* 2006, 19, 1656-256).

La mayoría de los instrumentos de ciclador térmico disponibles en el mercado están limitados porque reciben una retroalimentación de temperatura directamente y controlan la temperatura de bloqueo al contrario que la temperatura de la solución de PCR. Como consecuencia, el perfil de temperatura de la solución, que es crítico para el éxito de la PCR, es probable que sea bastante diferente del perfil deseado.

Además, la mayoría de la bibliografía sobre el aumento de la velocidad y sensibilidad de la PCR se ha enfocado en la amplificación de un locus particular a la vez ("ensayos singleplex") y solamente se ha informado de éxitos limitados en la amplificación simultánea de múltiples loci ("ensayos multiplex") como se necesita en el tipado de STR forense, diagnóstico clínico y aplicaciones no clínicas. Por ejemplo, se ha demostrado que una cámara de 160 nl acoplada a un calentador integrado es capaz de la amplificación y separación de 4 STR contenidas en un ensayo Y-

STR en 80 minutos con un límite de detección de 20 copias de una matriz de ADN. (Liu et al, Anal. Chem. 2007, 79, 1881-1889). Aumentaba la sensibilidad de la PCR debido al reducido volumen de la reacción de PCR también ha sido informado por el Sistema PowerPlex® 16, aunque no se ha hecho ningún intento para aumentar la velocidad de reacción (Schmidt et al., Int. J. Legal Med. 2006, 120, 42-48). Sin embargo, no se ha proporcionado ningún informe para acortar significativamente los tiempos de amplificación que se necesita en la técnica. Hopwood et al., (International Congress Series 1288 (2006) 639-641) informan de una amplificación de cien minutos utilizando un conjunto de 11 cebadores de STR. Con respecto al diagnóstico clínico, se amplificó un panel de siete virus respiratorios comunes utilizando un sistema de nanochip en un ensayo PCR que necesitaba 97,5 minutos (Takahashi et al., J. Clin. Microbiol 2008, doi:10.1128/JCM.01947-07).

Muchas de las aplicaciones de la PCR (y la PCR en tiempo real) tal como la identificación forense humana por tipado de STR, diagnóstico clínico, y detección de un agente de armas biológicas, son extremadamente sensibles al tiempo y muchas de las aplicaciones se llevan a cabo mejor en una configuración múltiple. Además, muchas de estas aplicaciones se utilizan en entornos en los que está disponible una muestra limitada (por ejemplo, un pequeño número de agentes patógenos de una muestra ambiental o clínica o un pequeño número de células humanas en una muestra forense) y la sensibilidad de la reacción es crítica.

En particular, Horsman et al., (J. Forensic Sci., 2007, 52, 784-799) Id. en 792 establece que la "PCR ha sido una búsqueda común entre los investigadores de microchip analíticos, como se demuestra por la abundancia de bibliografía sobre el tema. Sin embargo, para los análisis forenses de ADN, siguen existiendo varias avenidas para el desarrollo. No se ha presentado un trabajo extenso que utilice kits disponibles en el mercado de STR para forenses o, adicionalmente amplificaciones múltiples de STR en un único dispositivo. Cuando se desarrollen completamente, sin embargo, los PCR serán indudablemente un ahorro considerable de tiempo y costos para la comunidad forense". Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de métodos rápidos y sensibles para proporcionar una amplificación simultánea de una pluralidad de loci dentro de una muestra de ácido nucleico para un amplio intervalo de aplicaciones.

El documento WO 99/39005 se refiere a sistemas de PCR que comprenden medios de calentamiento sin contacto y enfriamiento (fuente de luz y corriente de enfriamiento, respectivamente). El documento EP 1710017 se refiere a la arquitectura de un bloque térmico adaptado para albergar una placa de microtitulación y llevando a cabo reacciones de PCR en él de una manera de alto rendimiento. El documento US 2005/019902 desvela un dispositivo donde la temperatura actual de la cámara se midió en relación con la posición de un calentador con el fin de crear un mapa de calor que se utiliza entonces para "calibrar" la temperatura apropiada del termoacoplamiento integrado del dispositivo. El documento US 5.281.516 desvela un ciclador térmico que utiliza luz para calentar y aire para enfriar un soporte de placa que adopta un sustrato plano con una muestra y una cámara de sensibilización. El documento WO 98/009437 desvela un ciclador térmico que utiliza calor por contacto mediante una placa calentadora desmontable y se enfría mediante un ventilador de un portador de sustrato plano.

### Sumario de la invención

Los instrumentos, biochips y sistemas por lo que respecta a como se define en las reivindicaciones adjuntas proporciona la capacidad de calentar y enfriar rápidamente una solución de PCR de manera controlada y reproducible mediante la monitorización y control del ciclo térmico basándose en, al menos en parte, la temperatura actual de la solución. Los instrumentos, biochips, métodos y sistemas desvelados en el presente documento proporcionan la capacidad para monitorizar y/o controlar de manera precisa la temperatura de reacción de una solución dentro de un biochip para evitar un sobre o bajo calentamiento mediante la incorporación específica de termosensores que no están presentes en los cicladores térmicos del mercado. La capacidad para calentar y enfriar rápidamente las soluciones de reacción a dichas temperatura permite que los tiempos de subida y ajuste se minimicen y el tiempo de incubación a la temperatura deseada domine el tiempo total de la etapa. Además, los instrumentos, biochips, métodos y sistemas dan la capacidad para alterar y equilibrar rápidamente la temperatura de una solución de reacción, aumentando mucho de esta manera la velocidad a la cual se produce la reacción de amplificación.

Se han conseguido tiempos rápidos de amplificación en PCR múltiple tan cortos como de diecisiete minutos utilizando instrumentos, biochips y sistemas de la invención. Son posibles reducciones de tiempo adicionales basándose en las enseñanzas de la presente invención. Además, los métodos de PCR rápidos de la presente divulgación son eficaces en un amplio intervalo dinámico, son extremadamente sensibles y son compatibles con un amplio intervalo de enzimas y reactivos disponibles en el mercado. Para aplicaciones forenses, los instrumentos, biochips y sistemas de la invención hacen posible una reducción significativa del tiempo necesario para generar perfiles completos que satisfagan las directrices de interpretación del análisis de STR.

En un primer aspecto, la invención proporciona sistemas que comprenden un biochip que comprende una o una pluralidad de cámaras de reacción que comprenden una parte del biochip que tiene un volumen, donde cada cámara de reacción comprende adicionalmente un canal de microfluídica de entrada y un canal de microfluídica de salida, donde cada cámara de reacción tiene un espacio de menos de 200 μm desde una superficie de contacto del sustrato del biochip; el sistema comprende adicionalmente un ciclador térmico, que comprende una bomba de calor con gran

capacidad de calentamiento y enfriamiento tal como un dispositivo Peltier de alta potencia de salida como elemento de control de la temperatura (temperature control element, TCE) que comprende medios para el calentamiento y enfriamiento, un termosensor, un controlador para la recepción de señales desde el termosensor, y una fuente de energía, donde una primera superficie de dicho TCE está adaptada para recibir el biochip, y un termosensor adicional alojado en una carcasa formada del mismo material que el biochip donde la carcasa se coloca próxima al biochip sobre la primera superficie del TCE y mantiene el termosensor adicional a la misma distancia de la primera superficie del TCE que la cámara de reacción del biochip cuando se pone en contacto con la primera superficie del TCE, donde dicho termosensor adicional proporciona una retroalimentación a dicho TCE para ajustar o mantener una solución de la cámara de reacción a una temperatura deseada, y donde la primera superficie del TCE está en comunicación térmica con la superficie de contacto del sustrato del biochip situando el sustrato directamente sobre el TCE.

En un segundo aspecto, la invención proporciona sistemas, como se ha definido anteriormente, donde cada cámara de reacción está espaciada menos de 100  $\mu\text{m}$  de una superficie de contacto del sustrato del biochip.

También se desvelan en el presente documento métodos para la amplificación simultánea de una pluralidad de loci en una solución de ácidos nucleicos que comprende la provisión de una o una pluralidad de cámaras de reacción donde cada cámara de reacción comprende (i) una solución de ácidos nucleicos que comprende al menos una copia de al menos un ácido nucleico diana que se va a amplificar; (ii) uno o más tampones; (iii) una o más sales; (iv) un conjunto de cebadores que se corresponde con cada uno de la pluralidad de loci que se van a amplificar; (v) una polimerasa de ácido nucleico; y (vi) nucleótidos, ciclando térmicamente de manera secuencial la temperatura de la solución de ácidos nucleicos en cada cámara de reacción entre el estado de desnaturalización, un estado de hibridación, y un estado de extensión durante un número predeterminado de ciclos con unas tasas de calentamiento y enfriamiento de aproximadamente 4-150  $^{\circ}\text{C}/\text{seg}$ , para dar lugar a una pluralidad de loci amplificados en cada cámara de reacción en aproximadamente 97 minutos o menos.

También se desvelan en el presente documento métodos para la amplificación simultánea de una pluralidad de loci en una solución de ácidos nucleicos que comprende la provisión de una o una pluralidad de cámaras de reacción donde cada cámara de reacción comprende (i) una solución de ácidos nucleicos que comprende al menos una copia de al menos un ácido nucleico diana que se va a amplificar; (ii) uno o más tampones; (iii) una o más sales; (iv) un conjunto de cebadores que se corresponde con cada uno de la pluralidad de loci que se van a amplificar; (v) una polimerasa de ácido nucleico; y (vi) nucleótidos, ciclando térmicamente de manera secuencial la temperatura de la solución de ácidos nucleicos en cada cámara de reacción un número predeterminado de ciclos con unas tasas de calentamiento y enfriamiento de aproximadamente 4-150  $^{\circ}\text{C}/\text{seg}$ , para dar lugar a una pluralidad de loci amplificados en cada cámara de reacción en aproximadamente 97 minutos o menos.

También se desvelan en el presente documento métodos para la amplificación simultánea de 5 o más loci en una solución de ácidos nucleicos que comprende la provisión de una o una pluralidad de cámaras de reacción donde cada cámara de reacción comprende (i) una solución de ácidos nucleicos que comprende al menos una copia de al menos un ácido nucleico diana que se va a amplificar; (ii) uno o más tampones; (iii) una o más sales; (iv) un conjunto de cebadores que se corresponde con los 5 o más loci que se van a amplificar; (v) una polimerasa de ácido nucleico; y (vi) nucleótidos, ciclando térmicamente de manera secuencial la temperatura de la solución de ácidos nucleicos en cada cámara de reacción entre el estado de desnaturalización, un estado de hibridación, y un estado de extensión durante un número predeterminado de ciclos con unas tasas de calentamiento y enfriamiento de aproximadamente 4-150  $^{\circ}\text{C}/\text{seg}$ , para dar lugar a 5 o más loci amplificados en cada cámara de reacción.

En un aspecto adicional, la invención proporciona sistemas de biochips integrados que comprenden un sistema como se ha definido anteriormente, que comprende adicionalmente una segunda cámara de reacción en conexión fluida con la primera cámara de reacción y adaptada para la extracción de ácidos nucleicos, purificación de ácidos nucleicos y limpieza de ácidos nucleicos por pre-PCR, limpieza post-PCR, limpieza pre-secuenciación, secuenciación, limpieza post-secuenciación, separación de ácidos nucleicos, detección de ácidos nucleicos, transcripción inversa, limpieza pre-transcripción inversa, limpieza post-transcripción inversa, ligadura de ácidos nucleicos, hibridación de ácidos nucleicos o cuantificación, donde la primera cámara de reacción está a menos de 200  $\mu\text{m}$  de una superficie de contacto del biochip.

Las realizaciones específicas preferidas de la presente invención se volverán evidentes a partir de la descripción más detallada siguientes de ciertas realizaciones preferidas y las reivindicaciones.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es una fotografía de una realización del ciclador térmico de la invención.

La Figura 1B es una fotografía que muestra una realización de un biochip de microfluídica de 16 carriles para su uso en el ciclador térmico que se muestra en la Figura 1A.

La Figura 2A es un gráfico que muestra los perfiles de temperatura de la solución de bloqueo y reacción para un

ciclo térmico del protocolo de ciclado STR convencional descrito en el presente documento (tiempo de ciclado total: 145,1 minutos).

5 La Figura 2B es un gráfico que muestra los perfiles de temperatura de la solución de bloqueo y reacción para un ciclo térmico del protocolo de ciclado rápido descrito en el presente documento (tiempo de ciclado total: 19,56 minutos).

10 La Figura 3 es un gráfico que muestra los perfiles de temperatura de la bomba de calor y la solución de reacción de un ciclo térmico para un ciclador térmico de la invención utilizando condiciones de ciclado rápido (tiempo de ciclado total: 17,3 minutos).

La Figura 4A es un gráfico que muestra el perfil de STR generado en las reacciones de biochip de acuerdo con la invención utilizando 0,5 ng de matriz de ADN.

15 La Figura 4B es un gráfico que muestra el perfil de STR generado en las reacciones en un tubo de acuerdo con la invención utilizando 0,5 ng de matriz de ADN.

20 La Figura 5A es un gráfico que muestra el efecto del nivel de matriz de ADN sobre la fuerza de la señal en las reacciones en un biochip.

La Figura 5B es un gráfico que muestra el efecto del nivel de matriz de ADN sobre la fuerza de la señal en las reacciones en un tubo.

25 La Figura 6A es un gráfico que muestra el efecto del nivel de matriz de ADN sobre la relación de altura del pico (peak height ratio, PHR) heterocigoto en las reacciones en un biochip.

La Figura 6B es un gráfico que muestra el efecto del nivel de matriz de ADN sobre la PHR en las reacciones en un tubo.

30 La Figura 7A es un gráfico que muestra el efecto del nivel de matriz de ADN sobre la adición de nucleótidos no de matriz (NTA) en las reacciones en un biochip.

La Figura 7B es un gráfico que muestra el efecto del nivel de matriz de ADN sobre la NTA en las reacciones en un tubo.

35 La Figura 8A es un gráfico que muestra el efecto del nivel de matriz de ADN sobre la distorsión por los artefactos de repetición en las reacciones en un biochip.

40 La Figura 8B es un gráfico que muestra el efecto del nivel de matriz de ADN sobre la distorsión por los artefactos de repetición en las reacciones en un tubo.

La Figura 9A es un gráfico que muestra el perfil para la reacción en el biochip (superior) y en el tubo (inferior) generado por el conjunto de cebadores COfiler™ que utiliza la matriz de ADN Ing.

45 La Figura 9B es un gráfico que muestra el perfil para la reacción en el biochip (superior) y en el tubo (inferior) generado por el conjunto de cebadores Identifiler™ que utiliza la matriz de ADN Ing.

La Figura 10 es un gráfico que muestra el perfil de una realización de una reacción de secuenciación, como se describe en el Ejemplo 5.

50 **Descripción detallada de la invención**

Con el fin de conseguir la amplificación múltiple de ácidos nucleicos tal como una PCR, la invención proporciona una instrumentación de ciclado térmico como se define en las reivindicaciones adjuntas. Se desvelan adicionalmente vasos de reacción, y condiciones de reacción que se pueden utilizar para amplificar una pluralidad de loci dentro de una muestra de ácidos nucleicos diana. Como se ilustra en los ejemplos que se proporcionan en el presente documento, los métodos de ciclado térmico rápido se pueden llevar a cabo en biochips de microfluidica utilizando el ciclador térmico de la invención y los métodos descritos en el presente documento.

60 Los métodos son capaces de la amplificación múltiple rápida en aplicaciones además de las que utilizan los biochips y los cicladores térmicos descritos en el presente documento. Por ejemplo, se contemplan específicamente el uso de tubos de pared delgada en los cicladores térmicos convencionales (por ejemplo, cicladores térmicos basados en bloques y el LightCycler™ de Roche) y el uso de métodos de amplificación distintos de la PCR de temperatura ciclada (por ejemplo, la PCR isotérmica o amplificación en círculo rodante).

65 Los métodos desvelados y los biochips, y cicladores térmicos proporcionados por la invención son capaces de

amplificar una pluralidad de loci en menos de 100 minutos dentro de una solución de ácidos nucleicos determinada presentes en cantidades de al menos 0,006 ng de ADN genómico humano (la cantidad de ADN aproximada en una única célula nucleada humana) que contenga el locus o loci del ácido nucleico diana. En otras realizaciones, la amplificación se produce en menos de 90 min, menos de 80 min, menos de 70 min, menos de 60 min, menos de 50 min, menos de 40 min, menos de 30 min, menos de 20 min, menos de 17,7 min, menos de 15 min, menos de 10 min, o menos de 5 min.

En otras realizaciones, se pueden amplificar una pluralidad de loci dentro de un genoma derivado de bacterias, virus, hongos, animales o plantas comenzando a partir de al menos una copia del locus o loci de ácido nucleico diana. Por ejemplo, una muestra que se va a analizar puede comprender menos de 1000 copias, menos de 400 copias, menos de 200 copias, menos de 100 copias, menos de 50 copias, menos de 30 copias, menos de 10 copias, o al menos 1 copia de un ácido nucleico diana antes de la reacción de amplificación múltiple. Además, se puede utilizar menos de un único equivalente genómico de ADN para la amplificación si el locus del ácido nucleico diana está presente en más de una copia del genoma. En general, se pueden amplificar simultáneamente al menos dos loci, y hasta aproximadamente 250 loci dentro de cada ácido nucleico diana en una muestra de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Adicionalmente, se pueden amplificar simultáneamente al menos dos loci, y hasta aproximadamente 250 loci en una pluralidad de ácidos nucleicos diana de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Los ácidos nucleicos diana utilizados en el presente documento pueden ser cualquier ácido nucleico, por ejemplo, ácidos nucleicos humanos, ácidos nucleicos bacterianos, o ácidos nucleicos víricos. La muestra de ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, una muestra de ácido nucleico de una o más células, tejidos o fluidos corporales tales como sangre, orina, semen, fluido linfático, líquido cefalorraquídeo, o líquido amniótico, u otras muestras biológicas, tales como células en cultivo tisular, frotis bucales, enjuagues bucales, heces, láminas de tejido, biopsias de aspiración y muestras arqueológicas tales como tejido óseo o momificado. Los ácidos nucleicos diana pueden ser, por ejemplo, ADN, ARN, o un producto ADN de un ARN sometido a transcripción inversa. Las muestras diana se pueden derivar de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitarse a, eucariotas, plantas, animales, vertebrados, peces, mamíferos, seres humanos, seres no humanos, bacterias, microbios, virus, fuentes biológicas, suero, plasma, sangre, orina, semen, fluido linfático, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, biopsias, biopsias por aspiración con aguja, cánceres, tumores, tejidos, células, lisados celulares, lisados celulares en bruto, células de cultivos tisulares, frotis bucales, enjuagues bucales, heces, tejido momificado, fuentes forenses, autopsias, fuentes arqueológicas, infecciones, infecciones nosocomiales, fuentes de producción, preparaciones farmacológicas, producciones de moléculas biológicas, preparaciones proteicas, preparaciones lipídicas, preparaciones de carbohidratos, objetos inanimados, aire, suelo, savia, metal, fósiles, materiales excavados, y/u otros materiales y fuentes terrestres y extraterrestres. La muestra puede contener también mezclas de materiales de una fuente o diferentes fuentes. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de una bacteria o virus infeccioso se pueden amplificar junto con ácidos nucleicos humanos cuando los ácidos nucleicos de dichas células o tejidos infectados se amplifican utilizando los métodos desvelados. Los tipos de muestras diana útiles incluyen células eucariotas, muestras vegetales, muestras animales, muestras de peces, muestras de mamíferos, muestras humanas, muestras no humanas, muestras bacterianas, muestras microbianas, muestras víricas, muestras biológicas, muestras de suero, muestras de plasma, muestras de sangre, muestras de orina, muestras de semen, muestras de fluido linfático, muestras de líquido cefalorraquídeo, muestras de líquido amniótico, muestras de biopsia, muestras de biopsias por aspiración con aguja, muestras de cáncer, muestras de tumores, muestras tisulares, muestras celulares, muestras de lisados celulares, muestras de lisados celulares brutos, muestras de lisados tisulares, muestras de células en cultivos tisulares, muestras de frotis bucales, muestras de enjuagues bucales, muestras de heces, muestras de tejido momificado, muestras de autopsias, muestras arqueológicas, muestras de infección, muestras de infección nosocomial, muestras de producción, muestras de preparación farmacológica, muestras de producción de moléculas biológicas, muestras de preparaciones proteicas, muestras de preparaciones lipídicas, muestras de preparaciones de carbohidratos, muestras de objetos inanimados, muestras de aire, muestras de suelo, muestras de savia, muestras metálicas, muestras de fósiles, muestras de material excavado, y/u otras muestras terrestres o extraterrestres. Los tipos de muestras forenses incluyen sangre, sangre seca, manchas de sangre, frotis bucales, huellas dactilares, muestras de contacto (por ejemplo, células epiteliales dejadas en el borde de un vaso de bebida, el borde interno de una gorra de beisbol o colillas de cigarrillos), chicle, contenidos gástricos, saliva, raspados de las uñas, suelo, muestras de violaciones, pelo, hueso, piel, y tejidos sólidos. Los tipos de muestras ambientales incluyen el aire filtrado y no filtrado, y el agua, suelo, muestras de frotis de superficies, sobres, y polvos.

Por ejemplo, el método del presente documento puede proporcionar muestras de ácido nucleico amplificadas cuyo análisis da lugar a datos adecuados para la interpretación forense, y en particular, datos que satisfagan las directrices de interpretación forense. Dichas directrices incluyen la fuerza de la señal, el balance de la altura de picos inter-loci, la relación de altura del pico (PHR) heterocigoto, la adición de nucleótidos no matrices (non-template nucleotide addition, NTA) incompletos, y la distorsión por los artefactos de repetición (Scientific Working Group on DNA Analysis Methods, Short Tandem Repeat (STR) Interpretation Guidelines. Forensic Science Communications, 2000, 2(3)).

La frase "en comunicación fluida" como se utiliza en el presente documento, se refiere a dos cámaras, u otros componentes o regiones que contienen un fluido, que se conectan entre ellos de manera que el fluido puede fluir

entre las dos cámaras, componentes o regiones. Por lo tanto, dos cámaras que están en "comunicación fluida" pueden conectarse, por ejemplo, mediante un canal de microfluídica entre las dos cámaras, de manera que el fluido puede fluir libremente entre las dos cámaras. Dichos canales de microfluídica pueden incluir opcionalmente una o más válvulas en ellos que se pueden cerrar u ocluir, con el fin de bloquear y/o controlar de otra manera la comunicación fluida entre las cámaras.

El término "poli(metil metacrilato) o "PMMA", como se utiliza en el presente documento, significa los polímeros sintéticos de metil metacrilato, incluyendo, pero sin limitarse a, los que se venden con los nombres comerciales Plexiglas™, Limacryl™, R-Cast™, Perspex™, Plazcryl™, Acrylex™, ACrylite™, ACryplast™, Altuglas™, Polycast™ y Lucite™, así como los polímeros descritos en las Patentes de EE. UU. N.º 5.561.208, 5.462.995 y 5.334.424.

El término "policarbonato" como se utiliza en el presente documento significa un poliéster de ácido carbónico y glicol o un fenol divalente. Ejemplos de dichos glicoles o fenoles divalentes son p-xileno glicol, 2,2-bis(4-oxifenil) propano, bis(4-oxifenil) metano, 1,1 -bis(4-oxifenil)etano, 1,1-bis(oxifenil)butano, 1,1 -bis(oxifenil) ciclohexano, 2,2-bis(oxifenil) butano, y mezclas de los mismos, incluyendo, pero sin limitarse a, los vendidos con los nombres comerciales Calibre™, Makrolon™, Panlite™, Makroclear™, Cyrolon™, Lexan™ y Tuffak™.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" tiene la intención de englobar el ARN y ADN de cadena sencilla o doble, así como todas y cada una de las formas de ácido nucleico alternativas que contienen bases, azúcares y esqueletos modificados. Por lo tanto, se entenderá que la expresión "ácido nucleico" incluye, pero no se limita a, ARN o ADN de cadena sencilla o doble (y formas de los mismos que pueden tener parcialmente cadenas sencillas o parcialmente cadenas dobles), ADNc, ácidos nucleicos peptídicos ("PNA"), un ADN 2'-5' (un material sintético con un armazón acortado que tiene un espaciado de bases que coincide con la conformación A del ADN; el ADN 2'-5' no se hibridará normalmente con el ADN en forma B, pero se hibridará fácilmente con el ARN), y ácidos nucleicos cerrados ("LNA"). Los análogos de ácidos nucleicos incluyen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión, hibridación de emparejamiento de bases similares o mejoradas. Las formas de purinas y pirimidinas "análogas" son bien conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a aziridinilcitosina, 4-acetilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, inosina, N<sup>6</sup>-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1 -metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N<sup>6</sup>-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N-6-isopenteniladenina, metiléster del ácido uracilo-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido uracilo-5-oxiacético, y 2,6-diaminopurina. Los análogos de armazón de ADN proporcionados por la invención incluyen fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforoamidato, alquil fosfotriéster, sulfamato, 3'-tioacetal, metileno(metilimino), 3'-N-carbamato, morfolino carbamato, y ácidos nucleicos peptídicos (PNA), enlaces metilfosfonato o enlaces alternativos metilfosfonato y fosfodiéster (Strauss-Soukup, 1997, Biochemistry 36:8692-8698), y enlaces bencilfosfonato como se expone en el documento US 6.664.057; véase también Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach, editado por F. Eckstein, IRL Press at Oxford University Press (1991); Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Sciences, Volumen 600, Eds. Baserga y Denhardt (NYAS 1992); Milligan, 1993, J. Med. Chem. 36:1923-1937; Antisense Research and Applications (1993, CRC Press). Los ácidos nucleicos del presente documento se pueden extraer de células o prepararse de manera sintética de acuerdo con cualquier medio conocidos por los expertos en la técnica; por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden sintetizar químicamente o transcribirse o transcribirse inversamente a partir de ADNc o ARNm, entre otras fuentes.

El término "vía" como se utiliza en el presente documento significa un agujero pasante formado en un material sólido para permitir la conexión fluida entre las superficies superior e inferior del material.

Los términos "locus" y "loci" (el plural) como se utilizan en el presente documento significan una o más posiciones específicas en uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, uno o más cromosomas), como se definen en el presente documento.

Las expresiones "locus de STR" y "loci de STR" como se utilizan en el presente documento significa una secuencia de nucleótidos que consiste en un patrón de repeticiones de dos o más nucleótidos en un locus determinado de un ácido nucleico diana. El patrón de repeticiones puede variar de longitud de 2 a 10 pares de bases (pb) y normalmente está en la región de intrón no codificante.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el ciclador térmico se proporciona para que tenga la capacidad de calentar y enfriar una solución de reacción rápidamente, de manera controlada y reproducible. Un ejemplo de una realización del ciclador térmico de la invención se muestra en la **Figura 1A**. La capacidad para calentar y enfriar rápidamente la temperatura de la solución de reacción permite que los tiempos de subida y ajuste se minimicen y el tiempo de incubación a la temperatura deseada domine el tiempo total de la etapa, haciendo posible la minimización de los tiempos de ciclado múltiple.

Las altas tasas de calentamiento y enfriamiento se pueden conseguir utilizando un elemento de control de la temperatura (TCE), sea solo o en comunicación fluida con un disipador de calor. Un TCE comprende un medio para

calentar y enfriar, un termosensor, un controlador que recibe señales del termosensor y una fuente de energía. Los termopares Tipo-T o Tipo-K disponibles en el mercado (de Omega Engineering, Stamford, CT) son más aplicables, pero se pueden utilizar otros tipos de termopar y termosensor incluyendo termistores, semiconductores e infrarrojos. Como apreciará un experto en la técnica, se pueden utilizar otros tipos de sensores tales como sensores de presión de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

La primera superficie del TCE se adapta para aceptar un sustrato esencialmente plano formando, por ejemplo, un rebaje en la primera superficie para aceptar un sustrato (por ejemplo, un biochip, *infra*). Preferentemente, el disipador de calor es un disipador de calor de alta eficacia, tal como, pero sin limitarse a, disipadores térmicos enfriados por ventilador con bases de cobre y aletas de enfriamiento. Más preferentemente, el disipador térmico puede ser una base de cobre enfriada por ventilador y aletas que tengan una resistencia térmica de aproximadamente 0,4 °C/W o menos. Un ejemplo particular y no limitante de un disipador de calor de alta eficacia es E1U-N7BCC-03-GP (Coolermaster, Taiwan ROC).

El ciclador térmico de la invención puede comprender adicionalmente un termosensor posicionado para monitorizar la temperatura de la primera superficie del TCE. Se pueden añadir termosensores adicionales como se desee para conseguir una mejora adicional en el control de temperatura de la muestra. Las temperaturas suplementarias que se pueden monitorizar incluyen las de múltiples regiones en y dentro del sustrato, múltiples regiones en y dentro del disipador de calor, entrada y salida de aire de enfriamiento, entrada y salida de muestras y ambiente.

Es deseable una buena comunicación térmica entre los TCE y el disipador de calor. Cuando las dos superficies emparejadas se preparan apropiadamente, un contacto físico íntimo es suficiente para proporcionar una adecuada transferencia térmica entre los dos componentes. Los materiales de la interfaz térmica (TIM) entre los TCE y el disipador de calor se puede utilizar para aumentar el acoplamiento térmico. Dichos TIM incluyen, pero no se limitan a, adhesivos, grasas, materiales de cambio de fase (PCM), materiales de interfaz térmica metálicos, materiales de interfaz térmica de cerámica, aleaciones metálicas blandas, indio, revestimientos de nanocapa de aluminio, películas submicrométricas, glicol, agua, aceites, anticongelante, compuestos de epoxi, y otros. Los ejemplos específicos incluyen Arctic Silver o Ceramique (Arctic Silver, Visalia, CA; compuestos que tienen resistencias térmicas de < 0,007 °C-in<sup>2</sup>/W), resorte de calor compresible HSD4 (Indium Corp, Utica, NY), HITHERM (GrafTech International Holdings Inc., Lakewood, OH), o la unión directa del TCE a la superficie del disipador térmico. El contacto térmico se puede aumentar adicionalmente por fijación física de los componentes con una fuerza media de más de 0,137 bares (2 psi), o más de 0,345 bares (5 psi), o más de 0,689 bares (10 psi), o más de 2,068 bares (30 psi), o más de 4,136 bares (60 psi), o más de 6,895 bares (100 psi), o más de 13,789 bares (200 psi), o por unión directa de las superficies.

La transferencia térmica entre el TCE y un sustrato en contacto con este se puede aumentar con respecto a los cicladores térmicos en bloque, tal como el ciclador térmico Eppendorf Mastercycler™ ep gradient S (que proporciona energía calorífica mediante un bloque de plata con alta conductividad térmica y baja capacidad calorífica específica), colocando el sustrato directamente sobre el TCE. Los TCE incluyen una bomba de calor de alta capacidad de calentamiento y enfriamiento, y dispositivos Peltier de alta potencia de salida; ejemplos de dispositivos Peltier son 9500/131/150B (Ferrotec, Bedford NH), XLT2393 (Marlow, Dallas TX). Cuando se utiliza como parte del TCE para cicladores térmicos de la invención, los dispositivos Peltier se alimentan ventajosamente mediante un puente H. Un ejemplo de dispositivo de puente H es el 5R7-001 (Oven Industries).

Cuando se utilizan dispositivos Peltier como parte del TCE para los cicladores térmicos de la invención, es ventajoso alimentar los dispositivos Peltier mediante un puente H con modulación de anchura de pulso para el calentamiento y enfriamiento. La retroalimentación de temperatura desde el termosensor que mide la temperatura de la muestra dirige al TCE para fijar y mantener la temperatura deseada de la muestra. Los algoritmos de control de temperatura de bucle cerrado para el control del TCE incluyen, pero no se limitan a, control PID y control lógico difuso.

Dichos controladores térmicos comprenden un algoritmo de control que proporciona la capacidad de transición rápida de un estado de temperatura diana a otro estado de temperatura diana. Esta transición se puede dividir en 3 fases distintas. En la fase 1, hay una gran diferencia entre la temperatura actual y la temperatura diana (por ejemplo, de 1 a 20 °C o más). En esta fase tiene lugar la subida gradual en o cerca de su máxima tasa del dispositivo de TCE. En la fase 2, la fase de transición, la temperatura actual y la temperatura diana están más cerca (menos de aproximadamente 1 a 20 °C). En este caso el controlador debe reducir la potencia al TCE con el fin de evitar pasarse de temperatura en la solución y permitir que se alcance rápidamente la temperatura diana con desviaciones y oscilaciones mínimas. En la fase 3, la temperatura diana se ha alcanzado y el controlador modera la energía al ciclador térmico para mantener la solución en un intervalo estrecho alrededor de la temperatura diana. La medición de la temperatura con el sensor proporciona una retroalimentación más precisa de la temperatura diana y también permite que la temperatura de la superficie del TCE se sobrecargue. Cada una de las 3 fases anteriores se puede subdividir en múltiples sub-fases para proporcionar tiempos de respuesta más rápidos, un control de la temperatura más preciso, aumento de estabilidad, y aumento de la tolerancia a la variabilidad externa.

De acuerdo con la invención, el segundo termosensor se aloja en una carcasa, formada del mismo material que se utiliza para el sustrato, que mantiene el segundo termosensor a la misma distancia del TCE que la cámara de

reacción en un sustrato en contacto con el TCE. Dicho segundo termosensor está separado del sustrato (es decir, un sensor que se mantiene solo), y se coloca cerca del sustrato sobre la primera superficie del TCE.

El disipador térmico puede comprender adicionalmente, de manera opcional, un ventilador de enfriamiento de velocidad variable y/o un segundo elemento de calentamiento para el control de la temperatura del disipador térmico, donde cada elemento adicional del disipador térmico está en comunicación con el segundo elemento de control. Esto permite que se ajuste la eficacia de enfriamiento del disipador térmico, en particular para mantener la temperatura del disipador térmico esencialmente constante e independiente de los cambios de temperatura ambiental. El calentador también puede precondicionar el disipador térmico para esencialmente la temperatura de operación.

Para facilitar el acoplamiento térmico de una solución de reacción en un sustrato y el TCE, se puede proporcionar una comunicación térmica uniforme de una superficie de contacto del sustrato con la primera superficie del TCE aplicando una fuerza al sustrato para asegurar lo a este mientras el ciclador térmico está operando. Dichas fuerzas se aplican preferentemente de manera que solo mantenga el sustrato temporalmente en la primera superficie del TCE y se puede retirar fácilmente al completar el ciclo térmico. Por ejemplo, se puede situar un elemento de compresión del chip (CCE) por encima de la primera superficie del TCE para permitir que el sustrato se coloque entre ellos. El elemento de compresión del chip se puede enganchar entonces para mantener el sustrato en su sitio durante la operación del ciclador térmico y liberarlo para permitir la retirada del sustrato. La integración apropiada del CCE, TCE y disipador térmico permite al CCE mejorar el acoplamiento entre estos tres componentes.

La parte del CCE en contacto con un sustrato debe estar formado a partir de un material aislante de baja masa térmica, incluyendo, pero no limitado a, una espuma, por ejemplo, la espuma WF71 Rohacell (Inspec foams, Magnolia, AR). Para las realizaciones expuestas en el presente documento se prefiere la Rohacell. Tiene una capacidad de calor específica de 1,4-1,6 (J/gK) [o menos de masa térmica] y una conductividad térmica de 0,0345 W/mK (o menos).

Los elementos de compresión del biochip incluyen, pero no se limitan a, uno o más de pinzas, resortes, espuma compresible, o una vejiga de aire presurizado que se puede inflar para proporcionar la fuerza para mantener el sustrato en la primera superficie del TCE. Preferentemente, el elemento de compresión del chip proporciona una fuerza sustancialmente uniforme de aproximadamente 0,345 a aproximadamente 17,237 bares (aproximadamente 5 a aproximadamente 250 psia) a una superficie del sustrato, y más preferentemente, aproximadamente 1,379 a aproximadamente 3,447 bares (aproximadamente 20 a 50 psia) para mantener el sustrato en la primera superficie del TCE. Principalmente, la comunicación térmica entre la superficie de contacto del sustrato del biochip y el TCE puede proporcionarse en ausencia de soluciones de acoplamiento térmico tal como un grasa térmica o glicol, aunque se pueden utilizar si es necesario.

Los elementos de compresión del biochip proporcionan una fuerza sobre el biochip-enfriador termoeléctrico-disipador térmico. Esta fuerza sirve para asegurar un buen contacto térmico y de esta manera la transferencia de calor entre el biochip y la superficie superior del TCE.

En una realización, el aislante de baja masa térmica es una vejiga de aire y se utiliza para proporcionar la masa térmica baja y propiedades aislantes. En otra realización, el aislante de baja masa térmica es una almohadilla de espuma. La fuerza de pinzado se puede aplicar a la almohadilla de espuma mediante un cilindro neumático, o almohadillas de espuma de celda cerrada bajo la compresión o presión de aire con una vejiga de aire. En el último caso, la vejiga de aire proporciona tanto aislamiento como fuerza de compresión.

Como se ha descrito anteriormente, el ciclador térmico puede tener una tasa de calentamiento y/o enfriamiento en la primera superficie del TCE aproximadamente de 4-150 °C por segundo, y preferentemente aproximadamente de 8-150 °C/seg, y más preferentemente aproximadamente de 10-150 °C/seg. El ciclador térmico también puede tener una tasa de calentamiento o enfriamiento en una solución dentro de una cámara de reacción o sustrato en comunicación térmica uniforme con la primera superficie del TCE (por ejemplo, un biochip) de aproximadamente 4-150 °C por segundo y preferentemente aproximadamente 8-150 °C/seg, y más preferentemente aproximadamente 10-150 °C/seg. Adicionalmente, el ciclador térmico de la invención puede tener una estabilidad a la temperatura de +/- 1,0 °C, y preferentemente +/- 0,5 °C, y más preferentemente de +/- 0,25 °C.

### **Biochip**

Un ejemplo de biochip (es decir, un sustrato para su uso con el ciclador térmico de la invención) de acuerdo con otro aspecto de la invención se muestra a modo de ilustración en la **Figura 1B**, como que tiene 16 sistemas de microfluídica, comprendiendo cada uno una entrada y una salida en comunicación fluida con cada una de las cámaras de reacción formadas dentro del biochip. Sin embargo, dicha divulgación no pretende ser limitante, más bien, un experto en la técnica reconocerá fácilmente que el biochip puede contener un número alternativo de sistemas de microfluídica (*infra*) incluyendo biochips con un sistema y biochips con dos o más sistemas. El término "pluralidad" como se utiliza en el presente documento, significa dos o más, cuatro o más, ocho o más, 16 o más, 32 o más, 48 o más, 64 o más, 96 o más, 128 o más, o 2 - 16, 2 - 32, 2 - 48, 2 - 64, 2 - 96, 2 - 128, 8 - 128, 8 - 64 u 8 - 32 canales de microfluídica.

El biochip puede comprender una capa de sustrato y una capa de recubrimiento donde una parte de uno o una pluralidad de sistemas de microfluídica, que comprenden agrupamientos y/o con forma de depresiones, están impresos en la capa de sustrato. Una serie de vías (es decir, agujeros pasantes y/o entradas o salidas) se pueden formar en la capa de recubrimiento para proporcionar un acceso fluídico a los canales microfluídicos y las cámaras de reacción y se pueden localizar en cualquier localización alrededor del biochip. De manera alternativa, las vías se pueden formar en la capa de sustrato en vez de den la capa de recubrimiento para conseguir la misma funcionalidad. La superficie superior de la capa del sustrato se puede unir con la superficie inferior de la capa de recubrimiento para completar los sistemas de microfluídica. Las técnicas para la fabricación de sistemas de microfluídica basados en polímero se revisan extensamente por Becker y Gartner (Becker, 2000, Electrophoresis 21, 12-26 y Becker, 2008, Electrophoresis 390, 89). Los biochips se pueden fabricar utilizando materiales tales como copolímeros de olefina cíclica "COC" insaturados, parcialmente insaturados o saturados, polímeros de olefina cíclica "COP" insaturados, parcialmente insaturados o saturados, poli(metil)metacrilato "PMMA", policarbonato "PC", polipropileno "PP", polietileno PE", polieteretercetona "PEEK", poli(dimetilsiloxano) "PDMA", poliimida "PI". Es importante seleccionar un plástico con una temperatura de transición a vidrio mayor que la de la temperatura máxima que se va a utilizar en la reacción de amplificación. Se puede utilizar cualquiera de estos procedimientos y materiales para fabricar los biochips descritos en el presente documento. En particular, los biochips se pueden preparar por moldeado por inyección de un sustrato plástico, por ejemplo, polímeros basados en COC o COP (actualmente vendidos con los nombres comerciales Topas™, Zeonex™, Zeonor™, y Apel™). En esta metodología de fabricación, se fabrica un moldeado por inyección e inserción por moldeado que consiste en el negativo de las características que se van a formar por maquinado y posterior pulido de la superficie. A la vez, el molde y el inserto permiten que las capas de sustrato se fabriquen y el sustrato formado comprenda los canales, las características de la cámara de reacción y las vías. La capa de sustrato y de recubrimiento pueden unirse en difusión mediante la aplicación de calor y presión.

De manera alternativa, se pueden preparar los biochips por grabado en relieve en caliente de películas termoplásticas delgadas con un troquel maestro del negativo de la estructura que se va a producir. El troquel maestro se puede preparar utilizando electroformación para replicar el dispositivo preparado en un sustrato sólido. El sustrato sólido puede ser láminas de cristal que se graban por métodos fotolitográficos convencionales y grabado químico conocidos por los expertos en la técnica. La capa de sustrato y de recubrimiento pueden unirse en difusión mediante la aplicación de calor y presión.

Las capas de sustrato y de recubrimiento del biochip se pueden construir a partir de una variedad de sustratos plásticos que incluyen, pero no se limitan a, polietileno, poli(acrilatos) (por ejemplo, poli (metil metacrilato)), poli(carbonatos), y polímeros de olefina cíclica insaturados, parcialmente insaturados o saturados (COP), o copolímeros de olefina cíclica insaturados, parcialmente insaturados, o saturados (COC). El grosor de la capa de sustrato plástico y de recubrimiento utilizado en el presente procedimientos se mantiene delgado para minimizar la masa del mismo para de esta manera maximizar la transferencia térmica entre el ciclador térmico y la solución de reacción contenida en cada cámara de reacción durante su uso. Las capas de sustrato plástico y de recubrimiento pueden tener cada uno, independientemente, un grosor de menos de 2 mm, menos de 1 mm, menos de 750  $\mu\text{m}$ , menos de 650  $\mu\text{m}$ , menos de 500  $\mu\text{m}$ , menos de 400  $\mu\text{m}$ , menos de 300  $\mu\text{m}$ , menos de 200  $\mu\text{m}$ , o menos de 100  $\mu\text{m}$ ; o las capas de sustrato plástico y de recubrimiento pueden comprender, independientemente, un plástico que tiene un grosor que varía desde 25-2000  $\mu\text{m}$ , 25-1000  $\mu\text{m}$ , 25-750  $\mu\text{m}$ , 25-650  $\mu\text{m}$ , 25-500  $\mu\text{m}$ , 25-400  $\mu\text{m}$ , 25-300  $\mu\text{m}$ , 25-200  $\mu\text{m}$ , o 25-100  $\mu\text{m}$ . Preferentemente, al menos una de las capas de sustrato y recubrimiento tiene un grosor de menos de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  para maximizar la transferencia térmica a la solución de reacción contenida en las cámaras de reacción del biochip. Más preferentemente, una superficie de contacto del biochip que está en contacto con la primera superficie del TCE tiene un grosor de menos de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ .

Cada cámara de reacción se puede formar para tener un volumen de, por ejemplo, menos de 100  $\mu\text{l}$ . Preferentemente, cada cámara de reacción tiene un volumen de menos de aproximadamente 50  $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 40  $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 30  $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 25  $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 20  $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 15  $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 10  $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 5  $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 1  $\mu\text{l}$ , o menos de aproximadamente 0,1  $\mu\text{l}$ . Alternativamente, cada cámara de reacción se puede formar para tener un volumen que varía desde aproximadamente 0,1  $\mu\text{l}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{l}$ . Preferentemente, cada cámara de reacción tiene un volumen que varía desde aproximadamente 0,1  $\mu\text{l}$  a aproximadamente 10  $\mu\text{l}$  o aproximadamente 10  $\mu\text{l}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{l}$ . Las cámaras de reacción no están revestidas en general con un polímero o un revestimiento de silano. Las cámaras de reacción se pueden diseñar para que tengan un canal de entrada y de salida. De manera alternativa, se puede utilizar un único canal para la entrada y la salida.

El diseño de biochip desvelado en el presente documento se aprovecha de los beneficios de la microfluídica incluyendo los que tiene una alta relación superficie a volumen y tiempos de difusión reducidos para maximizar la transferencia de calor, y un calentamiento y enfriamiento uniformes. El uso de la tecnología de microfluídica también proporciona beneficios con respecto a un instrumento de análisis forenses completamente integrado. Adicionalmente, los biochips fabricados por unión de difusión, y sin el uso de adhesivos para unir las distintas capas (por ejemplo, capas COC), se ensayaron y demostraban ser capaces de aguantar desde 6.895 a 103.421 bares (100

a 1500 psi) de presión antes del fallo basándose en las necesidades de la aplicación deseada. Por ejemplo, los biochips de la presente invención aguantan 31.026 bares (450 psi), suficiente para las aplicaciones de ciclado térmico deseado.

5 Se señala que los biochips específicos expuestos en el presente documento sustancialmente carecen de cualquier elemento de calentamiento integrado en el biochip para el calentamiento y/o enfriamiento de las cámaras de reacción. El ciclado térmico de las cámaras de reacción del biochip se proporciona de manera externa, por ejemplo, mediante un ciclador térmico de la invención. Sin embargo, los elementos de calentamiento se pueden integrar en los biochips de la presente invención.

10 En la operación, una parte del biochip puede recibir una o más soluciones de reacción, comprendiendo cada una independientemente uno o más reactivos (por ejemplo, para la PCR) y/o muestras de ácido nucleico, a través de una o más entradas en comunicación fluida con una o más cámaras de reacción formadas dentro del biochip. La amplificación simultánea de una pluralidad de muestras se puede llevar a cabo inyectando cada una de las muestras de ácido nucleico en una cámara de reacción diferente. Se puede proporcionar un inyector para la inyección simultánea de una pluralidad de muestras en la pluralidad de pocillos de muestra o tampón con el biochip para hacer posible la amplificación múltiple de muestras simultáneamente. Dichos inyectores proporcionan, por ejemplo, una muestra de la pluralidad de muestras en una cámara de reacción de la pluralidad de cámaras de reacción. Los inyectores pueden introducir las muestras en los canales de acuerdo con cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante transporte electroforético, accionamiento neumático o accionamiento líquido a través de una aguja o tubo o canal que conecta la muestra con la cámara de reacción.

25 A continuación de la amplificación (y opcionalmente, la extracción y cuantificación del ácido nucleico) el producto de ácido nucleico amplificado puede pasarse (por ejemplo, a un Genebench-FX™ 100) a través de una o más salidas en comunicación fluida con las cámaras de reacción para la separación del fragmento y la generación de los perfiles de STR.

30 El coste relativamente bajo de la fabricación en plástico permite que los biochips sean desechables, eliminando el trabajo necesario para la reutilización del biochip y eliminando esencialmente la posibilidad de contaminación. Un desechable de un solo uso sería particularmente ventajoso para el análisis de un número de copias bajo sin que haya posibilidad de que exista contaminación (distinta de la recolección de muestra inicial). En los entornos en los que ni la contaminación ni el trabajo son consideraciones importantes, se pueden utilizar biochips de cristal y plástico reutilizables.

### 35 **Métodos de integración**

40 El uso de microfluídica permite la fabricación de características para llevar a cabo más de una función en un único biochip. Estas funciones pueden incluir extracción de ácidos nucleicos, purificación de ácidos nucleicos, limpieza pre-PCR de ácidos nucleicos, limpieza post-PCR, limpieza pre-secuenciación, secuenciación, limpieza post-secuenciación, separación de ácidos nucleicos, detección de ácidos nucleicos, transcripción inversa, limpieza pre-transcripción inversa, limpieza post-transcripción inversa, ligadura de ácidos nucleicos, hibridación de ácidos nucleicos y cuantificación. Se pueden conectar dos o más de estas funciones de manera microfluídica para hacer posible el procesamiento secuencial de una muestra; este acoplamiento se denomina integración.

45 Una forma de extracción de ADN por microfluídica se puede conseguir insertando un medio de purificación entre un canal de entrada y salida. Este medio de purificación puede estar basado en fibras de sílice y utiliza reactivos de sales caotrópicas para lisar la muestra biológica, exponer el ADN y unir al ADN al medio de purificación. El lisado se transporta a través del canal de entrada a través del medio de purificación para unir el ADN. El ADN unido se lava mediante un tampón basado en etanol para retirar los contaminantes. Esto se puede conseguir con reactivos de lavado que fluyen por el canal de entrada a través de la membrana de purificación. El ADN unido se eluye entonces de la membrana haciendo fluir un tampón de baja salinidad apropiado (véase, por ejemplo, Boom, documento US 5.234.809) por el canal de entrada a través de la membrana de purificación y saliendo por el canal de salida.

55 Una estrategia para la cuantificación del ADN en un formato de microfluídica se basa en una PCR en tiempo real. En este método de cuantificación, se fabrica una cámara de reacción entre un canal de entrada y de salida. La cámara de reacción se acopla a un ciclador térmico y se acopla un sistema de excitación y detección óptica a la cámara de reacción para permitir que se mida la fluorescencia de la solución de reacción. La cantidad de ADN en la muestra se correlaciona con la intensidad de fluorescencia de la cámara de reacción por ciclo (véase, por ejemplo, Heid et al., Genome Research 1996, 6, 986-994).

60 Para más información acerca de la integración en formatos de microfluídica véase la Solicitud de Patente de EE. UU., titulada "Integrated Nucleic Acid Analysis" presentada el mismo día que la presente (N.º de expediente del mandatario 07-801-US). Para más información acerca de la separación y detección en formatos de microfluídica véase la Solicitud de Patente de EE. UU. Titulada "Plastic Microfluidic Separation and Detection Platforms" presentada el mismo día que la presente (N.º de expediente del mandatario 07-865-US).

Las unidades de microfluídica de la invención son medios para el transporte de fluidos dentro de las cámaras de reacción de los biochips integrados. Un tipo de unidad de microfluídica está afectada por una bomba de membrana incorporada que transporta el fluido por aplicación secuencial de una presión positiva y negativa en la membrana. De manera alternativa, se puede conectar una bomba de desplazamiento positivo en la entrada de la cámara de microfluídica. El desplazamiento de la bomba fuerza al fluido a través del canal de microfluídica.

La integración puede utilizar válvulas de microfluídica para regular el caudal dentro del biochip. La regulación con las válvulas se puede conseguir con estructuras pasivas o activas. Las estructuras de regulación con válvulas pasiva incluyen válvulas capilares que paran el caudal utilizando presión capilar. Los fluidos pueden fluir a través de la estructura de regulación con válvulas capilar mediante la aplicación de una presión que sea lo suficientemente grande para superar las fuerzas capilares. Las estructuras valvulares activas incluyen válvulas de membrana que utilizan estructuras flexibles o semi-rígidas en un punto entre dos canales. La aplicación de presión en la membrana produce que se cierre el canal. La aplicación de un vacío en la membrana la levanta del canal permitiendo el paso de fluidos.

### **Métodos de amplificación**

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona métodos para amplificar simultáneamente una pluralidad de loci de ácido nucleico en uno o más ácidos nucleicos diana mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) rápida. Dichos métodos comprenden proporcionar una o una pluralidad de soluciones de cámaras de reacción, donde cada solución de reacción comprende (i) al menos una copia de al menos un ácido nucleico diana, donde cada ácido nucleico diana es el mismo o diferente y cada ácido nucleico diana comprende independientemente una pluralidad de loci que se van a amplificar, (ii) uno o más tampones; (iii) una o más sales; (iv) un conjunto de cebadores que se corresponde con la pluralidad de loci que se van a amplificar; (v) una polimerasa de ácido nucleico; y (vi) nucleótidos. Cada una de las soluciones de reacción, por ejemplo, cada uno de los ácidos nucleicos diana, puede ser el mismo o diferentes según se necesite, por ejemplo, para ejecutar los análisis múltiples simultáneos en la misma muestra de ácido nucleico, o para ejecutar simultáneamente múltiples muestras de ácido nucleico.

Cada cámara de reacción puede estar contenida dentro de un biochip en línea con la invención como se ha descrito anteriormente o dentro de tubos de reacción de pared fina. Los tubos de reacción de pared fina tienen preferentemente un grosor de pared de menos de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ . Preferentemente, los tubos de reacción de pared fina tienen preferentemente un grosor de pared de menos de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ .

Los cebadores para la amplificación por PCR son secuencias de oligonucleótido que se diseñan específicamente para hibridarse con los loci del ADN diana. Estos cebadores sirven como puntos de inicio para las extensiones por la polimerasa. Para facilitar el análisis de los fragmentos amplificados, también se pueden utilizar cebadores marcados en las reacciones de PCR. Los cebadores marcados son secuencias de oligonucleótido que se acoplan a un resto detectable; un ejemplo no limitante del mismo es un colorante fluorescente. Cuando se lleva a cabo la PCR con cebadores marcados de manera fluorescente, se generan amplicones con un marcador fluorescente. Los métodos para llevar a cabo una PCR rápida son compatibles con cebadores tanto marcados como no marcados, y se ha demostrado la PCR múltiple rápida.

Los conjuntos de cebadores pueden ser cualquiera conocido por los expertos en la técnica para la amplificación de una pluralidad de loci dentro de un ácido nucleico, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, los cebadores útiles en la amplificación de uno o más loci en una muestra de ácido nucleico humano se describen en los documentos US 5.582.989; US 5.843.660; US 6.221.598; US 6.479.235; US 6.531.282; y US 7.008.771; y las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 2003/0180724; 2003/0186272; y 2004/0137504.

Adicionalmente, los cebadores útiles en la amplificación de uno o más loci en un ácido nucleico vírico se describen en, por ejemplo, los documentos US 7.312.036; US 6.958.210; US 6.849.407; US 6.790.952. y US 6.472.155.

Ejemplos de cebadores útiles en la amplificación de uno o más loci en un ácido nucleico bacteriano se describen en, por ejemplo, los documentos US 7.326.779; US 7.205.111; US 7.074.599; US 7.074.598; US 6.664.080. y US 5.994.066.

Las sales y tampones incluyen los que son familiares para los expertos en la técnica, incluyendo los que comprenden  $\text{MgCl}_2$  y Tris-HCl y KCl respectivamente. Los tampones pueden contener aditivos tales como tensioactivos (por ejemplo, Tweens), dimetilsulfóxido (DMSO) glicerol, albúmina sérica bovina (BSA) y polietilenglicol (PEG) así como otros familiares para los expertos en la técnica. Los nucleótidos son generalmente trifosfatos de desoxirribonucleósidos tales como trifosfato de desoxiadenosina (dATP), trifosfato de desoxicitidina (dCTP), trifosfato de desoxiguanosina (dGTP) y trifosfato de desoxitimidina (dTTP) también se añaden a la mezcla de síntesis en una cantidad adecuada para la amplificación del ácido nucleico diana.

Las soluciones pueden calentarse opcionalmente y mantenerlas a una primera temperatura durante un primer periodo de tiempo adecuado para la activación caliente de las polimerasas de ácido nucleico. En general, el primer

periodo de tiempo es menor de aproximadamente 90 segundos. La primera temperatura puede ser de aproximadamente 95 a aproximadamente 99 °C. Las polimerasas con mecanismos de inicio en caliente que pueden activarse en 60 segundos o menos incluyen las que utilizan inicios calientes mediados por anticuerpos y mecanismos de inicio en caliente mediados por aptámeros. De manera alternativa, las polimerasas de inicio en caliente no necesitan utilizarse en la presente invención.

Posteriormente, la temperatura de las soluciones de reacción se cicla secuencialmente entre un estado desnaturalizante, un estado de hibridación, y un estado de extensión durante un número predeterminado de ciclos. En general, la una o una pluralidad de soluciones de reacción se enfrían a partir del estado desnaturalizante al estado de hibridación con una primera velocidad de enfriamiento de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 °C/seg, o aproximadamente 1 a aproximadamente 100 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 80 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 60 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 40 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 30 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 20 °C/seg; aproximadamente 4 a aproximadamente 150 °C/seg, o aproximadamente 4 a aproximadamente 100 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 80 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 60 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 40 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 30 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 20 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 150 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 100 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 80 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 60 °C/seg; de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 30 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 20 °C/seg. La una o una pluralidad de soluciones de reacción se pueden calentar desde el estado de hibridación al estado de extensión con una primera velocidad de calentamiento de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 °C/seg, o aproximadamente 1 a aproximadamente 100 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 80 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 60 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 40 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 30 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 20 °C/seg; aproximadamente 4 a aproximadamente 150 °C/seg, o aproximadamente 4 a aproximadamente 100 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 80 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 60 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 40 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 30 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 20 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 150 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 100 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 80 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 60 °C/seg; de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 30 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 20 °C/seg; y/o la una o una pluralidad de soluciones de reacción se calientan desde el estado de extensión al estado de desnaturalización a una segunda velocidad de calentamiento de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 °C/seg, o aproximadamente 1 a aproximadamente 100 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 80 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 60 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 40 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 30 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 20 °C/seg; aproximadamente 4 a aproximadamente 150 °C/seg, o aproximadamente 4 a aproximadamente 100 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 80 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 60 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 40 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 30 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 20 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 150 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 100 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 80 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 60 °C/seg; de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 30 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 20 °C/seg. Finalmente, las soluciones de reacción se mantienen en un estado final para proporcionar uno o una pluralidad de productos de ácido nucleico amplificado.

Los estados de desnaturalización pueden variar incluyendo en general desde aproximadamente 90 a 99 °C durante tiempos que varían desde aproximadamente 1 a 30 segundos. Los tiempos y temperaturas actuales son dependientes de la enzima, cebador y diana. Para el kit multiplexed STR de Applied Biosystems (AB) para amplificar el ADN genómico humano, se prefieren aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 5 seg.

La influencia de la temperatura de hibridación y el tiempo sobre la especificidad y eficacia de la unión de cebadores a un locus particular dentro del ácido nucleico diana son particularmente importantes para las reacciones de PCR múltiples. La unión correcta de un conjunto de pares de cebadores completo durante la etapa de hibridación puede permitir la producción de la amplificación múltiple de una pluralidad de loci, por ejemplo, una o una pluralidad de perfiles STR completos con una PHR y equilibrio de la fuerza de señal inter-locus aceptables. Para un determinado par de cebadores, los estados de hibridación pueden variar desde aproximadamente 50 °C a 70 °C y con tiempos desde aproximadamente 1 a 30 segundos. Los tiempos y temperaturas actuales son dependientes de la enzima, cebador y diana. Para el kit multiplexed STR de AB para amplificar el ADN genómico humano, se prefieren aproximadamente 59 °C durante 15 seg.

La temperatura y tiempo de extensión tienen un impacto primariamente en el rendimiento del producto del alelo y son una propiedad inherente a la enzima en estudio. Se debería señalar que las velocidades de extensión informadas por el fabricante a menudo se proporcionan para reacciones sencillas; las velocidades de extensión para reacciones múltiples pueden ser mucho más lentas. Para una determinada enzima, los estados de extensión pueden

variar desde aproximadamente 60 °C a 75 °C y con tiempos desde aproximadamente 1 a 30 segundos. Los tiempos y temperaturas actuales son dependientes de la enzima, cebador y diana. Para el kit multiplexed STR de AB para amplificar el ADN genómico humano, se prefieren aproximadamente 72 °C durante aproximadamente 5 seg. Preferentemente, para la continuación de un número predeterminado de ciclos, la solución de reacción se calienta desde el estado de extensión al estado de desnaturalización a una tercera velocidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 °C/seg, o aproximadamente 1 a aproximadamente 100 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 80 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 60 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 40 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 30 °C/seg; o aproximadamente 1 a aproximadamente 20 °C/seg; aproximadamente 4 a aproximadamente 150 °C/seg, o aproximadamente 4 a aproximadamente 100 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 80 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 60 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 40 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 30 °C/seg; o aproximadamente 4 a aproximadamente 20 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 150 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 100 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 80 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 60 °C/seg; de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 30 °C/seg; o aproximadamente 10 a aproximadamente 20 °C/seg. En general el número de ciclos predeterminado se escoge que sea de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 ciclos, aunque se pueden utilizar menos o más ciclos según sea necesario.

Los tiempos de extensión final se pueden reducir significativamente hasta que comienza a aumentar el NTA incompleto. Para una determinada enzima, las temperaturas de extensión final pueden variar desde aproximadamente 60 °C a 75 °C y con tiempos desde aproximadamente 0 a 300 segundos. Los tiempos y temperaturas actuales son dependientes de la enzima, cebador y diana. Para el kit multiplexed STR de AB para amplificar el ADN genómico humano, se prefieren aproximadamente 72 °C durante aproximadamente 90 seg.

Además de la estrategia de ciclado térmico en 3 etapas expuesto anteriormente, este procedimiento también es posible con estrategias de ciclado térmico de 2 etapas. En esta estrategia, las soluciones de reacción se ciclan secuencialmente entre un estado desnaturalizante, y un estado de hibridación/extensión durante un número predeterminado de ciclos. Esta estrategia utiliza cebadores diseñados para hibridarse a la temperatura de extensión, permitiendo que las etapas de hibridación y extensión compartan la misma temperatura. El número reducido de transiciones de temperatura da como resultado una reducción adicional del tiempo de ciclado.

En ciertos aspectos, se puede obtener una pluralidad de productos de ácido nucleico amplificado en aproximadamente 5 a aproximadamente 20 minutos. En ciertos aspectos, se puede obtener una pluralidad de productos de ácido nucleico amplificado en aproximadamente 5 a aproximadamente 5 minutos. Cada producto de ácido nucleico amplificado se puede generar comenzando a partir de menos de aproximadamente 10 ng de ácido nucleico diana. Preferentemente, los productos de ácido nucleico amplificado se pueden generar comenzando desde menos de aproximadamente 5 ng o menos de aproximadamente 2 ng de ácido nucleico, o menos de aproximadamente 1 ng de ácido nucleico, o menos de aproximadamente 0,5 ng de ácido nucleico, o menos de aproximadamente 0,2 ng de ácido nucleico, o menos de aproximadamente 0,1 ng de ácido nucleico, o menos de aproximadamente 0,05 ng de ácido nucleico, o menos de aproximadamente 0,006 ng de ácido nucleico.

En otros aspectos, tales como en la identificación de agentes de armas biológicas en muestras clínicas o ambientales o el diagnóstico de infecciones bacterianas, víricas o fúngicas en seres humanos, plantas y animales, los productos de ácido nucleico amplificado se pueden generar comenzando a partir de al menos una copia de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, una muestra que se va a analizar puede comprender menos de 1000 copias (por ejemplo, de 1-1000 copias), menos de 400 copias, menos de 200 copias, menos de 100 copias, menos de 50 copias, menos de 30 copias, menos de 10 copias o 1 copia de un ácido nucleico diana antes de la reacción de amplificación múltiple.

Además, se puede utilizar menos de un único equivalente genómico de ADN para la amplificación si el locus del ácido nucleico diana está presente en más de una copia del genoma.

En cualquiera de los métodos precedentes, el ciclado térmico puede llevarse a cabo un número predeterminado de ciclos para conseguir una amplificación suficiente de los loci en el ácido nucleico diana como puede determinar un experto en la técnica. Por ejemplo, el número predeterminado de ciclos puede variar entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 ciclos, y preferentemente entre aproximadamente 20 y 50 ciclos. Adicionalmente, en cualquiera de los métodos precedentes, se pueden amplificar simultáneamente al menos 2 loci de uno o una pluralidad de ácidos nucleicos. Dependiendo de la aplicación deseada, se amplifican simultáneamente más de cuatro, 5 a 10, 10 a 20, 20 a 30, o aproximadamente 10 a 250 loci. Por ejemplo, para la amplificación de loci STR, pueden preferirse 10-20 loci.

Preferentemente, la temperatura de las soluciones de reacción se cicla en un ciclador térmico de la invención (*supra*). Aunque puede ser posible utilizar cicladores térmicos en bloque comerciales para el ciclado térmico rápido mediante la compensación del retraso de la respuesta de la solución de PCR ajustando la temperatura del bloque más alta que la temperatura deseada para la solución en las etapas de calentamiento y ajustando la temperatura del

bloque por debajo de la temperatura de la solución deseada en las etapas de enfriamiento, este modo de operación es muy pesado de implementar ya que los puntos de fijación de la temperatura necesarios para compensar la lenta respuesta de subida se tienen que determinar empíricamente. Además, como la retroalimentación y control se llevan a cabo aun por el bloque y no tiene lugar la monitorización de la temperatura de la solución, la repetibilidad y reproductibilidad del perfil puede estar influenciado por factores externos que incluyen cambios en la temperatura ambiente. Por lo tanto, el perfil de temperatura de la solución no es reproducible.

Muchas polimerasas disponibles en el mercado se pueden adaptar para su uso en aplicaciones de PCR rápida utilizando las estrategias descritas en el presente documento. Normalmente, la polimerasa de ácido nucleico tiene una velocidad de extensión de al menos 100 bases/seg. Hay muchas polimerasas disponibles para la amplificación por PCR incluyendo las de *Thermus aquaticus* (Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Pyrococcus woesei* (Pwo), *Thermus flavus* (Tfl), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus litoris* (Tli) y *Thermotoga maritima* (Tma). Estas enzimas, versiones modificadas de estas enzimas, y combinaciones de enzimas, están disponibles en el mercado en vendedores que incluyen Roche, Invitrogen, Qiagen, Strategene, y Applied Biosystems. Las enzimas representativas incluyen PHUSION (New England Biolabs, Ipswich, MA), Hot MasterTaq™ (Eppendorf), PHUSION Mpx (Finzymes), PyroStart (Fermentas), KOD (EMD Biosciences), Z-Taq (TAKARA), y CS3AC/LA (KlenTaq, University City, MO). Una enzima que se utiliza ampliamente para la amplificación por PCR para el tipado de STR es la polimerasa Taq, y la variante TaqGold que se suministra con los kits Identifier™, Profiler™, y COfiler™.

En ciertos aspectos, las condiciones de PCR que se presentan en el presente documento pueden generar perfiles de STR completos de un ácido nucleico diana humano con alta eficacia, aunque la producción de un perfil completo no sea necesario. Un perfil completo de una STR autosómica puede comprender loci tales como de amelogenina, D8S1179, D21S11, D7S820, CFS1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA, o una pluralidad de los mismos. Otros loci STR incluyen análisis de mini-STR e Y-STR. Los criterios para la optimización de los protocolos incluyen la generación de perfiles completos, fuerza de señal, rango dinámico, equilibrio de la fuerza de señal inter-locus, PHR, NTA incompleto, artefactos de repetición y tiempo del ciclo total.

De acuerdo con un aspecto, los protocolos que utilizan la enzima SpeedSTAR y el ciclador térmico de la invención pueden reducir el tiempo de ciclado total para las reacciones en biochip y tubo a 17,3 y 19,1 min respectivamente, para generar perfiles STR completos. En el protocolo, el estado de desnaturalización es aproximadamente de 98 °C durante aproximadamente 4 segundos, el estado de hibridación es aproximadamente de 59 °C durante aproximadamente 15 segundos, el estado de extensión es aproximadamente de 72 °C durante aproximadamente 7 segundos y el estado final es aproximadamente a 70 °C durante aproximadamente 90 segundos.

En ciertos aspectos, el tiempo de ciclado total para al menos 10, 20 o 30 ciclos de PCR múltiple puede variar desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 90 minutos. Preferentemente, el tiempo de ciclado total para al menos 10, 20 o 30 ciclos de PCR múltiple varía desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 90 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 85 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 80 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 75 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 70 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 65 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 55 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 50 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 45 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 40 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 35 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 25 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 20 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 15 minutos; o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 10 minutos o desde aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 minutos. En otras realizaciones, el tiempo de ciclado total para al menos 10, 20 o 30 ciclos de PCR múltiple es menos de aproximadamente 90 minutos. Preferentemente, el tiempo de ciclado total para al menos 10, 20 o 30 ciclos de PCR múltiple es menos de aproximadamente 89, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 minuto.

La invención contempla un biochip integrado que comprende uno o una pluralidad de sistemas de microfluídica, para llevar a cabo la amplificación de PCR múltiple de una pluralidad de loci dentro de una muestra de ácido nucleico, así como al menos otro método de preparación y/o análisis de la muestra dentro de la misma plataforma del biochip. Por ejemplo, dentro de cada sistema de microfluídica en un biochip, que tiene cada uno una dirección del flujo desde un puerto de entrada a un puerto de salida, el sistema puede comprender una pluralidad de cámaras de reacción, donde una primera cámara de reacción de la pluralidad de cámaras de reacción está en comunicación fluida con el puerto de entrada y una última cámara de reacción de la pluralidad de cámaras de reacción está en comunicación fluida con el puerto de salida, y al menos un microcanal que conecta fluidamente cada par consecutivo de cámaras de reacción junto con la dirección de flujo. Al menos una cámara de reacción en cada sistema de microfluídica puede estar a menos de 200 µm de una superficie de contacto del sustrato del biochip para facilitar la comunicación térmica con el ciclador térmico de la invención para llevar a cabo la PCR múltiple dentro de dicha cámara de reacción.

- Cada una de las cámaras de reacción restante dentro de cada uno de los sistemas de microfluídica del biochip se puede adaptar para la extracción de ácido nucleico, purificación de ácido nucleico, hibridación de ácido nucleico, ligadura de ácido nucleico, limpieza pre-PCR del ácido nucleico, limpieza post-PCR, limpieza pre-secuenciación, secuenciación, limpieza post-secuenciación, separación y detección, transcripción inversa, limpieza pre-transcripción inversa, y/o limpieza post-transcripción inversa, separación electroforética, detección del ácido nucleico. El término "limpieza" como se utiliza en el presente documento significa la retirada de los componentes de reacción (incluyendo aniones, cationes, oligonucleótidos, nucleótidos, conservantes, enzimas, o inhibidores) que pueden interferir con cualquiera de los procedimientos de la cámara de reacción enumerados anteriormente.
- Los ejemplos siguientes son ilustrativos de realizaciones específicas de la invención, y distintos usos de la misma. Solo se exponen con fines explicativos.

## Ejemplos

### 15 Ejemplo 1

#### *Ciclador térmico y biochip de microfluídica a medida*

- Se utilizó un ciclador térmico de la invención como se muestra en la Figura 1A para llevar a cabo un ciclado rápido permitiendo que se calentaran y enfriaran rápidamente las temperaturas de la reacción de PCR, de manera controlable y reproducible. Este instrumento acepta un biochip de microfluídica de 16 cámaras y consiste en un enfriador/calentador termoeléctrico de alto rendimiento montado en un disipador de calor de alta eficacia. Cada una de las 16 soluciones de reacción de PCR se colocó en una cámara individual del biochip de microfluídica acoplado a la bomba de calor aplicando una presión compresiva de 0,2 MPa con un mecanismo de pinzado. La Figura 1B muestra una fotografía del biochip de microfluídica de plástico desechable de 16 muestras. Cada cámara de PCR tiene 500 µm de profundidad y aproximadamente 1 mm de anchura y aloja 7 µl de solución de reacción de PCR.

#### *Instrumentación y perfiles de temperatura*

- En los siguientes ejemplos, todas las reacciones de amplificación en tubo se llevaron a cabo con un Eppendorf Mastercycler™ ep gradient S (Eppendorf North America, Westbury, NY). Los perfiles de bloques de temperatura del instrumento anterior se obtuvieron utilizando un sensor termopar tipo K de 127 µm de diámetro que estaba unido directamente al bloque. Para los perfiles de la solución de reacción se colocó un sensor termopar tipo K de 127 µm de diámetro en los 20 µl de la solución de reacción, dentro de un tubo de PCR de pared fina. La adquisición se llevó a cabo con un termómetro Omega HH506RA Multilogger fijado para adquirir los datos a una tasa de 100 Hz.

- Las reacciones de amplificación en los biochips se llevaron a cabo utilizando el ciclador térmico del Ejemplo 1 con biochips de plástico de 16 muestras como recipientes de reacción. La temperatura de la solución en el biochip de microfluídica se monitorizó insertando un termopar en una cámara sensible dentro del biochip.

#### *Mezcla de componentes de la reacción de PCR y condiciones de ciclado*

- Las reacciones de PCRampFLSTR® Profiler Plus® ID PCR múltiples se llevaron a cabo con el kit de amplificación (kit Profiler Plus ID) (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando el ADN genómico 9947A (Promega, Madison, WI) como matriz. Las polimerasas utilizadas para la amplificación fueron AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (TaqGold™) suministrada con el kit Profiler Plus ID u otras polimerasas: SpeedSTAR HS DNA Polymerase (SpeedSTAR) (Takara BIO USA Inc., Madison, WI), KOD Hot Start DNA Polymerase (KOD) (EMD Biosciences Inc., Gibbstown, NJ), o PyroStart™ Fast PCR Master Mix (PyroStart) (Fermentas Inc., Glen Burnie, MD). Las PCR múltiples con otras polimerasas se llevaron a cabo utilizando el conjunto de cebadores múltiples marcados del kit Profiler Plus ID en combinación con los tampones de polimerasa específicos y los dNTP. Todas las PCR en tubos se llevaron a cabo en tubos de PCR de pared fina de 0,2 ml (Eppendorf North America, Westbury, NY) utilizando el Eppendorf Mastercycler™ ep gradient S. Todas las reacciones en biochips se amplificaron en el ciclador térmico de la **Figura 1A** utilizando biochips de 16 muestras.

- Se prepararon las siguientes mezclas de reacción de PCR y se utilizaron para el ciclado térmico:

#### Reacciones con TaqGold™ convencional:

- Las reacciones múltiples con TaqGold™ convencional consistían en 9,55 µl de mezcla de reacción Profiler Plus ID, 1 ng de ADN genómico 9947A, 5 µl de conjunto de cebadores Profiler Plus ID y 2,25 U de TaqGold™ en un volumen de reacción de 25 µl. Las condiciones de ciclado (temperaturas y tiempos del bloque) se escogieron siguiendo las recomendaciones de los fabricantes y se fijaron en una inicial de 95 °C durante 11 min (inicio en caliente) seguido por 28 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización), 1 min a 59 °C (hibridación), 1 min a 72 °C (extensión) y una extensión final de 45 min a 60 °C.

#### Reacciones con TaqGold™ optimizada:

Las Reacciones con TaqGold™ optimizada para ciclado rápido se llevaron a cabo con 10 µl de volumen de reacción que contenía 3,82 µl de mezcla de reacción Profiler Plus ID, 1 ng de ADN genómico 9947A, 2 µl de conjunto de cebadores Profiler Plus ID y 0,9 U de TaqGold™. Las reacciones se ciclaron a 95 °C durante 11 min, 28 ciclos de 10 s, 98 °C, 45 s, 59 °C, 30 s, 72 °C y una extensión final de 15 min a 72 °C.

#### Reacciones en tubo con SpeedSTAR:

Los componentes de la mezcla de PCR SpeedSTAR para PCR en tubo eran: 2 µl de conjunto de cebadores Profiler Plus ID, ADN genómico 9947A, 1x de tampón I rápido (Takara BIO USA Inc., Madison, WI), 200 µM de dNTP y 0,315 U de SpeedSTAR en un volumen de reacción de 10 µl. Las condiciones de ciclado para la ejecución rápida se fijaron en 1 min a 95 °C (activación enzimática) seguido por 28 ciclos de 4 s a 98 °C, 15 s a 59 °C, 5 s a 72 °C y 1 min a 72 °C de extensión final.

#### Reacciones en biochip con SpeedSTAR:

Para la PCR con biochip los 7 µl contenían 1,4 µl del conjunto de cebadores Profiler Plus ID, ADN genómico 9947A, 1x de tampón I Fast Buffer, 200 µM de dNTP y 0,42 U de SpeedSTAR. Los parámetros de ciclado se fijaron en 70 s a 95 °C, 28 ciclos de 4 s, 98 °C; 15 s, 59 °C, 7 s, 72 °C y una extensión final de 1:30 min a 70 °C.

#### Reacciones con KOD:

La amplificación se llevó a cabo con 2 µl de conjunto de cebadores Profiler Plus ID, 1x de tampón KOD (EMD Biosciences Inc., Gibbstown, NJ), 200 µM de dNTP, 1 ng de ADN genómico 9947A, 1,5 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0.2 U de KOD en un volumen de reacción de 10 µl. Las condiciones de ciclado eran: 2 min, 95 °C seguido por 28 ciclos de 4 s, 98 °C, 30 s, 59 °C, 10 s, 72 °C con una extensión final de 1 min a 72 °C.

#### Reacciones con PyroStart:

Las mezclas de reacción con PyroStart en una concentración final 1x también contenían 2 µl del conjunto de cebadores Profiler Plus ID y 1 ng de ADN genómico 9947A en una reacción de 10 µl y se ciclaron a: 1 min, 95 °C y 28 ciclos de 4 s, 98 °C, 20 s, 59 °C, 30 s, 72 °C con una extensión final de 1 min a 72 °C.

#### PCR múltiple con otros kits de tipado de STR:

La idoneidad de SpeedSTAR para generar perfiles STR completos con otros kits de tipado STR (AmpFISTR® Identifier® (Identifier), AmpFLSTR® COfiler® PCR Amplification Kit (COfiler), (Applied Biosystems) se ensayó en un tubo y biochip con las condiciones de reacción como se ha descrito anteriormente para SpeedSTAR con el kit Profiler Plus ID. En estas reacciones, los conjuntos de cebadores Profiler Plus ID se reemplazaron con el conjunto de cebadores de cada uno de los kits.

#### *Reproductibilidad*

Los estudios de reproductibilidad en un tubo y en biochip se llevó a cabo con TaqGold™ y SpeedSTAR utilizando el ADN genómico Ing 9947A como matriz. Para la reproductibilidad en tubo se prepararon 5 reacciones individuales. La reproductibilidad del biochip se determinó en ejecuciones de PCR con 3 biochip con 8 reacciones cada uno.

#### *Sensibilidad*

Los estudios de sensibilidad para la amplificación de SpeedSTAR en tubo y biochip se llevaron a cabo utilizando las siguientes cantidades de ADN matriz 9947A: En tubo: 4 ng, 2 ng, 1,5 ng, 1 ng, 0,5 ng, 0,25 ng, 0,125 ng, 0,1 ng, 0,05 ng, 0,03 ng, 0,02 ng, 0,01 ng, 0,006 ng; en biochip: 4 ng, 2 ng, 1,5 ng, 1 ng, 0,5 ng, 0,25 ng, 0,1 ng, 0,05 ng, 0,025 ng, 0,02 ng, 0,015 ng, 0,01 ng, 0,006 ng. Las reacciones de cada nivel de matriz se llevaron a cabo por duplicado.

#### *Instrumentación de separación y detección de STR*

Se separaron y detectaron los productos amplificados utilizando la Network Biosystem Genebench-FX™ Series 100 (Pyzowski y Tan, Advances in Biochip-Based Analysis: A Rapid Field-Based Approach 59<sup>o</sup> Annual Meeting of the American Academy of Forensic Sciences San Antonio, TX, 19-24 de febrero de 2007). Este instrumento se desarrolló y optimizó específicamente para el análisis STR. A 2,7 µl de cada producto amplificado se añadieron 10,2 µl de formamida Hi-Di™ y 0,1 µl de calle interna de referencia Genescan 500 LIZ (ambos de Applied Biosystems, Foster City, CA). Después de la desnaturalización a 95 °C durante 3 min y enfriamiento instantáneo en hielo, se cargaron las muestras en el chip de separación y se movieron electroforéticamente en los canales de separación aplicando un campo eléctrico de 350 V/cm durante 90 segundos. Esto continuó con la aplicación de un campo eléctrico de 150 V/cm a lo largo del canal de separación para separar los fragmentos de ADN. Todas las

separaciones se llevaron a cabo a 50 °C.

#### *Análisis de los datos*

- 5 Los datos se analizaron con el Software de identificación de STR humana GeneMarker® HID, Versión 1.51 (SoftGenetics LLC, State College, PA). Las fuerzas de señal se normalizaron respecto a la calle interna de referencia y se determinaron los porcentajes de artefactos de repetición, NTA incompleto, así como PHR. La PHR se calcula dividiendo el alelo de fuerza de la señal más baja por el alelo de fuerza de señal más alta dentro del locus. El nivel de NTA incompleto se calcula dividiendo la fuerza de la señal del fragmento matriz (-A) por la fuerza de la señal de fragmento adenilado (+A).

#### **Ejemplo 2**

- 15 *Perfiles de temperatura de los instrumentos de ciclado térmico y soluciones de reacción en tubos de PCR convencionales y biochips de microfluídica*

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en tubos de PCR de pared fina utilizando un ciclador térmico comercial y en biochips de microfluídica utilizando el ciclador térmico del Ejemplo 1. Para las reacciones en tubo, se utilizó el Eppendorf Mastercycler™. La **Figura 2A** muestra la temperatura del bloque y la solución de reacción dentro de un tubo para uno de los 28 ciclos térmicos utilizando un protocolo de ciclado de STR convencional. El sistema de calentamiento y enfriamiento Mastercycler™ se basa en una bomba de calor con un bloque integrado para la inserción del tubo. Los puntos fijos de tiempo y temperatura son 1 minuto a 98 °C para la desnaturalización, 1 minutos a 59 °C para la hibridación, y 1 minuto a 72 °C para la extensión. Una comparación de los perfiles de temperatura para el bloque térmico y la solución de reacción muestra un retraso en la respuesta de la temperatura de la solución con respecto a la temperatura del bloque. Las velocidades de calentamiento y enfriamiento medidas en el bloque son 5,6 °C/seg y 4,9 °C/seg y de la solución son 4,8 °C/seg y 3,3 °C/seg. El bloque hace la transición de temperatura desde la extensión (72 °C) a la desnaturalización (98 °C) en 14 segundos, pero la solución no alcanza el punto fijo de temperatura durante 39 segundos. Las transiciones entre las etapas de desnaturalización e hibridación (59 °C) toma 10 y 27 segundos y entre las etapas de hibridación y extensión toma entre 7 y 24 segundos para el bloque y la solución, respectivamente.

Los perfiles de temperatura del bloque del Eppendorf Mastercycler™ y la solución de reacción para uno de los 28 ciclos térmicos en condiciones de ciclado rápido se muestran en la **Figura 2B**. Los puntos fijos de tiempo y temperatura son 5 segundos a 98 °C para la desnaturalización, 15 segundos a 59 °C para la hibridación, y 5 segundos a 72 °C para la extensión. Sin embargo, la respuesta retrasada y atenuada de la solución evita que alcance las temperaturas del punto fijado deseado.

También se determinaron los perfiles de temperatura de la bomba de calor y la solución de reacción para uno de los 28 ciclos térmicos del ciclador térmico de la invención que utiliza las condiciones de ciclado rápido (**Figura 3**). Para la determinación de la temperatura de la solución de reacción, se utilizó una cámara sensible dentro del biochip. Los puntos fijos de tiempo y temperatura son 4 segundos a 95 °C para la desnaturalización, 15 segundos a 59 °C para la hibridación, y 7 segundos a 72 °C para la extensión. Las velocidades de calentamiento y enfriamiento medidas en el bloque son 21,5 °C/seg y 21,7 °C/seg y las velocidades de calentamiento y enfriamiento medidas de la solución de reacción son 14,8 °C/seg y 15,4 °C/seg.

En consecuencia, el ciclador térmico de la invención es capaz de calentar y enfriar la solución de reacción a una velocidad que es de 3 a 5 veces más rápida que el ciclador comercial basado en un bloque. Los tiempos de transición entre las etapas de extensión, desnaturalización, e hibridación de la bomba de calor son 1,7, 2,1 y 0,7 segundos y para la solución de 2,7, 4,5 y 2,2 segundos. El ciclador térmico de la invención permite que la solución de reacción alcance las temperaturas necesarias aproximadamente 7 veces más rápido que el ciclador basado en un bloque, dando como resultado temperaturas de incubación definidas y controladas y tiempos en condiciones de ciclado rápido.

#### **Ejemplo 3**

- 55 *Evaluación de Enzimas de PCR en tubo*

Un gran número de polimerasas se evaluó para su uso potencial en el análisis de STR múltiple rápido, y se seleccionaron los candidatos basándose en parte en el tiempo de activación del inicio en caliente y la velocidad de extensión. Las propiedades informadas de las cuatro polimerasas seleccionadas para la evaluación experimental comparadas con las condiciones recomendadas para TaqGold™ se presentan en la Tabla 1(A).

TABLA 1A - Características de la polimerasa publicadas				
Polimerasa	ATG	SpeedSTAR	PyroStart	KOD
3'-5' Actividad exonucleasa	No	Sí < 20 %	No	Sí

## ES 2 748 134 T3

Generación de protuberancias 3'-dA	Sí	Sí >80 %	Sí	No
Mecanismo de inicio en caliente	Modificado químicamente	Anticuerpo	Modificado químicamente	Anticuerpo
Activación inicial	95 °C / 11 min	95 °C / 1 min	95 °C / 1 min	95 °C / 2 min
Tasa de alargamiento [nucleótidos/seg.]	16-67	100-200	40	100

1B – Rendimiento optimizado de polimerasas en reacciones en tubo

	ATG convencional		ATG optimizada		SpeedSTAR		PyroStart		KOD	
Condiciones de ciclado	95 °C / 11 min		95 °C / 11 min		85 °C / 1 min		95 °C / 1 min		95 °C / 2 min	
	94 °C / 1 min	x28	98 °C / 10 seg.	x28	98 °C / 4 seg.	x28	98 °C / 4 seg.	x28	98 °C / 4 seg.	x28
	59 °C / 1 min		59 °C / 45 seg.		59 °C / 15 seg.		59 °C / 20 seg.		59 °C / 30 seg.	
	72 °C / 1 min		72 °C / 30 seg.		72 °C / 5 seg.		72 °C / 30 seg.		72 °C / 10 seg.	
	60 °C / 45 min		72 °C / 15 min		72 °C / 1 min		72 °C / 1 min		72 °C / 1 min	
Tiempo de Amplificación	145,1 min		71,67 min		19,13 min		33,12 min		29,47 min	
Intervalo de fuerza de la señal [RFU]	561-1655		600-3876		945-3669		751 3197		1091-3494	
Intervalo de distorsión	4,18-11,16 %		3,91-13,77 %		6 49-13 56 %		621-18 91 %		4,46-23,61 %	
Intervalo NTA	1,54-7,67 %		1,93-20,13 %		3,07-19,66 %		3 01 23 09 %			
PHR	0,88-0,93 %		0,74-0,96 %		0,83-0,93 %		0,71-0,94 %		0,61-0,94 %	

5 Las enzimas evaluadas han informado de velocidades de extensión que varían desde aproximadamente 15-200 nucleótidos/segundo; en general, las velocidades de extensión informadas se basan en amplificaciones sencillas y pueden ser de alguna manera menores que las aplicaciones múltiples.

10 Las condiciones de la PCR en tubos se investigaron inicialmente para estas cuatro enzimas con el objetivo de conseguir perfiles de STR completos en la menor cantidad de tiempo. Para todas las reacciones, se amplificó 1 ng de ADN genómico humano utilizando pares de cebadores del kit Profiler Plus ID y tampones y concentraciones de enzimas recomendados por el vendedor, y se separaron, detectaron, midieron y cuantificaron los perfiles resultantes utilizando Genebench-FX™ Series 100. Se determinaron distintos tiempos y temperaturas para las etapas de desnaturalización, hibridación y extensión para dar tiempos totales para la amplificación por PCR con fuerzas de señal adecuadas para la interpretación de STR que varían de 19,13 minutos para SpeedSTAR a 71,7 minutos para TaqGold™ [Tabla 1(B)]. Las condiciones del método de la invención permiten que se lleve a cabo la amplificación 2-15 veces más rápido que las condiciones recomendadas para TaqGold™.

20 La evaluación adicional de las enzimas para el rendimiento forense relevante incluye la fuerza de la señal, niveles de artefactos de repetición y NTA incompleto y PHR [Tabla 1(B)]. Todas las enzimas son capaces de llevar a cabo la amplificación altamente múltiple utilizando los cebadores Profiler Plus ID. Las fuerzas de señal para SpeedSTAR, Pyrostart, KOD y TaqGold™ optimizada son aproximadamente las mismas o más altas que las generadas utilizando las condiciones de PCR de la TaqGold™ convencional.

25 Con respecto al NTA incompleto, las reacciones tanto SpeedSTAR como PyroStart, así como con TaqGold™ optimizada presentaban niveles que son hasta tres veces más altos que las reacciones con TaqGold™ convencional. Para la mayoría de los alelos, los niveles se encontraban por debajo del 15 % de los umbrales de interpretación.

30 Los alelos que tenían niveles más altos de NTA incompleto se podían disminuir por debajo del 15 % de umbral de interpretación como se expone posteriormente. La polimerasa KOD posee una actividad exonucleasa 3'-5' y no genera fragmentos con protuberancias A; en consecuencia, todos los alelos eran 1 nucleótido más corto que su equivalente alélico escalonado.

35 Los niveles relativos de artefactos de repetición observados para la TaqGold™ optimizada, SpeedStar y PyroStart son similares al intervalo de distorsión por artefactos de repetición producidos con las reacciones con TaqGold™ convencional; el intervalo de distorsión por artefactos de repetición generados con KOD es ligeramente mayor que el

de artefactos de repetición en la TaqGold™ convencional.

**Ejemplo 4a**

5 *Protocolo de PCR rápida utilizando la polimerasa SpeedSTAR en tubos y biochips*

Basándose en los resultados presentados anteriormente, la polimerasa SpeedSTAR se seleccionó para su evaluación adicional en los biochips con el objetivo de minimizar el tiempo de ciclado total y conseguir los perfiles STR completos que satisfagan la fuerza de señal, PHR, NTA incompleto y necesidades de interpretación de la distorsión por artefactos de repetición.

Los puntos fijados de tiempo y temperatura para la amplificación utilizando SpeedSTAR en el biochip de microfluídica de 16 muestras en el ciclador térmico de la invención son 70 segundos a 95 °C para la activación de inicio en caliente, seguido por 28 ciclos de 4 segundos a 95 °C para la desnaturalización, 15 segundos a 59 °C para la hibridación y 7 segundos a 72 °C para la extensión. Se llevó a cabo una extensión final de 90 segundos a 72 °C para un tiempo de protocolo final de 17,3 minutos. Las reacciones en tubo en el Eppendorf Mastercycler se llevaron a cabo en 19,13 minutos que comprendían los tiempos y temperaturas de bloque fijados en un tiempo de activación inicial de 1 minuto a 95 °C, 28 ciclos de 4 segundos a 98 °C, 15 segundos a 59 °C y 5 segundos a 72 °C seguido por una extensión final de 1 minuto a 72 °C.

Las Figuras 4A y 4B muestran los perfiles de STR generados con las condiciones de ciclado con SpeedSTAR precedentes en la (Figura 4A) con el biochip de 7 µl y en la (Figura 4B) con reacciones de 10 µl en tubo utilizando 0,5 ng de ADN y la Tabla 2 presenta las fuerzas de señal de todos los alelos del Profiler Plus ID de las reacciones en biochip y tubo de SpeedSTAR, así como de TaqGold™ en tubos utilizando el protocolo convencional. Las fuerzas de la señal de las reacciones en biochip de 0,5 ng son de media aproximadamente 2 veces más altas que las de 1 ng en las reacciones con TaqGold™ convencional, mientras que las fuerzas de señal de las reacciones de 0,5 ng en tubo con SpeedSTAR son de media aproximadamente las mismas que las reacciones de la TaqGold™.

TABLA 2 Comparación de la fuerza de señal, PHR, NTA y distorsión por artefactos de repetición para el biochip SpeedSTAR y reacciones en el tubo y reacciones ATG convencionales

Locus	Alelo	Reacción biochip SpeedSTAR				Reacción en tubo SpeedSTAR				Reacciones ATG convencionales							
		Fuerza de señal	PHR	NTA (%)	Distorsión (%)	Fuerza de señal	PHR	NTA (%)	Distorsión (%)	Fuerza de la señal		PHR		NTA (%)		Distorsión	
										Media	Desv. Est.	Media	Desv. Est.	Media	Desv. Est.	Media	Desv. Est.
D3S1358	14	1404,218	0,79	9,08		727,11		9,74		831,69	167,25	0,92	0,04	1,88	0,52		
D3S1358	16	1110,915		8,05	10,35	895,12	0,81	10,50	8,14	802,99	141,78			1,54	0,34	5,31	0,23
WVA	17	2338,633	0,95	6,14		1346,81	0,65	6,62		765,61	83,69	0,90	0,08	4,22	0,44		
WVA	18	2216,64		6,83	12,87	875,84		6,78	11,96	736,85	88,40			4,23	0,19	7,38	0,48
FGA	23	747,5319	0,87	4,21		877,22	0,96	2,54		735,41	130,32	0,93	0,05	2,14	0,45		
FGA	24	648,8992		3,34	9,72	840,03		2,30	8,32	727,02	122,82			1,98	0,44	7,19	0,43
Amelogenina	X	5645,423		4,04		1324,78		2,02		1665,65	343,77			3,35	0,49		
D8S1179	13	3784,38		5,62	10,70	1012,17		5,47	11,56	1405,57	105,18			4,52	0,58	8,51	0,62
D21S11	30	2008,992		3,15	13,05	787,70		3,45	13,29	1280,31	81,30			3,00	0,00	7,33	0,60
D18S51	16	1655,991	0,70	6,90	11,44	924,04	0,72	5,48	9,09	879,42	137,76	0,88	0,05	4,68	0,74	7,89	0,80
D18S51	19	1157,636		9,63	14,13	663,76		8,92	13,90	814,14	125,75			5,95	0,68	11,16	0,52
D5S818	11	2904,473		7,56	9,65	1608,46		3,97	8,73	1599,08	223,78			3,71	0,17	4,94	0,44
D13S317	11	3906,373		3,32	6,78	1867,36		3,21	7,74	1486,50	196,47			2,33	0,28	4,18	0,47
D7S820	10	1 232,908	0,93	7,23		647,24	0,73	8,01		634,96	113,82	0,89	0,08	4,69	0,99		
D7SB20	11	1149,849		10,16	7,37	469,59		10,00	5,96	561,37	92,47			7,67	0,72	4,57	0,62

30 **Ejemplo 4b**

*Caracterización de alelos de la PCR rápida utilizando polimerasa SpeedSTAR en tubos y biochips*

Con el fin de caracterizar los productos de las reacciones de PCR rápida del Ejemplo 4a, se llevó a cabo la cuantificación de PHR, NTA incompleto y artefactos de repetición. Las Reacciones en biochip y tubo utilizando la polimerasa SpeedSTAR muestran más inestabilidad de la altura del pico inter-locus en comparación con las reacciones con la TaqGold. La PHR para los alelos generados en las reacciones en biochip está entre 0,70 y 0,95 y es aproximadamente el mismo en tubos; y se encuentra dentro de las directrices de interpretación aceptables. Las reacciones utilizando SpeedSTAR tienen PHR que son aproximadamente un 10 % más bajos que los determinados por las reacciones con TaqGold™ convencional. De manera similar, el nivel de NTA incompleto para la mayoría de los alelos en las reacciones tanto en biochip como en tubo utilizando SpeedSTAR son aproximadamente las mismas (un 2,0 y un 10,6 %); ambas son aproximadamente 2 veces más altas que para las reacciones de control con TaqGold™. La excepción es el NTA incompleto para los alelos D3S1358, que es 4,8 a 7 veces mayor con

SpeedSTAR que con TaqGold™; incluso en este caso, el nivel de NTA incompleto es inferior al 12 % para la enzima SpeedSTAR. Finalmente, el nivel de distorsión por artefactos de repetición en las reacciones tanto en biochip como basadas en tubo utilizando SpeedSTAR es entre aproximadamente un 6,0 y un 14,1 % aproximadamente de media 1,6 veces mayor que para las reacciones en tubo con TaqGold™ convencional.

5 Las reacciones del biochip de microfluídica utilizando 0,5 ng de ADN matriz generan fuerzas de señal que son aproximadamente 2 veces más altas que las reacciones para la TaqGold™ convencional utilizando 1 ng de matriz. Este resultado sugiere que la enzima SpeedSTAR en el biochip y la enzima TaqGold™ en la reacción convencional actúan con eficacias similares; la concentración de ADN en el biochip es aproximadamente de 1,8 veces en el tubo, lo que corresponde con la fuerza de señal 2 veces mayor. Por el contrario, las reacciones rápidas basadas en tubo son menos eficaces que las reacciones con la TaqGold™ de control; la reducción en rendimiento del producto de aproximadamente un 40 % es probablemente la consecuencia del pobre perfil de ciclado que resulta cuando se utilizan los cicladores térmicos comerciales para el ciclado térmico rápido. Incluso en esta circunstancia, las fuerzas de señal están por encima de los niveles necesarios para la interpretación y pueden aumentarse significativamente aumentando el tiempo de extensión en pocos segundos por ciclo (datos no mostrados). La repetibilidad y reproductibilidad de la fuerza de señal para las reacciones de PCR rápida en biochips y tubos son similares a las de las reacciones convencionales.

20 La fuerza de señal en el alelo inter-locus para las reacciones rápidas en biochip y tubo presentan un nivel más alto de inestabilidad en comparación con la reacción con TaqGold™. El equilibrio de la fuerza de señal inter-loci está influenciada por numerosos factores incluyendo la concentración de cebador, la temperatura de hibridación y el tiempo, y el peso molecular de los loci. El kit de amplificación de STR utilizado para estos experimentos tenía unas concentraciones del conjunto de cebadores que están optimizadas para la enzima TaqGold™ y los protocolos de ciclado recomendados. Las fuerzas de señal de los loci se pueden modificar ajustando las concentraciones de cebadores utilizados en las reacciones de amplificación (Henegariu et al., Biotechniques 1997, 23, 504-11).

30 La relación entre la fuerza de la señal y el nivel de matriz para las reacciones rápidas en biochip y en tubo es como se esperaba que en general la fuerza de la señal aumenta con la matriz. Se observó una buena morfología del pico para todos los alelos con niveles altos de matriz de 4 ng (que genera alelos con fuerzas de señal mayores de 12000 RFU). A niveles de matriz de 0,03 ng y menores se producen algunas caídas de alelos. Este efecto se observa cuando las reacciones de amplificación se llevan a cabo con un número limitado de cadenas de ADN matriz en la solución dando lugar a una amplificación estocástica (Walsh et al., PCR Methods Appl. 1992, 1, 241-250). La presencia de una señal fácilmente detectable de ambos alelos de alta fuerza de señal y alelos de baja fuerza de señal a un nivel de matriz de 0,006 ng demuestra la alta sensibilidad de la reacción rápida en biochip y tubo emparejada con la separación y detección con el Genebench-FX™ Series 100, demostrando la utilidad de este sistema para el análisis de un bajo número de copias. En conjunto, estos datos también sugieren que la estrategia de PCR rápida y el ciclador térmico de la invención y la instrumentación Genebench tiene un rango dinámico de matriz alto.

#### 40 **Ejemplo 4c**

##### *Niveles de ADN matriz y características de alelos en las reacciones de PCR rápida*

45 Los efectos del ADN matriz sobre la fuerza de la señal en las reacciones de PCR rápida utilizando la polimerasa SpeedSTAR en las reacciones con biochip (**Figura 5A**) y tubo (**Figura 5B**) se presentan en las **Figuras 5A y 5B**. Los alelos seleccionados para el análisis eran de Amelogenina, el alelo con el nivel de señal más alto en el perfil STR eran FGA 23 y 24 y los de niveles de señal más baja en el perfil, D7S820 10 y 11. Las fuerzas de la señal para todos los alelos aumentaban según aumentaba el nivel de ADN matriz de 0,006 ng a 4 ng en las reacciones tanto en biochip como en tubo. A un nivel de matriz de 0,006 ng, se observaron fuerzas de señal para el pico de amelogenina de 111 RFU para las reacciones en biochip y 58 RFU para en tubo. A un nivel de matriz de 4 ng, se veían fuerzas de señal de 12680 RFU para las reacciones en biochip y 5570 RFU para en tubo. Todos los alelos observados en ambos tipos de reacción presentaban una buena morfología del pico.

55 Para las reacciones rápidas en biochip (**Figura 6A**), la PHR está entre 0,6 y 1,0 para niveles de matriz que variaban desde 0,05 a 4,0 ng. Para niveles de matriz por debajo de 0,05 ng, la PHR disminuía hasta 0,025 ng cuando se producían casos de caídas alélicas y se observaba una PHR de cero. Se observaban resultados similares en las reacciones rápidas en tubo, aunque generalmente presentaban PHR de alguna manera menores que las reacciones en biochip (**Figura 6B**). Para las reacciones en biochip el nivel de NTA incompleto es del 15 % o menos para niveles de matriz de 2,0 ng y menores. Para las reacciones en tubo, los niveles de NTA incompleto sobrepasan el 15 % a niveles de matriz de 1 ng y aumentan drásticamente a 4 ng.

65 Las dos diferencias principales entre las reacciones den biochip y tubo son los perfiles de temperatura de las soluciones de reacción y la concentración relativa de matriz y polimerasa. El nivel de NTA incompleto disminuye cuando está disponible más polimerasa. Para las reacciones en biochip, los datos experimentales muestran que sobre un intervalo de ADN matriz desde 0,5 a 4,0 ng el nivel de NTA incompleto disminuye aproximadamente un 50 % según aumenta la cantidad de polimerasa SpeedSTAR desde 0,3 U a 1,2 U (**Figuras 7A y 7B**). El nivel de

distorsión por artefactos de repetición para las reacciones rápidas en biochip y tubo era relativamente constante y en general menor del 15 % para todos los alelos sobre un intervalo de nivel de matriz de 0,25-4,0 ng (**Figuras 8A y 8B**).

5 La velocidad de la reacción de amplificación de STR solo es relevante si la propia reacción genera datos procesables que cumplan las directrices de interpretación forenses. El FBI tiene directrices generales que se utilizan para la interpretación de STR, y los laboratorios individuales fijan umbrales que deben cumplirse antes de que un perfil se considere aceptable basándose en su trabajo de validación (Holt et al., J. Forensic Sci. 2002, 47(1), p. 66-96; LaFountain et al., J. Forensic Sci., 2001, 46(5), 1191-8).

10 Las condiciones que se presentan en el presente documento pueden generar perfiles de STR rápidos que cumplen estas directrices. La PHR para 0,5 ng de matriz en las reacciones en biochip y en tubo cumplen las directrices de interpretación que establecen que se necesita un nivel de 0,6 o más y son consistentes con los resultados expuestos previamente (Leclair et al., J. Forensic Sci. 2004, 49, 968-80). Para cantidades de ADN matriz mayores, la PHR permanece relativamente constante, pero son menores que los de la reacción de 1 ng con TaqGold™. Para bajos números de copias, la PHR está dominado por la amplificación debido a fluctuaciones estocásticas.

20 El nivel de NTA incompleto se basa en la capacidad de la polimerasa para adenilar completamente todos los amplicones de STR. Para la amplificación convencional, esto se consigue uniendo una "cola de cerdo" al cebador y aumentando el tiempo de extensión final. El nivel de NTA incompleto para reacciones de 0,5 ng en biochip y en tubo que se describen en el presente documento están dentro de las directrices de interpretación.

25 Los niveles de NTA incompleto aumentan según aumenta el ADN matriz (una consecuencia del aumento de la relación del ADN respecto a polimerasa) y se puede reducir aumentando la cantidad de polimerasa, el tiempo de extensión por ciclo y el tiempo de extensión final. Las dos últimas estrategias no se adecúan bien a la amplificación múltiple rápida, ya que aumentan el tiempo de reacción. El aumento de la concentración de polimerasa es eficaz y compatible con la PCR rápida. La distorsión por los artefactos de repetición es un resultado del deslizamiento de la cadena de ADN durante la extensión (Walsh et al., *Nucleic Acids Res.* 1996, 24(14), 2807-12). El nivel de distorsión por artefactos de repetición descrito en el presente documento para las reacciones de 0,5 ng en biochip y tubo se encuentran dentro de las directrices de interpretación y también son consistentes con informes citados anteriormente. Como se esperaba, el nivel de artefactos de repetición parece ser independientes del nivel de matriz de ADN.

35 **Ejemplo 4d**

*Estudios de repetibilidad y reproductibilidad*

40 La repetibilidad y reproductibilidad de las reacciones rápidas en biochip (Tabla 3A) y tubo (Tabla 3B) utilizando la polimerasa SpeedSTAR se evaluaron llevando a cabo 24 reacciones de PCR idénticas en 3 biochips de PCR y llevando a cabo 5 reacciones idénticas en tubo. Para las reacciones en biochip, el valor de confianza (CV) para la fuerza de señal varía de un 17 a un 24 % y para las reacciones en tubo desde un 15 a un 34 %. El CV para las Reacciones con TaqGold™ convencional está entre un 6 y un 21 %.

TABLA 3 – *Reproductibilidad de biochip SpeedSTAR (3A) y reacciones en tubo (3B)*

A: Reacciones del biochip SpeedSTAR

Alelo	Fuerza de la señal (RFU)				PHR				NTA (%)				Distorsión (%)			
	Media	Desv. est.	Máx	Min	Media	Desv. est.	Máx	Min	Media	Desv. est.	Máx	Min	Media	Desv. est.	Máx	Min
D3S1358.14	1235,40	271,43	1963,95	781,79	0,85	0,11	1,00	0,63	9,11	1,77	11,86	6,64				
D3S1368.15	1066,55	251,75	1793,70	689,23					8,97	1,80	12,08	6,53	8,78	0,63	9,84	7,67
vWA 17	2765,49	551,47	3818,46	1732,31	0,81	0,12	0,98	0,56	6,19	1,27	8,25	4,76				
vWA 18	2274,33	398,37	3197,88	1379,49					6,22	1,34	8,29	4,71	12,96	0,66	14,36	11,78
FGA23	884,74	153,51	1276,87	620,51	0,84	0,11	0,99	0,61	251	0,58	351	1,03				
FGA24	794,62	176,07	1109,30	376,41					2,68	0,48	3,62	1,71	10,10	0,95	12,18	8,63
AMEL	5085,29	1138,51	7276,15	3271,82					3,70	0,40	4,54	3,01				
D8S1179.13	3787,27	778,68	5700,08	2420,29					7,35	0,74	8,82	6,17	10,96	0,53	12,08	10,01
D21S11.30	1914,04	424,28	2725,91	1005,45					291	0,61	4,14	2,04	12,74	0,85	14,44	10,73
D18S51.15	2243,76	429,94	3056,15	1475,43					5,80	2,08	7,99	0,00	10,61	0,64	11,54	9,04
D18S51.19	1843,92	358,13	2549,69	1271,08	0,83	0,10	0,99	0,59	5,90	2,23	8,19	0,00	14,52	0,35	16,64	12,96
D6S818.11	2734,70	500,56	3846,66	1629,74					9,04	1,88	12,07	6,34	8,90	0,33	3,89	8,35
D13S317.11	4097,95	701,10	5273,96	2724,10					3,02	0,85	6,39	2,25	6,87	0,42	7,95	6,09
D7S820.10	1877,24	384,59	3262,80	1397,96	0,84	0,09	1,00	0,69	6,68	0,60	7,67	6,67				
D7S820.11	1594,27	309,99	2336,39	1124,30					10,60	0,68	11,81	9,19	7,26	0,47	7,99	6,42
	CV Min: 17 %				CV Min: 11 %				CV Min: 6 %				CV Min: 4 %			
	CV Máx: 24 %				CV Máx: 14 %				CV Máx: 28 %				CV Máx: 9 %			

B: Reacciones SpeedSTAR en tubo

Alelo	Fuerza de la señal (RFU)				PHR				NTA (%)				Distorsión (%)			
	Media	Desv. est.	Máx	Min	Media	Desv. est.	Máx	Min	Media	Desv. est.	Máx	Min	Media	Desv. est.	Máx	Min
D3S1358.14	1718,86	464,62	2321,62	1249,71	0,86	0,08	0,94	0,74	19,51	0,44	20,04	18,84				
D3S1358.15	1455,28	285,03	1719,04	1110,96					19,68	0,78	20,71	18,56	8,34	0,49	8,88	7,66
vWA.17	1934,44	299,00	2150,18	1483,24	0,83	0,11	0,98	0,71	12,12	0,22	12,32	11,75				

vWA.18	1722,47	450,99	2439,38	1267,89					12,04	0,27	12,29	11,65	12,72	0,50	13,37	12,18
FGA23	1625,37	289,29	2020,33	1275,75	0,91	0,08	0,99	0,80	3,57	0,21	3,84	3,28				
FGA24	1561,32	346,77	2003,50	1185,22					3,07	0,21	3,30	2,75	9,57	0,53	10,22	8,90
AMEL	3669,00	844,56	4967,47	2799,39					5,02	0,27	5,41	4,68				
D8S1179.13	2447,48	658,60	3268,31	1820,49					8,20	0,40	3,61	7,58	10,47	0,46	10,86	9,72
D21S11.30	1628,98	436,18	2147,27	1222,17					4,85	0,33	5,26	4,46	11,78	0,28	12,14	11,54
D18S51.15	1603,23	545,46	2261,97	1066,52	0,79	0,17	0,95	0,61	3,30	0,34	8,67	7,91	9,67	0,31	10,09	3,30
D18S51.13	1296,20	434,98	2043,27	963,18					8,79	0,99	10,49	7,91	13,56	0,88	14,69	12,28
D5S818.11	3412,19	894,75	4629,47	2506,84					6,27	0,17	6,47	6,02	8,38	0,31	8,86	8,03
D13S317.11	3093,19	749,20	3987,13	2204,34					3,94	0,14	4,16	3,81	6,49	0,25	6,86	6,25
D7S820.10	1009,46	228,75	1297,92	780,76	0,93	0,03	0,98	0,90	7,86	0,65	8,55	6,86				
D7S820.11	945,50	208,75	1228,39	705,49					12,13	1,53	14,33	10,56	6,52	0,34	7,02	6,15
	CV Min: 15 %				CV Min: 3 %				CV Min: 2 %				CV Min: 2 %			
	CV Max: 34 %				CV Max: 21 %				CV Max: 13 %				CV Max: 6 %			

El CV para la PHR es hasta del 14 % para los biochips y del 21 % para las reacciones en tubo, en comparaci3n con el intervalo del 5 % al 10 % observado para las reacciones con TaqGold™ convencional. Los CV de NTA incompleto en las reacciones en biochip varian entre un 6 % y un 28 %, y para las reacciones en tubo entre un 2 a un 13 %. De nuevo, estas variaciones son similares al intervalo del 4 al 28 % observado para las reacciones con TaqGold™ convencional. Los CV para la distorsi3n por los artefactos de repetic3n en los biochips son de un 4 a 9 %, en tubos del 2 al 6 % y tambi3n son similares al intervalo del 4-13 % observado para las reacciones con TaqGold™ convencionales.

## 10 Ejemplo 4e

### *Compatibilidad con otros kits de STR disponibles en el mercado*

Utilizando las mismas condiciones en biochip y en tubo descritas anteriormente, se evaluaron una serie de muestras utilizando conjuntos de cebadores de los kits COfiler™ y Identifier™. Las Figuras 9A y 9B muestran los perfiles completos conseguidos utilizando estos conjuntos de cebadores utilizando el ciclador t3rmico de la invenci3n, la enzima SpeedSTAR, y los protocolos descritos en ellos. Cade uno tambi3n es adecuado para estos kits disponibles en el mercado. Aunque se consiguieron perfiles completos, se observ3 una inestabilidad en las fuerzas de señal a lo largo de los loci.

## 10 Ejemplo 5

### *Secuenciaci3n rápida con el ciclador t3rmico*

El instrumento de ciclado t3rmico y la metodología tambi3n se pueden utilizar para reacciones rápidas de secuenciaci3n de ADN. En esta implementaci3n del ciclador t3rmico rápido, la instrumentaci3n y el biochip son los mismos que los utilizados para la PCR. Se aplicaron diferentes soluciones de reacci3n, polimerasas y temperaturas de ciclado para la reacci3n de secuenciaci3n. Las reacciones de secuenciaci3n disponibles en el mercado tardan 49 min (para el kit GE Amersham DYEnamic™ ET Terminato Cycle Sequencing) y 2,25 h (para AB Big Dye V3.1). Utilizando el ciclador t3rmico NetBio, con reactivos convencionales se permitía que el tiempo de reacci3n de secuenciaci3n se redujera a 21 minutos.

La secuenciaci3n rápida se había conseguido utilizando el termociclador desvelado en el presente documento y un biochip que comprendía 16 carriles. El volumen de reacci3n final en los chips era de 7 µl. Las reacciones de secuenciaci3n de media fuerza se hicieron con el kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing de GE Healthcare siguiendo el protocolo del fabricante. Todos los volúmenes se escalaron para acomodar en consecuencia el volumen final de 7 µl. La matriz para la reacci3n era de 0,1 pmol de *B. subtilis* con un tamaño del fragmento de 343 pb.

Se demostraron los protocolos de ciclado con el primer protocolo que consistía en 30 ciclos de (20 s a 95 °C, 15 s a 50 °C y 60 s a 60 °C) (el tiempo de ciclado total era de 51,7 min), el segundo protocolo consistía en 30 ciclos de 5 s a 95 °C, 15 s a 50 °C y 30 s a 60 °C (el tiempo de ciclado total era de 29 min) y un tercer protocolo que consistía en 30 ciclos de 5 s a 95 °C, 10 s a 50 °C y 20 s a 60 °C (con un tiempo de ciclado total de 21,6 min). Cada reacci3n de secuenciaci3n se limpi3 con etanol, se precipit3 y separ3 con el Genebench FX Series 100. Las valoraciones medias de PHRED para la secuenciaci3n de un producto de PCR de 343 pb para los 3 protocolos de ciclado eran de 282, 287 y 279, respectivamente; demostrando que la secuenciaci3n del producto de 343 pb se podía conseguir en un chip en menos de 22 min. La Figura 10 muestra la secuencia de ADN del protocolo rápido de secuenciaci3n de ADN.

En general, la amplificaci3n multiple basada en biochip de uno o mas ácidos nucleicos que utilizan los sistemas y m3todos descritos en el presente documento tienen la ventaja de proporcionar productos amplificados de ácido nucleico en tiempos de reacci3n totales significativamente mas cortos con respecto a las reacciones ejecutadas en tubos de pared fina y utilizando las unidades de ciclado t3rmico comercializadas actualmente.

**REIVINDICACIONES**

1. Un sistema que comprende

5 un biochip que comprende una o una pluralidad de cámaras de reacción, donde

cada cámara de reacción comprende un canal de microfluídica de entrada y un canal de microfluídica de salida, donde cada cámara de reacción está espaciada menos de 200  $\mu\text{m}$  de una superficie de contacto del sustrato del biochip;

10

y un ciclador térmico, que comprende

una bomba de calor de alta capacidad de calentamiento y enfriamiento tal como un dispositivo Peltier de alta potencia de salida como elemento de control de temperatura (TCE) que comprende medios para el calentamiento y enfriamiento, un termosensor, un controlador para la recepción de señales del termosensor, y una fuente de energía, donde una primera superficie de dicho TCE se adapta para la recepción del biochip, y un termosensor adicional alojado en una carcasa formada del mismo material que el biochip donde la carcasa se coloca próxima al biochip sobre la primera superficie del TCE y mantiene el termosensor adicional a la misma distancia de la primera superficie del TCE que de la cámara de reacción en el biochip cuando se pone en contacto con la primera superficie del TCE, donde dicho termosensor adicional proporciona una retroalimentación a dicho TCE para fijar o mantener una solución en la cámara de reacción a una temperatura deseada, y

15

20

donde la primera superficie del TCE está en comunicación térmica con la superficie de contacto del sustrato del biochip colocando el sustrato directamente sobre el TCE.

25

2. El sistema de la reivindicación 1,

donde cada cámara de reacción está espaciada menos de 100  $\mu\text{m}$  de la superficie de contacto del sustrato del biochip; comprendiendo el sistema adicionalmente un segundo termosensor posicionado para monitorizar la temperatura de dicha primera superficie de dicho TCE.

30

3. El sistema de la reivindicación 1 o 2 donde el canal de microfluídica de entrada, el canal de microfluídica de salida, o ambos, tiene(n) una vía.

35

4. El sistema de la reivindicación 1 o 2, donde el ciclador térmico comprende adicionalmente un elemento de compresión del chip (CCE) posicionado sobre la primera superficie del TCE que permite la inserción del biochip entre el CCE y el TCE, donde el CCE proporciona una comunicación térmica entre el TCE y el sustrato del biochip.

40

5. El sistema de la reivindicación 4, donde el elemento de compresión del chip comprende uno o más seleccionado de entre el grupo que consiste en

un material de masa térmica baja y aislante,  
una almohadilla de espuma,  
uno o una pluralidad de clips, y  
una vejiga de aire.

45

6. El sistema de la reivindicación 4, donde el CCE proporciona aproximadamente de 0,345 a aproximadamente 3,45 bares (5 a 50 psi) de presión para mantener la superficie de contacto del sustrato del biochip en contacto térmico con la primera superficie del TCE.

50

7. El sistema de la reivindicación 1 o 2, donde las cámaras de reacción no están revestidas con un polímero, un revestimiento de silano o BSA.

55

8. El sistema de la reivindicación 1 o 2, donde la comunicación térmica entre la superficie de contacto del sustrato del biochip y la primera superficie del TCE se proporciona en ausencia de una solución de emparejamiento térmico.

9. El sistema de la reivindicación 1 o 2, que tiene una velocidad de calentamiento o enfriamiento en la primera superficie del TCE de aproximadamente 4 - 150  $^{\circ}\text{C}$  por segundo.

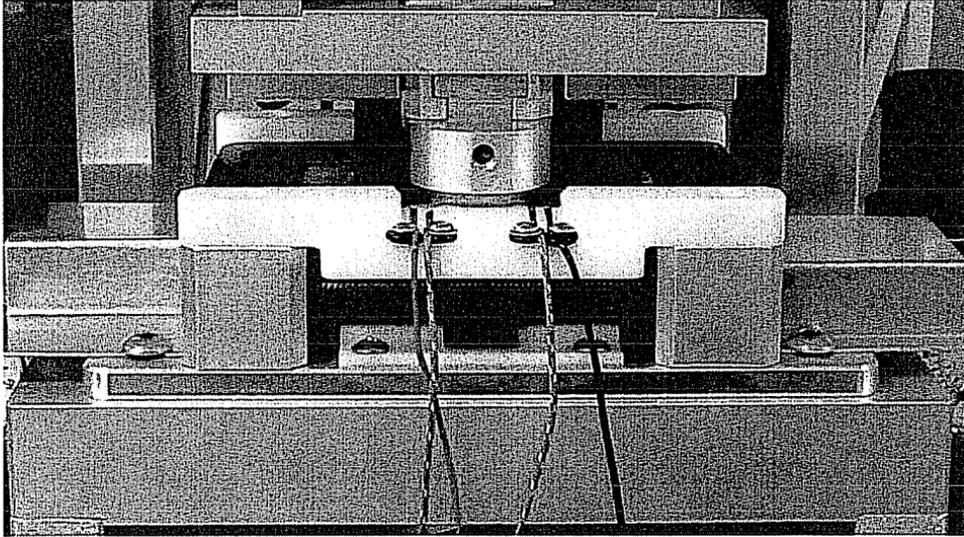
60

10. El sistema de la reivindicación 1 o 2, donde el ciclador térmico es capaz de una velocidad de calentamiento o enfriamiento dentro de las cámaras de reacción de aproximadamente 4 - 150  $^{\circ}\text{C}$  por segundo.

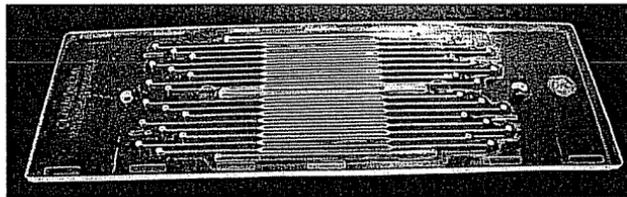
11. El sistema de la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente un disipador térmico con un ventilador de enfriamiento de velocidad variable para controlar la temperatura del disipador térmico.

65

12. El sistema de la reivindicación 11, donde el disipador térmico es un disipador térmico enfriado por ventilador con bases de cobre y aletas de enfriamiento.
- 5 13. El sistema de la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente un disipador térmico con una resistencia térmica de aproximadamente 0,4 °C/W o menos.
14. El sistema de la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente un disipador térmico que comprende adicionalmente un segundo elemento de calentamiento para controlar la temperatura del disipador térmico.
- 10 15. El sistema de la reivindicación 1 o 2, donde el ciclador térmico es capaz de una estabilidad de temperatura de +/- 1,0 °C en una muestra del biochip.
- 15 16. El sistema de la reivindicación 1 o 2, donde el sustrato del biochip se construye en un material orgánico, un material inorgánico, un material cristalino, o un material amorfo, donde el sustrato del biochip comprende preferentemente un material plástico tal como un copolímero de olefina cíclica (COC).
17. El sistema de la reivindicación 1 o 2, donde el sustrato del biochip comprende de 8-128 sistemas de microfluídica.
- 20 18. El sistema de la reivindicación 1 o 2, donde cada cámara de reacción tiene un volumen de menos de aproximadamente 100 µl.
19. Un sistema de biochip integrado que comprende el sistema de acuerdo con la reivindicación 1, donde el biochip comprende
- 25 una cámara de reacción adicional en conexión fluida con la cámara de reacción, adaptándose dicha cámara de reacción adicional para
- 30 (i) la extracción de un ácido nucleico;  
(ii) la purificación de un ácido nucleico;  
(iii) la limpieza pre-PCR de un ácido nucleico;  
(iv) la limpieza post-PCR;  
(v) la limpieza pre-secuenciación;  
(vi) la secuenciación;
- 35 (vii) la limpieza post-secuenciación;  
(viii) la separación de un ácido nucleico;  
(ix) la detección de un ácido nucleico;  
(x) la transcripción inversa;
- 40 (xi) la limpieza pre-transcripción inversa;  
(xii) la limpieza post-transcripción inversa;  
(xiii) la ligadura de un ácido nucleico;  
(xiv) la hibridación de un ácido nucleico; o  
(xv) la cuantificación.



*FIGURA 1A*



*FIGURA 1B*

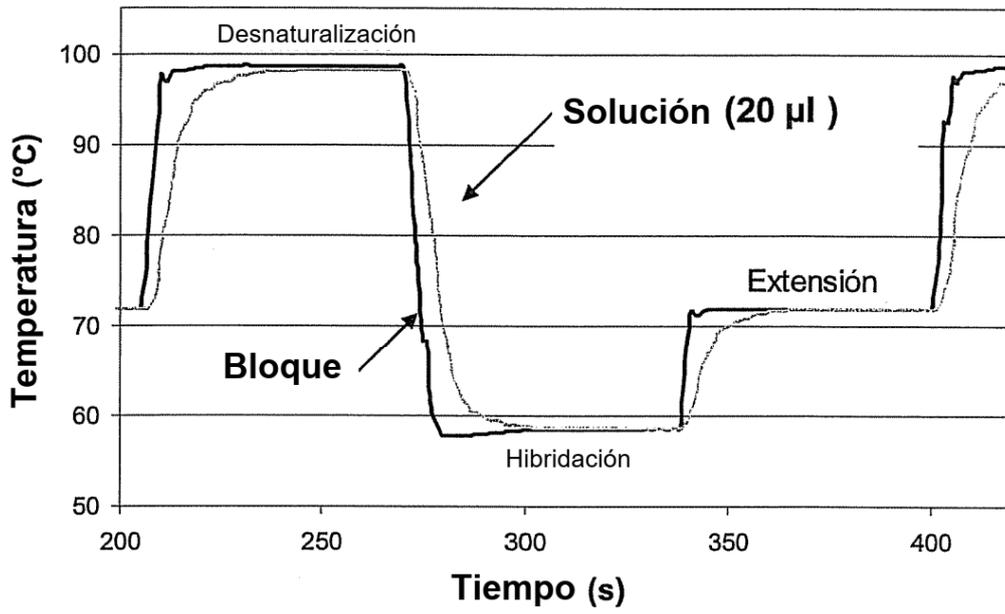


FIGURA 2A

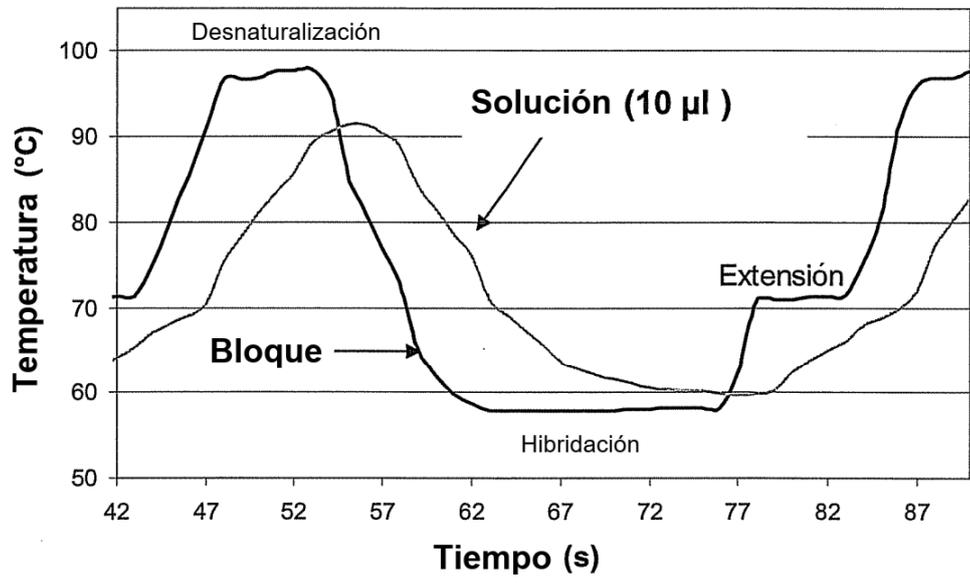
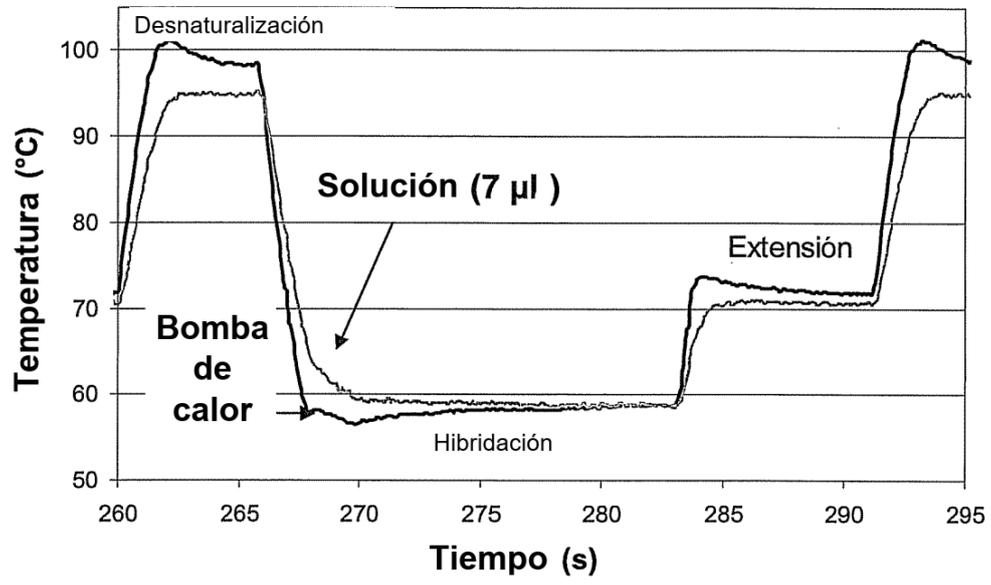


FIGURA 2B



*FIGURA 3*

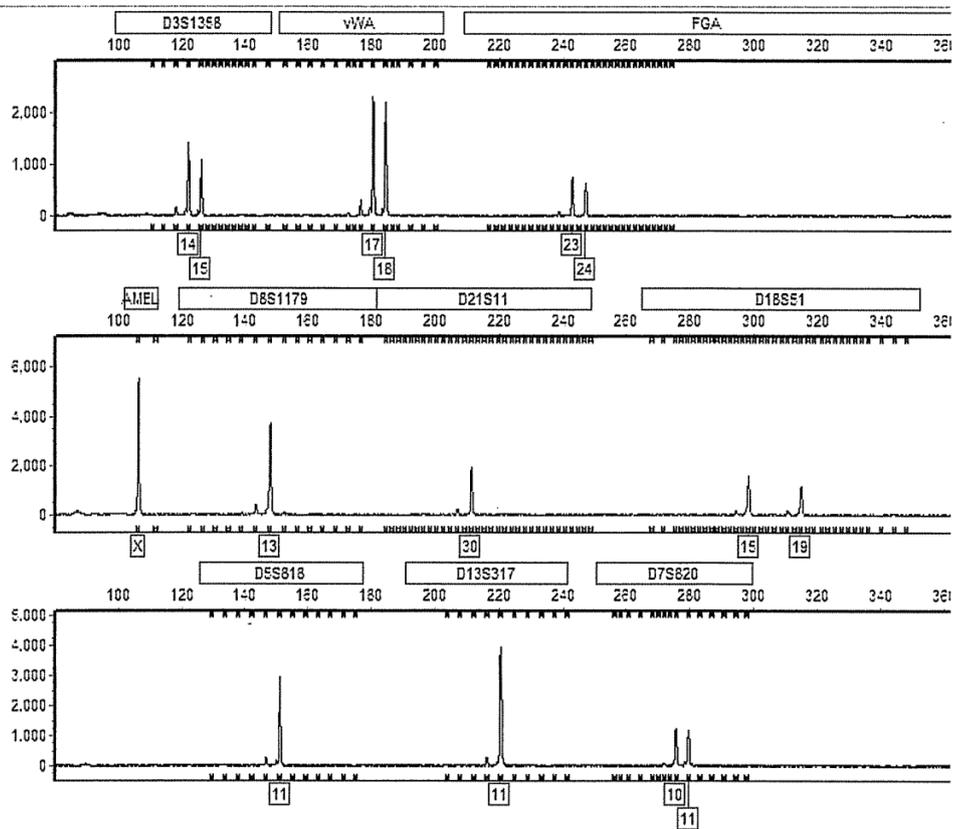


FIGURA 4A

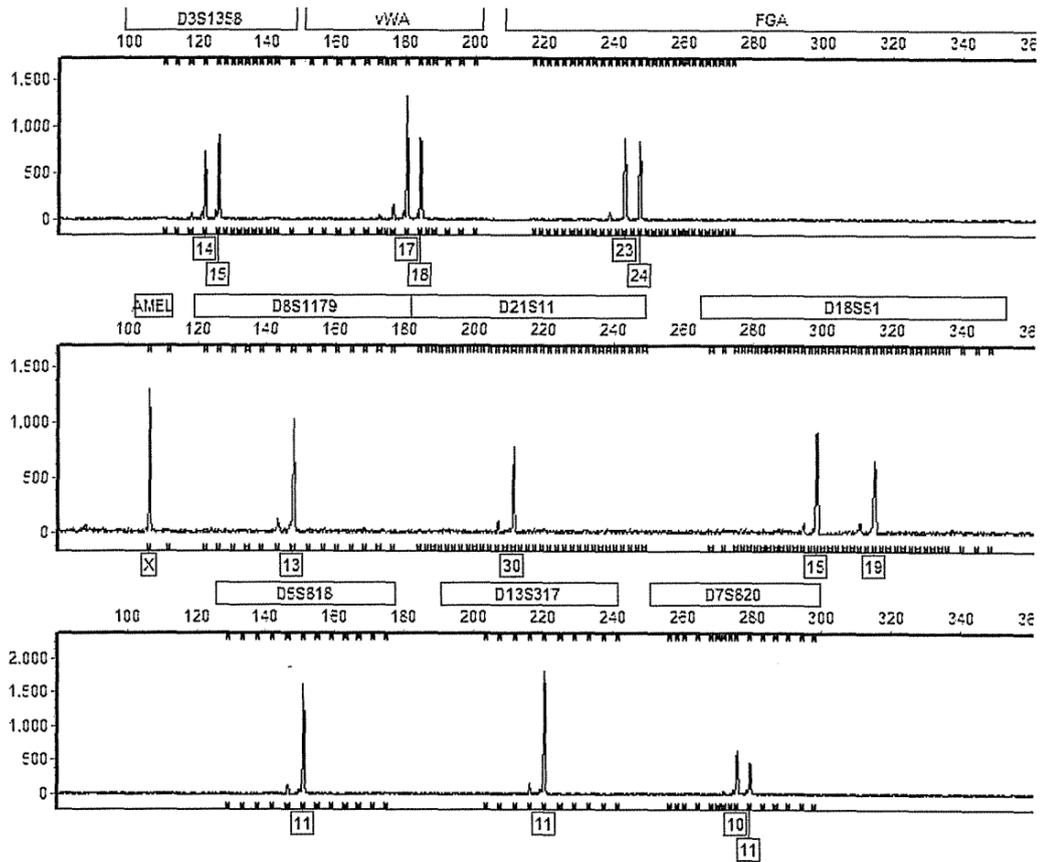


FIGURA 4B

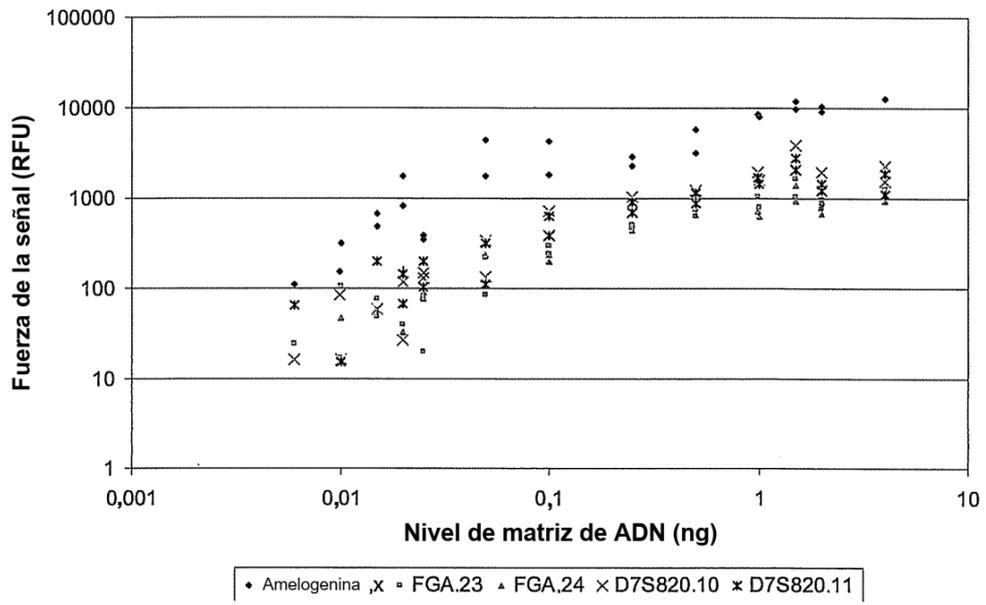


FIGURA 5A

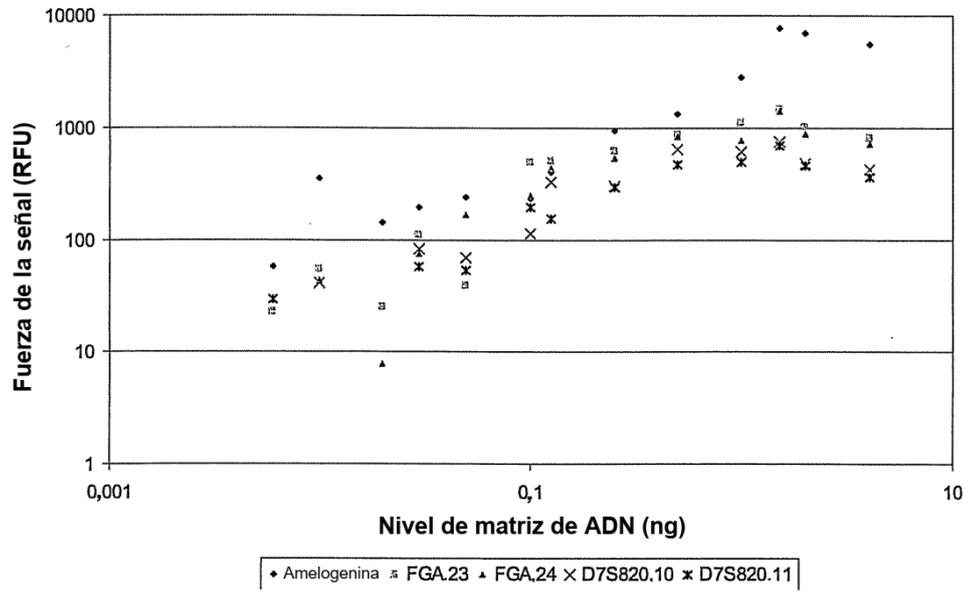


FIGURA 5B

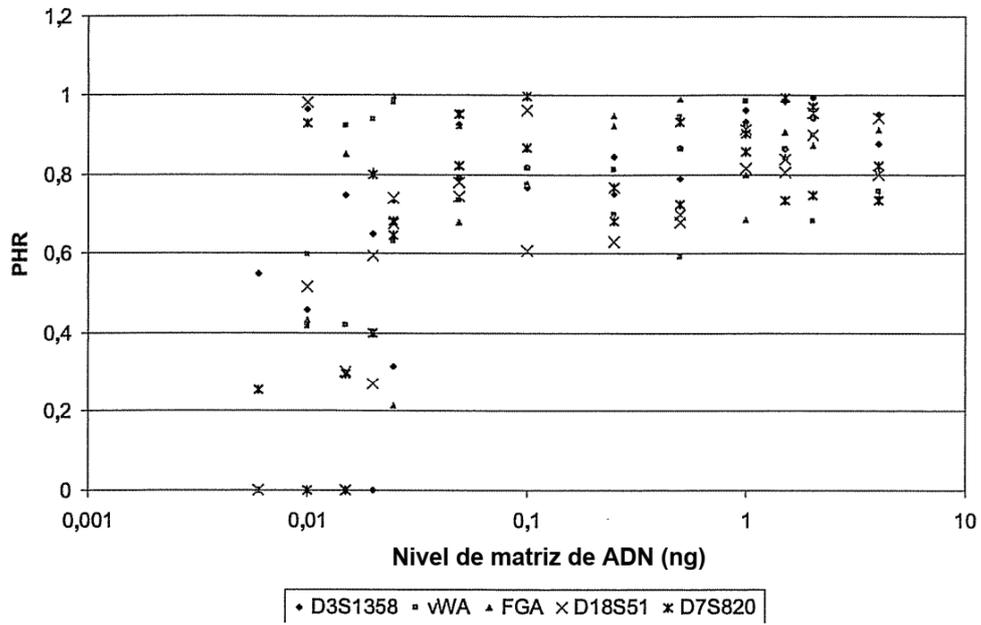


FIGURA 6A

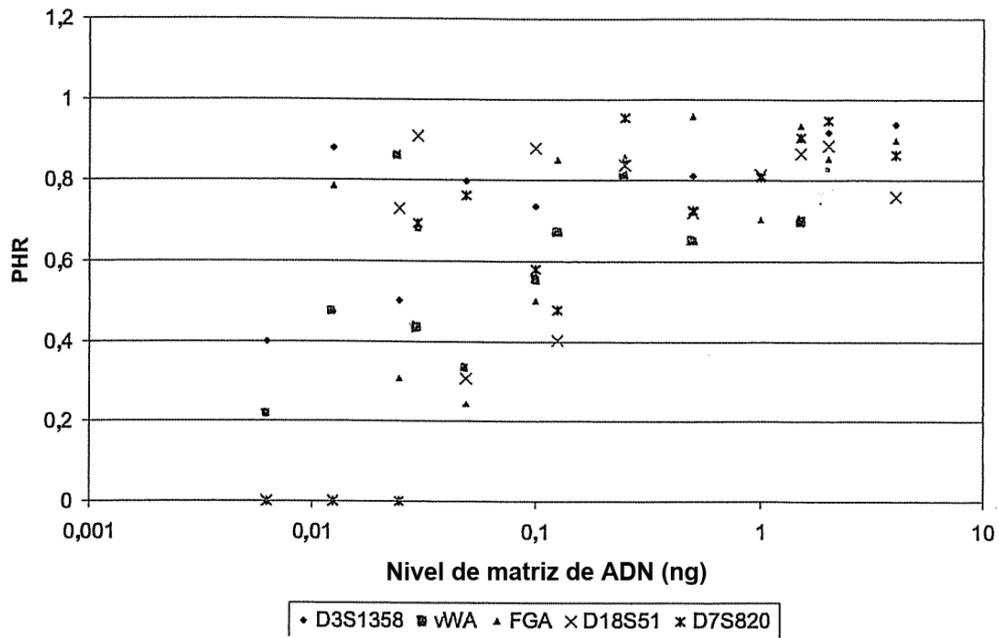


FIGURA 6B

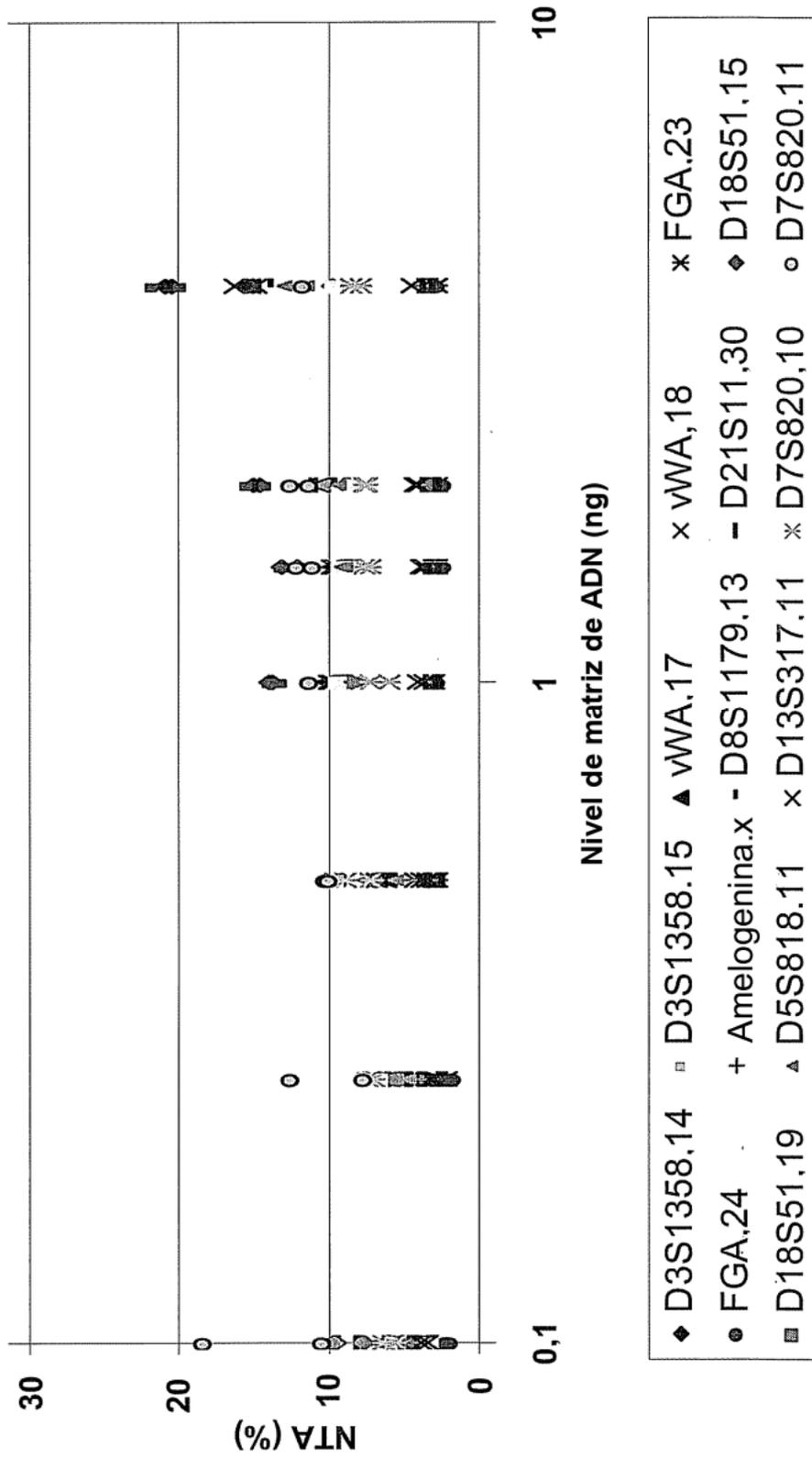


Figura 7a

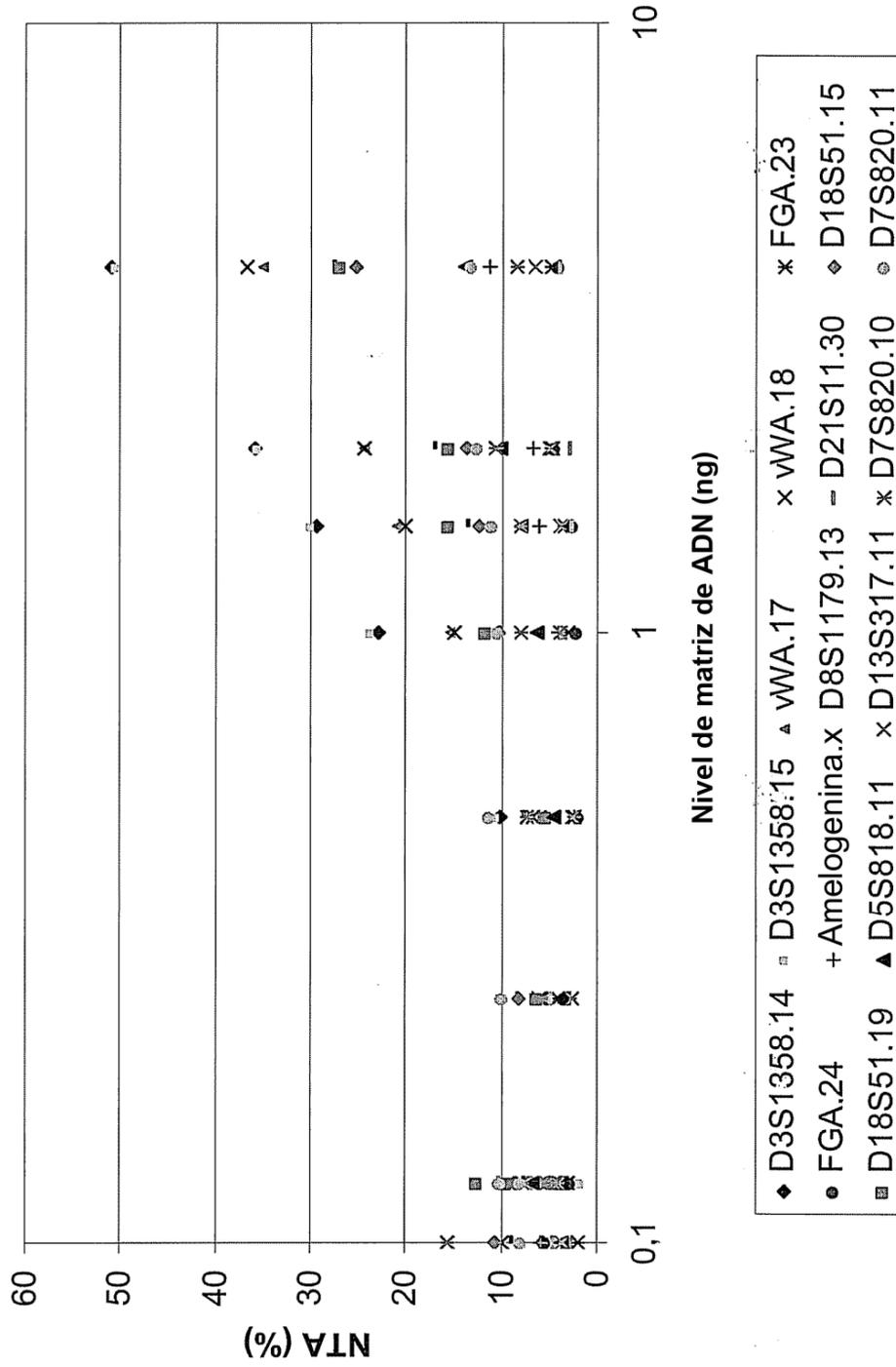


Figura 7b

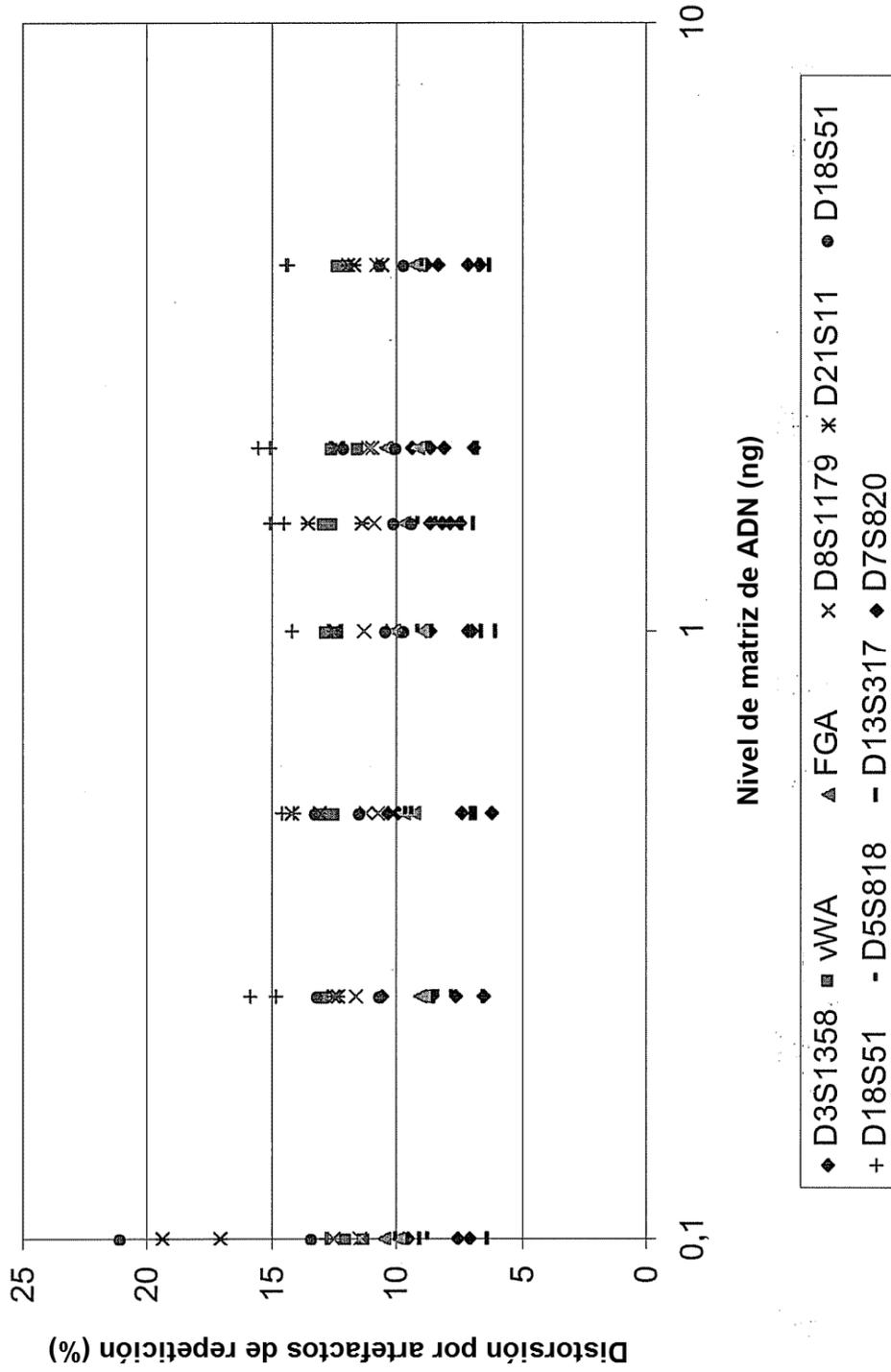


Figura 8a

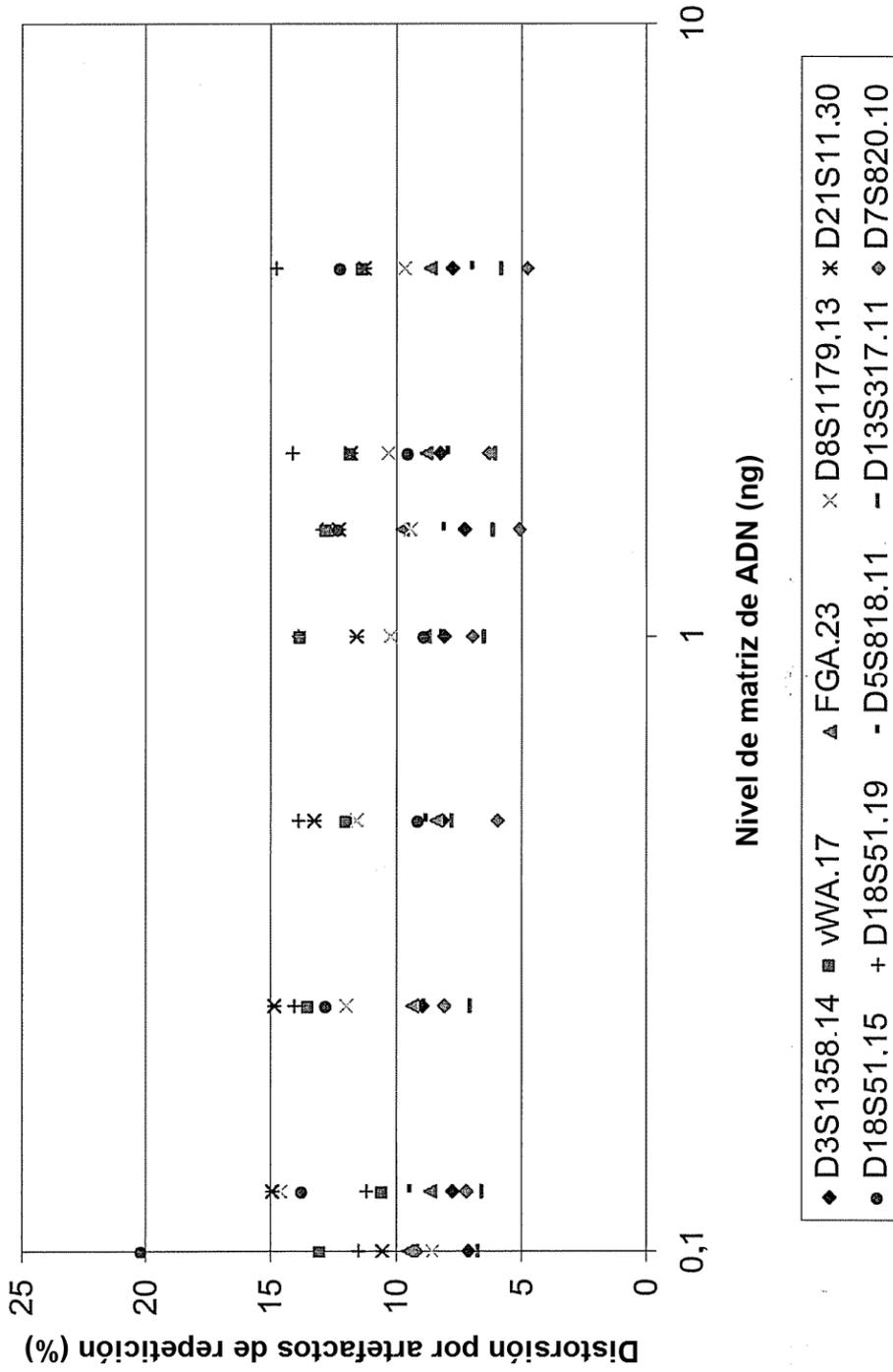


Figura 8b

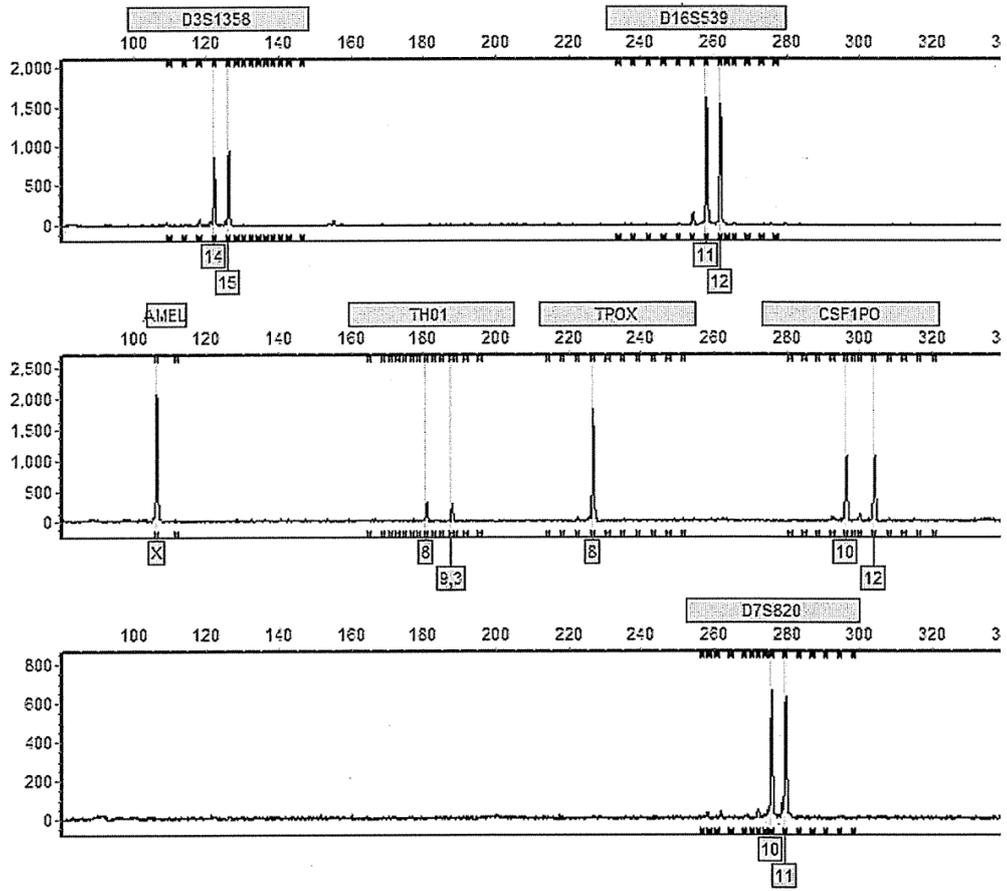


Figura 9a (superior)

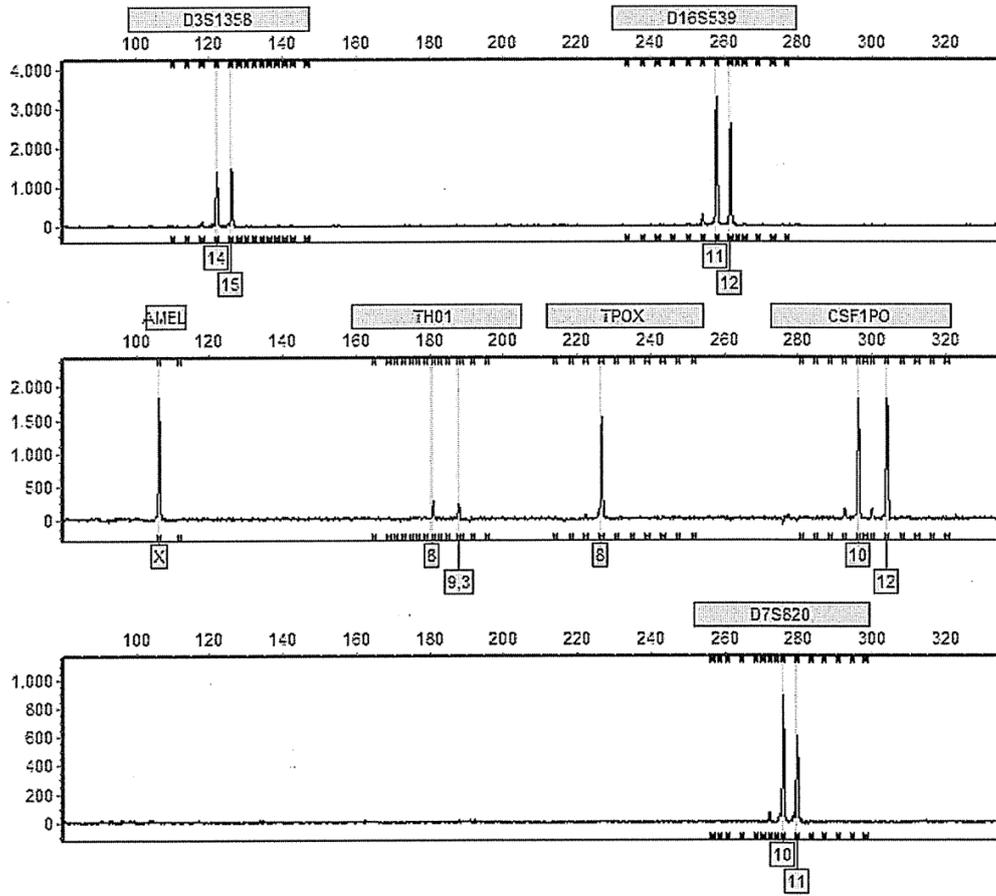


Figura 9a (inferior)

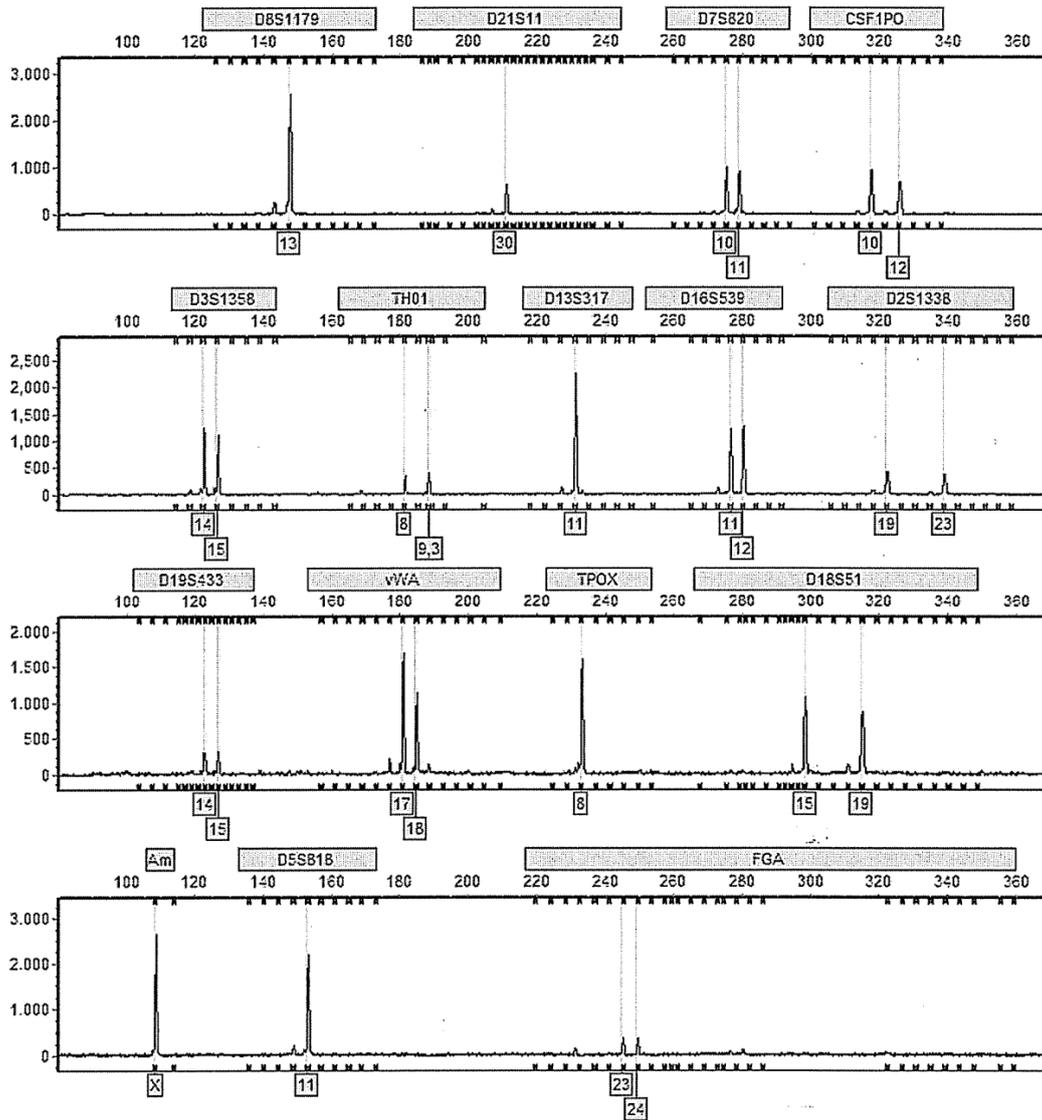


Figura 9b (superior)

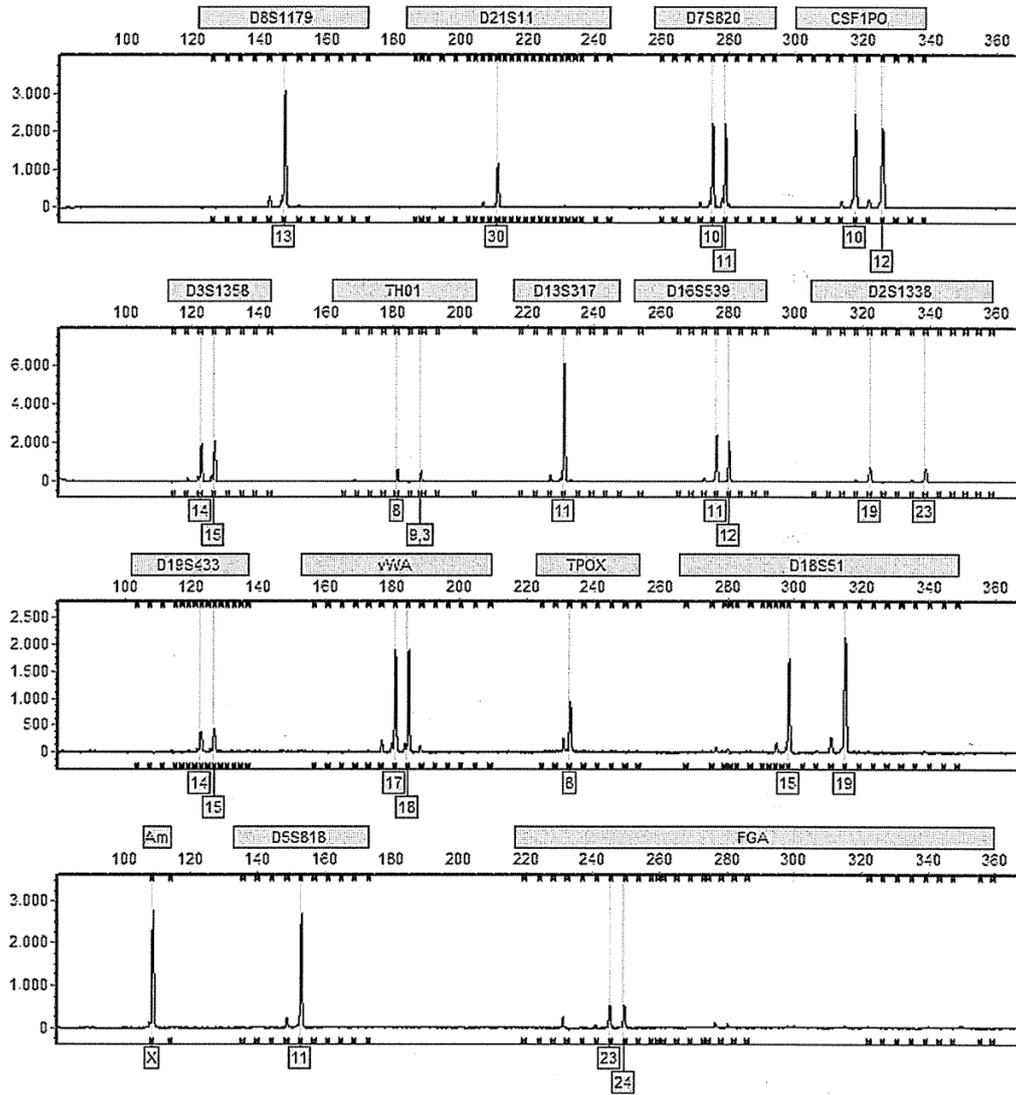


Figura 9b (inferior)

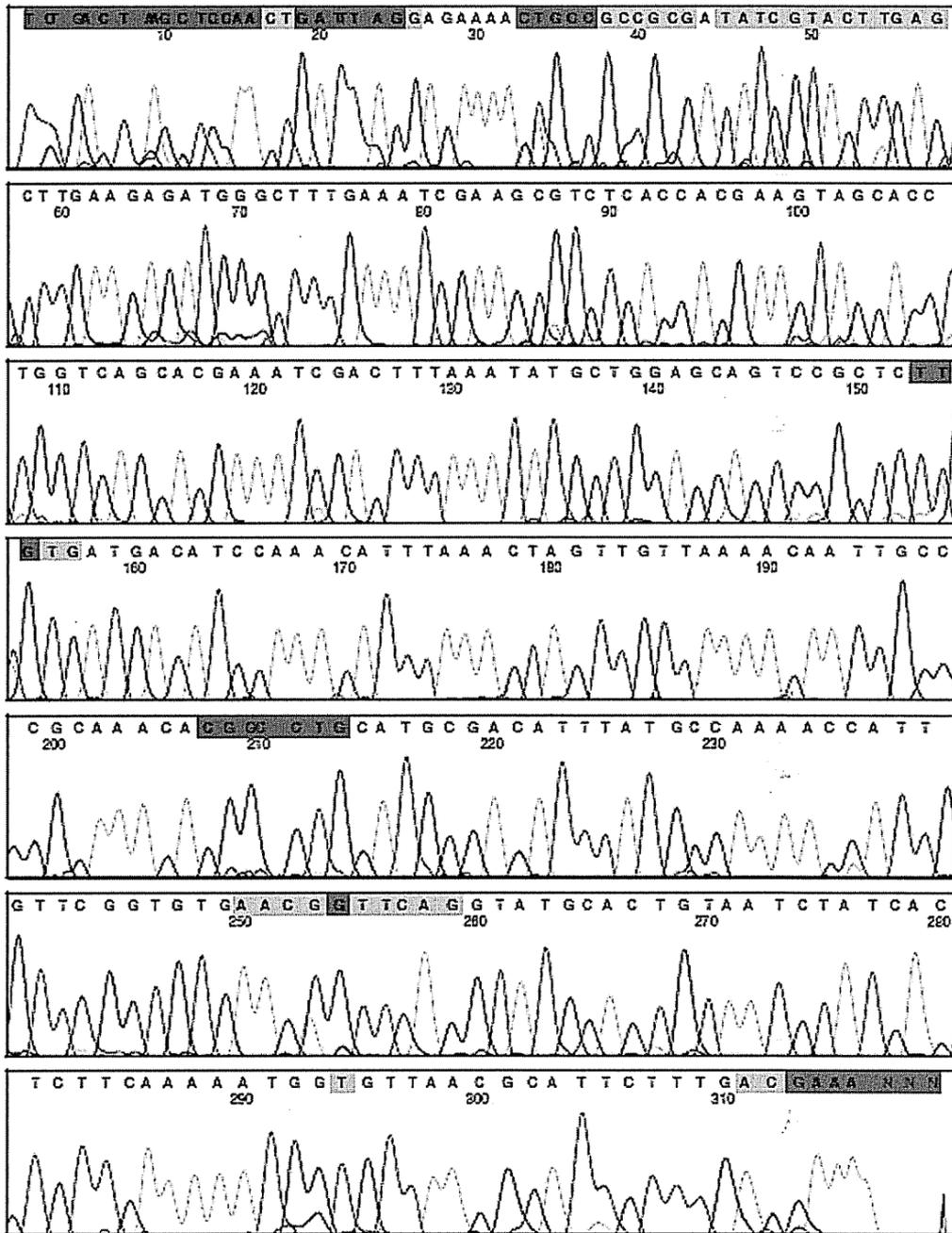


Figura 10