

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 951**

51 Int. Cl.:

**G01N 27/447** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2008 PCT/US2008/004462**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2008 WO08124104**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2008 E 08727302 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2137522**

54 Título: **Análisis integrado de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**04.04.2007 US 921802 P**

**13.08.2007 US 964502 P**

**12.02.2008 US 28073 P**

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

**04.12.2020**

73 Titular/es:

**ANDE CORPORATION (100.0%)**

**266 Second Avenue**

**Waltham, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**TAN, EUGENE;**

**LAM, HEUNG, CHUAN;**

**BOGDANOV, VALERY, LEONIDOVICH;**

**KELLOGG, GREGORY, JOHN;**

**WRIGHT, JOHN, A.;**

**ULRICH, HANS, THOMANN y**

**SELDEN, RICHARD, F.**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI , Peter**

ES 2 797 951 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

Análisis integrado de ácidos nucleicos

5 **Campo de la invención**

Esta invención pertenece al campo de la microfluídica para el análisis de ácidos nucleicos.

10 **Antecedentes de la invención**

10 Existe una necesidad insatisfecha de desarrollar instrumentos y tecnologías que permitan un análisis específico de ácidos nucleicos de integración total (es decir, de la muestra a los resultados), definido como la identificación rápida (por secuenciación de ácido nucleico o dimensionamiento de fragmentos) de un subconjunto de un genoma humano, animal, vegetal o patógeno. La secuenciación específica de ácidos nucleicos permitirá a los usuarios finales tomar  
15 decisiones clínicas, forenses u otras. Por ejemplo, muchas enfermedades humanas comunes pueden diagnosticarse en base a menos de 1000 pares de bases de secuencia de ADN, órdenes de magnitud inferiores a lo requerido para generar un genoma humano completo. De manera similar, la determinación precisa de los tamaños de conjuntos de menos de 20 fragmentos de ADN específicos generados por el análisis de repetición en tándem corto es suficiente para identificar a un individuo determinado. Dependiendo de la aplicación, el análisis específico de ácidos nucleicos  
20 se puede realizar en una variedad de ajustes, incluyendo laboratorios hospitalarios, consultorios médicos, la cabecera o, en el caso de aplicaciones forenses o ambientales, en el campo.

Existen varias necesidades insatisfechas para mejorar la secuenciación del ADN y los sistemas de dimensionamiento de fragmentos. En primer lugar, existe una necesidad insatisfecha de instrumentos de  
25 secuenciación y de dimensionamiento de fragmentos de ADN que sean fáciles de usar y no requieran operadores altamente capacitados. En segundo lugar, existe una necesidad insatisfecha de sistemas que eliminen todo el procesamiento manual. Como resultado, solo se requeriría una capacitación mínima para el operador y el sistema podría ser operado fácilmente por individuos limitados por entornos desafiantes como los que se encontrarían, por ejemplo, por un primer interviniente que viste un traje de materiales peligrosos:

30 En tercer lugar, existe una necesidad insatisfecha de análisis ultrarrápido que no sacrifique la necesidad de datos completos, precisos y fiables. Para aplicaciones de identificación humana, un tiempo apropiado para el resultado es de 45 minutos o menos, muy por debajo de los días o semanas requeridos utilizando tecnología convencional. Para aplicaciones clínicas como la secuenciación de agentes infecciosos para determinar un régimen de tratamiento apropiado, 90 minutos o menos es un tiempo razonable para responder, permitiendo que el tratamiento con medicamentos antibacterianos y antiviricos se inicie poco después de la llegada del paciente a la sala de emergencias. Independientemente de la aplicación, existe una necesidad insatisfecha de generar datos útiles en tiempo real. Un corto tiempo de respuesta también permite un aumento concomitante en el rendimiento de la muestra.

40 En cuarto lugar, existe una necesidad insatisfecha de miniaturización. Muchos sistemas de análisis de ADN requieren un laboratorio completo y soporte relacionado. Por ejemplo, el sistema de secuenciación de ADN Genome Sequencer FLX (Roche Diagnostics Corp, Indianápolis, IN) de alto rendimiento requiere no solo una mesa de trabajo para la instalación, sino también un gran laboratorio para realizar la construcción de la biblioteca requerida. La  
45 miniaturización es importante tanto para el uso en el laboratorio como en el punto de atención, así como para la operación en el campo. También es importante para la reducción de los costes por muestra.

En quinto lugar, existe una necesidad insatisfecha de refuerzo. Para muchas aplicaciones, particularmente aquellas en medicina forense, los militares y la defensa nacional, el instrumento de análisis de ADN debe ser operable en el  
50 campo. Por consiguiente, el instrumento debe ser capaz de transportarlo, ya sea que lo lleve sobre la espalda de un soldado, conducido en un vehículo policial o arrojado desde un helicóptero al campo de batalla. De manera similar, el instrumento debe ser capaz de resistir y funcionar bajo extremos ambientales, incluyendo temperatura, humedad y partículas en el aire (por ejemplo, arena).

55 En sexto lugar, existe una necesidad insatisfecha de sistemas que puedan aceptar múltiples tipos de muestras y realizar análisis altamente multiplexados en paralelo. Para la mayoría de las aplicaciones, la capacidad de análisis de ADN de un solo tipo de muestra en una reacción de un solo complejo no es aceptable para realizar un análisis de ADN significativo.

60 Los desarrolladores de microfluidos (también conocidos como sistemas de microanálisis total ( $\mu$ TAS) o tecnologías *lab-on-a-chip*, véase, Manz *et al.*, *Sens. Actuators B* 1990, 1, 244-248) que buscan condensar series complejas de manipulaciones de laboratorio en biochips han reconocido algunas de estas necesidades no satisfechas, pero hasta la fecha, no han podido diseñar biochips e instrumentos integrados que realicen todos los procesos bioquímicos y físicos necesarios o deseables para permitir que el análisis de ácidos nucleicos microfluídico aborde estas  
65 necesidades. Como resultado, el análisis específico de ácidos nucleicos no ha tenido un uso generalizado en la sociedad actual.

El desarrollo de sistemas microfluídicos implica la integración de componentes microfabricados, como separaciones a microescala, reacciones, microválvulas y bombas y diversos esquemas de detección en dispositivos totalmente funcionales (véase, por ejemplo, Pal *et al.*, *Lab Chip* 2005, 5, 1024-1032). Desde que Manz *et al.* (*supra*),  
5 demostraron la electroforesis capilar en un chip a principios de la década de 1990, otros han tratado de mejorarlo. Varios grupos han demostrado la integración de la funcionalidad de procesamiento de ADN con la separación y detección de biochips. Se han informado dispositivos integrados en una estructura híbrida de vidrio-PDMS (polidimetilsiloxano) (Blazej *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103, 7240-5; Easley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 19272-7; y Liu *et al.*, *Anal. Chem.* 2007, 79, 1881-9). Liu acopló la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple, separación y detección de cuatro colorantes para la identificación humana mediante dimensionamiento de repeticiones cortas en tándem (STR), la reacción de secuenciación de Sanger acoplada de Blazej, la depuración de la reacción de Sanger, la separación electroforética y la detección de cuatro colorantes para la secuenciación del ADN del amplicón pUC18. Easley acopló la extracción en fase sólida de ADN, PCR, separación electroforética y detección de un solo color para identificar la presencia de infección bacteriana en la sangre. Un  
10 dispositivo de silicio-vidrio integrado de acoplamiento de PCR, separación electroforética y detección de un solo color se demostró por Bums (Pal, 2005, *Id.*). Huang (Huang *et al.*, *Electrophoresis* 2006, 27, 3297-305) informaron sobre un dispositivo híbrido de acoplamiento de una porción de vidrio-PDMS para PCR a una porción de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) para separación electroforética y detección de un solo color para identificar la presencia de ADN de bacteria.

Koh *et al.*, informaron sobre un dispositivo de plástico de acoplamiento de PCR a la separación electroforética de biochips y la detección de un solo color para identificar la presencia de ADN bacteriano (Koh *et al.*, *Anal. Chem.* 2003, 75, 4591-8). Un dispositivo basado en silicona que combina la extracción de ADN, amplificación por PCR, separación electroforética de biochips y detección de un solo color fue informado por Asogawa (Asogawa M, *Development of portable and rapid human DNA Analysis System Aiming on-site Screening*, 18º Simposio internacional sobre identificación humana, Poster, 1-4 de Oct., 2007), Hollywood, CA, EE. UU.). El documento de patente US 7.332.126 (Tooke *et al.*) describe el uso de la fuerza centrífuga para efectuar operaciones microfluídicas requeridas para el aislamiento de ácido nucleico y la secuenciación cíclica. No obstante, este enfoque se basa en pequeños volúmenes de muestra, (los del orden de uno a unos pocos µl). Como resultado, el dispositivo no es útil  
20 para el procesamiento de muestras grandes para el aislamiento y análisis de ácidos nucleicos, especialmente en forma muy paralela, debido a que las muestras de fluido deben aplicarse al dispositivo mientras está parado, es decir, el disco debe poder contener todos los fluidos necesarios para la operación antes de la centrifugación (potencialmente hasta cientos de ml para un dispositivo altamente paralelo). En segundo lugar, el dispositivo se limita a la preparación de muestras y la secuenciación cíclica, de clones bacterianos (por ejemplo, ADN plasmídico).

Existen varias deficiencias en esos dispositivos que intentan integrar el procesamiento del ADN con la separación electroforética de biochips. En primer lugar, la detección está limitada por el contenido de información por ensayo (la mayoría usa detectores de un solo color, aunque algunos tienen hasta cuatro sistemas de detección de color) o el rendimiento (capacidad de una o dos muestras). En segundo lugar, estos dispositivos no representan una integración completa de muestra a respuesta, por ejemplo, el dispositivo de Blazej requiere la amplificación fuera de placa del ADN de la plantilla antes de la secuenciación cíclica, mientras que otros usan muestras que requieren un procesamiento anterior de algún tipo (por ejemplo, Easley y Tooke requieren lisis de la muestra antes de la adición). En tercer lugar, algunas de las elecciones de procesamiento realizadas para estos dispositivos afectan negativamente en el tiempo de respuesta: por ejemplo, el método basado en hibridación de Blazej requiere más de  
30 20 minutos para la depuración del producto de secuenciación cíclica. En cuarto lugar, muchos de estos dispositivos se fabrican en vidrio o silicio parcial o total. El uso de estos sustratos y las técnicas de fabricación correspondientes los hacen inherentemente costosos (Gardeniers *et al.*, *Lab-on-a-Chip* (Oosterbroeck RE, van den Berg A, Eds.). Elsevier: Londres, págs. 37-64 (2003)) y los limitan a aplicaciones donde se debe realizar la reutilización de los dispositivos; para muchas aplicaciones (como la identificación humana), esto conlleva el riesgo de contaminación de la muestra. Finalmente, la tecnología demostrada es inapropiada para dos aplicaciones, identificación humana mediante análisis de STR y secuenciación. Por ejemplo, los dispositivos Easley y Pal adolecen de una resolución pobre, mucho peor que una sola base. Las aplicaciones de dimensionamiento de fragmentos (por ejemplo, la identificación humana mediante el análisis de perfiles de repetición en tándem cortos) y la secuenciación requieren resolución de bases únicas.

Además de las limitaciones de la técnica anterior con respecto a la integración microfluídica, los problemas con respecto a la detección de fluorescencia también limitan la aplicación generalizada del análisis de ácidos nucleicos más allá del trabajo de laboratorio convencional. Los kits comerciales de secuenciación más utilizados (BigDye™ v3.1 [Applied Biosystems] y DYEamic™ ET [GE Healthcare Biosciences Corp, Piscataway, NJ]) se basan en un método de detección de veinte años de cuatro colores (véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. n.º 4.855.225; 5.332.666; 5.800.996; 5,847.162; 5.847.162). Este método se basa en la resolución de la señal de emisión de un nucleótido marcado con colorante en cuatro colores diferentes, representando cada uno cada una de las cuatro bases. Estos sistemas de colorante de cuatro colores tienen varias desventajas, incluyendo excitación ineficiente de los colorantes fluorescentes, superposición espectral significativa y recolección ineficiente de las señales de emisión.  
60 Los sistemas de colorante de cuatro colores son especialmente problemáticos porque limitan la cantidad de información que se puede obtener de una separación electroforética (u otra) dada de productos secuenciados.

Existe una necesidad insatisfecha de un sistema capaz de lograr ensayos de alto contenido de información en sistemas electroforéticos basados en la separación y detección de fragmentos de ADN tanto por tamaño de fragmento como por color (longitudes de onda de colorante). El número máximo de fragmentos de ADN que pueden distinguirse por electroforesis está determinado por la longitud de lectura de la separación y la resolución del dispositivo. El número máximo de colores que se pueden detectar está determinado en parte por la disponibilidad de colorantes fluorescentes y la discriminación de longitud de onda del sistema de detección. Los sistemas actuales de detección de biochips generalmente se limitan a un solo color, aunque se han reportado hasta 4 detecciones de color.

El análisis de STR para la identificación humana es un ejemplo del tamaño de fragmentos de ADN basado en la multiplexación por color y permite el análisis simultáneo de hasta 16 loci (kit AmpFISTR Identifier; Applied Biosystems, Foster City, CA) y el kit PowerPlex16 (Promega Corporation, Madison, WI). Usando cuatro o cinco colorantes fluorescentes, un solo canal de separación puede discriminar entre los tamaños de las muchas variantes alélicas de cada locus. Varias aplicaciones de dimensionamiento de fragmentos requerirían que se separen y detecten más de 16 fragmentos en un solo carril. Por ejemplo, la identificación de patógenos por huella digital (es decir, la separación y detección de una gran cantidad de fragmentos de ADN característicos) y el diagnóstico de aneuploidía mediante el estudio de todo el genoma humano se puede lograr al observar varias docenas o varios cientos de loci, respectivamente.

Un enfoque para aumentar el número de loci que se pueden detectar en un solo canal de separación es ampliar el intervalo de tamaños de fragmentos generados, en parte al aumentar el tamaño de los fragmentos de loci adicionales. El uso de fragmentos más largos para loci adicionales no es ideal, no obstante, ya que la amplificación de fragmentos más grandes es más susceptible a los inhibidores y la degradación del ADN, conduciendo a rendimientos más bajos de fragmentos más largos en relación con fragmentos más cortos. Además, la generación de fragmentos más largos también requiere un aumento en el tiempo de extensión y, por lo tanto, un aumento en el tiempo total de ensayo. Existe una necesidad insatisfecha de aumentar el número de loci que se pueden detectar en un canal de separación dado aumentando el número de colores de colorante que se pueden detectar de manera simultánea.

Existe una necesidad insatisfecha de aumentar la capacidad de las separaciones de secuenciación de Sanger (y, por lo tanto, disminuir el coste, trabajo y espacio del proceso) mediante el aumento del número de secuencias de ADN que se pueden analizar en un solo canal de separación. Asimismo, en algunas aplicaciones, se secuencian múltiples fragmentos de ADN que generan datos de "secuencia mixta" difíciles de leer; es necesario desarrollar un enfoque en el que las secuencias mixtas se puedan interpretar correctamente.

Un enfoque para aumentar la capacidad de los canales de separación de Sanger y desarrollar la capacidad de interpretar secuencias mixtas es aumentar el número de colores de colorante utilizados en las reacciones de secuenciación. Tanto en la secuenciación del ADN como en el tamaño de los fragmentos, se pueden detectar múltiples fragmentos marcados con diferentes colorantes al mismo tiempo. En general, la separación entre las longitudes de onda de emisión máximas de los colorantes adyacentes debe ser lo suficientemente grande en relación con el ancho máximo de los colorantes. Por consiguiente, el rendimiento de cada canal de separación puede, por ejemplo, duplicarse utilizando dos conjuntos de 4 colorantes en dos reacciones de secuenciación independientes, y combinando los productos y separándolos en un solo canal. Esta metodología requiere el uso de un total de 8 colores de colorante, con la primera reacción de secuencia usando un conjunto de 4 colores de colorante aplicados para marcar los terminadores de didesoxinucleótidos, y la segunda reacción otro conjunto de 4 colores de colorante aplicados al marcador de los terminadores; cada conjunto de colores de colorante es independiente, por lo que no es posible la superposición en la interpretación de las dos secuencias. Usando este mismo enfoque, se puede utilizar un conjunto de 12 colorantes para permitir el análisis simultáneo de la secuencia de tres fragmentos de ADN en un solo canal, un conjunto de 16 colorantes permite el análisis de cuatro secuencias, y así sucesivamente, aumentando dramáticamente la capacidad de información de las separaciones de Sanger.

Los nuevos instrumentos y biochips de esta aplicación satisfacen muchas necesidades no satisfechas, incluidas las descritas anteriormente.

## Sumario de la invención

La invención se define por un sistema según la reivindicación 1 y un método según la reivindicación 14.

Esta divulgación proporciona sistemas microfluídicos totalmente integrados para realizar análisis de ácidos nucleicos. Estos procesos incluyen la recolección de muestras, extracción y purificación de ADN, amplificación (que puede ser altamente multiplexada), secuenciación y separación y detección de los productos de ADN.

Los módulos de separación y detección de esta divulgación son reforzados y capaces de una resolución mejor que de bases únicas. Son capaces de detectar seis o más colores y, como tales, son útiles para generar contenido de alta información a partir de aplicaciones de secuenciación y dimensionamiento de fragmentos.

La PCR rápida altamente multiplexada en biochips es objeto de una solicitud de patente de EE. UU., presentada en la fecha de la presente, teniendo el expediente del representante n.º MBHB 08-318-US, y titulada, "MÉTODOS PARA LA AMPLIFICACIÓN MULTIPLEXADA RÁPIDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS DIANA"; Además, los productos de la PCR se pueden separar y detectar dentro de un biochip como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. titulada, "PLATAFORMAS DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN MICROFLUIDICA DE PLÁSTICO", expediente del representante n.º 07-865-US.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la divulgación proporciona detectores ópticos que comprenden una o más fuentes de luz posicionadas para iluminar una o una pluralidad de posiciones de detección en un sustrato; una o una pluralidad de primeros elementos ópticos posicionados para recoger y dirigir la luz que emana de las posiciones de detección en el sustrato; y un detector de luz colocado para aceptar la luz de los primeros elementos ópticos, en donde el detector de luz comprende un elemento dispersivo de longitud de onda para separar la luz de los primeros elementos ópticos de acuerdo con la longitud de onda de la luz y colocado para proporcionar una porción de la luz separada a los elementos de detección, en donde cada uno de los elementos de detección está en comunicación con un primer elemento de control para recopilar de manera simultánea información de detección de cada uno de los elementos de detección y, en donde dicho detector de luz detecta fluorescencia de al menos 6 colorantes marcados a una o más moléculas biológicas, teniendo cada colorante una longitud de onda de emisión máxima única.

En un segundo aspecto, la divulgación proporciona sistemas para la separación y detección de moléculas biológicas que comprenden, un componente para separar de manera simultánea una pluralidad de moléculas biológicas en uno o una pluralidad de canales en un sustrato, en donde cada canal comprende una posición de detección; una o más fuentes de luz posicionadas para iluminar las posiciones de detección en el sustrato; uno o una pluralidad de primeros elementos ópticos posicionados para recoger y dirigir la luz que emana de las posiciones de detección; y un detector de luz colocado para aceptar la luz dirigida desde los primeros elementos ópticos, en donde el detector de luz comprende un elemento dispersivo de longitud de onda para separar la luz de los primeros elementos ópticos de acuerdo con la longitud de onda de la luz y colocado para proporcionar una porción de la luz separada a los elementos de detección, en donde cada uno de los elementos de detección está en comunicación con un primer elemento de control para recopilar de manera simultánea información de detección de cada uno de los elementos de detección y, en donde dicho detector de luz detecta fluorescencia de al menos 6 colorantes marcados a una o más moléculas biológicas, teniendo cada colorante una longitud de onda máxima única.

En un tercer aspecto, la divulgación proporciona métodos para separar y detectar una pluralidad de moléculas biológicas que comprenden, proporcionar una o una pluralidad de muestras de análisis en uno o una pluralidad de canales microfluídicos en un sustrato, en donde cada canal microfluídico comprende una posición de detección, y cada muestra de análisis comprende independientemente una pluralidad de moléculas biológicas, cada una marcada independientemente con uno de al menos 6 colorantes, cada colorante tiene una longitud de onda máxima única; separar de manera simultánea la pluralidad de moléculas biológicas marcadas en cada canal microfluídico; y detectar la pluralidad de analitos diana separados en cada canal microfluídico mediante, la iluminación de cada posición de detección con una fuente de luz; la recogida de la luz que emana de cada posición de detección; el direccionamiento de la luz recogida a un detector de luz; y (i) la separación de la luz recogida por la longitud de onda de la luz; y (ii) la detección de manera simultánea de la fluorescencia de al menos 6 colorantes marcados con una o más moléculas biológicas, teniendo cada colorante una longitud de onda máxima única.

En un cuarto aspecto, la divulgación proporciona sistemas integrados de biochips que comprenden (a) un biochip que comprende uno o una pluralidad de sistemas microfluídicos, en donde cada sistema microfluídico comprende una primera cámara de reacción en comunicación microfluídica con una cámara de separación, en donde la primera cámara de reacción está adaptada para la extracción de ácido nucleico; purificación de ácido nucleico; depuración anterior a la amplificación de ácido nucleico; amplificación de ácido nucleico; depuración posterior a la amplificación de ácido nucleico; depuración anterior a la secuenciación de ácido nucleico; secuenciación de ácido nucleico; depuración posterior a la secuenciación de ácido nucleico; transcripción inversa; depuración anterior a la transcripción inversa; depuración posterior a la transcripción inversa; ligadura de ácido nucleico; hibridación de ácido nucleico; o cuantificación; y la cámara de separación comprende una posición de detección; y (b) un sistema de separación y detección que comprende, (i) un elemento de separación para separar de manera simultánea una pluralidad de analitos diana en las cámaras de separación; (ii) una o más fuentes de luz posicionadas para iluminar las posiciones de detección en el biochip; (iii) uno o una pluralidad de primeros elementos ópticos posicionados para recoger y dirigir la luz que emana de las posiciones de detección; y (iv) un detector de luz colocado para aceptar la luz dirigida desde los primeros elementos ópticos, en donde el detector de luz comprende un elemento dispersivo de longitud de onda para separar la luz de los primeros elementos ópticos de acuerdo con la longitud de onda de la luz y colocado para proporcionar una porción de la luz separada a al menos seis elementos de detección, en donde cada uno de los elementos de detección está en comunicación con un primer elemento de control para recopilar de manera simultánea información de detección de cada uno de los elementos de detección; y en donde dicho detector de luz detecta fluorescencia de al menos 6 colorantes marcados con una o más moléculas biológicas, teniendo cada colorante una longitud de onda máxima única.

En un quinto aspecto, la descripción proporciona sistemas integrados de biochips que comprenden (a) un biochip

que comprende uno o una pluralidad de sistemas microfluídicos, en donde cada sistema microfluídico comprende una primera cámara de reacción en comunicación microfluídica con una cámara de separación, en donde la primera cámara de reacción está adaptada para la extracción de ácido nucleico; purificación de ácido nucleico; depuración anterior a la amplificación de ácido nucleico; amplificación de ácido nucleico; depuración posterior a la amplificación de ácido nucleico; depuración anterior a la secuenciación de ácido nucleico; secuenciación de ácido nucleico; depuración posterior a la secuenciación de ácido nucleico; transcripción inversa; depuración anterior a la transcripción inversa; depuración posterior a la transcripción inversa; ligadura de ácido nucleico; hibridación de ácido nucleico; o cuantificación; y la cámara de separación comprende una posición de detección; y

(b) un sistema de separación y detección que comprende, (i) un elemento de separación para separar de manera simultánea una pluralidad de moléculas biológicas que comprenden secuencias de ADN, en las cámaras de separación; (ii) una o más fuentes de luz posicionadas para iluminar las posiciones de detección en el biochip; (iii) uno o una pluralidad de primeros elementos ópticos posicionados para recoger y dirigir la luz que emana de las posiciones de detección; y (iv) un detector de luz colocado para aceptar la luz dirigida desde los primeros elementos ópticos, en donde el detector de luz comprende un elemento dispersivo de longitud de onda para separar la luz de los primeros elementos ópticos de acuerdo con la longitud de onda de la luz y colocado para proporcionar una porción de la luz separada a al menos seis elementos de detección, en donde cada uno de los elementos de detección está en comunicación con un primer elemento de control para recopilar de manera simultánea información de detección de cada uno de los elementos de detección; y en donde dicho detector de luz detecta fluorescencia de al menos 8 colorantes marcados en una o más secuencias de ADN, teniendo cada colorante una longitud de onda máxima única, dichos colorantes son miembros de al menos dos subconjuntos que contienen 4 colorantes, de modo que dichos conjuntos de colorantes sean capaces de detectar al menos dos secuencias de ADN en un solo canal, en donde el número de colorantes es un múltiplo de cuatro, y el número de secuencias de ADN por detectar es igual a ese múltiplo, de modo que cada uno de los diferentes colorantes esté presente en un solo subconjunto.

## 25 Descripción de los dibujos

- La figura 1 es una ilustración de una realización de un biochip integrado para lisis y amplificación de plantilla para 4 muestras individuales.
- La figura 2 es una ilustración de una realización de la primera capa del biochip de la figura 1.
- La figura 3 es una ilustración de una realización de la segunda capa del biochip de la figura 1.
- La figura 4 es una ilustración de una realización de la tercera capa del biochip de la figura 1.
- La figura 5 es una ilustración de una realización de la cuarta capa del biochip de la figura 1.
- La figura 6 es una ilustración de una realización de ensamblaje y unión del biochip de la figura 1.
- La figura 7 es un gráfico que ilustra la presión de las válvulas capilares en función del diámetro hidráulico inverso de la válvula para el agua desionizada y los reactivos de secuenciación cíclica para dos tipos de válvulas, válvulas en plano y de orificios pasantes.
- La figura 8 es una ilustración que muestra una realización de etapas fluidicas del biochip de la figura 1 para la amplificación de plantilla por PCR.
- La figura 8a es una ilustración que muestra muestras y reactivos de PCR que se han cargado en un biochip de la divulgación.
- La figura 8b es una ilustración que muestra el suministro de muestras a través de canales a las cámaras de muestras (se muestran en diferentes posiciones a lo largo de los canales de muestra para ilustrar la trayectoria de flujo).
- La figura 8c es una ilustración que muestra las muestras en las cámaras de muestras.
- La figura 8d es una ilustración que muestra el suministro de reactivos de PCR a las cámaras de reactivos.
- La figura 8e es una ilustración que muestra la extracción del exceso de reactivo de PCR.
- Las figuras 8f y 8g son ilustraciones que muestran la etapa inicial de mezcla y la retención de los líquidos por el primer conjunto de válvulas capilares.
- Las figuras 8h a 8j son ilustraciones que muestran los líquidos mezclados suministrados a la cámara de PCR, en ese punto se inicia el ciclado térmico.
- La figura 9 es una ilustración que muestra una realización de las etapas fluidicas de un biochip integrado.

Las figuras 9a a 9e son ilustraciones que muestran el suministro de reactivo de secuenciación cíclica a las cámaras de medición en la capa 1 y la eliminación del exceso de reactivo desde la proximidad de las cámaras.

5 Las figuras 9f y 9g son ilustraciones que muestran la introducción del producto de PCR en una cámara de reacción de Sanger.

Las figuras 9h-9j son ilustraciones que muestran la mezcla del reactivo de Sanger con el producto de PCR por movimiento recíproco.

10 La figura 9l es una ilustración que muestra un producto reciclado que se puede eliminar para su análisis.

La figura 10 es un cromatograma de secuenciación (electroferogramas) para el producto de secuenciación producido en el biochip de la figura 1.

15 La figura 11 es una ilustración que muestra una realización de un biochip integrado para el rendimiento de la ultrafiltración de un producto de secuenciación cíclica. El conjunto de chips es similar al del biochip 1, excepto por la adición de un filtro de ultrafiltración (UF) 1116 entre las capas 3 y 4.

20 La figura 12 es una ilustración que muestra las etapas fluidicas del biochip de la figura 11 durante la purificación del producto de secuenciación.

Las figuras 12a y 12b son ilustraciones que muestran el suministro de un producto de Sanger a las cámaras de entrada de UF.

25 La figura 12c es una ilustración que muestra el producto de secuenciación suministrado a la cámara de filtración.

La figura 12d es una ilustración que muestra la filtración casi completa del producto de secuenciación.

30 Las figuras 12e a 12g son ilustraciones que muestran el suministro de lavado a las cámaras de entrada de UF y la posterior eliminación del exceso de lavado del canal de suministro.

La figura 12h es una ilustración que muestra el comienzo del primer ciclo de lavado; es seguido por filtración como en la figura 12d y un ciclo de lavado posterior.

35 Las figuras 12i y 12j son ilustraciones que muestran el líquido de elución (el mismo líquido que el lavado) que se suministra a las cámaras de entrada de UF.

Las figuras 12k a 12m son ilustraciones que muestran un solo ciclo de presurización de las cámaras de entrada de UF con los puertos de salida cerrados, y luego liberan la presión para provocar un movimiento recíproco.

40 La figura 12n es una ilustración que muestra un producto purificado listo para su posterior procesamiento o eliminación.

45 La figura 13 es una ilustración que muestra una realización de un biochip integrado para el rendimiento de la amplificación de plantilla, secuenciación cíclica, depuración del producto de secuenciación, separación por electroforesis y detección por fluorescencia inducida por láser.

50 La figura 14 es una ilustración que muestra la concentración de fragmentos de ácido nucleico marcados por contraelectrodo e inyección en un canal de separación.

La figura 15 es una ilustración que muestra una realización de un sistema de excitación y detección según la invención.

55 La figura 16 es una ilustración que muestra una realización de un sistema de excitación y detección según la invención.

60 La figura 17 es un electroferograma generado para la separación y detección de una muestra de colorante. Cada cromatograma en el gráfico representa la señal de cada uno de los 32 elementos de un PMT de 32 ánodos. Cada cromatograma se compensa entre sí para permitir una fácil visualización de los datos.

La figura 18 es un gráfico que muestra los espectros de colorante de cada uno de los 6 colorantes, extraídos del electroferograma; también se muestra el espectro de fluorescencia de fondo.

65 La figura 19 es un gráfico que muestra los espectros de emisión de colorante para los colorantes 6-FAM, VIC, NED, PET y LIZ.

La figura 20 es un gráfico que muestra los espectros de emisión de colorante para los colorantes 5-FAM, JOE, NED y ROX.

5 La figura 21 es un electroforegrama generado para la separación y detección de una muestra de 4 colorantes. Cada cromatograma en el gráfico representa la señal de cada uno de los 32 elementos de un PMT de 32 ánodos. Cada cromatograma se compensa entre sí para permitir una fácil visualización de los datos.

La figura 22 es un cromatograma de secuenciación.

10

## **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

### **I. INTEGRACIÓN Y SISTEMAS INTEGRADOS**

#### **15 A. Descripción general de la integración**

El uso de microfluídica permite la fabricación de características para realizar más de una función en un solo biochip. Dos o más de estas funciones se pueden conectar de forma microfluídica para permitir el procesamiento secuencial de una muestra; este acoplamiento se denomina integración.

20

Existe una gama de posibles funciones o procesos de componentes que deben integrarse para lograr cualquier aplicación dada, aunque no todos los procesos deben implementarse para una aplicación determinada. Como resultado, los métodos de integración elegidos deben ser apropiados para conectar efectivamente un número de procesos de componentes diferentes en diferentes secuencias. Los procesos que se pueden integrar incluyen, pero sin limitación, los siguientes:

25

1. Inserción de muestra;
2. Eliminación de materias extrañas (por ejemplo, partículas grandes como polvo, fibras)
3. Separación de células (es decir, la eliminación de células distintas de las que contienen el ácido nucleico para analizar, como la eliminación de células humanas (y en consecuencia, ADN genómico humano) de muestras clínicas que contienen ácidos nucleicos microbianos para analizar);
4. Concentración de células que contienen los ácidos nucleicos de interés;
5. Lisis de células y extracción de ácidos nucleicos;
6. Purificación de ácidos nucleicos del lisado; con posible concentración de los ácidos nucleicos a volúmenes más pequeños;
7. Depuración anterior a la amplificación de ácido nucleico;
8. Depuración posterior a la amplificación;
9. Depuración anterior a la secuenciación;
10. Secuenciación;
11. Depuración posterior a la secuenciación (por ejemplo, eliminar los terminadores e iones marcados con colorante no incorporados que interfieren con la electroforesis);
12. Separación de ácido nucleico;
13. Detección de ácido nucleico;
14. Transcripción inversa de ARN;
15. Depuración anterior a la transcripción inversa;
16. Depuración posterior a la transcripción inversa;
17. Ligadura de ácido nucleico;
18. Cuantificación de ácido nucleico.
19. Hibridación de ácido nucleico; y
20. Amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, PCR, amplificación en círculo rodante, amplificación por desplazamiento de cadena y amplificación por desplazamiento múltiple).

40

45

50

Una de las muchas formas en que se pueden combinar algunos de estos procesos es en un sistema integrado para la identificación humana mediante análisis de STR. Tal sistema puede requerir el acoplamiento de extracción de ADN, cuantificación específica de ADN humano, adición de una cantidad definida de ADN a la reacción de PCR, amplificación por PCR multiplexada, y separación y detección (opcionalmente, también se pueden incorporar etapas de depuración para eliminar los componentes de reacción o cebadores). Se pueden recolectar una o más muestras mediante técnicas como el frotis (véase, Sweet *et al.*, *J. Forensic Sci.* 1997, 42, 320-2) de sangre entera, sangre secada, la superficie interna de las mejillas, huellas dactilares, agresión sexual, tacto u otras muestras forenses relevantes. La exposición al lisado (opcionalmente, en presencia de agitación) libera el ADN del hisopo en un tubo.

55

60

#### **B. Descripción general de los componentes de integración y sus usos**

##### **1. Recolección de muestras y procesamiento inicial**

65

Para muchas aplicaciones, los siguientes componentes discretos se integran ventajosamente en el biochip: inserción

de muestra; eliminación de materias extrañas; eliminación de ácidos nucleicos interferentes; y concentración de células de interés. En general, un componente de procesamiento anterior del biochip acepta muestras, realiza la eliminación inicial de partículas y células que contienen ácido nucleico extraño y concentra las células de interés en pequeños volúmenes. Un enfoque es usar un tubo de muestra que pueda aceptar un hisopo (por ejemplo, parecido a un "Q-tip") y que se llena con solución de lisis para realizar la etapa de lisis y extracción. El hisopo se puede poner en contacto con varios sitios que contienen células, incluyendo una mancha de sangre, una huella digital, agua, un filtro de aire o un sitio clínico (por ejemplo, hisopo bucal, hisopo de herida, hisopo nasal).

La interfaz de estos tubos con otros componentes del biochip puede incluir un filtro para la eliminación de materias extrañas. Otro enfoque es utilizar un cartucho de adquisición de muestras de sangre o ambientales de gran volumen, que procesa 1-100 ml de muestra. En el caso de la sangre, un medio de reducción de leucocitos puede eliminar los glóbulos blancos humanos y el ADN interferente mientras pasa microbios que contienen ácidos nucleicos de interés. Para muestras ambientales, los filtros de malla grande se pueden utilizar para eliminar el polvo y la suciedad, mientras que los filtros de malla pequeña (por ejemplo, filtros de < 20  $\mu\text{m}$ , < 10  $\mu\text{m}$ , < 5  $\mu\text{m}$ , < 2,5  $\mu\text{m}$ , < 1  $\mu\text{m}$ , < 0,5  $\mu\text{m}$ , < 0,2  $\mu\text{m}$ , < 0,1  $\mu\text{m}$ ) se pueden usar para atrapar microbios, concentrándolos en un pequeño volumen. Estos componentes de procesamiento anterior pueden ser consumibles separados o pueden estar unidos al biochip integrado en el momento de la fabricación. Como alternativa, el biochip puede diseñarse para realizar lisis diferencial para separar las células por tipo (por ejemplo, espermatozoides de células epiteliales vaginales o glóbulos rojos de bacterias).

## 2. Lisis y extracción

Se puede emplear una variedad de métodos de lisis y extracción. Por ejemplo, un procedimiento típico implica la aplicación de calor después de mezclar la muestra con una pequeña cantidad de una enzima degradante como la proteinasa K, que rompe las paredes celulares y libera ácidos nucleicos. Otros métodos útiles son sonicación y ultrasonidos, uno o ambos se realizaron a veces en presencia de cuentas.

Por ejemplo, la lisis y la extracción se pueden realizar en una muestra que contiene  $10^6$  células o menos. Dependiendo de la aplicación, se puede utilizar un número menor de células iniciales en los biochips y métodos de la divulgación, menos de  $10^5$ , menos de  $10^4$ , menos de  $10^3$ , menos de  $10^2$ , menos de 10 y, en los casos en que se analicen secuencias de varias copias, menos de 1.

## 3. Purificación de ácidos nucleicos

Se puede lograr una forma de purificación de ácidos nucleicos insertando un medio de purificación entre un canal de entrada y salida. Este medio de purificación puede estar basado en fibra de sílice y usar reactivos de sal caotrópica para lisar la muestra biológica, exponer el ADN (y ARN) y unir el ADN (y ARN) a los medios de purificación. El lisado se transporta a través del canal de entrada a través del medio de purificación para unir los ácidos nucleicos. El ácido nucleico unido se lava con un tampón basado en etanol para eliminar contaminantes. Esto se puede lograr haciendo fluir los reactivos de lavado a través del canal de entrada a través de la membrana de purificación. El ácido nucleico unido se eluye luego de la membrana haciendo fluir un tampón bajo en sal apropiado (por ejemplo, el documento de Boom US 5.234.809). Una variación de este método implica el uso de una fase sólida configurada de manera diferente. Por ejemplo, el gel de sílice se puede emplear para unir el ácido nucleico. Se pueden usar perlas de sílice paramagnética y emplear sus propiedades magnéticas para inmovilizarlas contra un canal o pared de la cámara durante la unión, lavado y etapas de elución. También se pueden emplear perlas de sílice no magnetizadas, empaquetadas dentro de una "columna" estanca donde son retenidas por fritas (típicamente fabricadas en el plástico del dispositivo, pero también pueden insertarse durante el ensamblaje) o "liberarse" durante ciertas fases de su operación: Las perlas libres se pueden mezclar con ácidos nucleicos y luego fluir contra una frita o un vertedero en el dispositivo para atraparlas de modo que no interfieran con los procesos posteriores. Otros formatos incluyen sol-gel con partículas de sílice distribuidas en el medio de gel y monolitos poliméricos con inclusiones de partículas de sílice, en que el soporte está reticulado para una mayor estabilidad mecánica. Esencialmente, cualquier método de purificación de ácidos nucleicos que sea funcional en un entorno convencional puede adaptarse a los biochips integrados de esta divulgación.

## 4. Amplificación de ácido nucleico

Se puede emplear una variedad de métodos de amplificación de ácido nucleico, tales como PCR y PCR de transcripción inversa, que requeriría ciclos térmicos entre al menos dos, y más típicamente, tres temperaturas. Se pueden usar métodos isotérmicos, como la amplificación por desplazamiento de cadena, y se puede usar la amplificación por desplazamiento múltiple para la amplificación del genoma completo. Se hace referencia a la solicitud de patente de EE. UU. titulada "MÉTODOS PARA LA AMPLIFICACIÓN MULTIPLEXADA RÁPIDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS DIANA" (expediente del representante n.º 08-318-US) presentada en la misma fecha.

## 5 Cuantificación de ácido nucleico

Un enfoque para la cuantificación en formato microfluídico se basa en la 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 está acoplada a un ciclador térmico y un sistema óptico de excitación y detección está acoplado a la cámara de reacción para permitir que se mida la fluorescencia de la solución de reacción. La cantidad de ADN en la muestra está correlacionada con la intensidad de la fluorescencia de la cámara de reacción por ciclo. Véase, por ejemplo, Heid *et al.*, *Genome Research* 1996, 6, 986-994. Otros métodos de cuantificación incluyen el uso de colorantes intercalantes como picoGreen, SYBR, o bromuro de etidio, ya sea antes o después de la amplificación, que luego puede detectarse utilizando fluorescencia o absorbancia.

#### 6. Purificaciones secundarias

Para el análisis de STR, el producto de PCR amplificado de múltiples y marcado se puede usar directamente para el análisis. No obstante, el rendimiento de la separación electroforética se puede mejorar en gran medida mediante la purificación del producto para eliminar los iones necesarios para la PCR que interfieren con la separación u otras etapas posteriores. De manera similar, la purificación después de la secuenciación cíclica u otras manipulaciones de ácido nucleico puede ser útil. En su conjunto, cualquier etapa de purificación que sigue a la extracción inicial o purificación de ácido nucleico puede considerarse una purificación secundaria. Se puede emplear una variedad de métodos, incluyendo ultrafiltración, en que los pequeños iones/cebadores/marcadores colorantes no incorporados son conducidos a través de un filtro, dejando el producto deseado en el filtro que luego se puede eluir y aplicar directamente a la separación o al módulo posterior. Los medios de ultrafiltración incluyen filtros "tejidos" de polietersulfona y celulosa regenerada, así como las membranas de trazas nucleares de tipo "track-etch", en que se forman poros de tamaño altamente uniforme en una membrana extremadamente delgada (1-10  $\mu\text{m}$ ). Estas tienen la ventaja de recolectar productos de mayor tamaño que el tamaño de poro en la superficie del filtro, en lugar de capturar el producto a cierta profundidad debajo de la superficie. Los ácidos nucleicos amplificados también pueden purificarse utilizando los mismos métodos descritos anteriormente (es decir, purificación clásica en fase sólida sobre sílice). Todavía otros métodos incluyen hidrogeles, polímeros reticulados que tienen la propiedad de la variabilidad del tamaño de poro, es decir, el tamaño de poro cambia en respuesta a variables ambientales como el calor y el pH. En un estado, los poros son estancos y el producto de PCR no puede pasar. A medida que los poros se dilatan, es posible el flujo hidrodinámico o electroforético del producto a través de los poros. Otro método es el uso de hibridación, ya sea hibridación no específica del producto con ADN aleatorio inmovilizado en una superficie (como la superficie de las perlas) o hibridación específica, en que un complemento a una marca de secuencia en el producto está en la superficie sólida. En esta estrategia, el producto de interés se inmoviliza mediante hibridación y el material no deseado se elimina mediante lavado; el calentamiento posterior funde el dúplete y libera el producto purificado.

#### 7. Reacción de secuenciación cíclica

La secuenciación cíclica clásica requiere ciclados térmicos, tanto como la PCR. Los métodos preferidos son aquellos que emplean terminadores marcados con colorante, de modo que cada producto de extensión lleva una marca fluorescente única correspondiente a la base final de la reacción de extensión.

#### 8. Inyección, separación y detección

La inyección, separación y detección de fragmentos de ácido nucleico marcado en el canal de electroforesis se puede realizar de varias maneras, que se han descrito en la solicitud de patente de EE. UU. titulada "PLATAFORMAS DE DETECCIÓN Y SEPARACIÓN MICROFLUÍDICA DE PLÁSTICO", presentada en la misma fecha y a la que se le asignó el número de expediente de representante 07-865-US. En primer lugar, los inyectores cruzados como se discute en el presente documento pueden usarse para inyectar una porción de la muestra. En una realización alternativa, se puede utilizar la inyección electrocinética ("EKI"). En cualquier caso, la concentración adicional del producto de secuenciación en la proximidad del extremo abierto del canal de carga (en el caso de inyección cruzada) o del canal de separación (en el caso de EKI) puede realizarse concentrando electrostáticamente el producto cerca de un electrodo. En la figura 14 se muestra un pocillo de muestra de dos electrodos en la porción de electroforesis del chip. Ambos electrodos están recubiertos con una capa de permeación que evita que el ADN entre en contacto con el metal del electrodo, pero permite el acceso de iones y agua entre el pocillo de muestra y el electrodo. Dichas capas de permeación pueden estar formadas por poliacrilamida reticulada (véase la publicación de solicitud de patente de EE. UU. US 2003-146145-A1). El electrodo más alejado de la abertura del canal es el electrodo de separación, mientras que el más cercano a la abertura del canal es el contraelectrodo. Al cargar el contraelectrodo positivamente en relación con el electrodo de separación, se extraerá ADN hacia el contraelectrodo y se concentrará cerca de la abertura del canal de separación. Al hacer flotar el contraelectrodo e inyectarlo usando el electrodo de separación y el ánodo en el extremo más alejado de los canales de separación, el producto concentrado se inyecta electrocinéticamente.

#### C. Métodos de integración

El biochip también contiene varios medios diferentes para integrar los módulos funcionales. Estos medios implican el transporte de líquidos de punto a punto en el biochip, el control de caudales para procesos que dependen del caudal, (por ejemplo, algunas etapas de lavado, separación de partículas y elución), la activación del movimiento fluido en el tiempo y el espacio en el biochip (por ejemplo, mediante el uso de alguna forma de válvula) y la mezcla de fluidos.

Se puede usar una variedad de métodos para el transporte de fluidos y el flujo controlado de fluidos. Un método es el bombeo de desplazamiento positivo, en el sentido de que un émbolo en contacto con el fluido o un gas o fluido interpuesto conduce el fluido una distancia precisa basada en el volumen desplazado por el émbolo durante el movimiento. Un ejemplo de tal método es una bomba de jeringa. Otro método es el uso de membranas elastoméricas integradas que son accionadas neumáticamente, magnéticamente, o de otra manera. Individualmente, estas membranas se pueden usar como válvulas para contener fluidos en un espacio definido y/o prevenir la mezcla o suministro prematuro de fluidos. Cuando se usan en serie, no obstante, estas membranas pueden formar una bomba análoga a una bomba peristáltica. Mediante el accionamiento sincronizado secuencial de las membranas, el fluido puede ser "empujado" desde su lado posterior a medida que las membranas del lado delantero se abren para recibir el fluido en movimiento (y para evacuar el aire desplazado en los canales del dispositivo). Un método preferido para el accionamiento de estas membranas es el accionamiento neumático. En tales dispositivos, el biochip está compuesto de capas fluidicas, al menos una de ellas tiene membranas, uno de sus lados está expuesto dentro de los canales y cámaras de fluido del dispositivo. El otro lado de la membrana está expuesto a una capa de colector neumático que se conecta a una fuente de presión. Las membranas se abren o cierran mediante la aplicación de presión o vacío. Se pueden usar válvulas que están normalmente abiertas o normalmente cerradas, cambiando de estado bajo la aplicación de presión o vacío. Considérese que cualquier gas puede ser utilizado para el accionamiento, ya que el gas no entra en contacto con los fluidos bajo análisis.

Otro método más para conducir fluidos y controlar los caudales es aplicar vacío o presión directamente sobre los fluidos mismos, alterando la presión en los meniscos delantero, trasero o ambos del líquido. Se aplican presiones apropiadas (típicamente en el intervalo de 0,34 - 20,68 kPa ((0,05-3 psig))). Los caudales también pueden controlarse dimensionando adecuadamente los canales fluidicos, ya que el caudal es proporcional al diferencial de presión a través del fluido y el diámetro hidráulico a la cuarta potencia e inversamente proporcional a la longitud del canal o del tapón de líquido y la viscosidad.

La activación fluida se puede lograr usando una variedad de válvulas activas. Estas pueden incluir válvulas piezoeléctricas o válvulas solenoides que pueden incorporarse directamente en el chip o aplicarse al biochip de modo que los puertos en el cuerpo del chip principal se comuniquen con las válvulas, dirigiendo el fluido a las válvulas y luego nuevamente al chip. Un inconveniente de este tipo de válvulas es que para muchas aplicaciones, es probable que sean difíciles de fabricar y demasiado costosas de incorporar en dispositivos integrados desechables. Un enfoque preferible es utilizar membranas como válvulas, como se ha analizado anteriormente. Por ejemplo, las membranas activadas por 68,94 kPa (10 psig) se pueden usar para contener con éxito los fluidos sometidos a PCR.

En algunas aplicaciones, pueden ser preferibles microválvulas capilares, que son válvulas pasivas. Esencialmente, las microválvulas son constricciones en la trayectoria del flujo. En microválvulas, se pueden utilizar la energía superficial y/o las características geométricas, como los bordes afilados, para impedir el flujo cuando la presión aplicada al fluido está por debajo de una válvula crítica, denominada presión de estallido, que generalmente viene dada por la relación:

$$P_{\text{válvula}} \propto (\gamma/d_H) * \text{sen}(\theta_c)$$

donde  $\gamma$  es la tensión superficial del líquido,  $d_H$  es el diámetro hidráulico de la válvula (definido como  $4 * (\text{área de sección transversal}) / \text{perímetro de sección transversal}$ ), y  $\theta_c$  es el ángulo de contacto del líquido con la superficie de la válvula.

Las propiedades que hacen que las válvulas pasivas sean preferibles para ciertas aplicaciones incluyen: volumen muerto extremadamente bajo (típicamente en el intervalo de picolitros) y pequeña extensión física (cada una de ellas es solo un poco más grande que los canales que conducen hacia y desde la válvula). La pequeña extensión física permite una alta densidad de válvulas en una superficie dada del biochip. De forma adicional, ciertas válvulas capilares son muy simples de fabricar, consistiendo esencialmente en un pequeño orificio en una lámina de plástico, con o sin tratamiento superficial. El uso juicioso de las válvulas capilares puede reducir el número total de válvulas de membrana requeridas, simplificar la fabricación general y crear un sistema robusto.

Las válvulas capilares implementadas en dispositivos de la divulgación son de dos tipos: válvulas en el plano, en que los pequeños canales y las esquinas afiladas de las válvulas se forman creando "pasos" en una capa y uniendo esta capa a una tapa sin características (típicamente otra capa del dispositivo); y válvulas de orificios pasantes, en estas, se forman pequeños agujeros (típicamente 250  $\mu\text{m}$  o menos) en una capa intermedia entre dos capas de fluidos del dispositivo. En ambos casos, el tratamiento con fluoropolímero se puede utilizar para aumentar el ángulo de contacto de los fluidos en contacto con las válvulas.

La figura 7 muestra el rendimiento de las válvulas de estas válvulas para líquidos de interés, en concreto, agua desionizada y reactivo de secuenciación cíclica, en función del tamaño de la válvula para el caso del tratamiento con fluoropolímero. En ambos casos, se observa la dependencia esperada de la presión de la válvula en la dimensión de la válvula (Presión  $\sim 1/\text{diámetro}$ ). Las válvulas de orificios pasantes tienen ventajas significativas sobre las válvulas en plano. En primer lugar, son más fáciles de fabricar, ya que se pueden formar pequeños orificios pasantes

fácilmente en una lámina de plástico, ya sea moldeando alrededor los postes, punzonando, troquelando, perforando o perforando con láser después de que se haya creado la capa de válvula. Las válvulas en plano requieren una fabricación bastante precisa, y las válvulas muy finas (con altas presiones de válvulas) requieren el uso de técnicas litográficas para crear las herramientas de moldeo o estampado necesarias. En segundo lugar, las válvulas de orificios pasantes pueden recubrirse más completamente con fluoropolímero en "todos los lados". La aplicación de una solución de fluoropolímero de baja tensión superficial a un orificio da como resultado un recubrimiento completo de las paredes internas del orificio por acción capilar. El recubrimiento de todos los lados de una válvula en plano requiere la aplicación de fluoropolímero tanto en la válvula como en la región de la capa de acoplamiento que se sella sobre la válvula. Como resultado, las válvulas en plano típicas se forman sin recubrimiento en el "techo" de la

En prototipos mecanizados, las válvulas de orificios pasantes son más fáciles de implementar y exhiben mayores presiones de válvulas, tal y como se ilustra en la figura 7.

La mezcla se puede lograr de varias maneras. En primer lugar, la difusión se puede usar para mezclar fluidos mediante la coinyección de los dos fluidos en un solo canal, generalmente de pequeña dimensión lateral y de longitud suficiente para que el tiempo de difusión

$$t_D = (\text{ancho})^2 / (2 * \text{constante de difusión})$$

esté satisfecho con los caudales dados. Desafortunadamente, este tipo de mezcla suele ser inadecuado para mezclar grandes volúmenes rápidamente, debido a que el tiempo de difusión o mezcla se escala con el ancho de canal al cuadrado. La mezcla se puede mejorar de varias maneras, como la laminación, en que la corriente de fluido se divide y se recombina. (Campbell y Grzybowski *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 2004, 362, 1069-1086); o mediante el uso de microestructura fina para crear advección caótica dentro del canal de flujo (Stroock *et al., Anal. Chem.* 2002, 74, 5306-4312). En sistemas que utilizan bombas y válvulas activas, la mezcla se puede lograr ciclando fluido entre dos puntos en el dispositivo varias veces. Finalmente, esto último también se puede lograr en sistemas usando válvulas capilares. Una válvula capilar dispuesta entre dos canales o cámaras actúa como un pivote para el flujo de fluido; a medida que el fluido fluye de un canal al otro a través del capilar, el menisco posterior queda atrapado si se usa una presión suficientemente baja para bombear el fluido. La inversión de la presión conduce el fluido de regreso al primer canal, y nuevamente se fija en el capilar. Se pueden usar múltiples ciclos para mezclar eficientemente los componentes.

Los enfoques para la separación y detección en formatos microfluídicos se describen en la solicitud de patente de EE. UU. titulada "PLATAFORMAS DE DETECCIÓN Y SEPARACIÓN MICROFLUÍDICA DE PLÁSTICO", expediente del representante n.º MBHB 07-865-US, presentada en la fecha de la presente, (véase, por ejemplo, párrafos 68-79, 94-98, en el presente documento).

La parte superior de la figura 13 muestra la construcción del biochip integrado (1301) a partir de dos componentes que están unidos en o durante la fabricación. En primer lugar, un biochip de 16 muestras (1302) que combina las características de lisis, de amplificación y de secuenciación del biochip de la figura 1 con las características de purificación del producto de secuenciación del biochip de la figura 11 y en segundo lugar, un biochip de separación de plástico de 16 carriles (1303). El producto de secuenciación purificado también se puede inyectar electrocinéticamente antes de la separación.

#### D. Métodos de fabricación

Los dispositivos de la divulgación pueden estar compuestos principalmente de plásticos. Los tipos útiles de plásticos incluyen, pero no se limitan a: polímero olefínico cíclico (COP); copolímero de olefina cíclica (COC); (ambos tienen excelente calidad óptica, baja higróscopica y altas temperaturas de operación cuando tienen suficiente peso molecular); poli(metacrilato de metilo) (PMMA) (fácilmente mecanizable y se puede obtener con excelentes propiedades ópticas); y policarbonato (PC) (altamente moldeable con buena resistencia al impacto y alta temperatura de operación). Se incluye más información sobre materiales y métodos de fabricación, en la solicitud de patente de EE. UU. titulada "MÉTODOS PARA LA AMPLIFICACIÓN MULTIPLEXADA RÁPIDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS DIANA"(expediente del representante n.º 08-318-US).

Se puede usar una variedad de métodos para fabricar las partes individuales del biochip y ensamblarlas en un dispositivo final. Debido a que el biochip puede estar compuesto de uno o más tipos de plástico, con la posible inclusión de componentes insertados, los métodos de interés pertenecen a la creación de piezas individuales seguido del procesamiento posterior de piezas y ensamblaje.

Los componentes plásticos se pueden fabricar de varias maneras, incluyendo moldeo por inyección, estampado en caliente y mecanizado. Las piezas moldeadas por inyección pueden estar compuestas tanto de características macroscópicas (como depósitos de fluido) como de características finas (como válvulas capilares). En algunos casos, puede ser preferible crear características finas en un conjunto de piezas y características mayores en otro conjunto, ya que los enfoques para el moldeo por inyección de estas características de diferentes tamaños pueden

variar. Para depósitos grandes (que miden varios mm (aproximadamente 1 -50 mm) en un lado y con profundidades de varios mm (aproximadamente 1-10 mm) y capaces de acomodar cientos de  $\mu\text{l}$ ), el moldeo convencional puede emplearse utilizando herramientas de moldeo por inyección mecanizadas, o herramientas creadas al quemar un acero u otro metal usando un electrodo de grafito que ha sido mecanizado para ser un negativo de la herramienta.

5 Para características finas, tanto la creación de herramientas como el proceso de moldeo se pueden variar. Las herramientas generalmente se crean mediante un proceso litográfico sobre un sustrato de interés (por ejemplo, grabado isotrópico de vidrio o grabado iónico reactivo profundo u otros procesos en silicio). El sustrato se puede electrochapar con níquel (generalmente después de la deposición de una capa de cromo para promover la adhesión) y se puede eliminar el sustrato, por ejemplo, por grabado en un ácido. Esta placa "hija" de níquel es la herramienta de moldeo por inyección. El proceso de moldeo puede ser algo diferente al anterior, también: Para características superficiales finas, el moldeo por inyección y compresión, en que el molde se comprime físicamente un poco después de que se haya inyectado plástico en la cavidad, se ha encontrado que es superior al moldeo por inyección estándar en términos de fidelidad, precisión y reproducibilidad.

15 Para el estampado en caliente, se mantienen los problemas similares con respecto a las características grandes y finas como se discutió anteriormente, y se pueden crear como anteriormente las herramientas. En el troquelado en caliente, la resina plástica en forma de gránulos, o como una pieza en bruto preformada de material creado mediante moldeo o troquelado, se puede aplicar a la superficie de la herramienta o a un sustrato plano. A continuación, una segunda herramienta puede ponerse en contacto a temperatura y presión controladas con precisión para elevar el plástico por encima de su temperatura de transición vítrea y hacer que el flujo de material llene las cavidades de la(s) herramienta (s). El estampado en vacío puede evitar el problema de que el aire quede atrapado entre la herramienta y el plástico.

25 El mecanizado también se puede emplear para crear piezas. Se pueden usar máquinas controladas numéricamente por ordenador (CNC por sus siglas en inglés) de alta velocidad para crear muchas piezas individuales por día a partir de plástico moldeado, extrudido o fundido con disolvente. La elección adecuada de fresadora, los parámetros de operación y las herramientas de corte pueden lograr una alta calidad de la superficie (se pueden obtener rugosidades superficiales de 50 nm en el fresado a alta velocidad de COC (Bundgaard *et al.*, *Proceedings of IMechE Part C: J. Mech. Eng.Sci.* 2006, 220,1625-1632). El fresado también se puede utilizar para crear geometrías que pueden ser difíciles de lograr en el moldeo o estampado y para mezclar fácilmente tamaños de características en una sola pieza (por ejemplo, depósitos grandes y válvulas capilares finas pueden mecanizarse en el mismo sustrato). Otra ventaja del fresado sobre el moldeo o estampado es que no se necesitan agentes de desmoldeo para liberar la pieza fabricada de una herramienta de moldeo.

35 El procesamiento posterior de piezas individuales incluye inspección óptica (que puede automatizarse), operaciones de depuración para eliminar defectos tales como rebabas o plástico colgante, y tratamiento superficial. Si se requieren superficies de calidad óptica en plástico mecanizado, se puede usar pulido con vapor de un solvente para el plástico. Por ejemplo, para PMMA, se puede usar diclorometano, mientras que para COC y COP, se puede usar ciclohexano o tolueno.

45 Antes del ensamblaje, se pueden aplicar tratamientos superficiales. El tratamiento superficial se puede realizar para promover o reducir la humectación (es decir, para cambiar la hidrofiliidad/hidrofobicidad de la pieza); para inhibir la formación de burbujas dentro de las estructuras microfluídicas; para aumentar la presión de las válvulas de las válvulas capilares; y/o para inhibir la adsorción de proteínas a las superficies. Los recubrimientos que reducen la humectabilidad incluyen fluoropolímeros y/o moléculas con restos de flúor que están expuestos al fluido cuando las moléculas se adsorben o se adhieren a las superficies del dispositivo. Los recubrimientos pueden adsorberse o depositarse de otra manera, o pueden unirse covalentemente a la superficie. Los métodos que pueden usarse para hacer tales recubrimientos incluyen recubrimiento por inmersión, pasar el reactivo de recubrimiento a través de los canales del dispositivo ensamblado, entintado, deposición química de vapor y deposición por chorro de tinta. Los enlaces covalentes entre las moléculas de recubrimiento y la superficie pueden formarse mediante tratamiento con oxígeno u otro plasma u ozono UV para crear una superficie activada, con depósito posterior o codeposición conjunta de la molécula de tratamiento de superficie en la superficie (véase, Lee *et al.* *Electrophoresis* 2005, 26, 1800-1806; y Cheng *et al.*, *Sensors and Actuators B* 2004, 99, 186-196.)

55 El ensamblaje de las piezas componentes en el dispositivo final se puede realizar de varias maneras. Los dispositivos insertados, como filtros, se pueden troquelar y luego colocar con una máquina de recogida y colocación.

60 Se puede usar la unión por difusión térmica, por ejemplo, para la unión de dos o más capas del mismo material, cada una siendo de espesor uniforme. En general, las piezas se pueden apilar y la pila se coloca en una prensa caliente, donde la temperatura puede elevarse a la proximidad de la temperatura de transición vítrea del material que comprende las piezas, causar fusión en las interfaces entre las piezas. Una ventaja de este método es que la unión es "general", es decir, se pueden unir dos pilas de capas de aproximadamente las mismas dimensiones, independientemente de la estructura interna de las capas, porque el calor y la presión se aplican uniformemente a través de las capas.

65

La unión por difusión térmica también puede usarse para unir partes más complejas, como aquellas que no son planas en sus superficies de unión u opuestas, mediante el uso de cunas de unión especialmente creadas. Dichas cunas se ajustan a la superficie exterior de las capas a unir.

- 5 Otras variaciones de unión incluyen la unión térmica asistida por solvente, en el sentido de que un solvente como el metanol solubiliza parcialmente la superficie plástica, mejorando la resistencia de la unión a una temperatura de unión más baja. Una variación adicional es el uso de capas recubiertas por rotación de material de bajo peso molecular. Por ejemplo, un polímero de la misma estructura química pero de un peso molecular más bajo que los componentes del sustrato puede tejerse sobre al menos una capa para unirse, los componentes ensamblados y la pila resultante unida, mediante unión por difusión. Durante la unión por difusión térmica, los componentes de bajo peso molecular pueden pasar a través de su temperatura de transición vítrea a una temperatura menor que los componentes y difundirse en el plástico del sustrato.

- 15 Los adhesivos y epoxis se pueden usar para unir materiales diferentes y es probable que se usen al unir componentes fabricados de diferentes maneras. Las películas adhesivas se pueden troquelar y colocar sobre componentes. El adhesivo líquido también se puede aplicar mediante recubrimiento por rotación. El entintado de adhesivo sobre piezas estructuradas (como en la impresión por nanocontacto) se puede utilizar con éxito para aplicar adhesivo a superficies estructuradas sin necesidad de "dirigir" el adhesivo sobre áreas particulares.

- 20 En un ejemplo, se puede ensamblar un biochip de la divulgación como se muestra en la figura 6. Las capas 1 y 2 se pueden alinear según las características incluidas (por ejemplo, clavijas y enchufes); por separado, las capas 3 y 4 se pueden alinear de manera similar por las características incluidas. La pila de la capa 1 más la capa 2 se puede invertir y aplicar a la pila de la capa 3 más la capa 4 y luego se puede unir toda la pila.

## 25 E. Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Biochip integrado para extracción y amplificación de ácido nucleico*

- 30 En la figura 1 se muestra un biochip integrado para la extracción y amplificación de ADN por PCR. Este dispositivo de 4 muestras integra las funciones de distribución y medición de reactivos; mezcla de reactivos con muestras; suministro de muestras a una porción de ciclado térmico del chip; y ciclado térmico. El mismo biochip se usa en el Ejemplo 2 a continuación y tiene estructuras adicionales para el desempeño de la secuenciación cíclica.

- 35 El biochip se construyó con 4 capas de termoplástico como se muestra en las figuras 2-5. Las 4 capas están mecanizadas en PMMA y tienen espesores de las capas de 0,76 mm, 1,9 mm, 0,38 mm y 0,76 mm, respectivamente, y el tamaño lateral del biochip fue de 124 mm X 60 mm. En general, los biochips de tres o más capas permiten el uso de un número indefinido de reactivos comunes para dividir entre múltiples ensayos: dos capas fluidicas y una capa que al menos contiene orificios pasantes, permitiendo que los canales fluidicos en las capas externas se "cruzan" entre sí. (Se reconocerá que existen casos especiales, como el uso de un solo reactivo común entre múltiples muestras, que no requieren una construcción de tres capas). La elección de 4 capas se hizo por compatibilidad con la construcción de chips para otras funciones (como ultrafiltración, Ejemplo 3) e integración completa (Ejemplo 4).

- 45 Los canales del biochip tenían dimensiones de sección transversal que variaban de 127  $\mu\text{m}$  X 127  $\mu\text{m}$  a 400  $\mu\text{m}$  X 400  $\mu\text{m}$ , mientras que los depósitos variaban entre 400  $\mu\text{m}$  X 400  $\mu\text{m}$  en sección transversal a 1,9 X 1,6 mm; ambos canales y depósitos se extienden por distancias tan cortas como 0,5 mm a varias decenas de mm. Las válvulas capilares utilizadas en el biochip tenían un tamaño de 127  $\mu\text{m}$  X 127  $\mu\text{m}$  para válvulas "en plano" y un diámetro de 100  $\mu\text{m}$  para válvulas capilares de orificios pasantes.

- 50 Determinados canales, depósitos y válvulas capilares de las cuatro capas mecanizadas se trataron con un material hidrófobo/oleófobo, PFC 502A (Cytonix, Beltsville, MD). El tratamiento superficial se realizó recubriendo con una punta Q humedecida seguido de secado al aire a temperatura ambiente. La capa de fluoropolímero seca tenía menos de 10  $\mu\text{m}$  de espesor según se determinó por microscopía óptica. El tratamiento de la superficie tiene dos propósitos: prevenir la formación de burbujas dentro de los líquidos, especialmente en líquidos de baja tensión superficial, como el reactivo de secuenciación cíclica, que puede ocurrir cuando el líquido humedece rápidamente las paredes de los canales o cámaras (y "cierra" una burbuja antes de que se pueda desplazar el aire), y para mejorar la presión de ruptura capilar en las válvulas capilares que resisten el flujo del líquido. Las regiones que no se trataron fueron las cámaras de ciclado térmico para PCR y secuenciación cíclica.

- 60 Después del tratamiento superficial, las capas se unieron como se muestra en la figura 6. La unión se realizó mediante unión térmica difusiva, en que la pila de componentes se calentó bajo presión a una temperatura cercana a la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) del plástico. Se aplicó una fuerza de 20,41 kg (45 lb) sobre todo el biochip de 74,19 cm cuadrados (11,5 pulgadas cuadradas) durante 15 minutos durante un perfil de unión térmica que consiste en una rampa de temperatura ambiente a 130 °C en 7,5 minutos, una retención a 130 °C durante 7,5 minutos y

enfriamiento rápido a temperatura ambiente.

La instrumentación neumática fue desarrollada para conducir fluidos dentro de los biochips de la divulgación. Dos pequeñas bombas peristálticas proporcionaron presión y vacío. La salida de presión positiva se dividió entre tres reguladores que tienen un intervalo de aproximadamente 0,34 - 20,68 kPa (0,05 -3 psig). El vacío se transfirió a un regulador con un vacío de salida de aproximadamente (-0,69) - (-20,68) kPa ((-0,1) - (-3) psig). Una cuarta mayor presión se tomó de un cilindro de N<sub>2</sub> a un regulador adicional o alternativamente desde una bomba de mayor capacidad. Las presiones positivas y negativas se aplicaron a una serie de 8 módulos selectores de presión. Cada módulo estaba equipado con válvulas solenoides que podían elegir una presión de salida para ser transmitida al biochip desde las 5 entradas. Las líneas de presión de salida terminaron en al menos una interfaz neumática. Esta interfaz se sujeta al chip con juntas tóricas colocadas sobre los puertos del chip en el lado de entrada del chip (los puertos en la parte superior de las figuras).

Inmediatamente por encima de los puertos del biochip había válvulas de solenoide adicionales (es decir, válvulas de compuerta; 8 por interfaz) que aceptan las líneas de presión de salida de los módulos selectores de presión. Estas válvulas, en estrecha proximidad, al chip proporciona una interfaz de bajo volumen muerto (aproximadamente 13 µl) entre la línea de presión y el chip. Una interfaz de bajo volumen muerto puede evitar el movimiento involuntario de ciertos líquidos en el biochip cuando se aplica presión para mover otros líquidos (el pequeño volumen de gas entre el tapón de líquido y la válvula cerrada determina la cantidad máxima que puede mover el tapón, por ejemplo, debido a la compresión del gas a medida que se aplica presión). Todas las válvulas selectoras de presión y válvulas de compuerta se operaron bajo control por ordenador utilizando un programa LabView™ basado en script. Una característica importante de este sistema es que son posibles tiempos cortos de ciclos de presión. Se podrían realizar algunos eventos de control fluido que requerían pulsos de presión tan cortos como 30 mseg y/o se podrían utilizar perfiles de presión complejos donde la presión se pudieran cambiar de un valor a otro (es decir, de un regulador a otro) rápidamente (es decir, con retrasos de no más de 10-20 ms).

Las muestras consistieron en una suspensión bacteriana de aproximadamente 10<sup>6</sup> células/ml de DH5 de *E. coli* transformadas con inserto de plásmido de secuenciación pGEM (objetivo de secuenciación pUC18). El reactivo de PCR consistió en dNTP KOD Taq Polymerase (Novagen, Madison, WI) a una concentración de 0,1 µM.

Se añadió una muestra de 1,23 µl de la suspensión bacteriana a cada uno de los cuatro puertos **104**, cada uno compuesto por orificios pasantes **202** y **336** en las capas 1 y 2, respectivamente. La muestra luego residía en canales de muestra **303** en la capa 2. A continuación, se añadieron 10 µl de reactivo de PCR al puerto 105, compuesto de orificios pasantes **217** y **306** en las capas 1 y 2. El reactivo de PCR residió en la cámara **307** en la capa 2 (véase, la figura 8a). Un puerto para la evacuación del aire desplazado para el reactivo de PCR fue el puerto **107**, que comprende **109** y orificios pasantes **203+305**.

Durante la operación, el aire desplazado por muestras y procesos posteriores (como la medición de reactivos, mezcla de fluidos) se evacuó a través de puertos en el extremo de salida del chip, **108**, compuesto de orificios pasantes **227**. El volumen final de la reacción de PCR se puede aumentar o disminuir según se desee.

El biochip se colocó en el colector neumático descrito anteriormente. El siguiente perfil de presión automatizado se realizó sin demoras entre las etapas. A menos que se indique lo contrario, las válvulas de interfaz neumática, correspondientes con los puertos a lo largo del lado de entrada del chip, se cerraron durante todas las etapas.

Se aplicó una presión de 0,83 kPa (0,12 psig) a los puertos **104** durante 15 segundos para conducir las muestras hacia abajo por los canales **303** al orificio pasante **304**. Las muestras pasaron a través del orificio pasante **304** y emergieron del otro lado de la capa 2 en la cámara de muestra **204** de la capa 1 y fueron conducidas a la primera unión de mezcla **205**. En la primera unión de mezcla, las muestras fueron retenidas mediante válvulas capilares **210** (véanse, las figuras 8b-c).

Se aplicó una presión de 0,83 kPa (0,12 psig) al puerto **105** durante 10 segundos para conducir el reactivo de la PCR a través del orificio pasante **320**. El reactivo de la PCR surgió en el otro lado de la capa 2 en el canal de distribución **208**, y se trasladó a las cámaras de medición **209**, que definen un volumen de reactivo igual al volumen de muestra, donde se retuvieron por válvulas capilares **211** en la unión de mezcla **205**. (véase, la figura 8d).

Se aplicó una presión de 0,83 kPa (0,12 psig) al puerto **107** (compuesto de orificios pasantes **203** y **305**) con el puerto **105** abierto a la atmósfera durante 3 segundos para vaciar el canal **208** (véase, la figura 8e).

Se aplicó una presión de 5,51 kPa (0,8 psig) a los puertos **107** y **105** durante 0,03 segundos y se aplicó de manera simultánea una presión de 4,83 kPa (0,7 psig) a los puertos **104** durante 0,03 segundos para iniciar la mezcla de las muestras y los reactivos de la PCR haciendo estallar los líquidos más allá de las válvulas capilares **210** y **211** (véase, la figura 8f).

Se aplicó una presión de 0,83 kPa (0,12 psig) a los puertos **104** y **107** durante 10 segundos para bombear las muestras y los reactivos de la PCR en los canales de mezcla **214**, con retención en las válvulas capilares **210** y **211**.

El paso a través de los bulbos de mezcla **212** en las constricciones **213** creó resistencia hidráulica agregada al flujo, disminuyendo la alta velocidad impartida por el pulso de alta presión anterior.

5 Se aplicó una presión de 4,83 kPa (0,7 psig) a los puertos **104** y **107** durante 0,03 segundos para separar el líquido de las válvulas capilares **210** y **211** (véase, la figura 8 g).

Se aplicó una presión de 0,83 kPa (0,12 psig) durante 3 segundos a los puertos **104** y **107** para bombear líquido a través del canal de mezcla **214** a las válvulas capilares **219**, donde se retuvieron (véase, la figura 8h).

10 Se aplicó una presión de 0,83 kPa (0,7 psig) durante 0,1 segundos a los puertos **104** y **107** para conducir la mezcla de las muestras y reactivos de PCR a través de orificios pasantes **315** y **402** y a través del cuerpo de las capas 2 y 3, y dentro de la cámara de PCR **502** (véase, la figura 8i).

15 Se aplicó una presión de 0,83 kPa (0,12 psig) durante 3 segundos a los puertos **104** y **107** para completar el bombeo de la mezcla de las muestras y los reactivos de PCR a la cámara **502**. El borde frontal de la mezcla de muestras y los reactivos de PCR luego pasaron a través de orificios pasantes **403** y **316**, emergieron en la capa 1, y se fijaron en la válvula capilar **220** (véase, la figura 8j).

20 El biochip se presurizó a 206,84 kPa (30 psig) de N<sub>2</sub> y se cicló térmicamente para la amplificación por PCR a través de un Peltier utilizando un mecanismo de compresión de vejiga de gas como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. titulada, "Métodos para la amplificación multiplexada rápida de ácidos nucleicos diana", expediente del representante n.º 08-318-US, presentada de manera simultánea con el presente documento; y en la solicitud de patente internacional con número de serie PCT/US08/53234, expediente del representante n.º 07-084-WO, presentada el 6 de febrero de 2008 y titulada, "DISPOSITIVOS Y MÉTODOS PARA EL DESEMPEÑO DE ENSAYOS MINIATURIZADOS *IN VITRO*".

30 La muestra, los volúmenes de reactivos y los tamaños de las cámaras de PCR se eligieron de modo que el líquido llenó la región entre las válvulas **219** y las válvulas **220**. Como resultado, las interfaces líquido/vapor de área de sección transversal pequeña (típicamente 127 µm X 127 µm) se ubicaron aproximadamente a 3 mm de la superficie inferior ciclada térmicamente de la capa 4. La aplicación de presión durante el ciclado térmico inhibió la desgasificación por oxígeno disuelto en la muestra. La pequeña área transversal de la interfaz líquido/vapor y la distancia desde la superficie de Peltier inhibieron la evaporación.

35 La temperatura observada en la parte superior del biochip durante el ciclado nunca superó los 60 °C, y, como resultado, la presión de vapor en las interfaces líquido/vapor fue significativamente menor de lo que hubiera sido para tales interfaces si estuvieran dentro de la cámara de PCR. Para una muestra de 2 µl, 1,4 µl de la misma están dentro de la cámara **502** y el resto está dentro de los orificios pasantes y las válvulas capilares. La evaporación observada fue inferior a 0,2 µl durante 40 ciclos de PCR. El volumen de fluido no ciclado, 0,6 µl en este caso, se puede reducir mediante la elección de diámetros más pequeños para los orificios pasantes.

40 La PCR se realizó utilizando el siguiente perfil de temperatura:

- Calentar la lisis de las bacterias durante 3 minutos a 98 °C.
- 40 ciclos de lo siguiente

- 45
- Desnaturalización a 98 °C durante 5 segundos
  - Recocido a 65 °C durante 15 segundos
  - Extensión a 72 °C durante 4 segundos
  - Extensión final a 72 °C/2 min
- 50

55 El producto de la PCR se recuperó lavando la cámara 502 con ~ 5 µl de agua desionizada y se analizó por electroforesis en gel en placa. El rendimiento de la PCR fue de hasta 40 ng por reacción, mucho más de lo requerido para las posteriores reacciones de secuenciación. En la presente solicitud, los ácidos nucleicos bacterianos se generaron simplemente por lisis de bacterias. Los ácidos nucleicos pueden someterse a purificación según sea necesario, un proceso que puede mejorar la eficiencia de la amplificación, secuenciación y otras reacciones.

## Ejemplo 2

60 *Biochip integrado para la distribución del reactivo de secuenciación cíclica, mezcla con producto de PCR y secuenciación cíclica*

65 Se usaron los biochips descritos en el Ejemplo 1. El producto de PCR generado en tubos usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1 se añadió a los puertos de muestra y el reactivo de la PCR del biochip como se describe anteriormente. 50 µl de un reactivo de secuenciación cíclica (BigDye™3.1/BDX64, MCLab, San Francisco) fue agregado al puerto **106** (compuesto de orificios pasantes **215** y **308**) y cámara **309**. Después de la instalación de dos interfaces neumáticas (una para la entrada y otra para el extremo de salida del chip), el producto de PCR se procesó

como se describe en el Ejemplo 1 hasta la cámara de PCR, pero sin la etapa de ciclado térmico de PCR. La disposición de los fluidos en el chip fue como se muestra en la figura 9a.

5 El siguiente perfil de presión se realizó utilizando el software del sistema neumático; todas las válvulas solenoides correspondientes a los puertos de chip se cerraron a menos que se indique lo contrario:

1. Se aplicó una presión de 0,69 kPa (0,1 psig) al puerto **106** con puertos **109** abiertos a la atmósfera durante 10 segundos para bombear el reactivo de secuenciación cíclica al canal **310** (véase, la figura 9b).
- 10 2. Se aplicó una presión de 0,83 kPa (0,7 psig) durante 0,2 segundos en los puertos **106** y **108** (compuesto de orificios pasantes **216** y **314**) para conducir el ciclo del reactivo de secuenciación del canal **304** a través de orificios pasantes **311**, a través del cuerpo de la capa 2 y dentro del ciclo las cámaras de medición **218** de reactivo de secuenciación cíclica en la capa 1 (véase, la figura 9c).
- 15 3. Se aplicó una presión de 0,69 kPa (0,1 psig) al puerto **106** con los puertos **109** abiertos a la atmósfera, conduciendo el reactivo de secuenciación cíclica a las válvulas capilares **221**, donde fue retenido (véase, la figura 9d).
- 20 4. Se aplicó una presión de 0,69 kPa (0,1 psig) al puerto **108** con el puerto **106** abierto a la atmósfera durante 1 segundo para conducir el exceso de reactivo de secuenciación cíclica hacia atrás en la cámara **101**, dejando el canal **310** vacío (véase, la figura 9e).
- 25 5. Se aplicó una presión de 0,83 kPa (0,7 psig) a los puertos **104** y **107** durante 0,1 segundos con los puertos **109** abiertos a la atmósfera para conducir el producto de PCR a través de la válvula capilar **220** y en el orificio pasante **317**, pasando por el cuerpo de la capa 2 y el orificio pasante **404** en la capa 3, y dentro de la cámara de secuenciación cíclica **503** de la capa 4 (véase, la figura 9f).
- 30 6. Se aplicó una presión de 0,69 kPa (0,1 psig) a los puertos **109** con los puertos **104** y **107** abiertos a la atmósfera durante 5 segundos para conducir la muestra de PCR de vuelta a los orificios pasantes. La acción capilar retuvo los líquidos en la entrada del orificio pasante, evitando que aparezca una burbuja de aire atrapado entre el producto de la PCR y la cámara **503** (véase, la figura 9g).
- 35 7. Se aplicó una presión de 0,83 kPa (0,7 psig) al puerto **108** durante 0,2 segundos con los puertos **109** abiertos a la atmósfera para conducir el reactivo de secuenciación cíclica a la cámara **503**, mientras que, de manera simultánea, se aplica 0,69 kPa (0,1 psig) a los puertos **104** y **107**, para contactar el producto de PCR con el reactivo de secuenciación (véase, la figura 9h).
- 40 8. Se aplicó una presión de 0,69 kPa (0,1 psig) durante 10 segundos a los puertos **104**, **107** y **108** con los puertos **109** abiertos a la atmósfera para conducir el producto de PCR y el reactivo de Sanger a la cámara. El menisco posterior del producto de la PCR y el reactivo de secuenciación se fijaron en las válvulas capilares **220** y **221** (véase, la figura 9i).
- 45 9. Se aplicaron 5 pulsos de vacío de 1,72 kPa (0,25 psig) de vacío y una duración de 0,1 segundos al puerto **108** con los puertos **109** abiertos a la atmósfera para extraer ambos líquidos parcialmente hacia atrás en la cámara de medición de reactivos **218** (véase, la figura 9j).
- 50 10. Se aplicó una presión de 0,69 kPa (0,1 psig) a los puertos **104**, **107** y **108** con los puertos **109** abiertos a la atmósfera durante 10 segundos para bombear la mezcla de vuelta a la cámara **503**, con el menisco posterior fijado en las válvulas capilares como en la etapa 8. (véase, la figura 9k).

Las etapas 9-10 se repitieron dos veces más para efectuar la mezcla del reactivo de secuenciación y el producto de la PCR.

55 El biochip se presurizó a 206,84 kPa (30 psig) de N<sub>2</sub> y se cicló térmicamente usando el siguiente perfil de temperatura:

- 95 °C/1 min de desnaturalización inicial
  - 30 ciclos de lo siguiente
  - Desnaturalización a 95 °C durante 5 segundos
  - Recocido a 50 °C durante 10 segundos
  - Extensión a 60 °C durante 1 min.

65 Las muestras (véase, la figura 9l) fueron recuperadas y purificadas por precipitación con etanol y analizadas por separación electroforética y detección de fluorescencia inducida por láser en el instrumento Genebench™ como se describe *infra* (Parte II, Ejemplo 5). El análisis de calidad de Phred produjo 408+/-57 bases QV20 por muestra.

**Ejemplo 3***Ultrafiltración en biochips de 4 muestras*

5 Se construyó un biochip de 4 muestras para el desempeño de la purificación del producto de secuenciación de cuatro capas, como se discutió en el Ejemplo 1, y se muestra en la figura 11. Un elemento adicional en la construcción fue el filtro de ultrafiltración (UF) **1116**, que se corta a medida y se coloca entre las capas 3 y 4 antes de la unión térmica. La creación de un buen enlace alrededor del filtro UF requirió el uso de la capa 3. Las capas 3 y 4 crean perímetros ininterrumpidos alrededor del filtro, porque todos los canales que conducen hacia y desde el filtro están en la parte inferior de la capa 2. (El enlace directo entre las capas 2 y 4, por ejemplo, deja un enlace pobre al filtro donde los canales cruzan el filtro). En este ejemplo, se utilizó un filtro de celulosa regenerada (RC) de corte de peso molecular (MWCO por sus siglas en inglés) de 30 kD (Sartorius, Goettingen, Alemania). Una variedad de otros MWCO (10 kD, 50 kD y 100 kD) han sido examinados, ya que tiene un material alternativo, polietersulfona (Pall Corporation, East Hills, NY).

1. Se agregaron a los puertos cuatro muestras de 10 µl de producto de secuenciación cíclica generado en reacciones de tubo usando la plantilla pUC18 y la enzima KOD **1104** en la primera capa y se condujeron a través del canal **1105** en la segunda capa a la cámara **1106** en la segunda capa. Se agregaron 200 µl de agua desionizada al puerto **1120** (un orificio pasante en la primera capa) al depósito **1121** en la segunda capa. El biochip se instaló en dos interfaces neumáticas.

El siguiente perfil de presión se realizó utilizando el software del sistema neumático. Todas las válvulas solenoides correspondientes a los puertos de biochip se cerraron a menos que se indicara lo contrario.

2. Se aplicó una presión de 0,62 kPa (0,09 psig) a los puertos **1104** con los puertos **1119** abiertos a la atmósfera durante 5 segundos para conducir el producto de secuenciación a las válvulas capilares **1108** en la capa 1, donde se retuvieron.

3. Se aplicó una presión de 4,14 kPa (0,6 psig) a los puertos **1104** con los puertos **1119** abiertos a la atmósfera durante 0,1 segundos para estallar las muestras a través de válvulas capilares **1108** en la capa 1 y suministrarlas a través de orificios pasantes **1111** en la capa 2 en cámaras de entrada UF **1112** en la capa 2.

4. Se aplicó una presión de 0,62 kPa (0,09 psig) a los puertos **1104** con los puertos **1119** abiertos a la atmósfera durante 10-30 segundos (se usaron diferentes tiempos en diferentes experimentos) para completar el suministro del producto de secuenciación a las cámaras **1112**. El producto de secuenciación fue retenido por las válvulas capilares **1113** en la capa 2 (véase la figura 12a y 12b).

5. Se aplicó una presión de 5,52 kPa (0,8 psig) al puerto **1124** con los puertos **1119** y **1104** abiertos a la atmósfera durante 0,5 segundos para conducir el producto de secuenciación a través de las válvulas **113** a las cámaras de filtración **1115**. Esto también eliminó las válvulas capilares de entrada **1108** de líquido retenido.

6. Se aplicó una presión de 0,62 kPa (0,09 psig) al puerto **1124** con los puertos **1119** abiertos a la atmósfera durante 10-30 segundos para completar el suministro del producto de secuenciación a la cámara **1115**. El producto de secuenciación se retuvo en la válvula **1113** (véase, la figura 12c).

7. Se aplicó lentamente una presión de 51,71 kPa (7,5 psig) a todos los puertos del chip para la ultrafiltración. Durante la ultrafiltración, el menisco del producto de secuenciación permanece fijado en **1113** mientras que el borde delantero del líquido "se retrae" a medida que el líquido pasaba por el filtro **1116**. 10 µl de producto de secuenciación requirieron ~ 120 segundos para la filtración. La presión se liberó después de la filtración (véase, la figura 12c y 12d).

8. Se aplicó una presión de 0,62 kPa (0,09 psig) al puerto **1120** con el puerto **1124** abierto a la atmósfera durante 3 segundos para conducir agua al canal **1122** (en la capa 4) y la cámara de desbordamiento **1123** parcialmente llena (véase, la figura 12e).

9. Se aplicó una presión de 5,52 kPa (0,8 psig) a los puertos **1120** y **1124** con los puertos **1119** abiertos a la atmósfera para conducir agua a través de las válvulas capilares **1110** de orificios pasantes en el canal **1122** en las cámaras **1112**.

10. Se aplicó una presión de 0,62 kPa (0,09 psig) al puerto **1120** con los puertos **1119** abiertos a la atmósfera durante 10-30 segundos para completar el suministro de líquido a las cámaras **1112**, donde se retuvo por las válvulas **1113**. (véase, la figura 12f).

11. Se aplicó una presión de 0,62 kPa (0,09 psig) al puerto **1124** con el puerto **1120** abierto para conducir agua en la cámara **1123** y el canal **1122** de vuelta a la cámara **1121** (véase, la figura 12g).

12. Se aplicó una presión de 5,52 kPa (0,8 psig) al puerto **1124** con los puertos **1119** y **1104** abiertos a la atmósfera durante 0,5 segundos para conducir agua a través de válvulas **113** en las cámaras de filtración **1115**. Esto también eliminó las válvulas capilares de entrada **1108** de líquido retenido.

5 13. Se aplicó una presión de 0,62 kPa (0,09 psig) al puerto **1124** con los puertos **1119** abiertos a la atmósfera durante 10-30 segundos para completar el suministro de agua a la cámara **1115**. El producto de secuenciación se retuvo en la válvula **1113** (véase, la figura 12h).

El agua se condujo a través del filtro UF como en la etapa 6 anterior, completando el primer lavado.

10 Las etapas 8-13 se repitieron una vez más.

Las etapas 8-12 se repitieron para llenar parcialmente las cámaras. **1115** con un volumen final de agua utilizada para la elución (véase, la figura 12k).

15 Se aplicó vacío de 11,03 kPa (1,6 psig) a los puertos **1104** con todos los demás puertos cerrados durante 1 segundo, extrayendo un poco de agua de las cámaras **1115** en las cámaras **1112** (el movimiento máximo está dictado por la creación de un vacío de igual magnitud en el espacio muerto entre el menisco del líquido y las válvulas solenoides correspondientes a los puertos **1119**), (véase, la figura 12i).

20 Los puertos **1104** se abrieron a la atmósfera durante 1 segundo, permitiendo que el líquido regrese a la cámara **1115** debido al vacío parcial generado entre el líquido y las válvulas correspondientes a los puertos **1119** (véase, la figura 12m).

25 16-17 se repitió 50X para crear 50 ciclos de elución.

Se aplicó una presión de 0,62 kPa (0,09 psig) al puerto **1124** durante 10 segundos con los puertos **1119** abiertos a la atmósfera para conducir líquidos de tal manera que su menisco se fije en **1113**.

30 Se aplicó una presión de 4,83 kPa (0,7 psig)/0,05 segundos al puerto **1124** con los puertos **1119** abiertos a la atmósfera para separar el eluyente (véase, la figura 12n).

Las muestras se recuperaron y se ejecutaron directamente en Genebench™ como se describe, produciendo hasta 479 bases QV20.

#### 35 Ejemplo 4

*Biochip totalmente integrado para extracción de ácidos nucleicos, amplificación de plantilla, secuenciación cíclica, purificación del producto de secuenciación, separación electroforética y detección del producto purificado*

40 La figura 13 ilustra una realización de un biochip de 16 muestras, **1301**, que combina la lisis y la extracción, amplificación de plantilla y funciones de secuenciación cíclica del biochip de la figura 1; la función de ultrafiltración del chip de la figura 11; y la separación y detección electroforética. El proceso por ultrafiltración se realiza por el subcomponente. **1302** y puede realizarse como se describe en los ejemplos 1, 2 y 3; los puntos de transferencia **1304** en la superficie inferior de **1302** están alineados con los pocillos de entrada **1305** en el subcomponente de separación **1303**.

La inyección se realiza electrocinéticamente con una etapa de preconcentración utilizando contraelectrodos. El pocillo de entrada **1305**, como se ilustra en la figura 14, consiste en un pocillo receptor de líquido **1401**; un electrodo de separación principal, **1402**; y un contraelectrodo **1403**. El canal de separación **1306** se abre en el fondo del depósito del pocillo **1401**. El electrodo de separación está típicamente recubierto de platino u oro, y es preferiblemente un electrodo plano recubierto de oro que cubre sustancialmente 1, 3 o 4 de las superficies internas de **1401**. El contraelectrodo es un alambre delgado de oro, acero o platino (típicamente de 0,25 mm de diámetro) que ha sido recubierto con una capa delgada (~10 µm) de poliacrilamida reticulada. Esto forma una capa de protección de hidrogel en el electrodo. En el panel d, el producto de secuenciación purificada (puntos negros dentro de **1401**) se ha transferido al pocillo. Aplicando potencial positivo entre **1402** y **1403**, el producto de secuenciación cargado negativamente se dirige hacia **1403**, como en los paneles c-d. La capa de hidrogel en **1403** evita que el producto de secuenciación entre en contacto con el electrodo metálico y, por lo tanto, evita la electroquímica y el daño del producto de secuenciación. Al contraelectrodo **1403** entonces se le permite flotar con respecto a **1402**. Luego se aplica un potencial positivo entre el electrodo de separación principal **1402** y el ánodo (no mostrado) en el extremo más alejado del canal de separación **1306**. Esto permite que el producto se inyecte (panel e) y que se baje la electroforesis **1306** para la separación y la detección (panel f). Como se ilustra en la figura 14, este esquema permite la concentración del producto de secuenciación en la proximidad del extremo del canal **1306** para aumentar significativamente en relación con la concentración con la que se suministra por ultrafiltración. Si bien dicha concentración es deseable para algunas aplicaciones, no es necesario en todos los casos. En tales casos, el pocillo de la figura 14 sin el contraelectrodo **1403** se puede usar para realizar EKI directamente. Como alternativa, el

electrodo simple en el pocillo de carga puede ser la mitad de un inyector de T cruzada o doble (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. titulada, "PLATAFORMAS DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN MICROFLUIDICA DE PLÁSTICO", expediente del representante n.º 07-865-US, presentada de manera simultánea con el presente documento).

5 La separación ocurre en los canales de separación. **1306**, y la detección se produce mediante fluorescencia inducida por láser en la región de detección **1307**. En este biochip, se proporciona un rebaje **1308** para permitir, por ejemplo, un bloque de Peltier (no se muestra) para acoplarse con la superficie inferior de **1301** para proporcionar ciclos térmicos para PCR y secuenciación cíclica. Las interfaces neumáticas (no se muestran) dentro del instrumento se sujetan a los extremos del chip para proporcionar control microfluidico.

## II. SISTEMAS DE SEPARACIÓN y DETECCIÓN

### A. Descripción detallada de los componentes de separación y detección y sus usos

#### 1. Instrumento de separación

15 La separación del ADN se lleva a cabo en un biochip e instrumentación como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. n.º US2006-0260941-A1. Los chips de separación pueden ser de vidrio (véase, la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. n.º US2006-0260941-A1) o de plástico (la solicitud de patente de EE. UU. titulada, "PLATAFORMAS DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN MICROFLUIDICA DE PLÁSTICO", expediente del representante n.º 07-865-US, presentada de manera simultánea con el presente documento).

#### 2. Instrumentación de excitación y detección

25 El instrumento comprende subsistemas de excitación y detección para interactuar con e interrogar una muestra. Las muestras generalmente incluyen una o más moléculas biológicas (que incluyen pero no se limitan a ADN, ARN y proteínas) que están marcados con colorantes (por ejemplo, colorantes fluorescentes). El subsistema de excitación comprende una fuente o fuentes de excitación y una trayectoria del haz de excitación con elementos ópticos que incluyen lentes, agujeros estenopeicos, espejos y objetivos, para acondicionar y enfocar la fuente de excitación en una ventana de excitación/detección. La excitación óptica de una muestra se puede lograr mediante una serie de tipos de láser, con longitudes de onda de emisión en la región visible, entre 400 y 650 nm. Los láseres de estado sólido pueden proporcionar longitudes de onda de emisión de aproximadamente 460 nm, 488 nm y 532 nm. Estos láseres incluyen, por ejemplo, los productos Compass, Sapphire y Verdi de Coherent (Santa Clara, CA). Los láseres de gas incluyen iones de argón y helio-neón con emisión en las longitudes de onda visibles a aproximadamente 488 nm, 514 nm, 543 nm, 595 nm y 632 nm. Otros cristales láser con longitudes de onda de emisión en la región visible están disponibles en CrystaLaser (Reno, NV). En una realización, se puede usar un láser de estado sólido de 488 nm Sapphire 488-200 (Coherent, Santa Clara, CA). En otra realización, se puede usar una fuente de luz con una longitud de onda más allá del intervalo visible para colorantes excitantes que tengan espectros de absorción y/o emisión más allá del intervalo visible (por ejemplo, colorantes emisores de infrarrojos o ultravioletas). Alternativamente, la excitación óptica se puede lograr mediante el uso de fuentes de luz no láser con longitudes de onda de emisión apropiadas para la excitación del colorante, incluyendo diodos emisores de luz y lámparas.

45 El subsistema de detección comprende uno o más detectores ópticos, un dispositivo de dispersión de longitud de onda (que realiza la separación de longitud de onda) y uno o una serie de elementos ópticos que incluyen, pero sin limitación, lentes, agujeros estenopeicos, espejos y objetivos para recoger la fluorescencia emitida a partir de fragmentos de ADN marcados con fluoróforo que están presentes en la ventana de excitación/detección. La fluorescencia emitida puede ser de un único colorante o una combinación de colorantes. Para discriminar la señal para determinar su contribución del colorante emisor, se puede utilizar la separación de la longitud de onda de la fluorescencia. Esto se puede lograr mediante el uso de espejos dicróicos y elementos de filtro paso banda (disponibles en numerosos proveedores, incluidos Chroma, Rockingham, VT; y Omega Optical, Brattleboro, VT). En esta configuración, la fluorescencia emitida pasa a través de una serie de espejos dicróicos donde una porción de la longitud de onda será reflejada por el espejo para continuar viajando por la trayectoria, y la otra porción pasará. Una serie de fotodetectores discretos, cada uno colocado al final del espejo dicróico detectará la luz en un intervalo específico de longitudes de onda. Se puede colocar un filtro paso banda entre el espejo dicróico y el fotodetector para reducir aún más el intervalo de longitud de onda antes de la detección. Los detectores ópticos que se pueden utilizar para detectar las señales separadas por longitud de onda incluyen fotodiodos, fotodiodos de avalancha, módulos fotomultiplicadores y cámaras CCD. Estos detectores ópticos están disponibles en proveedores como Hamamatsu (Bridgewater, NJ).

60 En una realización de la invención, los componentes de longitud de onda se separan mediante el uso de espejos dicróicos y filtros de paso de banda y estos componentes de longitud de onda se detectan con detectores de tubo fotomultiplicador (PMT) (H7732-10, Hamamatsu). El espejo dicróico y los componentes de paso de banda se pueden seleccionar de modo que la luz incidente en cada uno de los PMT consista en una banda de longitud de onda estrecha correspondiente a la longitud de onda de emisión del colorante fluorescente. El paso de banda se selecciona típicamente para centrarse alrededor del máximo de emisión fluorescente con un paso de banda de

intervalo de longitud de onda de entre 1 y 50 nm. El sistema es capaz de detectar ocho colores y puede diseñarse con ocho PMT y un conjunto correspondiente de espejos dicróicos y filtros de paso de banda para dividir la fluorescencia emitida en ocho colores distintos. Se pueden detectar más de ocho colorantes aplicando espejos dicróicos adicionales, filtros de paso de banda y PMT. La figura 15 muestra la trayectoria del haz para la implementación de un filtro paso banda discreto y un filtro dicróico. Una versión integrada de esta configuración de detección y discriminación de longitud de onda es el H9797R, Hamamatsu, Bridgewater, NJ.

Otro método para discriminar los colorantes que componen la señal de fluorescencia implica el uso de elementos y sistemas dispersivos de longitud de onda como los prismas, rejillas de difracción, rejillas de transmisión (disponibles en numerosos proveedores, incluidos ThorLabs, Newton, NJ; y Newport, Irvine, CA; y espectrógrafos (disponibles de numerosos proveedores, incluyendo Horiba Jobin-Yvon, Edison, NJ). En este modo de operación, los componentes de la longitud de onda de la fluorescencia se dispersan sobre un espacio físico. Los elementos detectores ubicados a lo largo de este espacio físico detectan la luz y permiten la correlación de la ubicación física del elemento detector con la longitud de onda. Los detectores adecuados para esta función están basados en matrices e incluyen fotodiodos multielementos, cámaras CCD, cámaras CCD estrechadas en la parte posterior, PMT de múltiples ánodos. Un experto en la materia podrá aplicar una combinación de elementos de dispersión de longitud de onda y elementos detectores ópticos para producir un sistema que sea capaz de discriminar las longitudes de onda de los colorantes utilizados en el sistema.

En otra realización de la invención, se utiliza un espectrógrafo en lugar de los filtros dicróicos y de paso de banda para separar los componentes de longitud de onda de la fluorescencia excitada. Los detalles sobre el diseño del espectrógrafo están disponibles en John James, Spectrograph Design Fundamental. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2007. El espectrógrafo P/N MF-34 con una rejilla holográfica cóncava con un intervalo espectral de 505 - 670 nm (P/N 532.00.570) (HORIBA Jobin Yvon Inc, Edison, NJ) se utiliza en esta aplicación. La detección se puede lograr con una matriz de detectores PMT lineales de 32 elementos (H7260-20, Hamamatsu, Bridgewater, NJ). La fluorescencia recogida se refleja en el agujero estenopeico, reflejado, dispersado y fotografiado por la rejilla holográfica cóncava en el detector lineal de PMT que está montado en el puerto de salida del espectrógrafo. El uso de un detector basado en PMT aprovecha el bajo ruido oscuro, la alta sensibilidad, el alto intervalo dinámico y la respuesta rápida característica de los detectores de PMT. El uso de un espectrógrafo y un detector de PMT multielementos para la detección de fluorescencia excitada permite flexibilidad en la cantidad de colorantes y la longitud de onda de emisión de colorantes que se pueden aplicar dentro de los sistemas y dentro del carril, sin la necesidad de reconfigurar físicamente el sistema de detección (dicróico, paso de banda y detectores) del instrumento. Los datos recopilados de esta configuración son espectros dependientes de la longitud de onda a través del intervalo de longitud de onda visible para cada exploración para cada carril. La generación de un espectro completo por exploración proporciona flexibilidad de colorante, tanto en términos de longitud de onda de emisión de colorante como en número de colorantes que pueden estar presentes dentro de una muestra. Asimismo, el uso del espectrómetro y el detector de PMT multielementos lineal también permite velocidades de lectura extremadamente rápidas ya que todos los elementos de PMT en la matriz se leen en paralelo. La figura 16 muestra la trayectoria del haz para la implementación de PMT multielementos y espectrógrafo.

Los instrumentos que no forman parte de la invención pueden emplear un modo de operación fijo, para detectar múltiples carriles de manera simultánea y múltiples longitudes de onda de manera simultánea. En una configuración, el haz de excitación se incide de manera simultánea en todos los carriles al mismo tiempo. La fluorescencia de esto es recogida por un detector bidimensional, como una cámara CCD o matriz. En este modo de colección fija, se utiliza un elemento dispersivo de longitud de onda. Una dimensión del detector representa la separación de longitud de onda física, mientras que la otra dimensión representa la separación espacial o carril-carril.

Para la excitación y detección simultáneas de múltiples muestras, un sistema de espejo de exploración (62) (P/N 6240HA, 67124-H-O y 6M2420X40S100S1, Cambridge technology, Cambridge MA) se utiliza para dirigir las trayectorias del haz de excitación y detección para obtener imágenes de cada uno de los carriles del biochip. En este modo de operación, el espejo de exploración dirige las trayectorias del haz, explorando secuencialmente de un carril a otro desde el primer carril hasta el último carril, y repitiendo el proceso nuevamente desde el primer carril hasta el último carril nuevamente. Se utiliza un algoritmo de búsqueda de carril como el descrito en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. n.º US2006-0260941-A1 para identificar la ubicación del carril.

En la figura 16 se muestra una realización de un sistema de detección óptica para la detección simultánea de múltiples carriles y múltiples colorantes. El sistema de excitación y detección de fluorescencia **40** excita los componentes separados por electroforesis de una muestra de ADN (por ejemplo, que contiene fragmentos de ADN después de la amplificación de un conjunto de loci de STR) explorando una fuente de energía (por ejemplo, un rayo láser) a través de una parte de cada uno de los microcanales mientras recoge y transmite la fluorescencia inducida desde el colorante a uno o más detectores de luz para su registro y, finalmente, análisis.

En una realización, el conjunto de excitación y detección de fluorescencia **40** incluye un láser **60**, un dispositivo de exploración **62**, uno o más detectores de luz **64** y varios espejos **68**, espectrógrafo y lentes **72** para transmitir un rayo láser emitido por el láser **60** a través de la abertura **42** al módulo de prueba **55** y de vuelta a los detectores de luz **64**. El dispositivo de exploración **62** mueve el rayo láser entrante a varias posiciones de exploración en relación con el

módulo de prueba **55**. Específicamente, el dispositivo de exploración **62** mueve el rayo láser a una parte pertinente de cada microcanal dentro del módulo de prueba **55** para detectar componentes separados respectivos. El PMT multielementos **64** recoge datos (por ejemplo, las señales fluorescentes de fragmentos de ADN de longitud variable) del módulo de prueba **55** y proporciona los datos electrónicamente a través de un cable conectado al puerto **75** a un sistema de adquisición y almacenamiento de datos ubicado fuera de la cubierta protectora **50**. En una realización, el sistema de adquisición y almacenamiento de datos puede incluir un ordenador reforzado disponible de Option Industrial Computers (13 audreuil-Dorion, Quebec, Canadá).

En otra realización (un "modo fijo"), que no forma parte de la invención, la fuente de excitación incide en todos los puntos de detección de manera simultánea, y la fluorescencia de todos los puntos de detección se recoge de manera simultánea. La dispersión espectral simultánea (espectros de longitud de onda de fluorescencia detectada) y la dispersión espacial (puntos de detección) se pueden realizar con una matriz de detectores bidimensionales. En esta configuración, la matriz de detectores bidimensionales se coloca en el sistema de modo que se generen imágenes de los componentes espectrales y se detecten en una dimensión del detector de matriz (fila), mientras que los componentes espaciales se graban y detectan en la otra dimensión del detector de matriz.

Un instrumento de la invención utiliza un modo de operación de exploración, en lugar de un modo "fijo". En modo de exploración, se requiere que se recoja la señal para cada canal, se integre y se lea mientras el dispositivo de exploración coincide con el carril que se está interrogando y antes de que ocurra en el siguiente canal. Un detector con lectura rápida permite una óptima recogida e integración de luz, traducéndose en una señal más alta al rendimiento de ruido. De forma ideal, el tiempo de lectura del detector debe ser significativamente menor que el tiempo total que el dispositivo de exploración coincide con el canal. El PMT multielementos se puede leer en menos de 0,7 ms y este tiempo de lectura es mucho menor que el tiempo de integración para la detección de cada canal individual.

La rejilla puede dispersar la fluorescencia incidente en el agujero estenoico de acuerdo con su composición de longitud de onda y enfocarla en la matriz lineal de detectores de PMT de múltiples ánodos. El detector proporciona 32 salidas de corriente, una para cada uno de los elementos en la matriz que corresponde al número de fotones incidentes en el elemento. Durante la detección de múltiples muestras (o carriles), cuando el láser está en posición de excitación del carril seleccionado, los circuitos integradores integrarán la corriente de salida de PMT para generar un voltaje de salida proporcional a la corriente de PMT integrada. Al mismo tiempo, el voltaje de salida de extremo único se convierte al modo diferencial utilizando el IC del controlador diferencial (P/N SSM2142) de Analog Devices (Norwood, MA). Al final del tiempo de integración (definido por la velocidad de exploración y el número de carril), el sistema de adquisición de datos leerá la señal diferencial y guardará los datos en su búfer. Después de guardar los datos, el sistema de adquisición de datos moverá el dispositivo de exploración para desplazar el rayo láser al siguiente carril seleccionado, al mismo tiempo reiniciando los circuitos integradores.

Cada módulo de PMT de elemento único tiene su propio circuito integrador. Para un sistema de detección de 8 colores, hay 8 módulos PMT y 8 circuitos integradores. Se pueden agregar colores adicionales utilizando los números correspondientes de módulos de PMT y circuitos integradores.

Como cada uno de los elementos de PMT (H77260-20, Hamamatsu, Japón) tiene una respuesta de señal similar o más rápida que un solo tubo de PMT (H7732-10, Hamamatsu, Japón), y la lectura está en paralelo, este detector puede operar muy rápidamente. Cuando se combina con el espectrómetro, este espectrómetro y sistema de detector de múltiples ánodos puede proporcionar exploraciones espectrales completas en todo el espectro visible (450 nm a 650 nm) con tiempos de lectura de menos de 0,1 ms.

La capacidad de proporcionar velocidades de actualización rápidas permite que este espectrómetro/sistema detector se aplique a la implementación del modo de exploración de detección de múltiples carriles secuencialmente dentro de una sola ejecución. El uso de detectores basados en PMT proporciona poco ruido, alta sensibilidad y alto intervalo dinámico, y respuesta rápida. El espectrómetro de 140 mm con una rejilla holográfica cóncava (Horiba Jobin-Yvon) y un detector de PMT de múltiples ánodos es el detector H7260-20 (Hamamatsu, Japón). También se pueden utilizar otras configuraciones de espectrómetros y detectores de PMT de múltiples ánodos para esta aplicación.

La determinación de las bases de nucleótidos a partir de los electroforegramas se logró utilizando algoritmos de procesamiento de señales para corregir, filtrar y analizar los datos. Este proceso consistió en localizar una señal identificable, corrigiendo la señal de referencia, filtrando el ruido, eliminando la conversación cruzada de color, identificando máximos de señal y determinando bases asociadas. La localización de la señal exigible se realizó para eliminar datos extraños desde el principio y el final de la señal y se logró mediante el empleo de un umbral. A continuación, el fondo fue eliminado de la señal, para que la señal tuviera una línea base común para todos los colores detectados. Finalmente, se aplicó un filtro de paso bajo para eliminar el ruido de alta frecuencia de la señal.

Para desambiguar los colores detectados, se calculó una matriz ponderada y se aplicó a la señal para amplificar el espacio de color del espectro de nucleótido-colorante. El cálculo de esta matriz de separación de colores se realizó utilizando los métodos de Li *et al. Electrophoresis* 1999, 20, 1433-1442. En esta adaptación, se calcula una matriz de

separación de colores "m x n" a partir de la correlación del número "m" de colorantes utilizados en el ensayo con el número "n" de elementos detectores. La conversión de la señal del espacio del detector (elementos de PMT), al espacio de colorante se realiza mediante manipulación matricial de la siguiente manera:  $D = CSM \times PMT$ , donde D es la señal en el espacio de colorante para cada uno de los colorantes m, CSM es la matriz de separación de colores, y PMT es una matriz con la señal de cada uno de los n elementos del detector.

A continuación, los máximos en la señal separada por colores se identificaron utilizando una combinación de filtros de cruce por cero y análisis de frecuencia. Finalmente, para aplicaciones de dimensionamiento de fragmentos, en los cromatogramas corregidos se identificaron los alelos para identificar cada fragmento y asignar un tamaño de fragmento basado en un estándar de tamaño. Para aplicaciones de secuenciación de ADN, en los cromatogramas corregidos se identificaron las bases para asociar uno de los cuatro nucleótidos con cada máximo en el cromatograma. Se puede encontrar una descripción detallada de las identificaciones de bases en Ewing *et al.*, *Genome Research*, 1998, 8, 175-185 y Ewing *et al.*, *Genome Research*, 1998, 8, 186-194.

### 3. Marcadores colorantes

Los marcadores colorantes unidos a oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados se pueden sintetizar u obtener comercialmente (por ejemplo, Operon Biotechnologies, Huntsville, Alabama). Una gran cantidad de colorantes (más de 50) están disponibles para su aplicación en aplicaciones de excitación de fluorescencia. Estos colorantes incluyen los de la familia de colorantes fluoresceína, rodamina AlexaFluor, Biodipy Cumarina y Cianina. Además, los extintores también están disponibles para marcar secuencias de oligonucleótidos para minimizar la fluorescencia de fondo. Los colorantes con emisiones máximas de 410 nm (Cascade Blue) a 775 nm (Alexa Fluor 750) están disponibles y se pueden usar. Los colorantes que oscilan entre 500 nm y 700 nm tienen la ventaja de estar en el espectro visible y pueden detectarse utilizando tubos fotomultiplicadores convencionales. La amplia gama de colorantes disponibles permite la selección de conjuntos de colorantes que tienen longitudes de onda de emisión que se extienden por todo el intervalo de detección. Se han informado sistemas de detección capaces de distinguir muchos colorantes para aplicaciones de citometría de flujo (véase, Perfetto *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.* 2004, 4, 648-55; y Robinson *et al.*, *Proc of SPIE* 2005, 5692, 359-365).

Los colorantes fluorescentes tienen longitudes de onda de excitación máximas que son típicamente desplazadas en azul de 20 a 50 nm desde su longitud de onda de emisión máxima. Como resultado, el uso de colorantes en una amplia gama de longitudes de onda de emisión puede requerir el uso de múltiples fuentes de excitación, con longitudes de onda de excitación para lograr una excitación eficiente de los colorantes sobre el intervalo de longitud de onda de emisión. Como alternativa, los colorantes de transferencia de energía se pueden utilizar para permitir que se utilice un solo láser, con una sola longitud de onda de emisión, para excitar todos los colorantes de interés. Esto se logra uniendo un resto de transferencia de energía a la marca del colorante. Este resto es típicamente otro colorante fluorescente con una longitud de onda de absorción que es compatible con la longitud de onda de excitación de la fuente de luz (por ejemplo, láser). La colocación de este absorbedor en las proximidades de un emisor permite que la energía absorbida se transfiera del absorbedor al emisor, permitiendo una excitación más eficiente de los colorantes de longitud de onda larga (Ju *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92, 4347-51).

Los dideoxinucleotidos marcados con colorante están disponibles de Perkin Elmer, (Waltham, MA).

### B. Ejemplos

#### Ejemplo 5. Separación de seis colores y detección de ácidos nucleicos

El siguiente ejemplo ilustra la separación y detección de fragmentos de ácido nucleico marcados con 6 colorantes fluorescentes, y demuestra la capacidad de resolución de color del sistema de excitación/detección espectrómetro/multielementos. Los fragmentos de ADN se marcaron con los colorantes 6-FAM, VIC, NED, PET mediante la aplicación de cebadores marcados con fluorescencia en una reacción de amplificación por PCR multiplexada. En esta reacción, se amplificó 1 ng de ADN genómico humano (9947A) en una reacción de 25  $\mu$ l de acuerdo con las condiciones recomendadas por el fabricante (AmpFISTR Identifier, Applied Biosystems). Se eliminaron 2,7  $\mu$ l del producto de PCR y se mezclaron con 0,3  $\mu$ l del estándar de dimensionamiento GS500-LIZ (Applied Biosystems) y 0,3  $\mu$ l del estándar de dimensionamiento HD400-ROX. Se añadió HiDi (Applied Biosystems) a un total de 13  $\mu$ l y la muestra se insertó en el pocillo de muestra del biochip de separación y se sometió a electroforesis.

La separación electroforética de ADN usando Genebench consiste en una serie de cuatro operaciones: preelectroforesis, carga, inyección y separación. Estas operaciones se llevan a cabo en un biochip microfluídico, que se calienta a una temperatura uniforme de 50 °C. El biochip contiene sistemas de 16 canales para separación y detección múltiple, cada uno consiste en un canal de inyector y un canal de separación. El ADN para el análisis se separa por transporte electroforético del ADN a través de una matriz de tamizado a lo largo del canal de separación. La longitud de separación de los biochips varía de 160 a 180 mm.

La primera etapa es la preelectroforesis, que se logra aplicando un campo de 160 V/cm a lo largo de la longitud del

canal durante seis (6) minutos. El tampón de separación (TTEIX) se pipetea en el ánodo, cátodo y pocillos de residuos. Las muestras para análisis se pipetean en los pocillos de muestra y se aplican 175 V desde el pocillo de muestra al pocillo de residuos durante 18 segundos, seguido de la aplicación de 175 V en la muestra y el pocillo de residuos y 390 V en el cátodo durante 72 segundos, para cargar la muestra en el canal de separación. La inyección de la muestra se realiza mediante la aplicación de un campo de 160 V/cm a lo largo de la longitud del canal de separación, mientras que los campos de 50 V/cm y 40 V/cm se aplican a través de la muestra y los pocillos de residuos, respectivamente. La separación continúa con los parámetros de voltaje de inyección durante 30 minutos, durante los cuales un sistema óptico detecta las bandas de ADN de separación. La velocidad de recopilación de datos es de 5 Hz y las ganancias de PMT se establecen en -800 V.

Dieciséis muestras que contenían ADN amplificado se cargaron para la separación y detección simultáneas. Las señales de cada uno de los 32 elementos de la PMT se recogieron en función del tiempo para generar un electroforegrama. El electroforegrama resultante (figura 17) muestra máximos correspondientes a la presencia de un fragmento de ADN en la ventana de excitación/detección para uno de los 16 carriles. Además, la intensidad de señal relativa de cada elemento del PMT de 32 elementos para cada máximo corresponde al contenido espectral del colorante (o colorantes si hay más de un colorante presente en la ventana de detección) asociado con el fragmento de ADN. La figura 18 muestra los espectros de emisión de los colorantes detectados y los espectros de fondo del sustrato. El espectro de fondo del sustrato se resta de los espectros de cada uno de los máximos. La realización de este ejercicio da como resultado la identificación de 6 espectros de colorante distintos. Los espectros de los 6 colorantes se superponen en el mismo gráfico. Una comparación de estos datos con los espectros de colorante publicados reales muestra que los relativos de los colorantes son similares a los datos publicados. Este ejemplo demuestra que el sistema puede detectar y diferenciar los 6 colorantes en la solución de reacción. La salida espectral se utiliza para generar la matriz de corrección de color y convertir las señales del espacio del detector a la representación del espacio de colorante (figuras 19 y 20).

#### **Ejemplo 6. Ocho colores de separación y detección de ácidos nucleicos**

En este ejemplo, se muestra una separación de 8 colorantes y detección de ácidos marcados con colorantes fluorescentes. Las secuencias de pares de cebadores directa e inversa para 8 loci se seleccionan de las secuencias publicadas (Butler *et al. J Forensic Sci* 2003, 48, 1054-64).

Los loci seleccionados son CSF1P0, FGA, THO1, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818 y D7S820, aunque cualquiera de los loci y, por lo tanto, los pares de cebadores descritos en el documento también pueden usarse en este ejemplo. Cada uno de los cebadores directos para los pares de cebadores está marcado con un colorante fluorescente separado (Operon Biotechnologies, Huntsville, Alabama). Los colorantes seleccionados para su fijación a los cebadores incluyen Alexa Fluor Dyes 488, 430, 555, 568, 594, 633, 647 y Tamra. Hay muchos otros colorantes disponibles y también se pueden usar como marcadores. Cada locus se amplifica por separado siguiendo los protocolos de reacción de PCR (Butler, 2003, *Id.*) para producir una solución de reacción con fragmentos marcados con sus respectivos colorantes. La plantilla para la reacción de PCR es 1 ng de ADN gemónico humano (tipo 9947A de Promega, Madison WI).

Cada reacción de PCR se purificó limpiando a través de una columna de depuración de la PCR, donde se eliminan los cebadores (cebadores marcados y marcados con colorante) y enzimas, y el eluyente DI intercambia el tampón de PCR. El producto resultante de la depuración es una solución de fragmentos de ADN marcados en agua DI. La depuración de los productos con colorante sigue el protocolo de Smith utilizando columnas MinElute™ (Qiagen, Valencia, CA). Se realizan un total de ocho reacciones. Ocho reacciones de PCR limpiadas se mezclaron en una proporción para generar máximos de intensidades de señal equivalentes, generando una mezcla que contiene fragmentos marcados con 8 colorantes diferentes. Como alternativa, los cebadores para 8 loci se pueden mezclar para formar una mezcla maestra de cebadores para amplificación multiplexada.

Esta solución se separa y detecta con el instrumento y el protocolo como se describe en el Ejemplo 1. La rejilla del espectrógrafo se ajusta de modo que la emisión de los 8 colorantes caiga a través de los 32 píxeles de los elementos del detector. La cantidad de muestra cargada para el análisis debe ajustarse de modo que las señales detectadas caigan dentro del intervalo dinámico del sistema de detección.

#### **Ejemplo 7. Sistema de espectrómetro/PMT multielementos**

El siguiente ejemplo ilustra la separación/detección de fragmentos de ADN marcados con el sistema de espectrómetro/PMT multielementos de la figura 16, específicamente para identificar la secuencia de una plantilla de ADN. En esta reacción, se amplificaron 0,1 pmoles de cebador de secuenciación de la plantilla de ADN M13 y M13 con el kit de secuenciación GE Amersham BigDye™, según las condiciones de reacción recomendadas. La mezcla de reacción se limpió mediante precipitación con etanol y se resuspendió en 13 µl de agua DI. La muestra se separó siguiendo la condición de separación electroforética como se describe en el ejemplo 5. Las condiciones de carga de la muestra se modificaron y se llevaron a cabo aplicando 175 V a través del pocillo de muestra al pocillo de residuos durante 105 segundos. La figura 21 muestra un electroforegrama para la secuencia de ADN, con cromatogramas de colores que representan el elemento detector correspondiente al máximo espectral para cada uno de los 4

colorantes utilizados. En la secuencia obtenida se identificaron las bases con una puntuación de calidad de Phred > 20 para 519 bases y QV30 de 435 bases (figura 22).

### Ejemplo 8. Separación y detección simultánea de productos de dos reacciones de secuenciación

En este ejemplo, la separación y detección de fragmentos de la secuenciación cíclica de dos plantillas de ADN se llevan a cabo de manera simultánea en un único canal de separación. Las reacciones de secuenciación cíclica pueden prepararse mediante reacciones de terminadores marcadas con colorante o reacciones cebadoras marcadas con colorante de la siguiente manera:

#### *Para reacciones de terminadores marcadas con colorante:*

Se prepara una reacción de secuenciación cíclica para cada fragmento de plantilla que consiste en un cebador de secuenciación apropiado para la secuencia de plantilla de interés, y reactivos para llevar a cabo la secuenciación de ADN, incluido el tampón de secuenciación cíclica, polimerasa, oligonucleótidos, didesoxinucleótidos y didesoxinucleótidos marcados. Se utilizan ocho colorantes diferentes para el marcado. En la primera reacción de secuenciación cíclica, se utiliza un conjunto de nucleótidos didesoxi marcados con 4 colorantes. En la segunda reacción de secuenciación cíclica, se utiliza otro conjunto de nucleótidos didesoxi marcados con 4 colorantes (con longitudes de onda de emisión diferentes a las de los cuatro utilizados en la primera reacción de secuenciación cíclica). Cada reacción de secuenciación cíclica se lleva a cabo por separado siguiendo un protocolo que cicla térmicamente cada reacción varias veces. Cada ciclo térmico incluye una etapa de desnaturalización, de recocido y de extensión con temperaturas y tiempos siguiendo los protocolos de Sanger (véase, Sanger et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74, 5463-7). El producto de secuenciación cíclica de las dos reacciones se combina para formar una muestra que consiste en fragmentos de ADN marcados, con un total de ocho colorantes únicos, de cada una de las dos plantillas de ADN.

#### *Para reacciones de cebador marcadas con colorante:*

Como alternativa, la muestra para la separación y detección puede fabricarse mediante el uso de secuenciación cíclica marcada con cebador. Se llevan a cabo cuatro reacciones de secuenciación cíclica para cada plantilla de ADN. Cada reacción es una reacción de secuenciación cíclica que consiste en un cebador de secuenciación marcado y reactivos para llevar a cabo la secuenciación de ADN, incluido el tampón de secuenciación cíclica, polimerasa, oligonucleótidos. Asimismo, cada reacción incluirá uno de los didesoxinucleótidos (ddATP, ddTTP, ddCTP o ddGTP) y un cebador marcado. Cada colorante asociado con el cebador es único en la longitud de onda de emisión y está correlacionado con el tipo de didesoxi nucleótido en la solución de secuenciación cíclica (ddATP, ddTTP, ddCTP o ddGTP). Cada reacción de secuenciación cíclica se lleva a cabo por separado siguiendo un protocolo que cicla térmicamente cada reacción varias veces. Cada ciclo térmico incluye una desnaturalización, etapa de recocido y extensión con temperaturas y tiempos siguiendo los protocolos de Sanger (véase, Sanger, 1977, *Id.*). Para la secuenciación cíclica de la segunda plantilla de ADN, se aplica otro conjunto de 4 colorantes (con una longitud de onda de emisión diferente a la de los cuatro utilizados en la primera reacción de secuenciación cíclica). El producto de las ocho reacciones (cada una con un colorante diferente) se mezclan para formar una muestra que consta de fragmentos de ADN de cada una de las dos plantillas de ADN.

#### *Muestra para separación y detección:*

Cada una de las reacciones de secuenciación se depura mediante precipitación con etanol. La separación y detección de la muestra sigue el protocolo del Ejemplo 8. El resultado de la separación y detección es la generación de dos secuencias de ADN distintas, correspondientes a cada uno de los dos fragmentos de ADN de la plantilla.

Los métodos de este ejemplo pueden modificarse para permitir el uso de colorantes en múltiplos de cuatro para permitir la detección de ese múltiplo de secuencias de ADN en un solo canal de separación (por ejemplo, 12 colorantes para la detección de 3 secuencias de manera simultánea, 16 colorantes para la detección de 4 secuencias de manera simultánea, 20 colorantes para la detección de cinco secuencias de manera simultánea, y así sucesivamente). Finalmente, la separación de los fragmentos marcados no necesita limitarse a la electroforesis.

### Ejemplo 9

#### *Separación y detección de 500 o más loci en un solo canal*

Hay varias aplicaciones de análisis de ácidos nucleicos que se pueden aplicar al diagnóstico clínico, incluyendo secuenciación de ADN y ARN y determinación de tamaño de fragmento. En este ejemplo, el uso de la detección simultánea de 10 colores permite la interrogación de hasta 500 loci. El análisis del tamaño de una gran cantidad de fragmentos se puede utilizar para identificar patógenos o caracterizar muchos loci dentro del genoma de un individuo, por ejemplo. En el contexto del diagnóstico genético prenatal y preimplantacional, la aneuploidía se diagnostica actualmente mediante cariotipo y mediante hibridación fluorescente. *in situ* (FISH por sus siglas en inglés). En estudios de FISH, la presencia de dos señales por célula indica que dos copias de un locus dado están

5 presentes dentro de esa célula, una señal indica monosomía o monosomía parcial, y tres señales indican trisomía o trisomía parcial. FISH típicamente utiliza aproximadamente 10 sondas para evaluar si una célula contiene o no un complemento cromosómico normal. Este enfoque no permite una vista detallada de todo el genoma, no obstante, y las células que parecen normales por FISH pueden tener anomalías importantes que no son detectadas por la técnica.

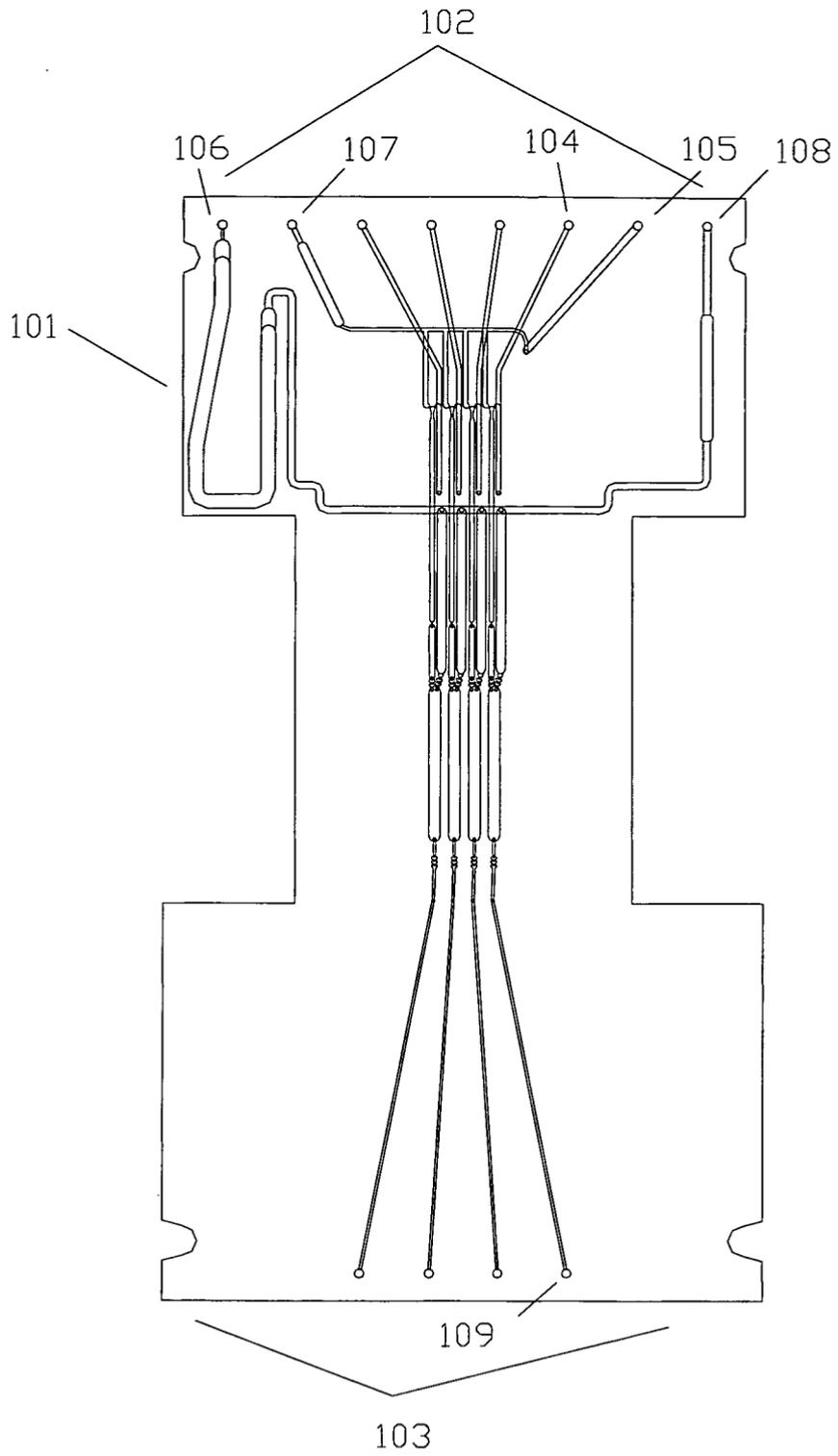
10 Las enseñanzas de la presente divulgación usan la separación y detección multicolor para permitir que se evalúen aproximadamente 500 loci cromosómicos ampliamente dispersos en todos los cromosomas para permitir un análisis mucho más detallado de la estructura cromosómica. En este ejemplo, se seleccionan secuencias de pares de cebadores para aproximadamente 500 loci de secuencias publicadas, con cada locus presente como una copia única por genoma haploide. Asimismo, se seleccionan 10 conjuntos de 50 pares de cebadores de modo que cada conjunto defina un conjunto correspondiente de fragmentos de ADN de modo que ninguno de los fragmentos sea del mismo tamaño. Para cada conjunto, los cebadores directos para los pares de cebadores están marcados con un colorante fluorescente, y no hay dos conjuntos que compartan el mismo colorante. Los colorantes seleccionados para su fijación a los cebadores son los colorantes Alexa Fluor 488, 430, 555, 568, 594, 633, 647, 680, 700 y Tamra. Hay muchos otros colorantes disponibles y también se pueden usar como marcadores. Los loci pueden amplificarse en una o varias reacciones de PCR paralelas como se describe en "MÉTODOS PARA LA AMPLIFICACIÓN MULTIPLEXADA RÁPIDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS DIANA", *supra*. Los cebadores amplificados se separan y detectan usando los métodos descritos en el presente documento. En un único canal de separación, los 500 fragmentos se pueden identificar con precisión por tamaño, 50 por cada uno de diez colorantes.

25 El número de loci, colorantes y canales de separación se pueden variar según la aplicación deseada. Si se desea, se pueden detectar cantidades más pequeñas de fragmentos utilizando un número menor de marcadores colorantes o generando menos fragmentos de ADN por marcador; de esta manera, se pueden detectar menos de 500, menos de 400, menos de 300, menos de 200, menos de 100, menos de 75, menos de 50, menos de 40, menos de 30, o menos de 20 fragmentos, según se desee. El número máximo de loci que se puede identificar por carril se basa en la longitud de lectura y la resolución del sistema de separación (por ejemplo, la resolución de un solo par de bases de fragmentos de ADN que van de 20 a 1500 pares de bases da como resultado cientos de fragmentos) multiplicados por el número de colorantes distintos que se pueden detectar (como se señaló *supra*, están disponibles docenas). Por consiguiente, se pueden identificar miles de loci en un solo canal de separación, y el número aumentará a medida que se desarrollen colorantes adicionales.

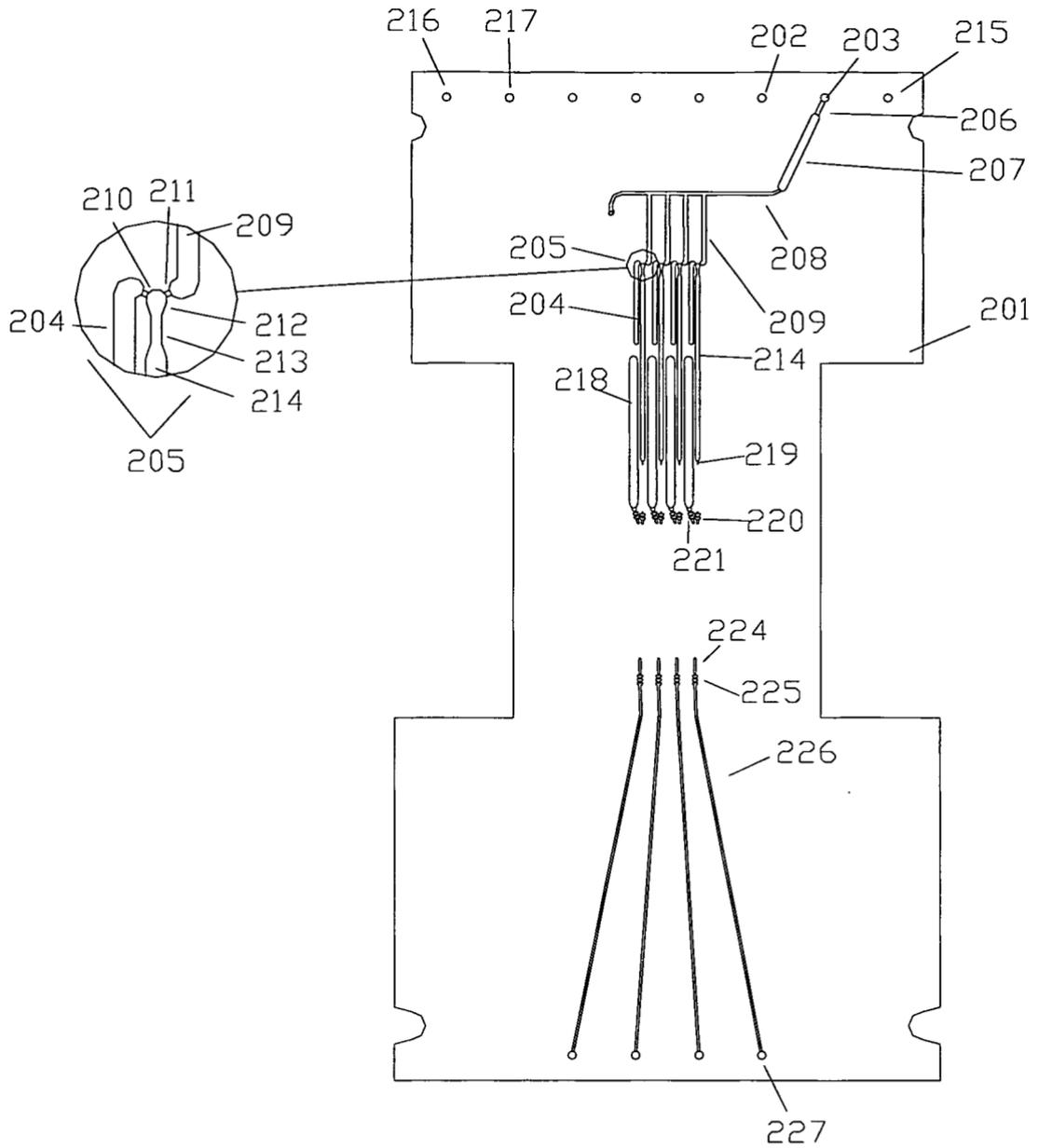
## REIVINDICACIONES

1. Un sistema microfluídico integrado para la separación y detección de moléculas biológicas que comprende, una cámara de reacción adaptada para la amplificación de ácido nucleico en comunicación fluidica con un componente para separar de manera simultánea una pluralidad de moléculas biológicas en una pluralidad de canales en un sustrato, en donde cada canal comprende una posición de detección; una fuente de luz posicionada para iluminar las posiciones de detección en el sustrato; un espejo para explorar la única fuente de luz secuencialmente entre la pluralidad de posiciones de detección; uno o una pluralidad de primeros elementos ópticos posicionados para recoger y dirigir la luz que emana de las posiciones de detección; y un detector de luz basado en tubo fotomultiplicador (PMT) posicionado para aceptar la luz dirigida desde el(los) primer(os) elemento(s) óptico(s), en donde el detector comprende un elemento dispersivo de longitud de onda para dispersar la luz de los primeros elementos ópticos de acuerdo con la longitud de onda de la luz y posicionado para proporcionar una porción de la luz dispersada a al menos ocho elementos de detección de PMT, en donde cada uno de los elementos de detección de PMT está en comunicación con un primer elemento de control para recopilar de manera simultánea información de detección de cada uno de los elementos de detección de PMT y, en donde dicho detector de luz está configurado para detectar fluorescencia de al menos 8 colorantes marcados con una o más moléculas biológicas, teniendo cada colorante una longitud de onda de emisión máxima única.
2. El sistema de la reivindicación 1, en donde las moléculas biológicas son ácidos nucleicos.
3. El sistema de la reivindicación 2 en donde el ácido nucleico es ADN.
4. El sistema de la reivindicación 3, en donde dicho detector de luz detecta fluorescencia de al menos 8 colorantes diferentes, siendo cada colorante miembro de al menos dos subconjuntos que contienen 4 colorantes, de modo que los subconjuntos sean capaces de distinguir al menos dos secuencias de ADN en una sola posición de detección en el sustrato, en donde el número de colorantes es un múltiplo de cuatro, y el número de secuencias de ADN por detectar es igual a ese múltiplo, de modo que cada uno de los diferentes colorantes esté presente en un solo subconjunto.
5. El sistema de la reivindicación 1, en donde las moléculas biológicas son proteínas.
6. El sistema de la reivindicación 1, en donde la única fuente de luz es un láser.
7. El sistema de la reivindicación 1, en donde cada elemento de detección de PMT es capaz de detectar luz ultravioleta, luz visible, luz infrarroja, o una combinación de las mismas.
8. El sistema de la reivindicación 1, en donde cada elemento de detección de PMT es un tubo fotomultiplicador de un solo ánodo y el elemento dispersivo de longitud de onda comprende una pluralidad de espejos dicróicos posicionados para proporcionar una porción de la luz desde los primeros elementos ópticos a cada uno de los elementos de detección, en donde cada espejo dicróico refleja una longitud de onda de luz predeterminada independientemente.
9. El sistema de la reivindicación 8, que comprende además un filtro paso banda en donde cada longitud de onda de luz predeterminada independientemente corresponde esencialmente a un máximo de emisión de fluorescencia de un colorante fluorescente presente en al menos una de las posiciones de detección.
10. El sistema de la reivindicación 8, en donde el elemento dispersivo de longitud de onda es un prisma, rejilla de difracción, rejilla de transmisión, espectrógrafo o rejilla de difracción holográfica.
11. El sistema de la reivindicación 1, en donde cada molécula biológica comprende independientemente un colorante fluorescente y cada espectro óptico único comprende un máximo de fluorescencia único.
12. El sistema de la reivindicación 1, en donde el componente es un dispositivo de electroforesis.
13. El sistema de la reivindicación 1, en donde el detector basado en PMT es un tubo fotomultiplicador lineal de múltiples ánodos que comprende los elementos de detección.
14. Un método para separar y detectar una pluralidad de moléculas biológicas que comprende, proporcionar una o una pluralidad de muestras de análisis en una pluralidad de canales microfluídicos en un sustrato, en donde cada canal microfluídico comprende una posición de detección, y cada muestra de análisis comprende independientemente una pluralidad de moléculas biológicas, cada una marcada independientemente con uno de al menos 8 colorantes, teniendo cada colorante una longitud de onda de emisión máxima única; separar de manera simultánea la pluralidad de moléculas biológicas marcadas en cada canal microfluídico; y detectar la pluralidad de analitos diana separados en cada canal microfluídico mediante,

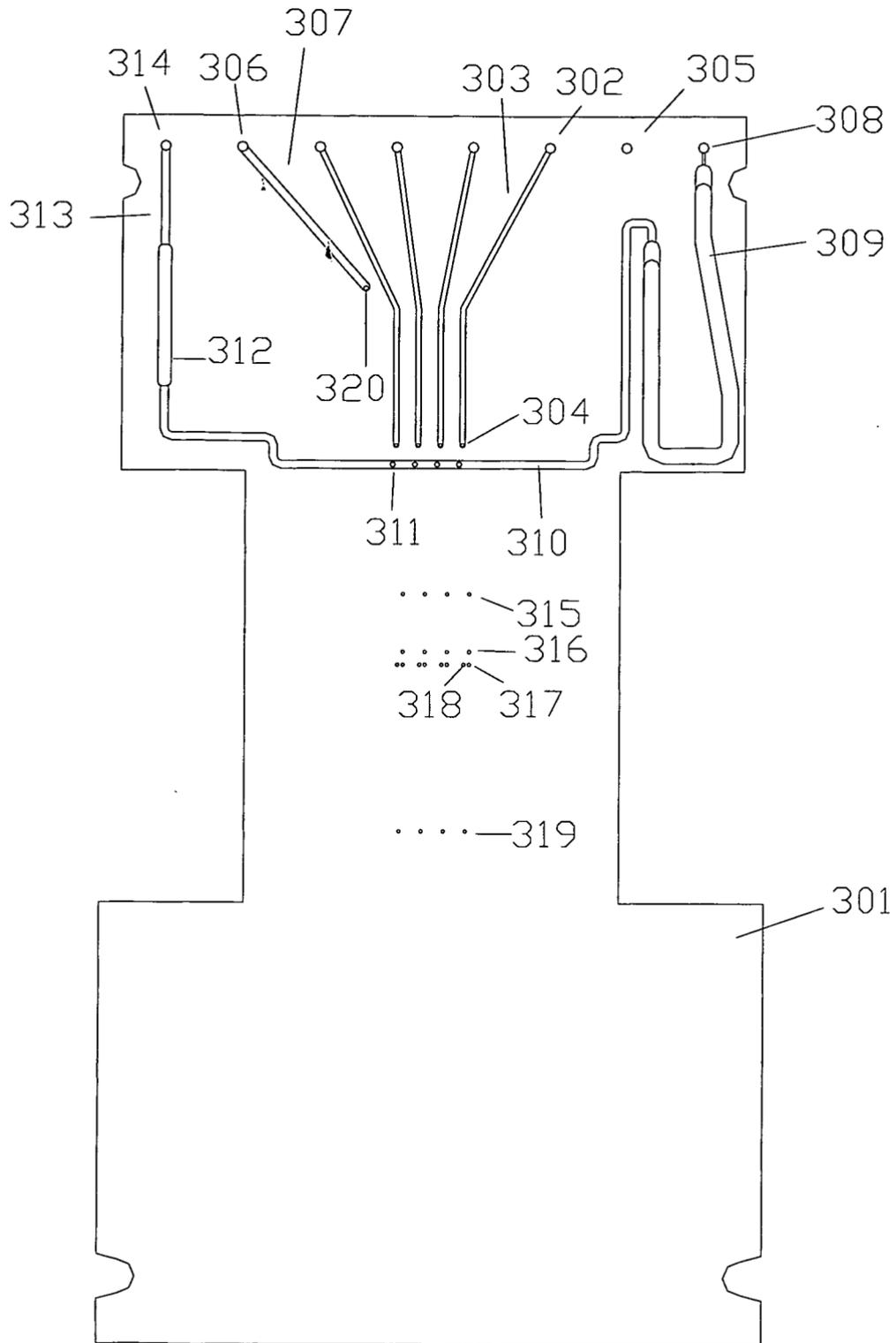
- (i) la iluminación de manera secuencial de cada posición de detección con una fuente de luz;
  - (ii) la recogida de la luz que emana de cada posición de detección;
  - (iii) el direccionamiento de la luz recogida a un detector de luz basado en PMT que comprende al menos 8 elementos de detección de PMT, en donde cada elemento de detección de PMT está adaptado para detectar uno de los colorantes fluorescentes; y
  - (iv) la separación de la luz recogida por la longitud de onda de la luz; y
  - (v) la detección de manera simultánea de la fluorescencia de los al menos 8 colorantes marcados para la una o más moléculas biológicas, teniendo cada colorante una longitud de onda de emisión máxima única.
- 5
- 10
- 15
- 20
15. El método de la reivindicación 14, en donde la separación se ve afectada al aplicar un potencial eléctrico a través de la pluralidad de canales microfluídicos.
16. El método de la reivindicación 14, en donde los colorantes tienen cada uno independientemente un máximo de fluorescencia a una longitud de onda que varía de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 1500 nm.
17. El método de la reivindicación 14, en donde los analitos diana comprenden fragmentos de ácido nucleico, preferiblemente los fragmentos de ácido nucleico son el producto de una o más reacciones de amplificación de ácido nucleico y los colorantes fluorescentes están unidos al cebador, o los fragmentos de ácido nucleico son el producto de una o más reacciones de secuenciación de Sanger y los colorantes fluorescentes están unidos a los terminadores de didesoxinucleótidos.



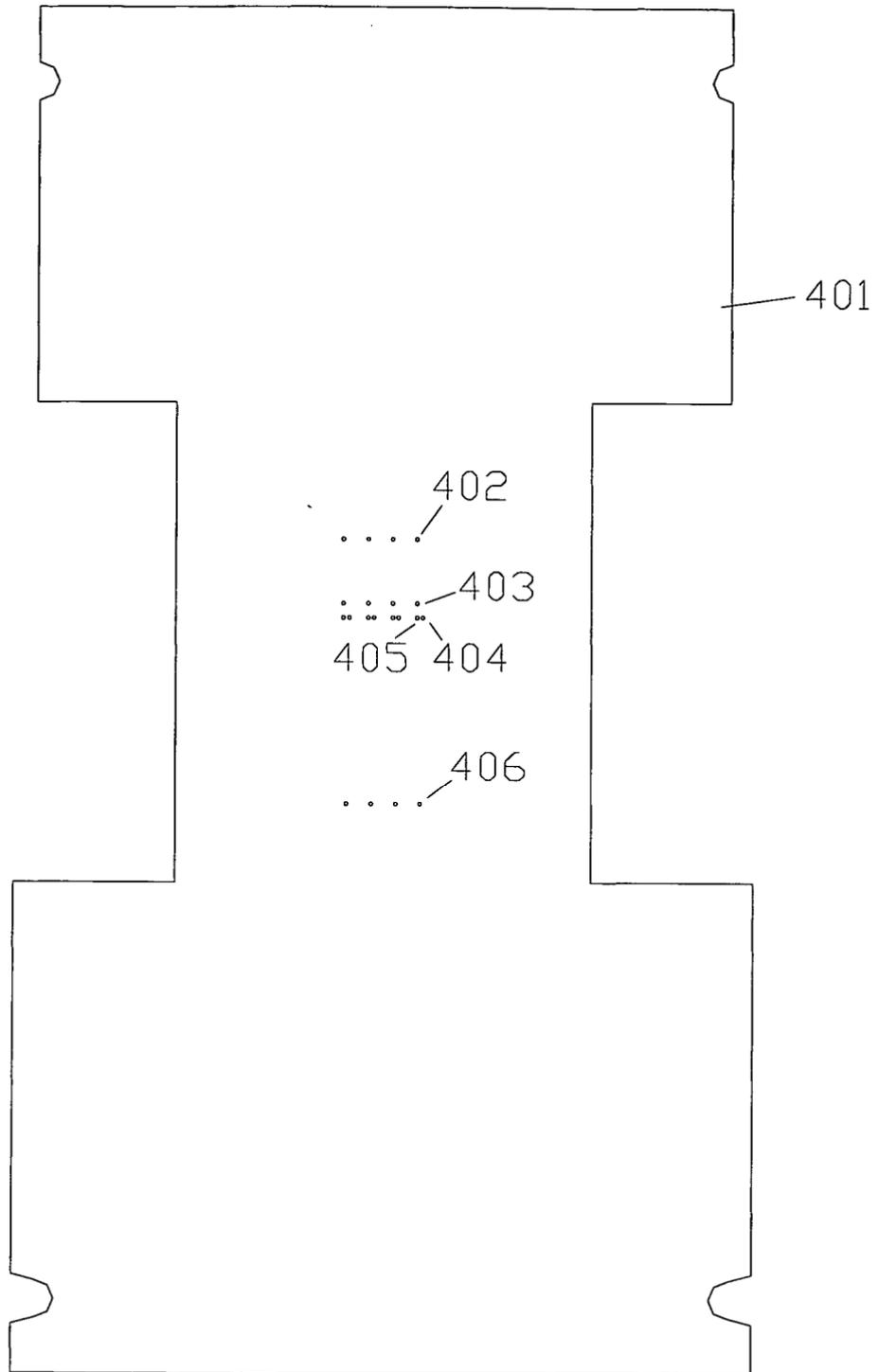
**FIGURA 1**



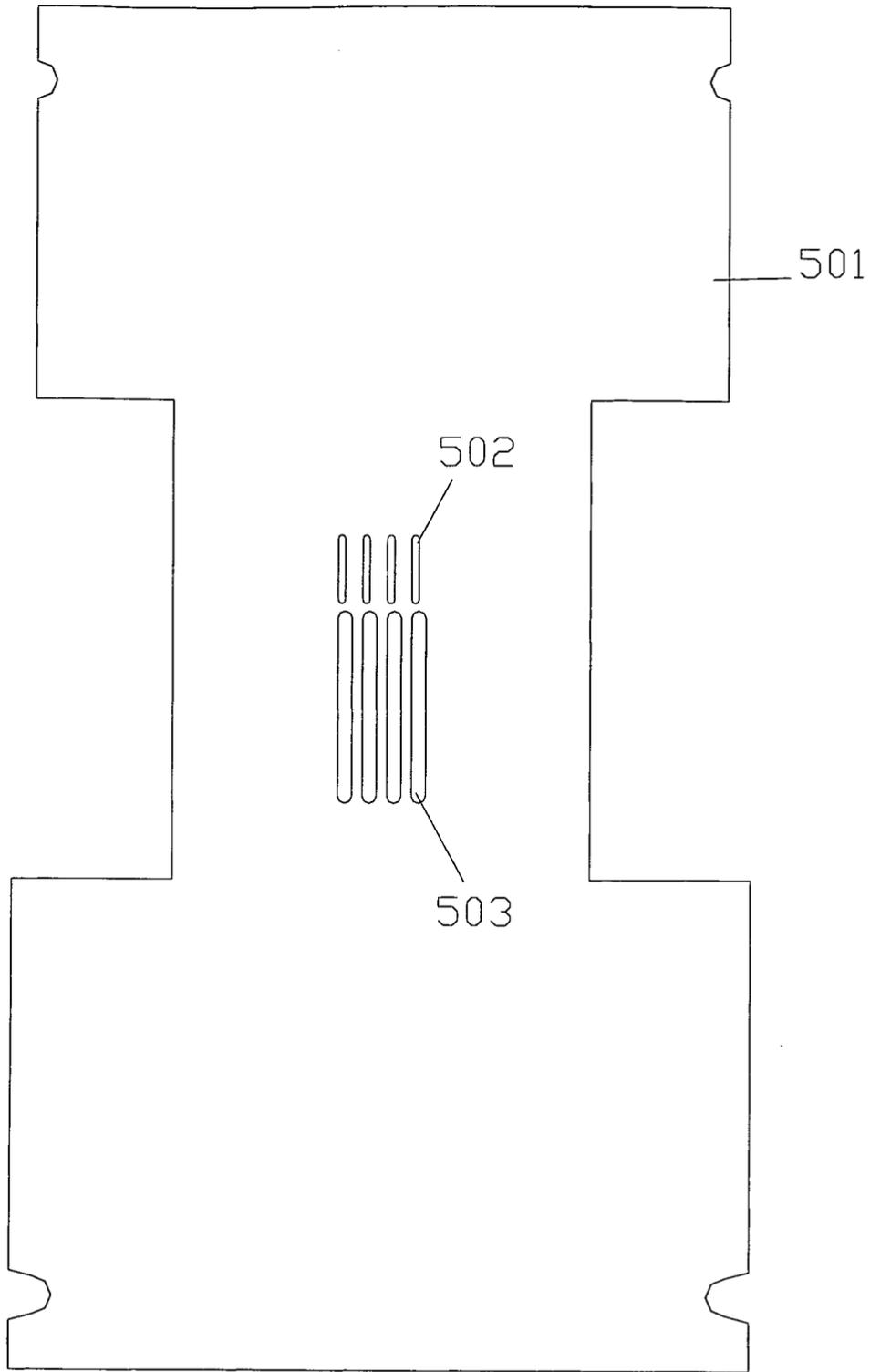
**FIGURA 2**



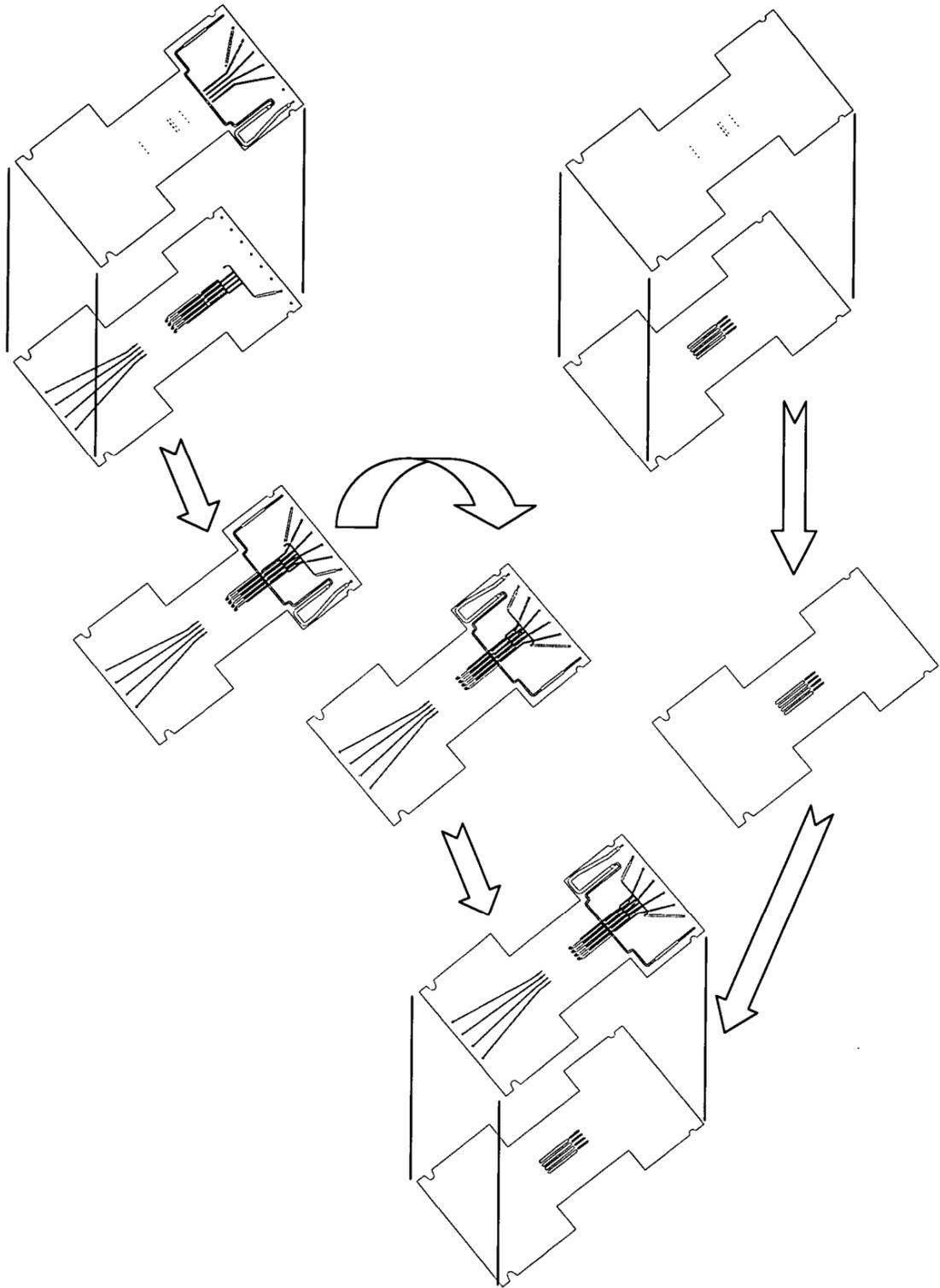
**FIGURA 3**



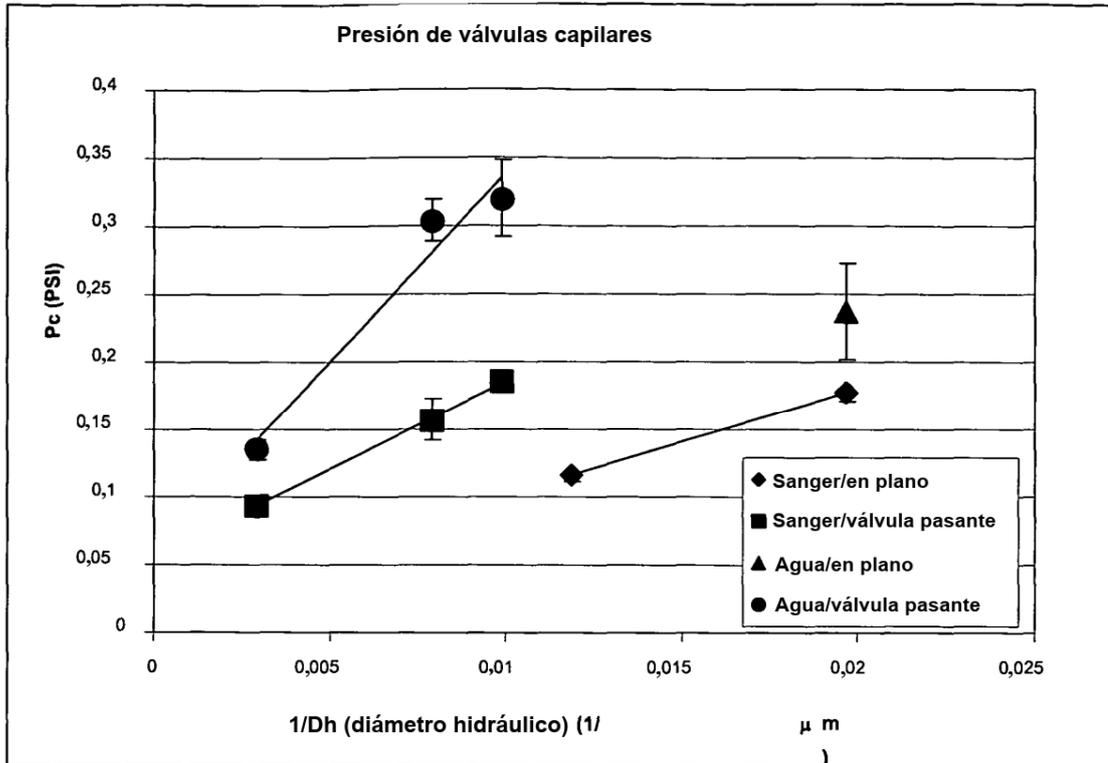
**FIGURA 4**



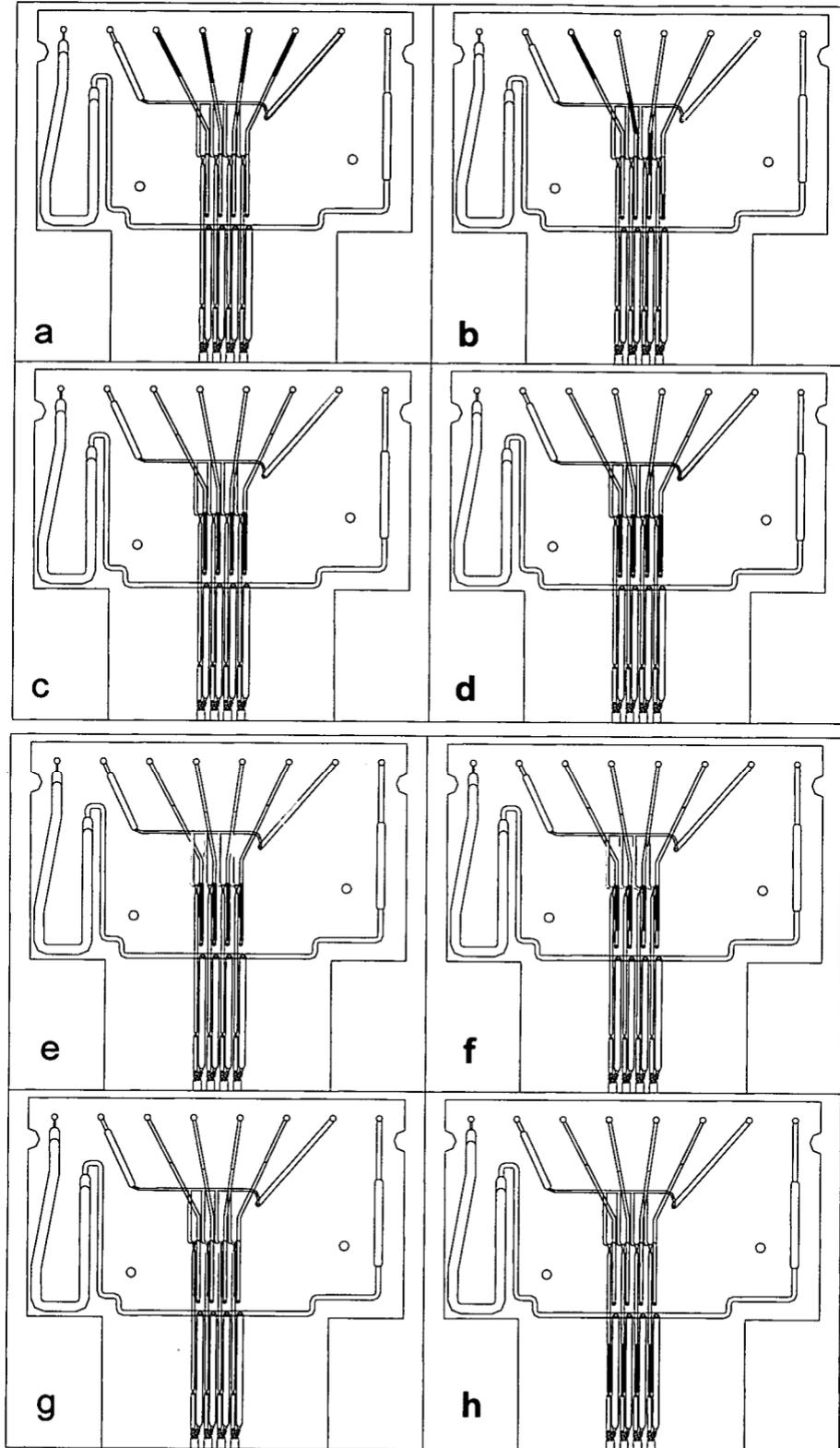
**FIGURA 5**



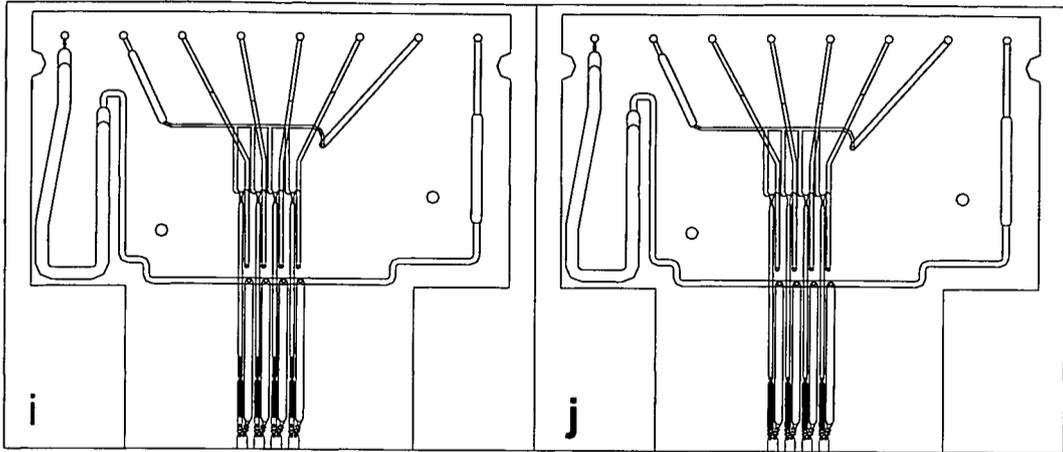
**FIGURA 6**



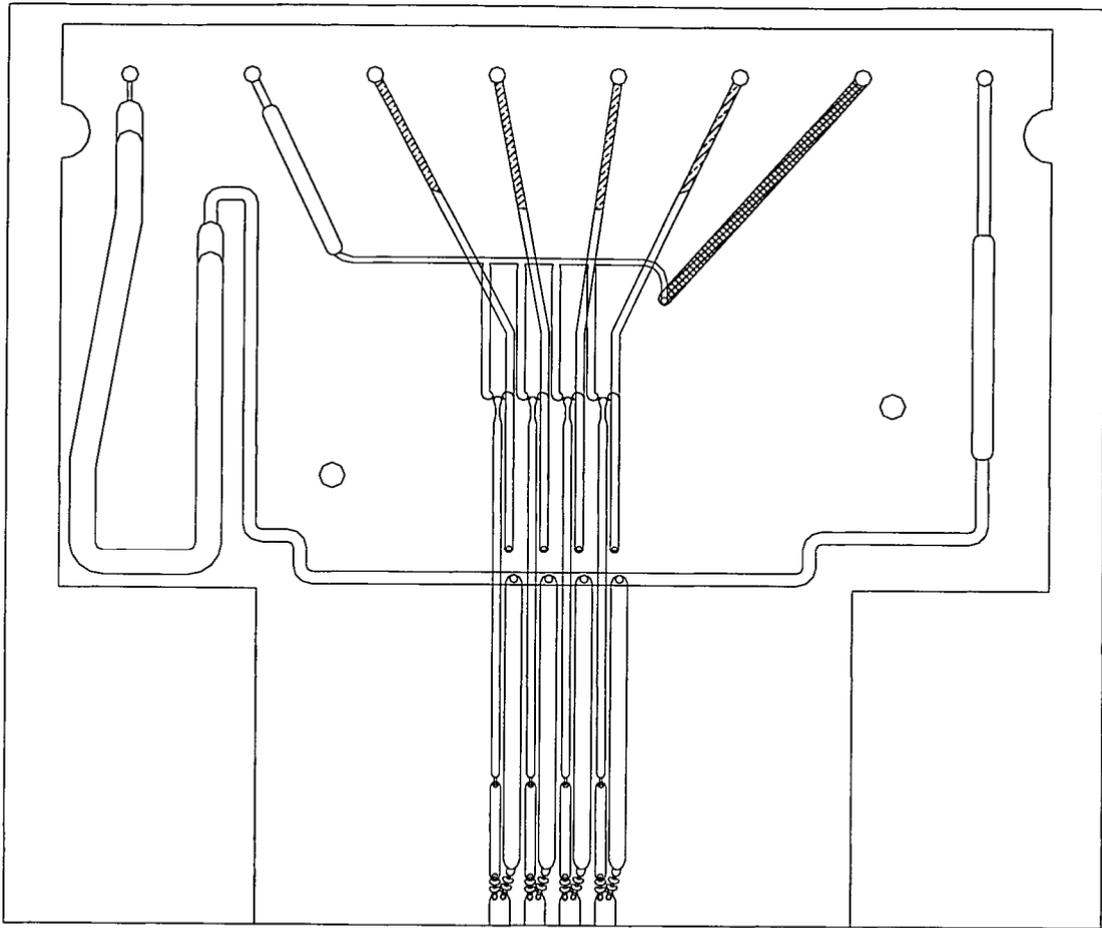
**FIGURA 7**



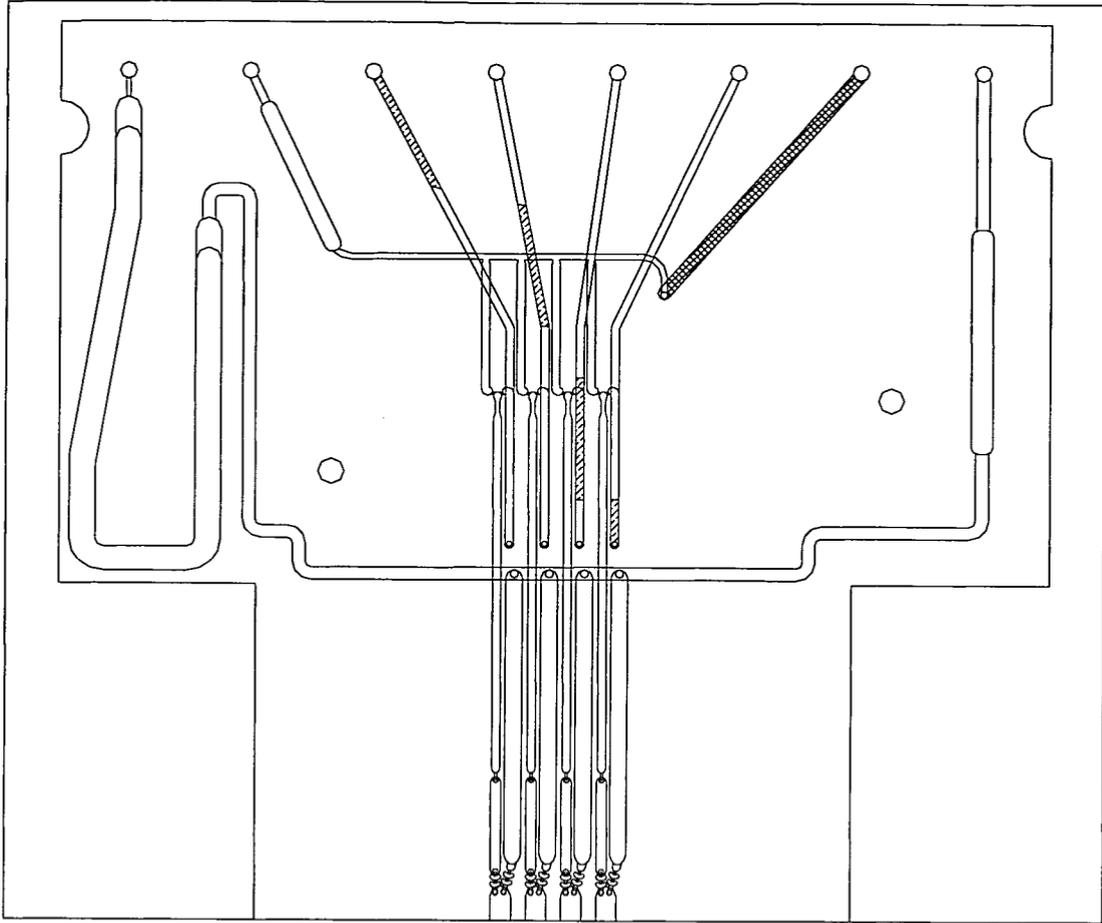
**FIGURA 8**



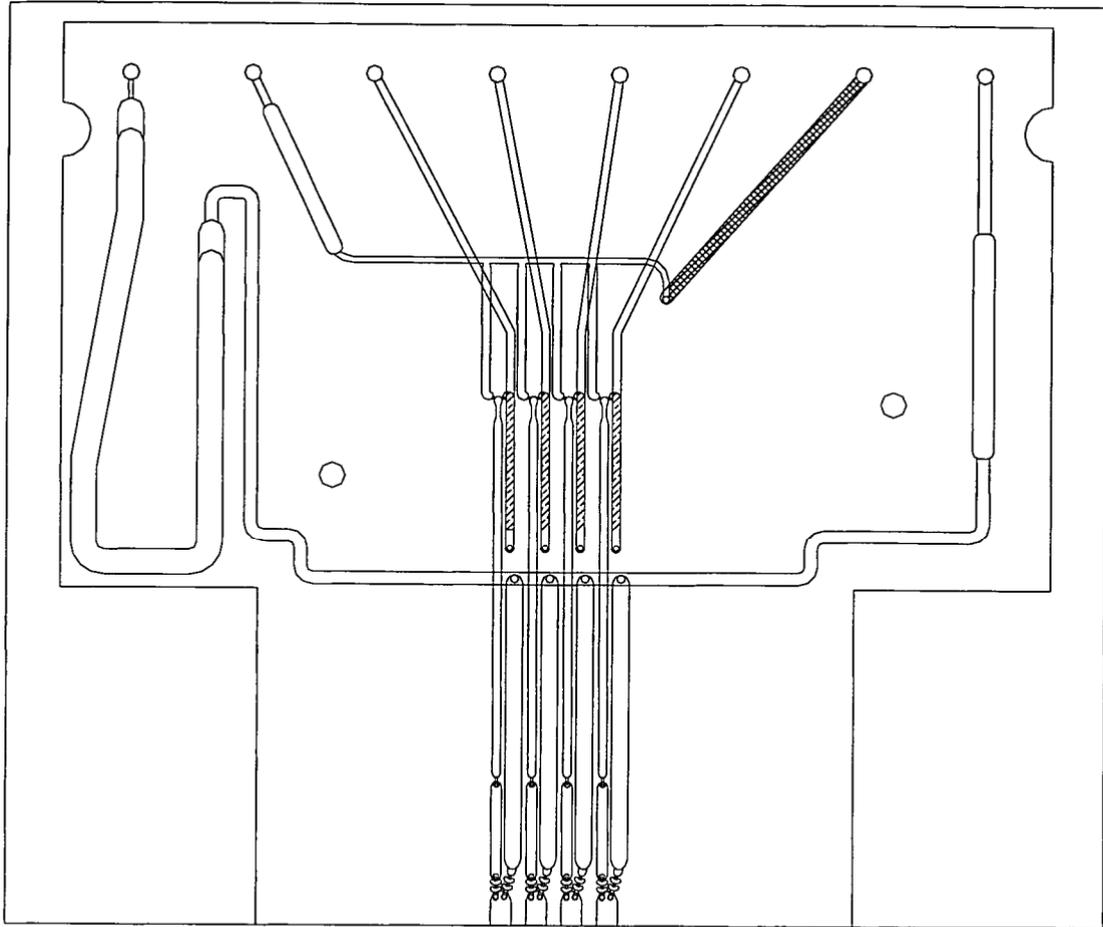
**FIGURA 8 (CONTINUACIÓN)**



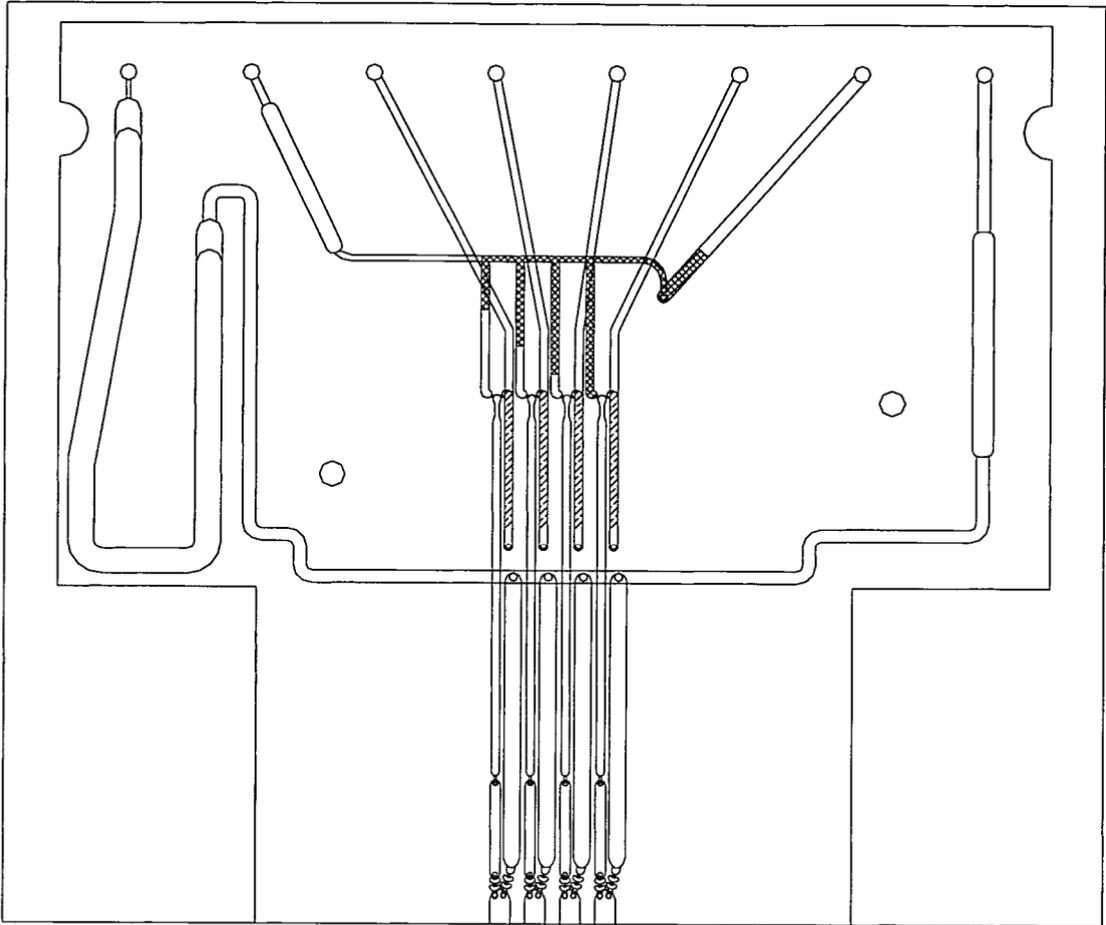
**FIGURA 8A**



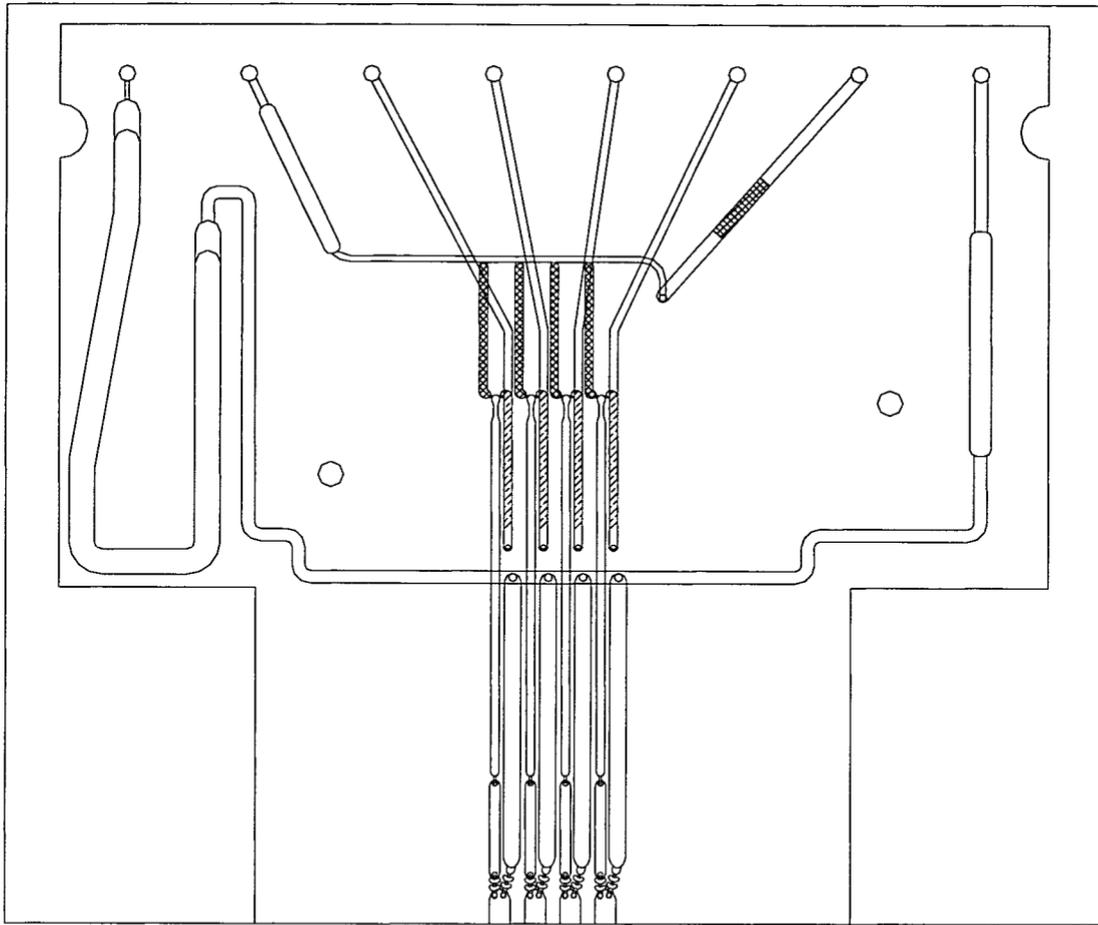
**FIGURA 8B**



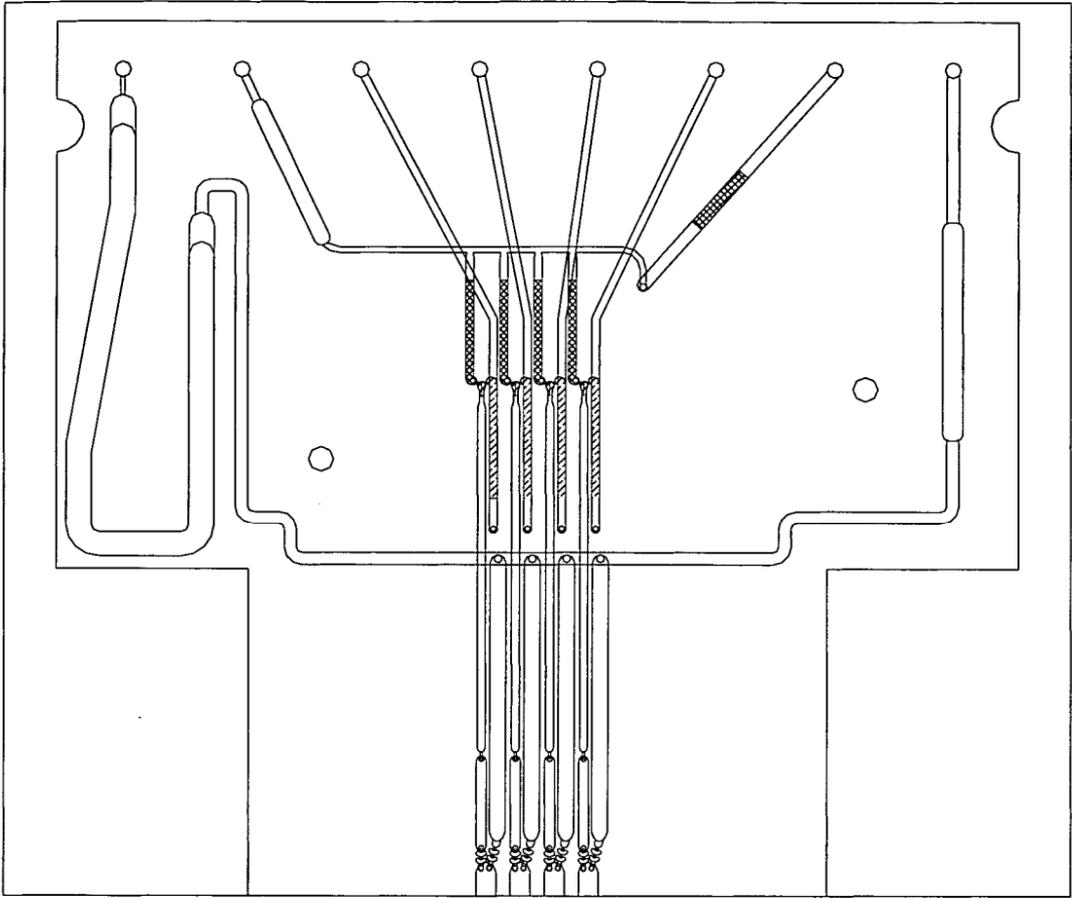
**FIGURA 8C**



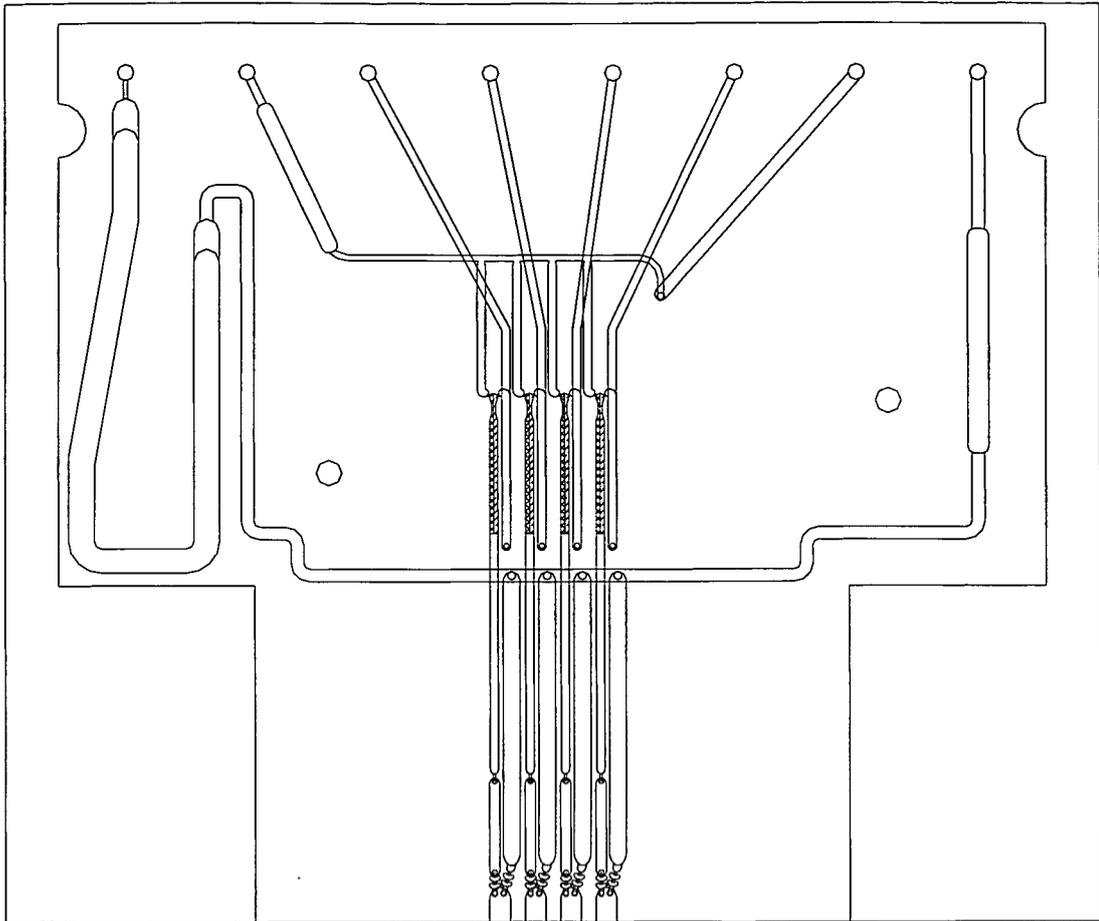
**FIGURA 8D**



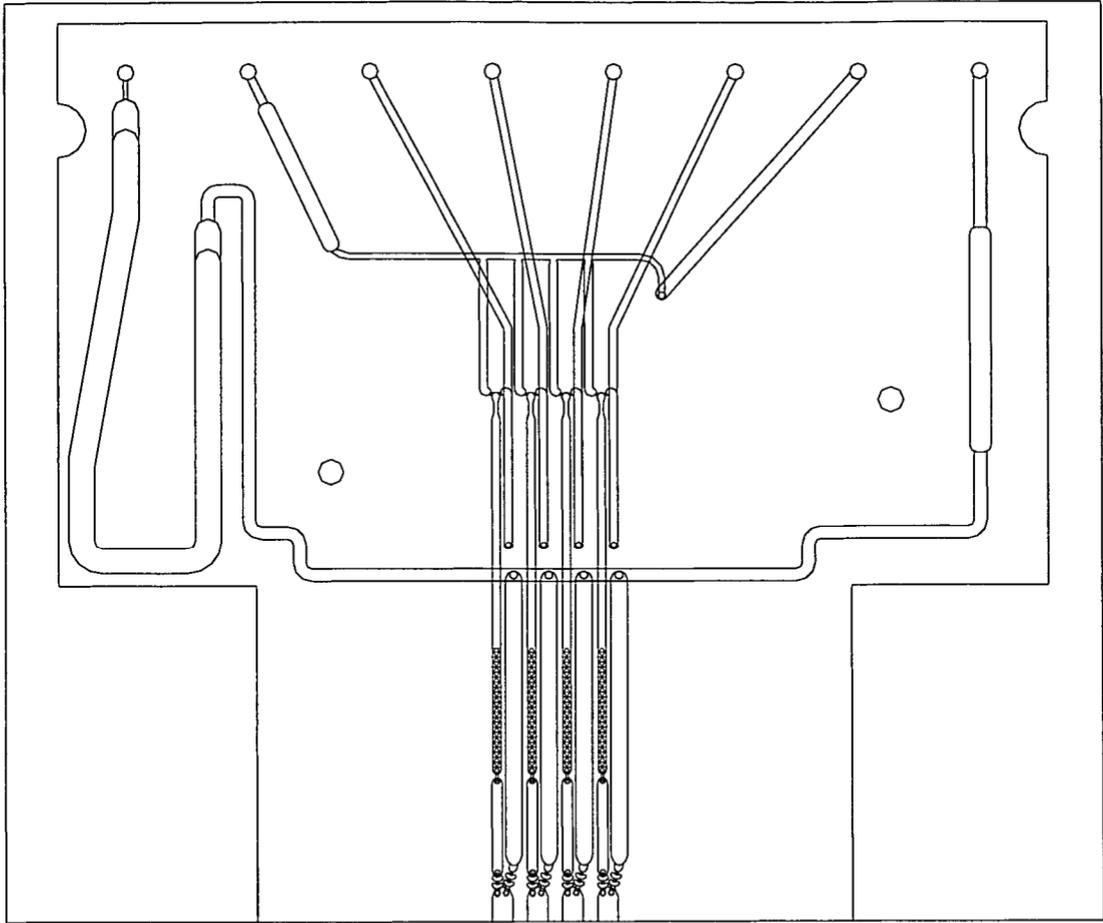
**FIGURA 8E**



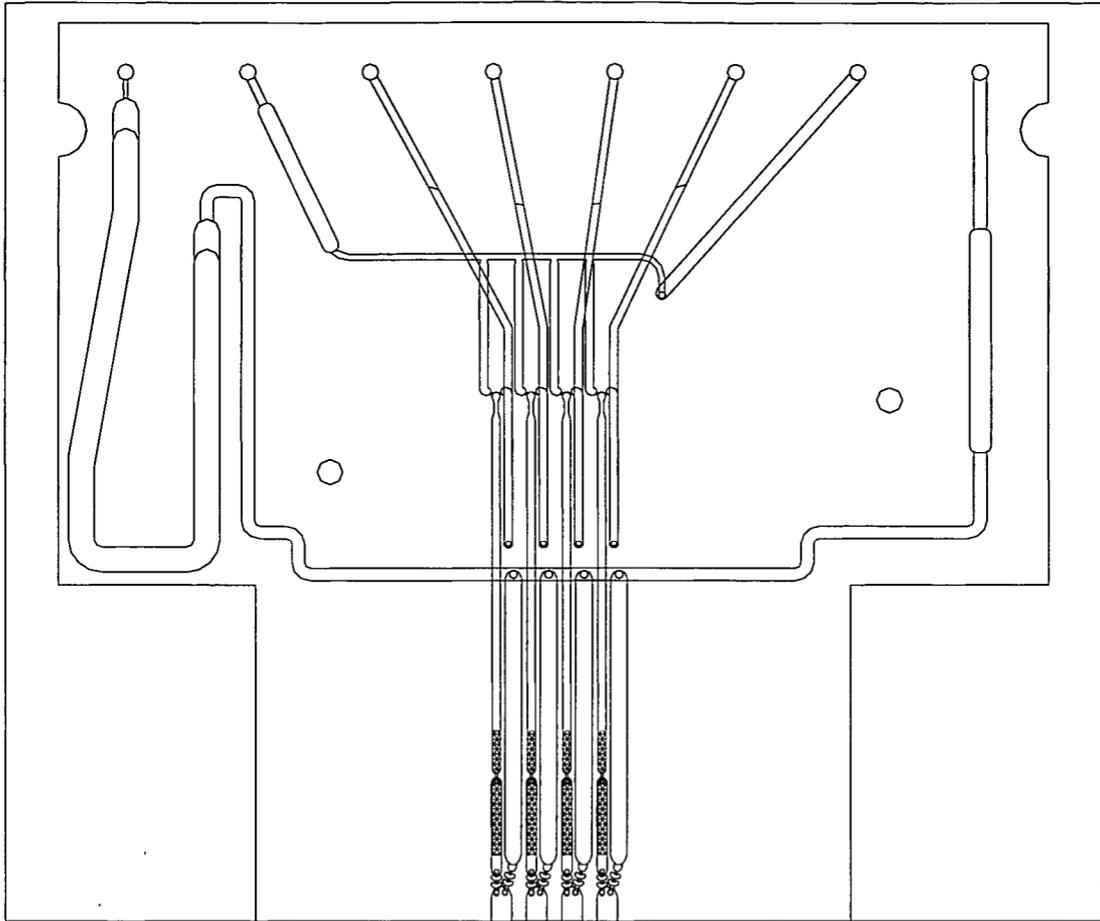
**FIGURA 8F**



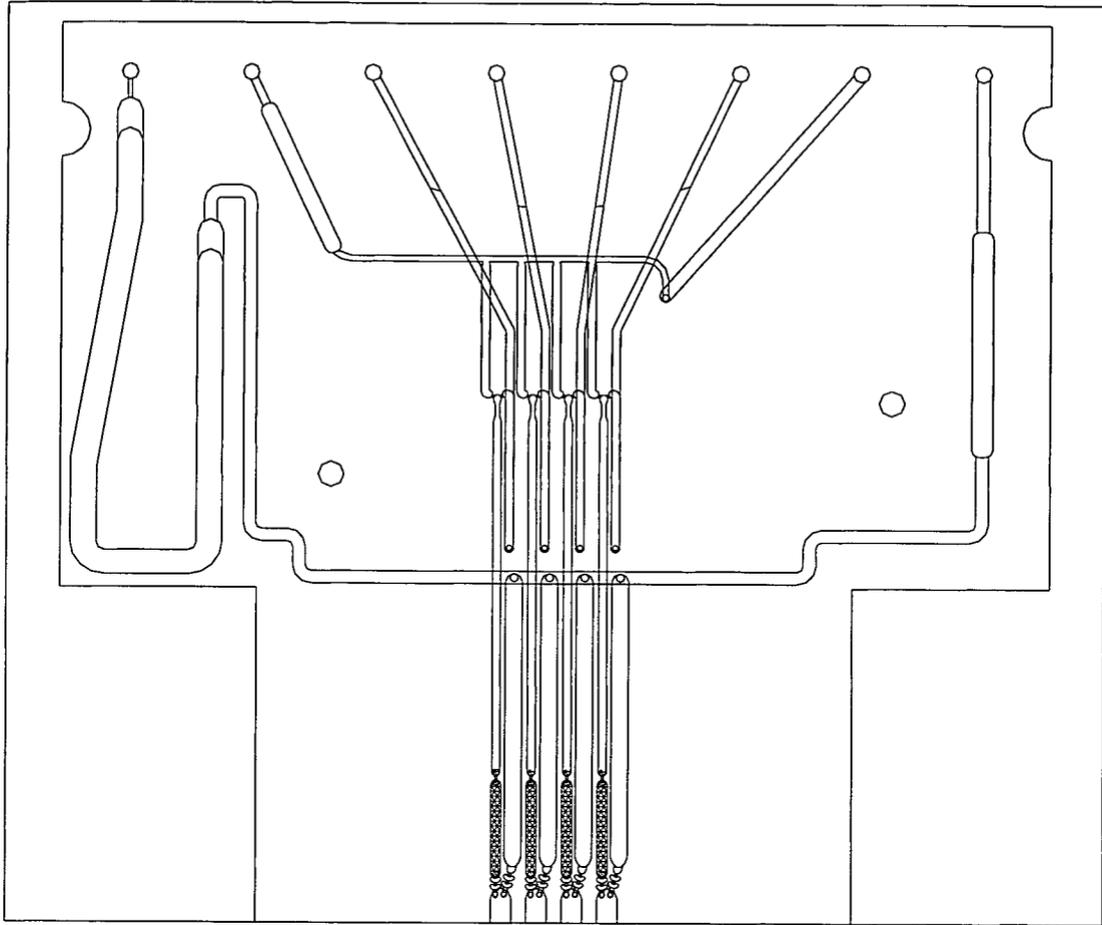
**FIGURA 8G**



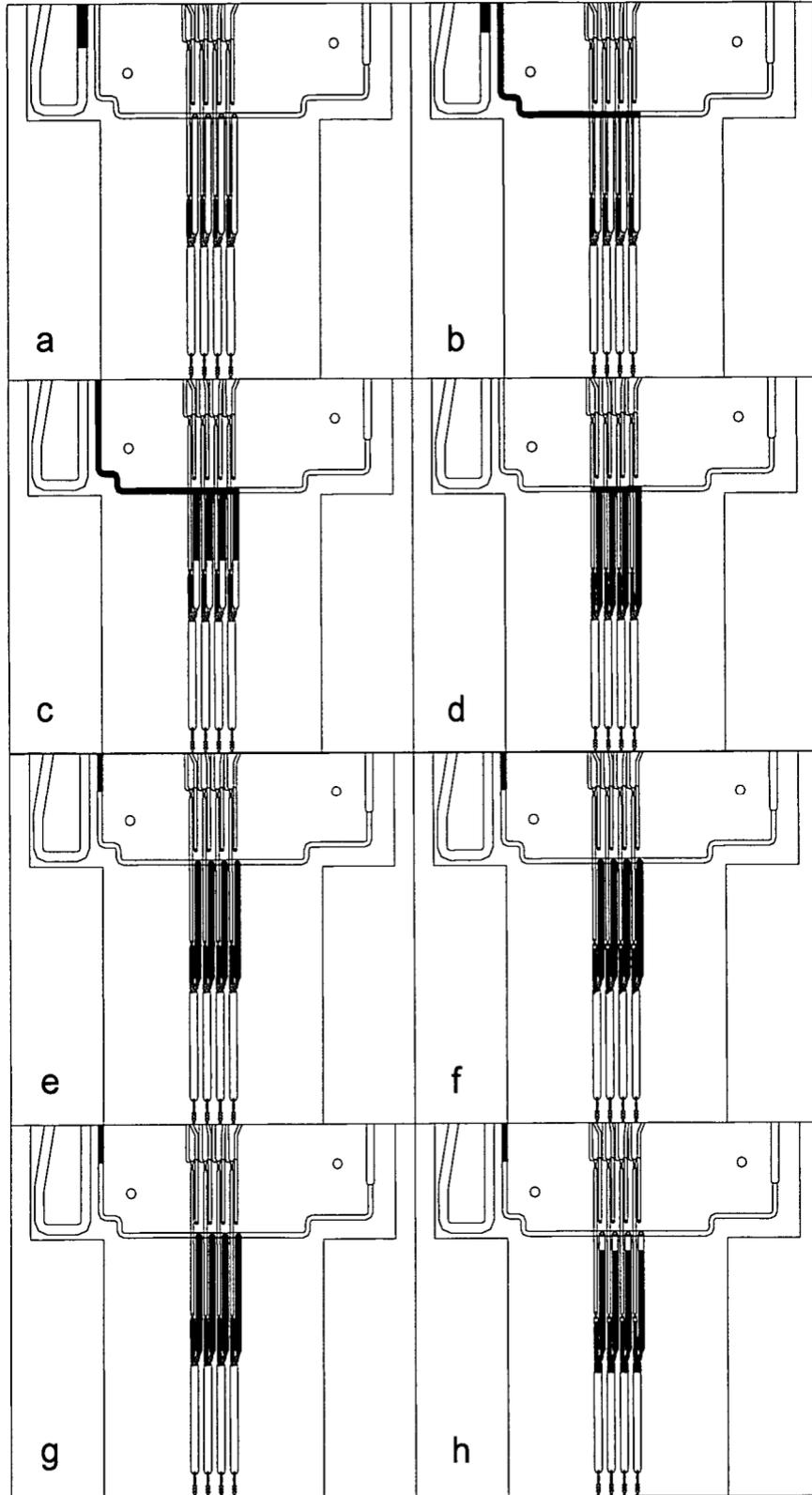
**FIGURA 8H**



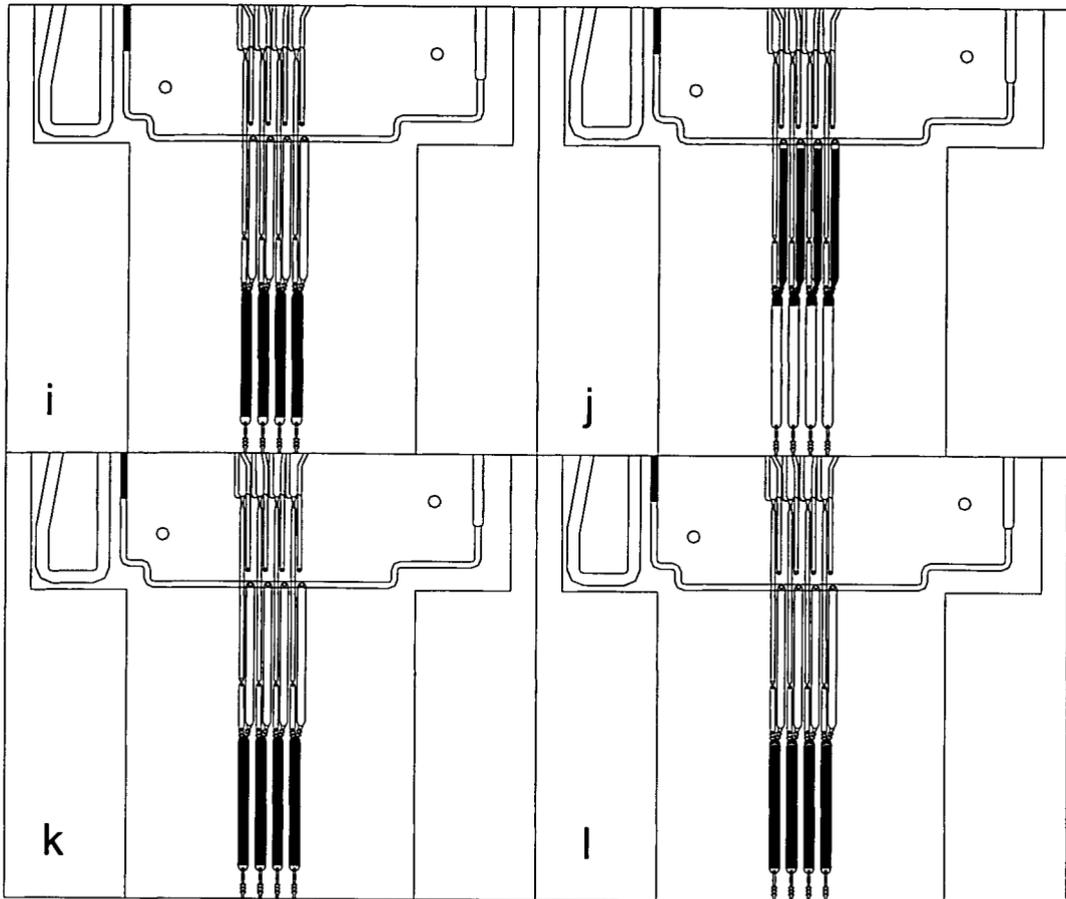
**FIGURA 81**



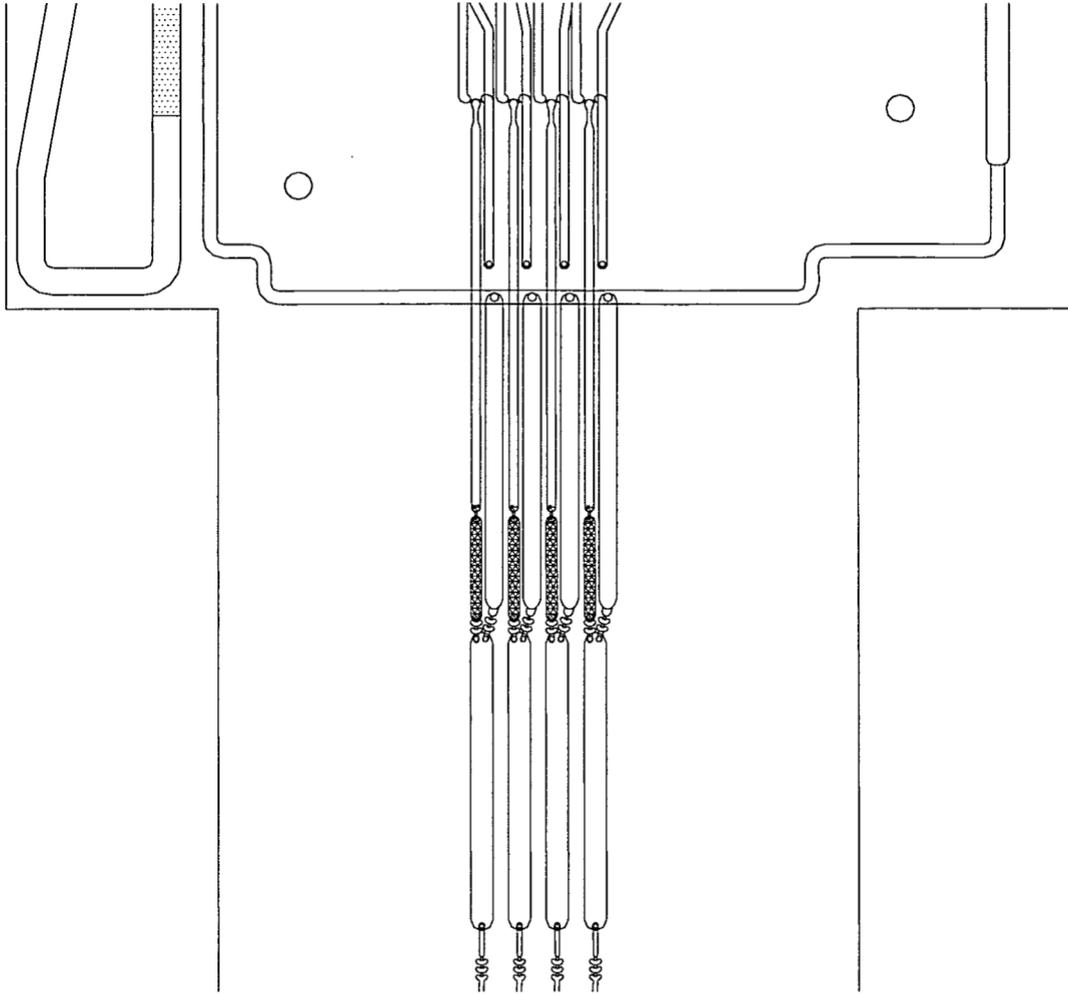
**FIGURA 8J**



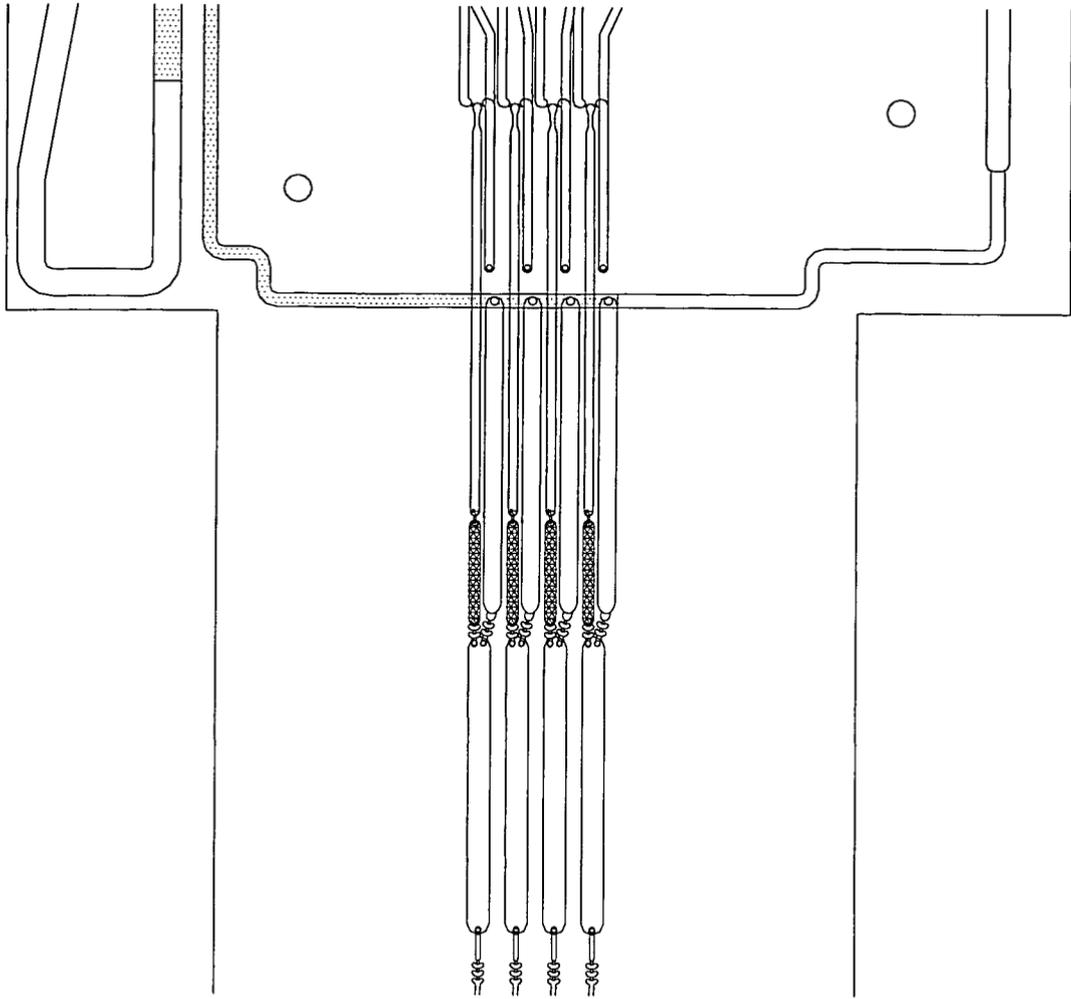
**FIGURA 9**



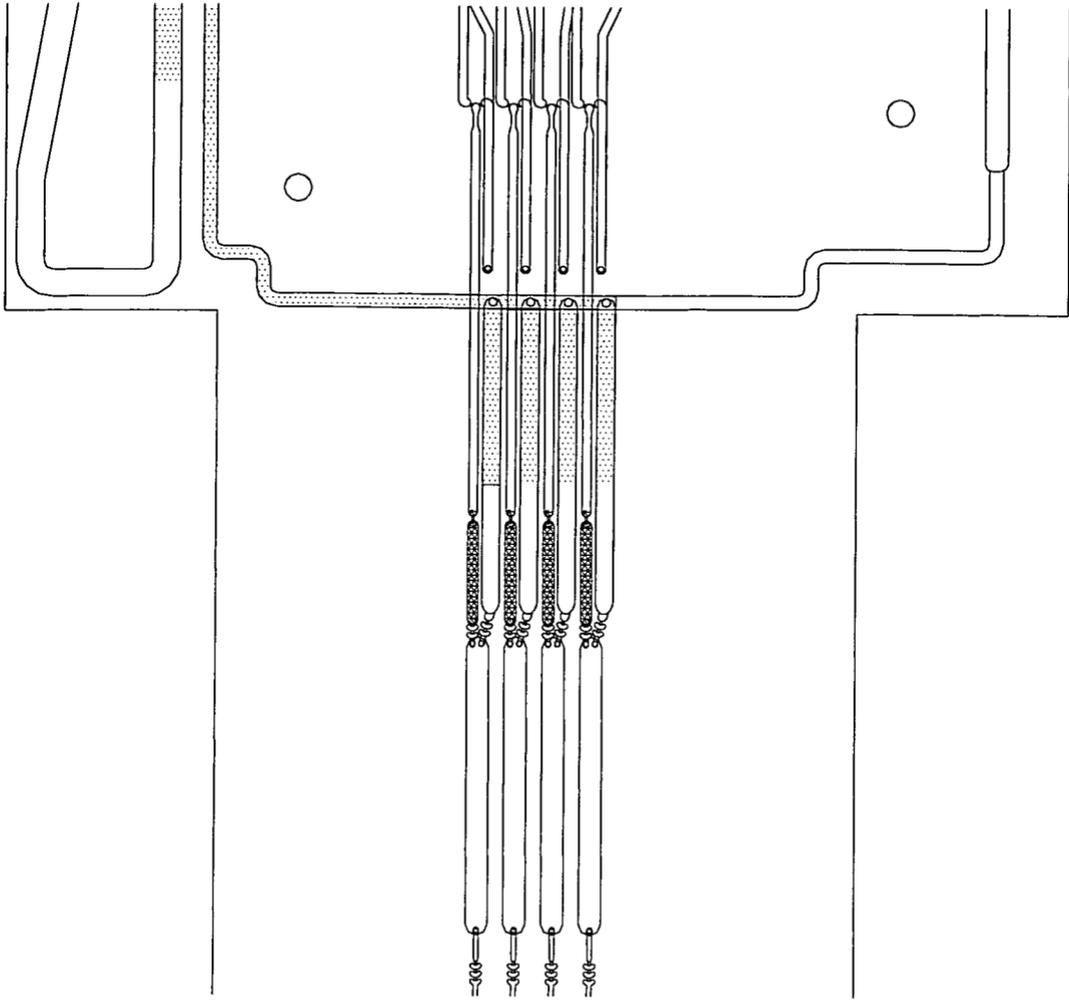
**FIGURA 9 (CONTINUACIÓN)**



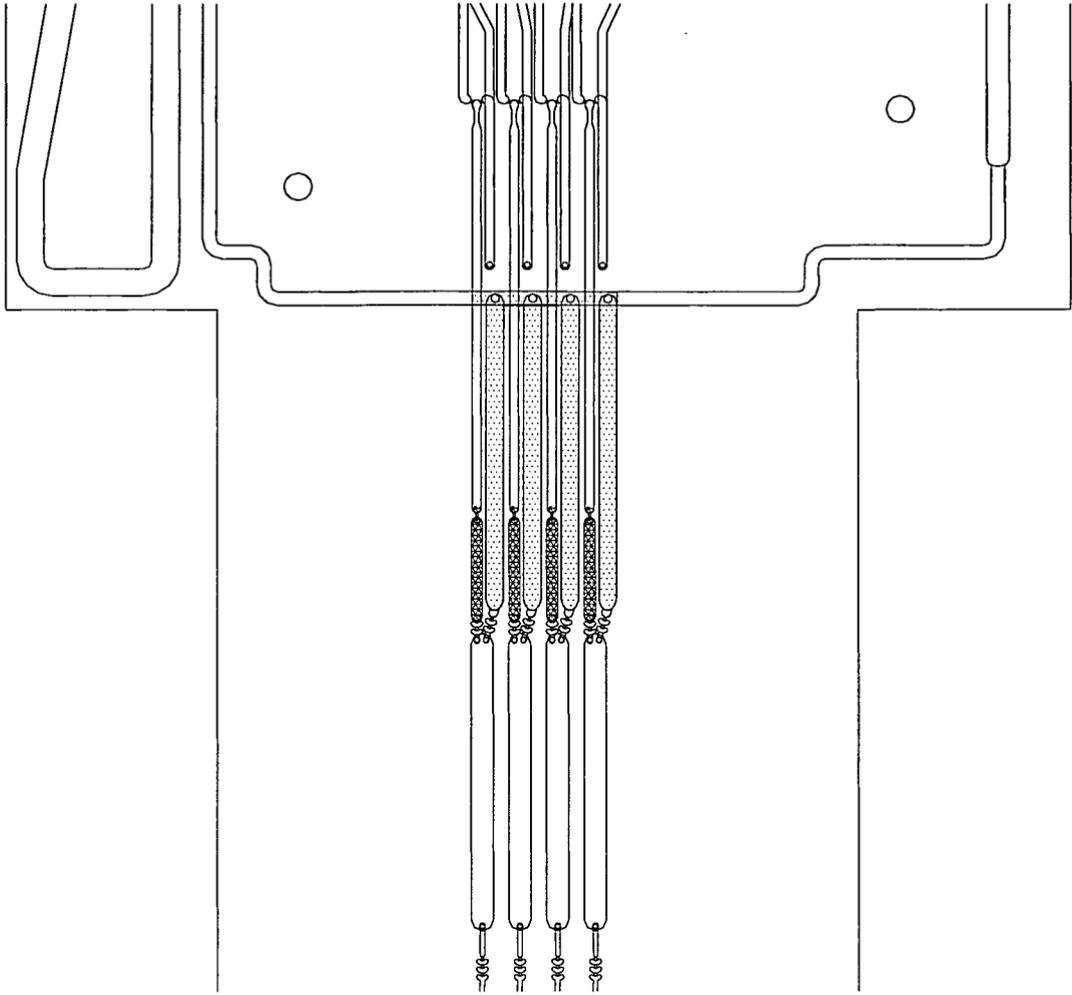
**FIGURA 9A**



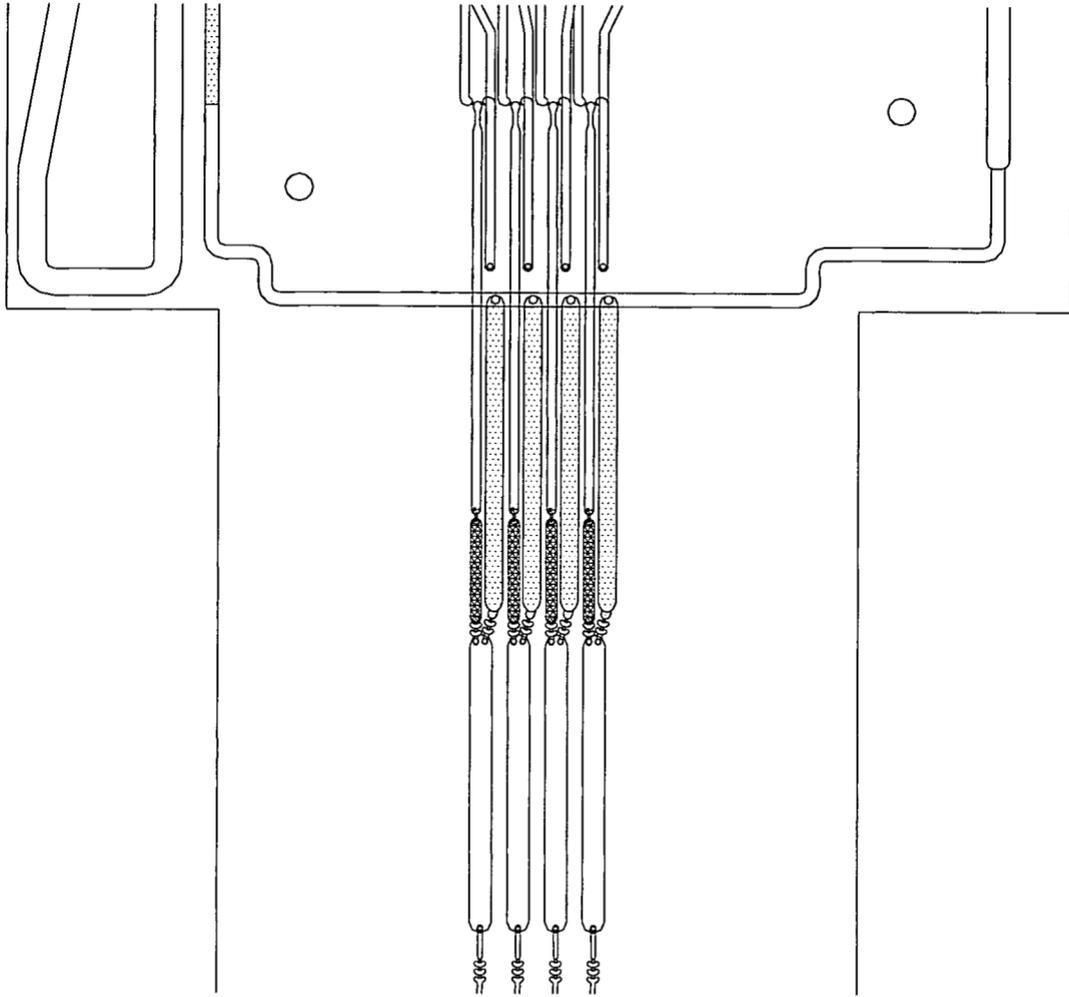
**FIGURA 9B**



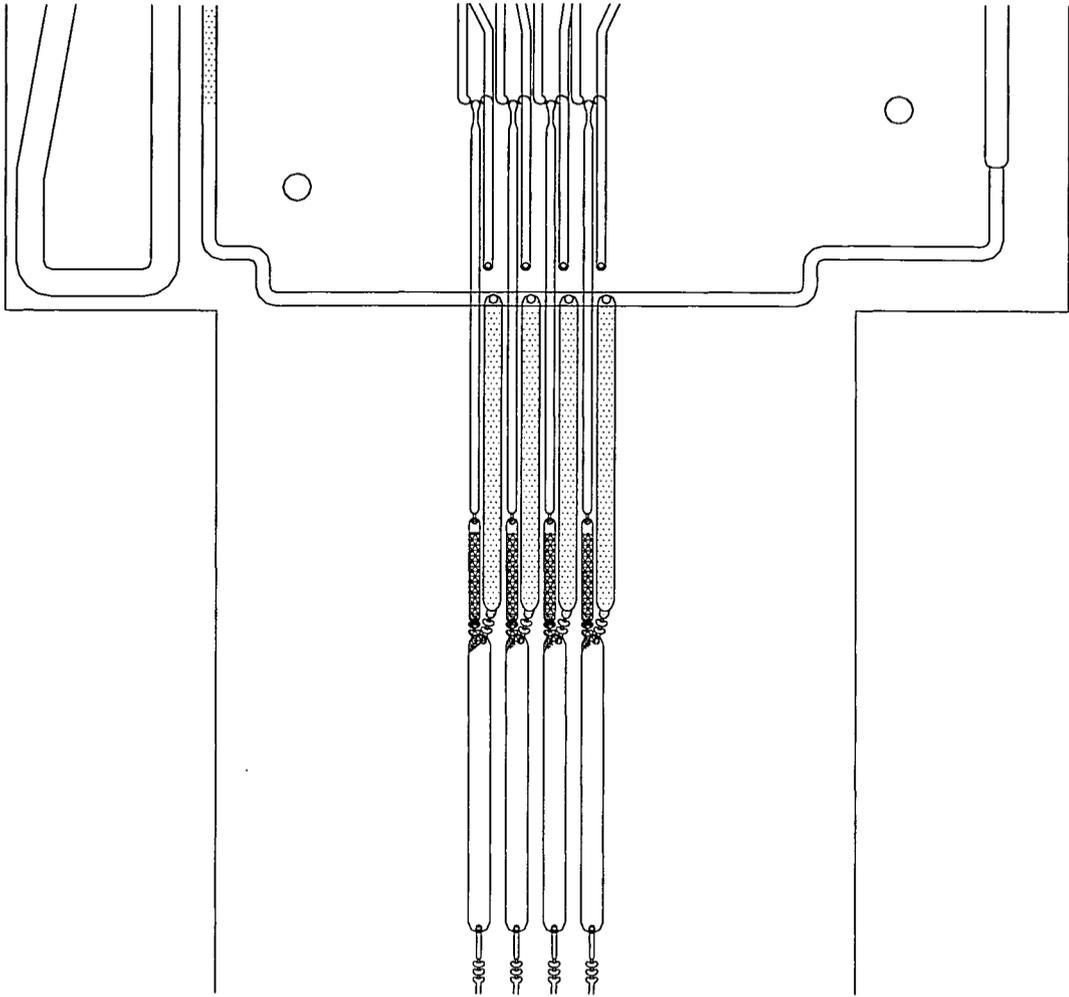
**FIGURA 9C**



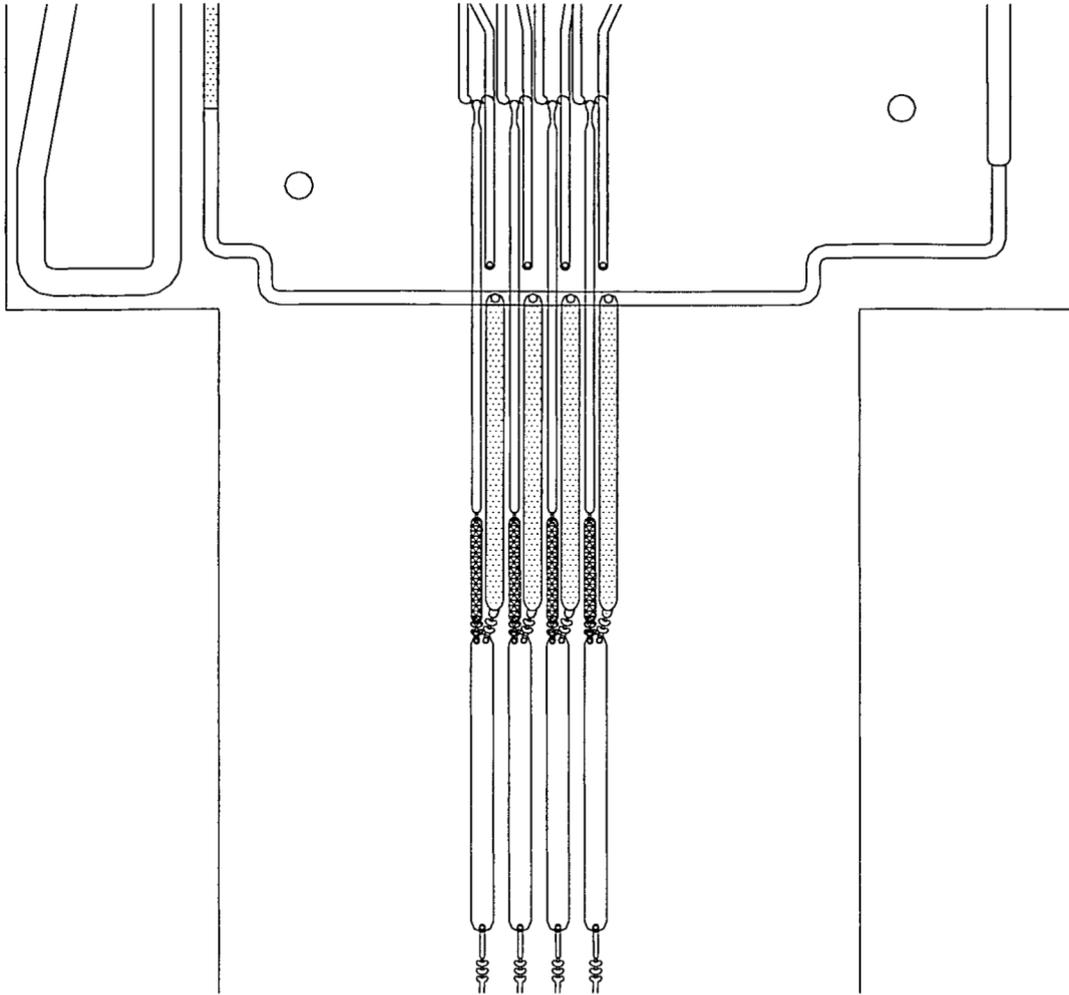
**FIGURA 9D**



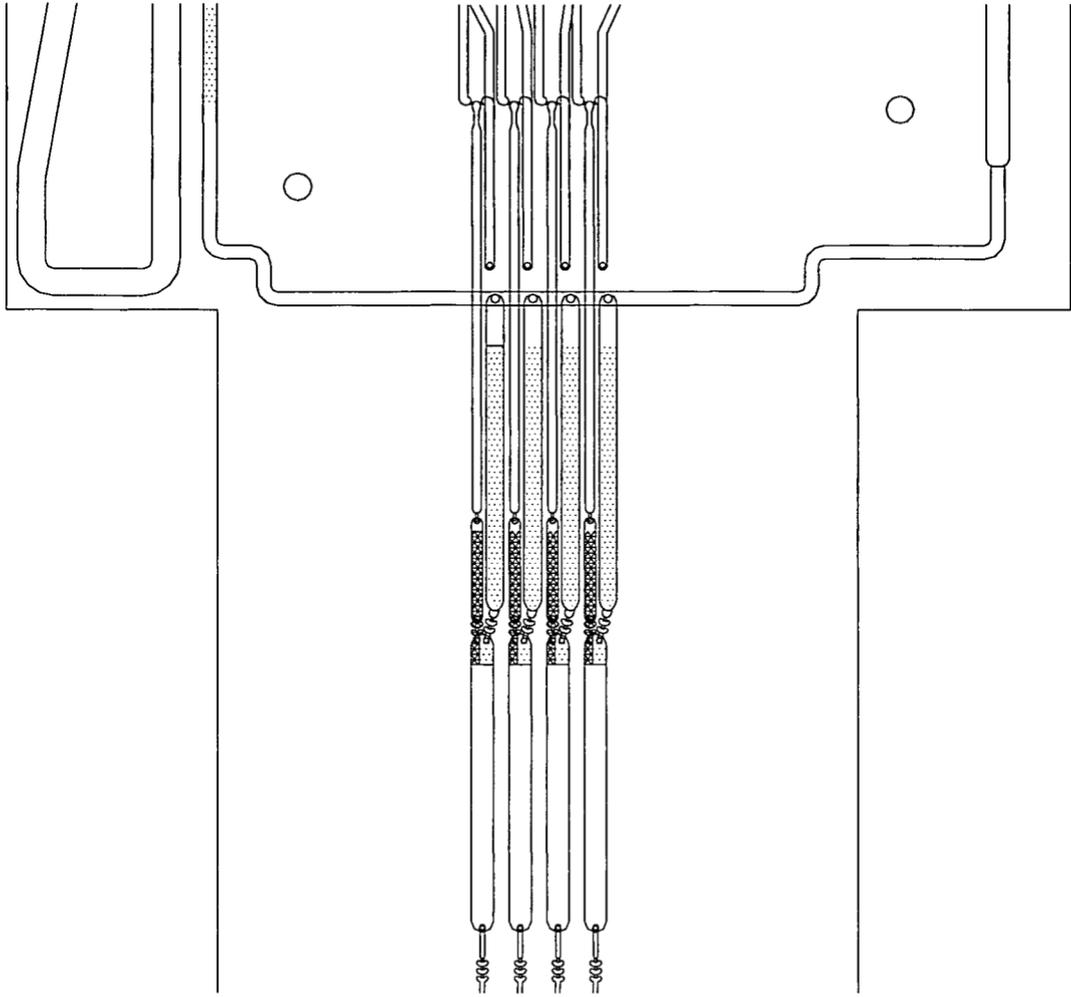
**FIGURA 9E**



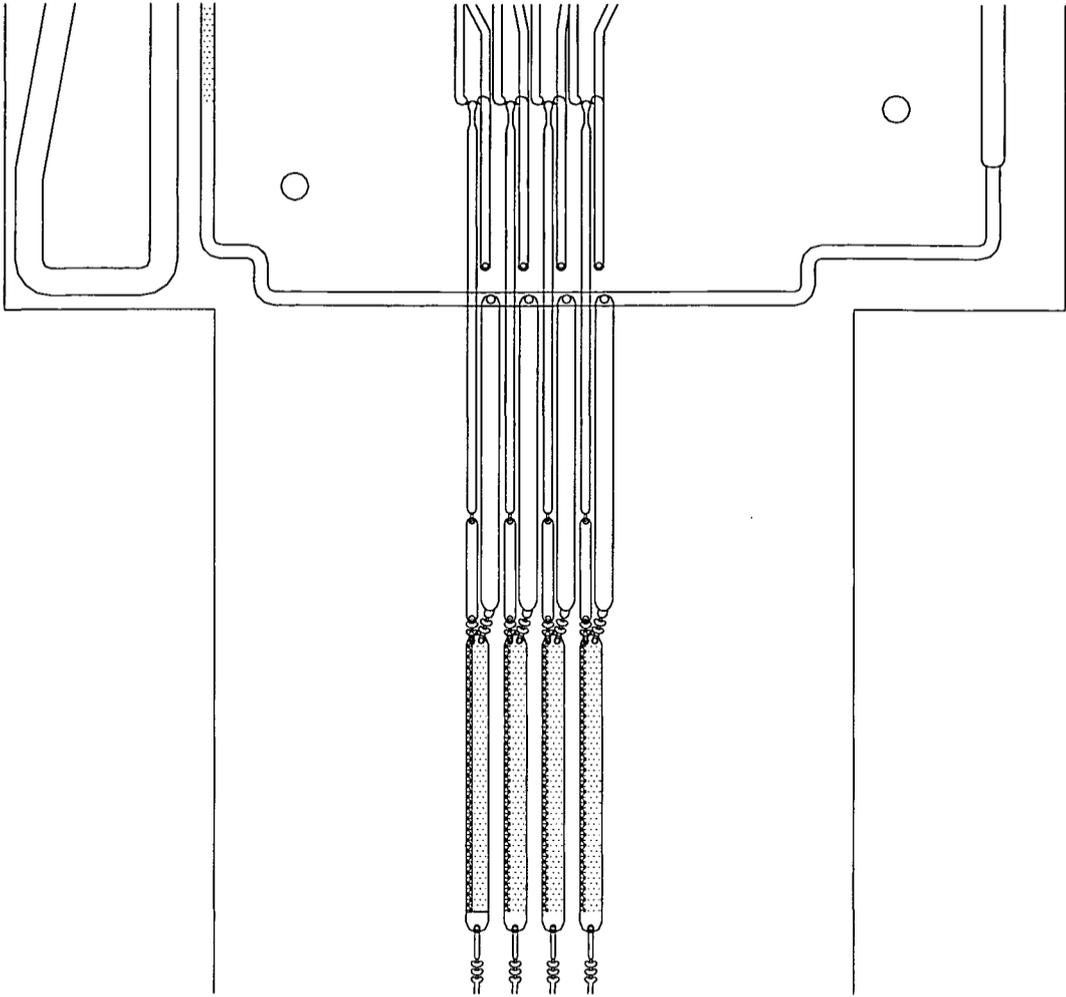
**FIGURA 9F**



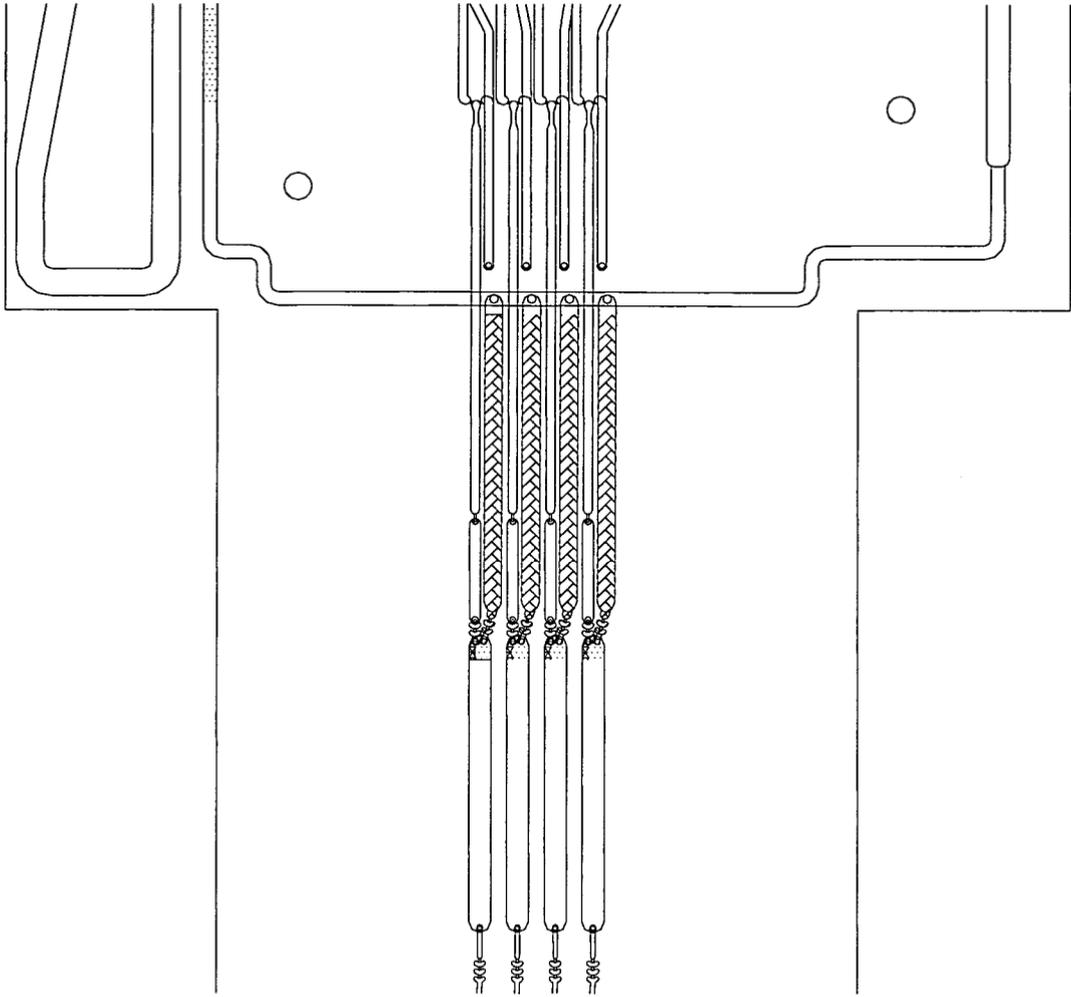
**FIGURA 9G**



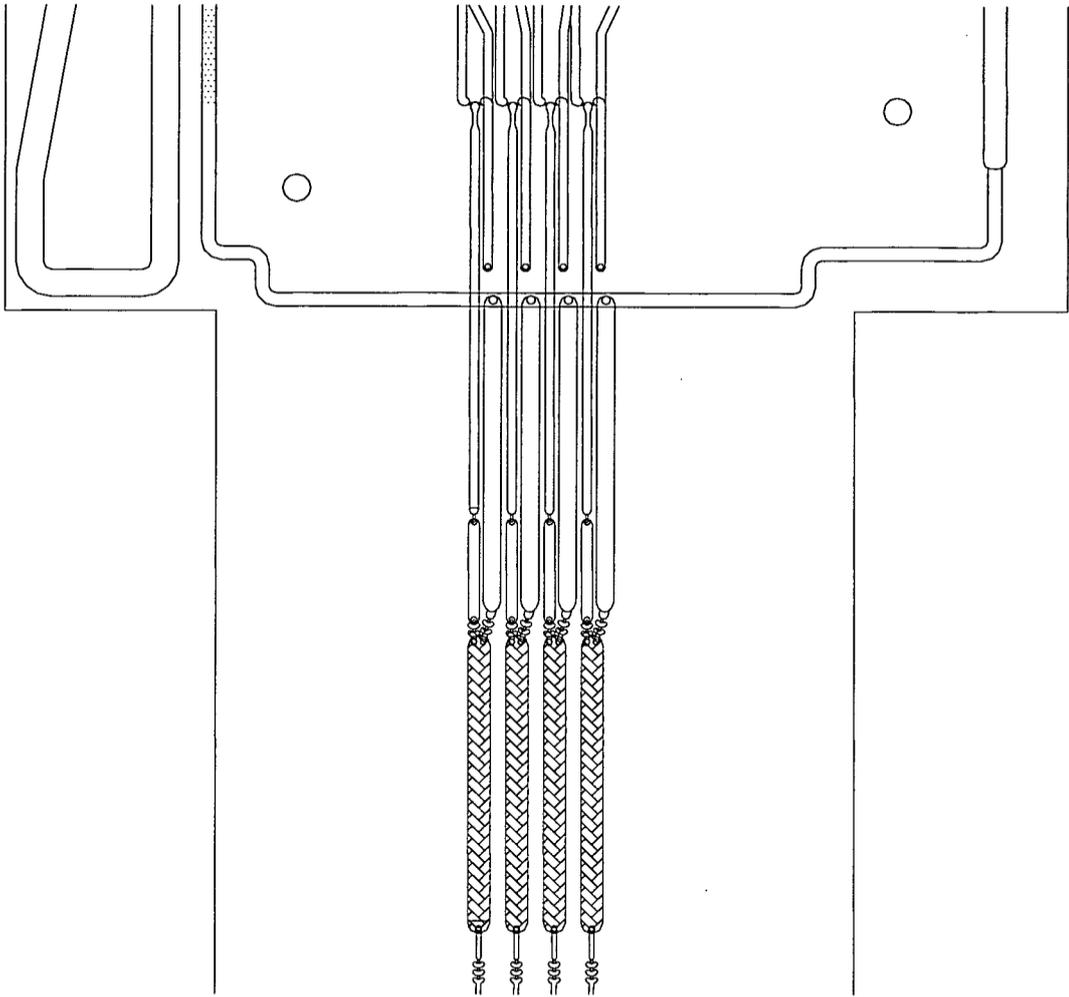
**FIGURA 9H**



**FIGURA 9I**



**FIGURA 9J**



**FIGURA 9K**

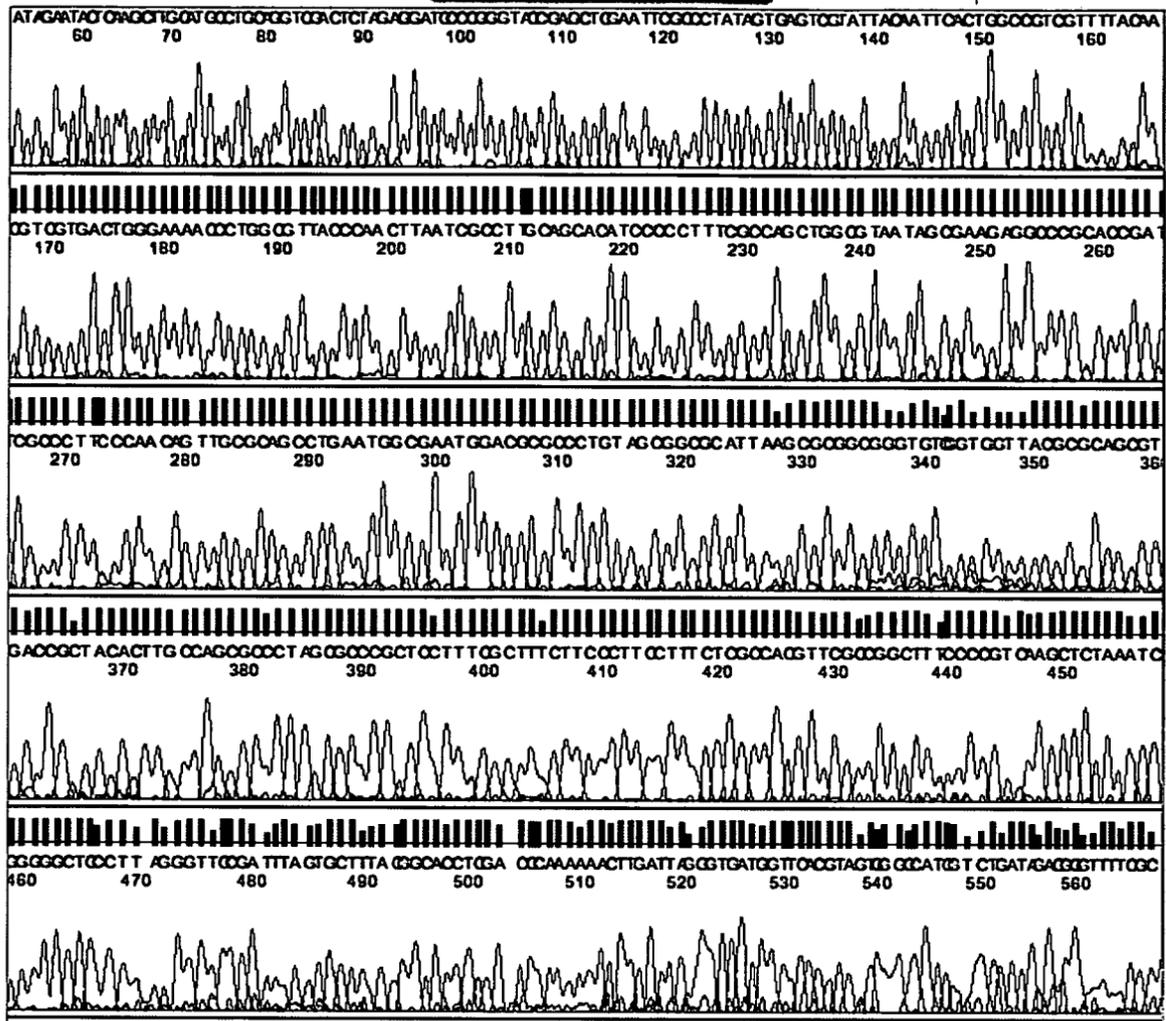
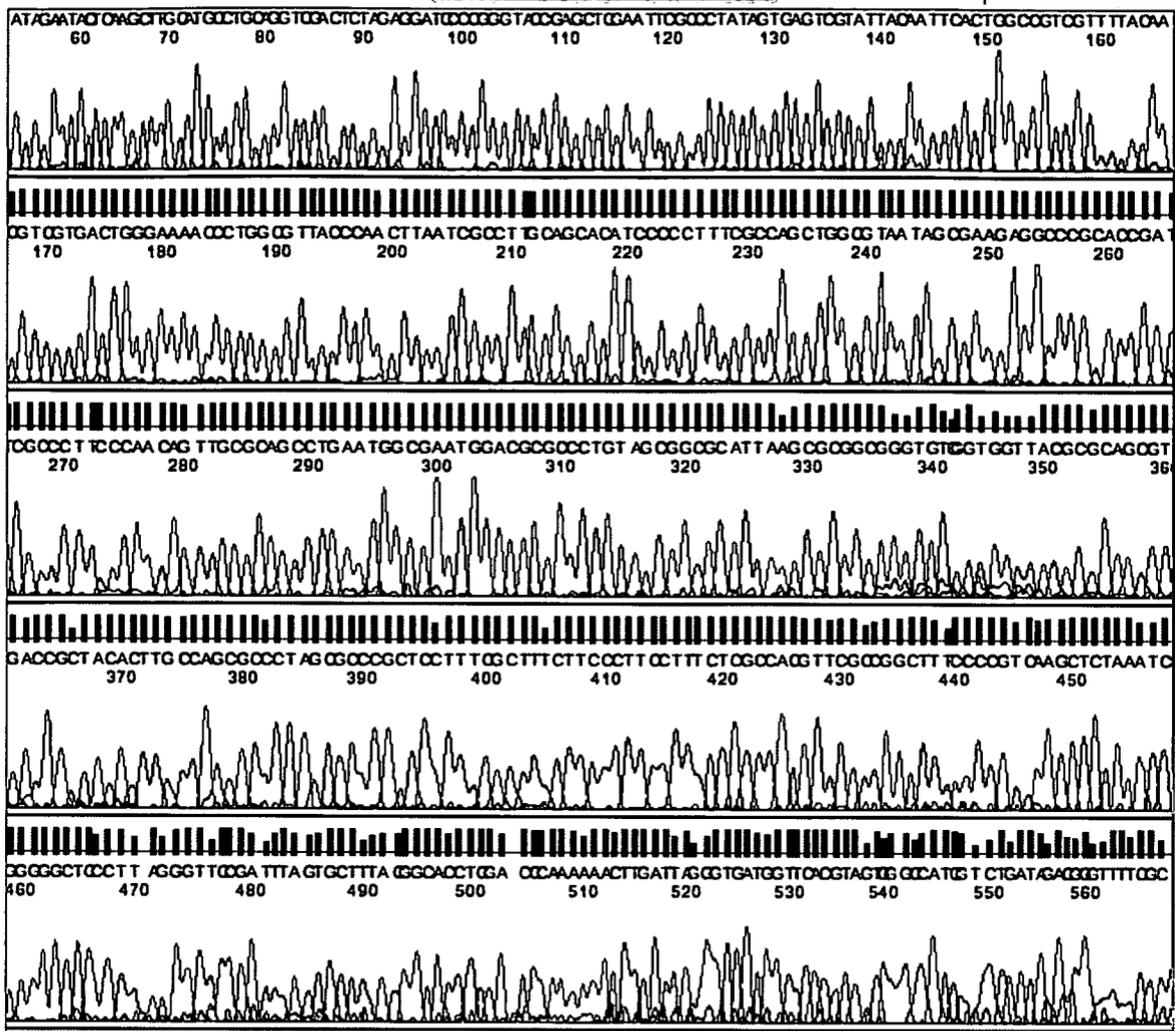
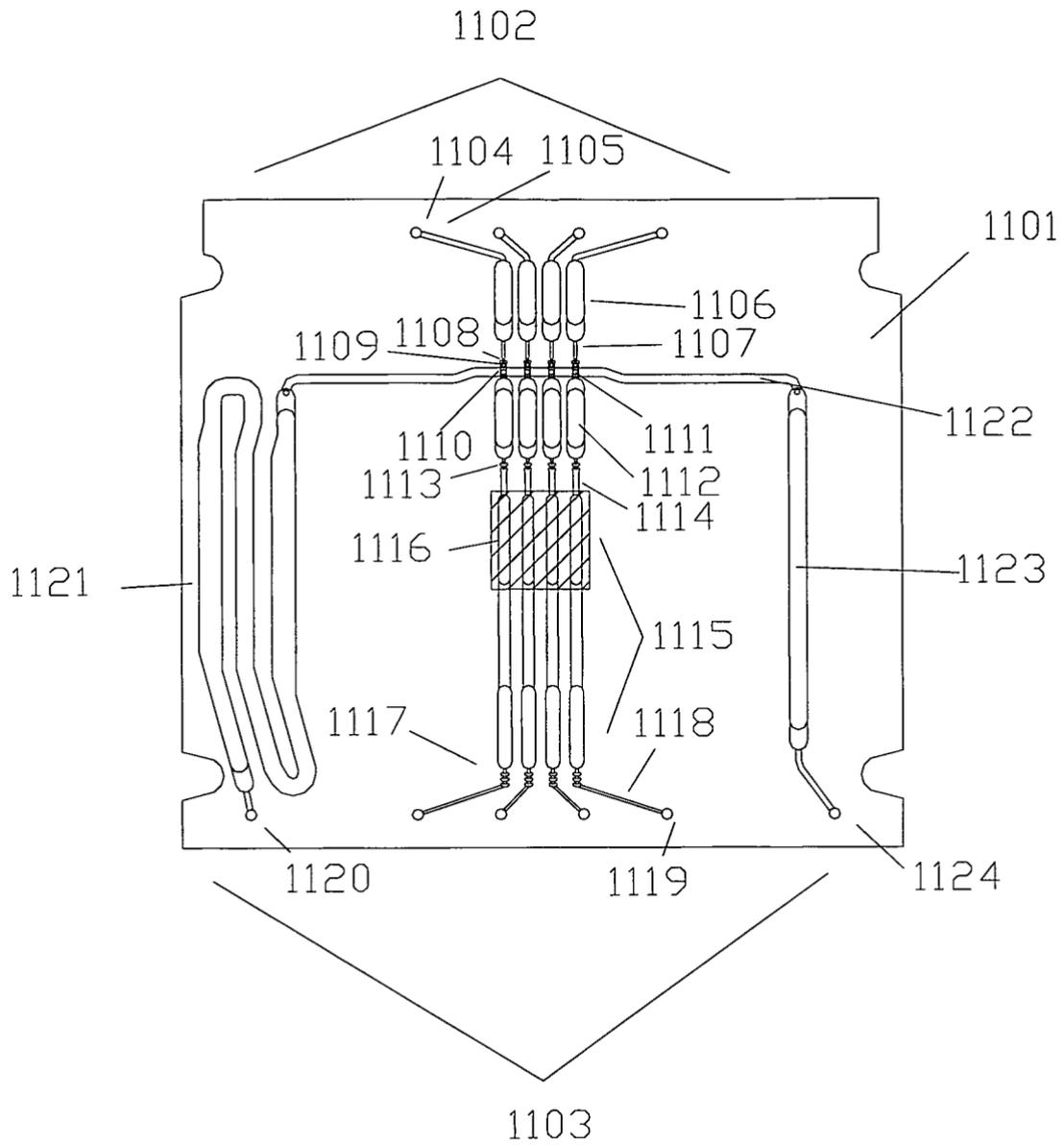


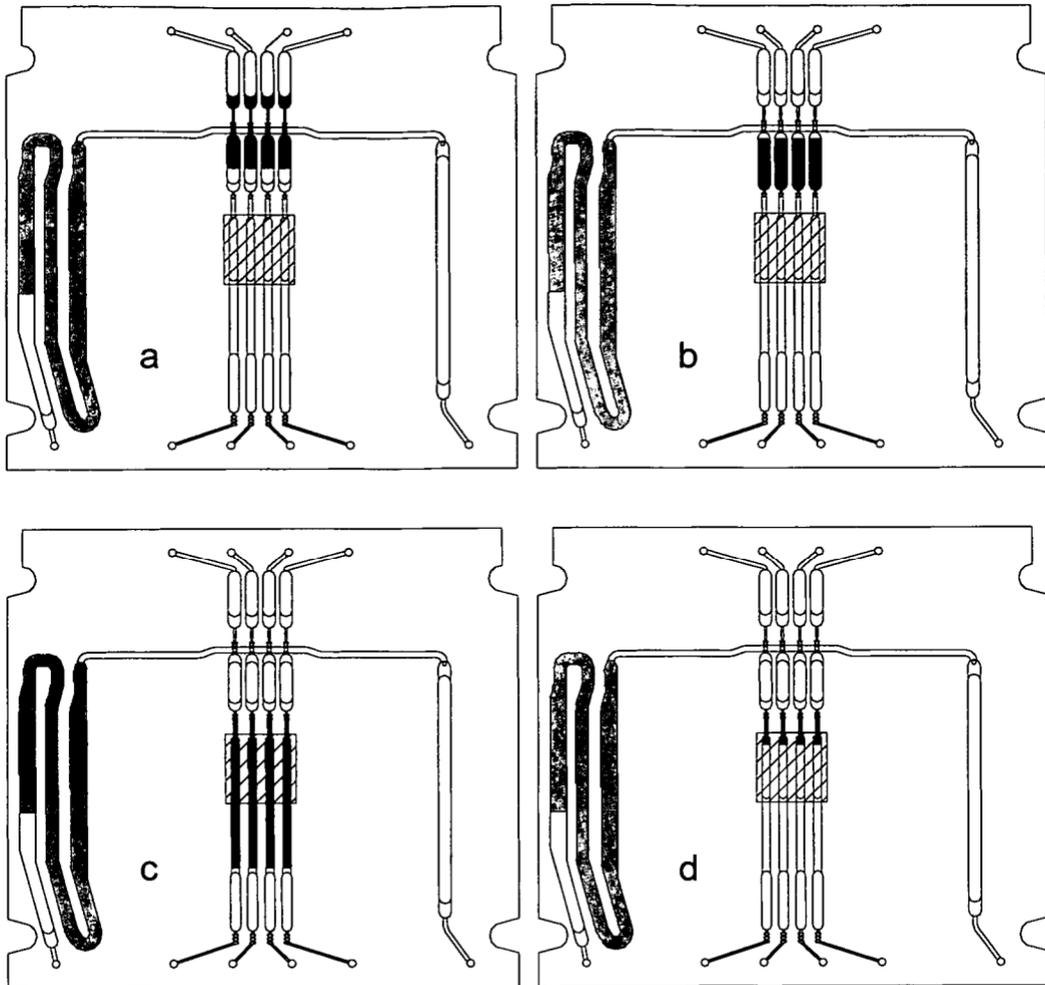
FIGURA 10



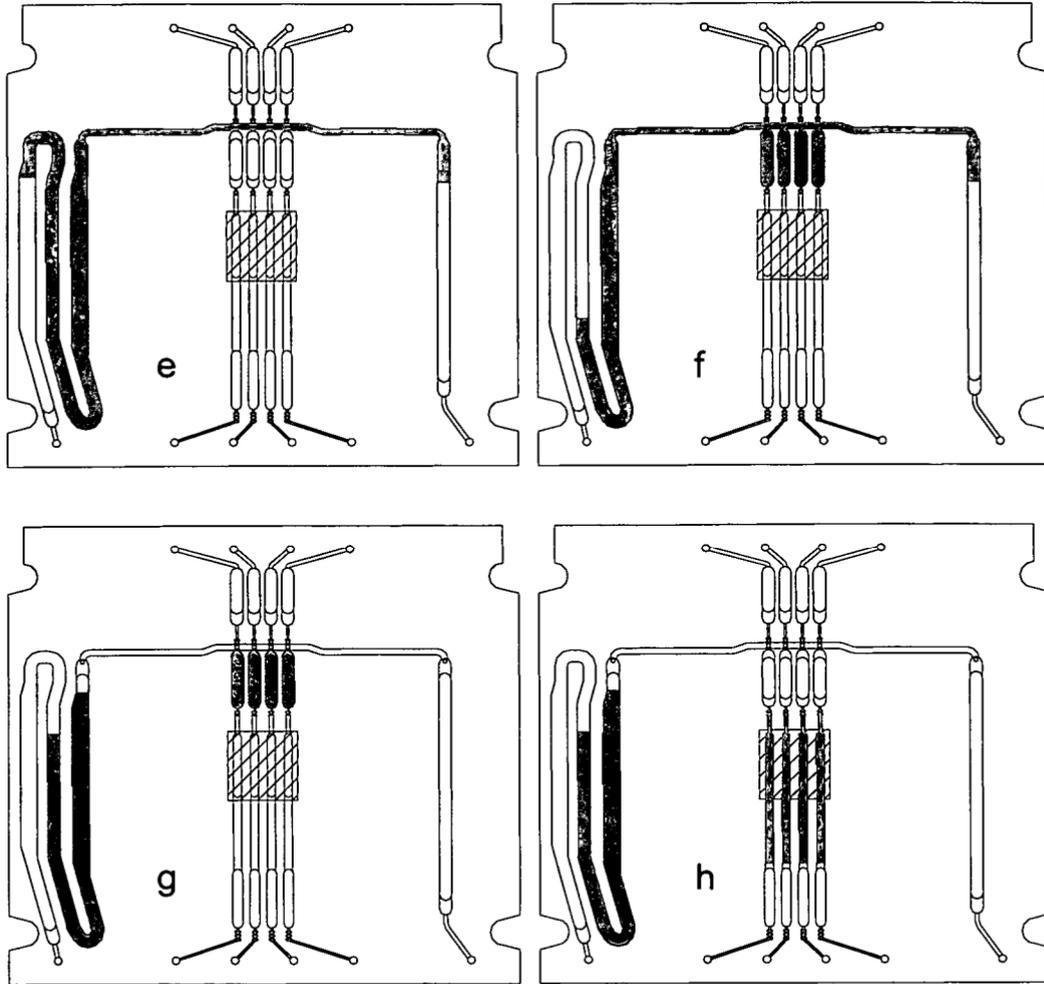
**FIGURA 10**



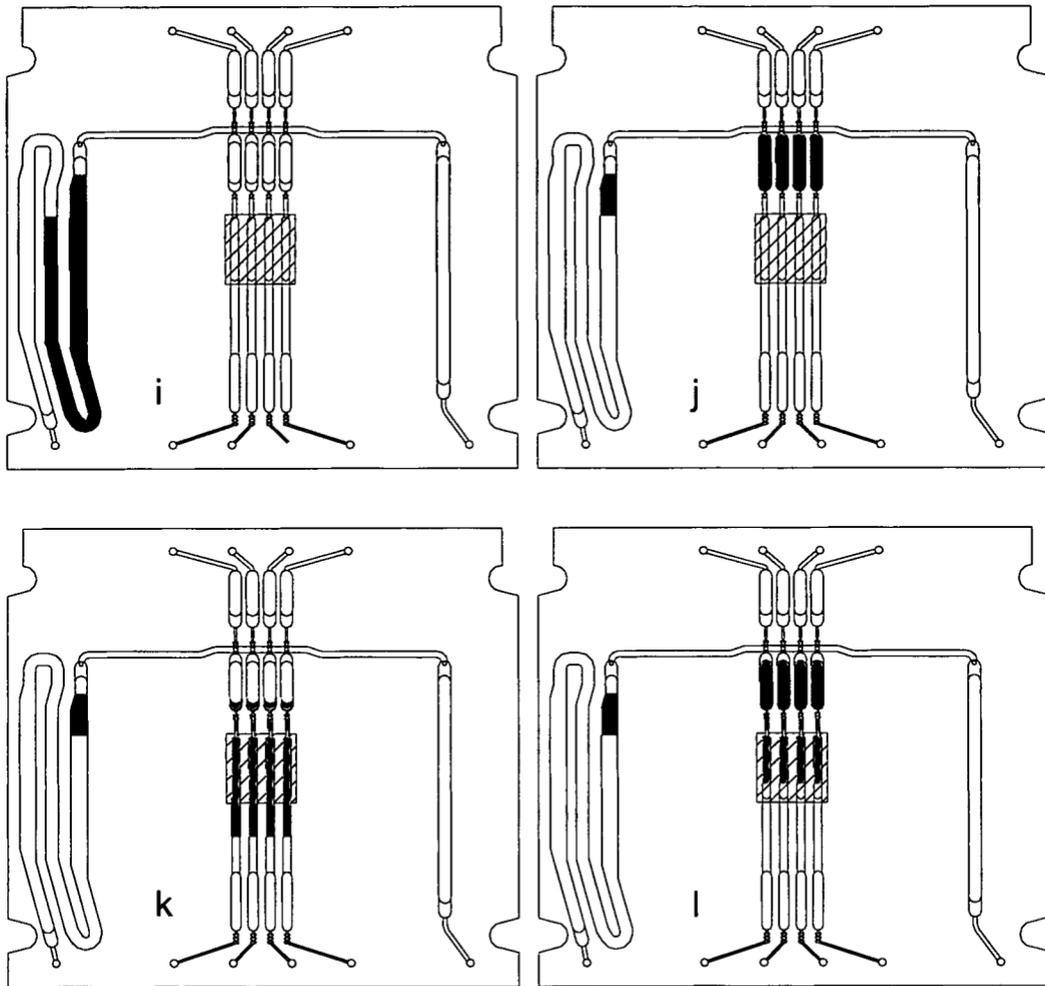
**FIGURA 11**



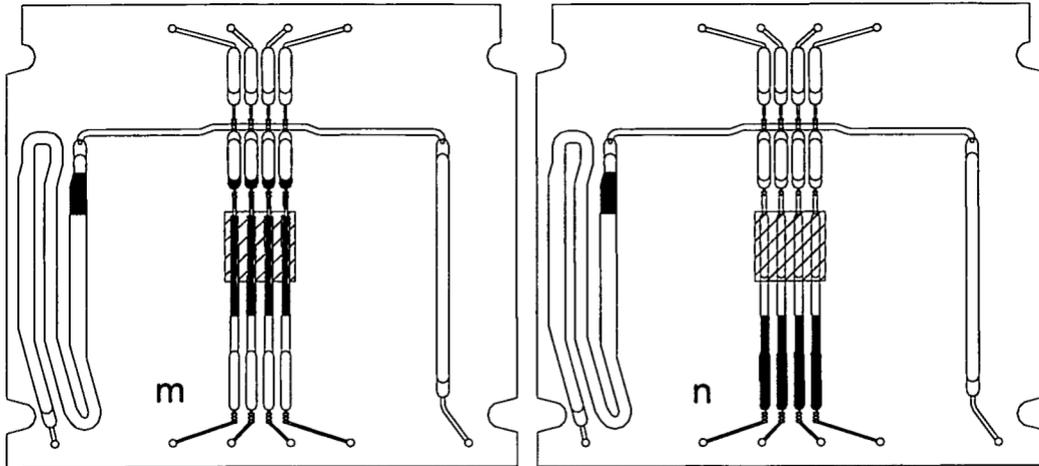
**FIGURA 12**



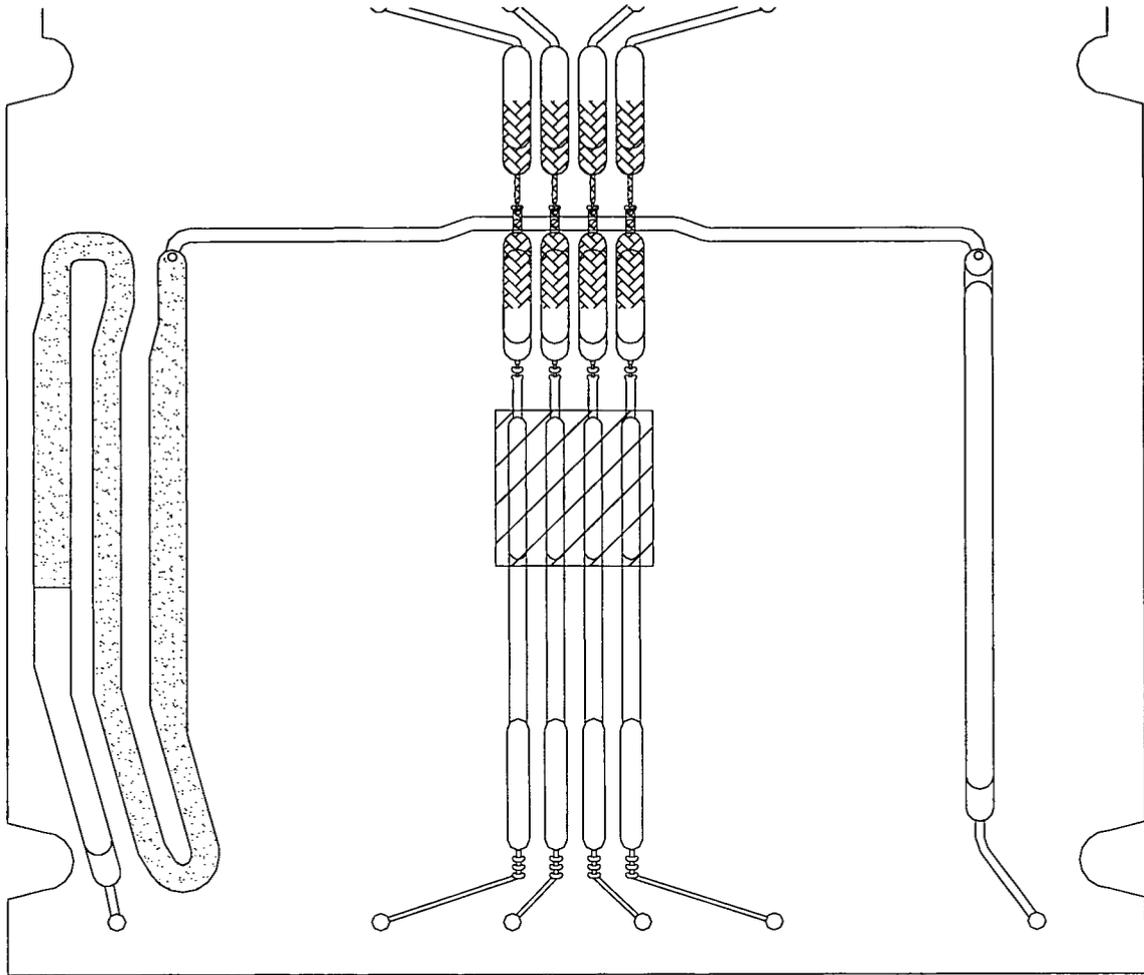
**FIGURA 12 (CONTINUACIÓN)**



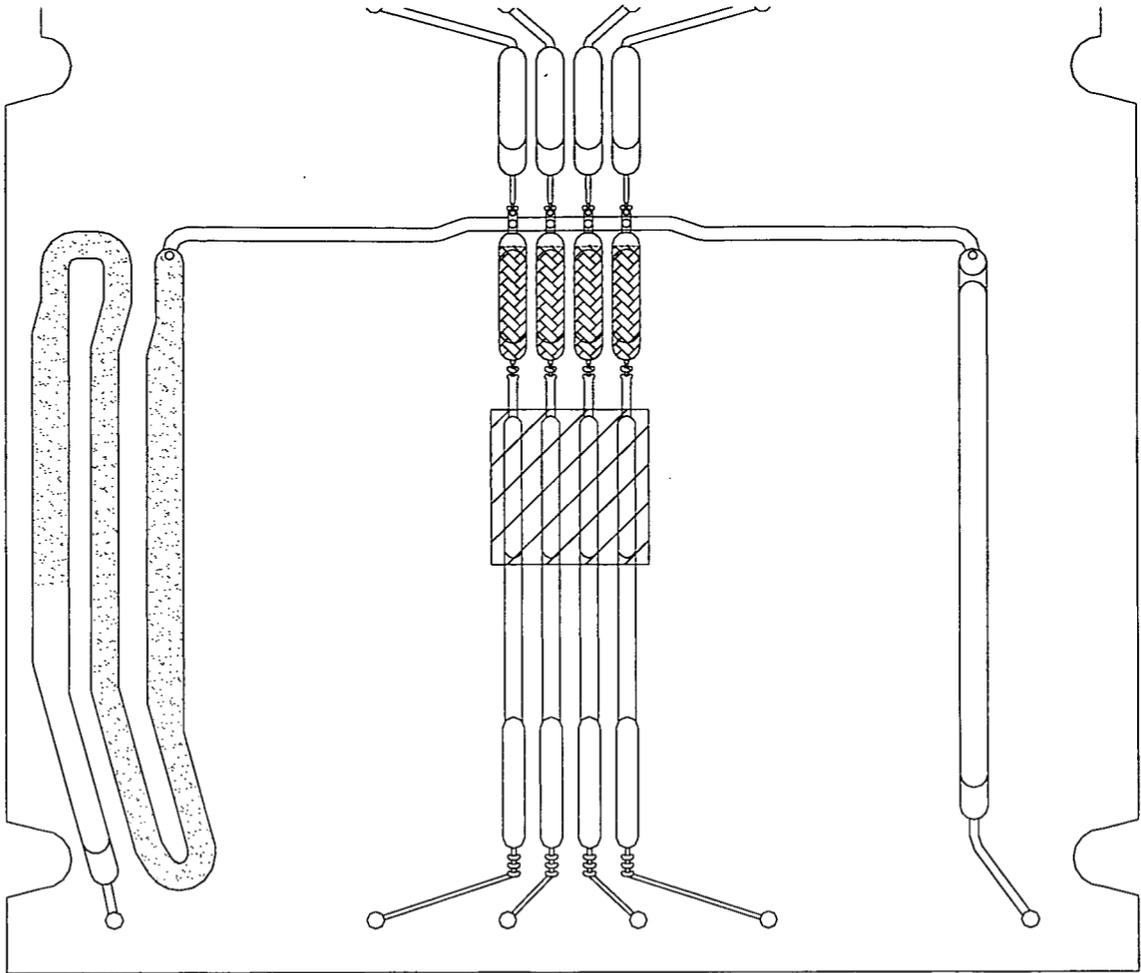
**FIGURA 12 (CONTINUACIÓN)**



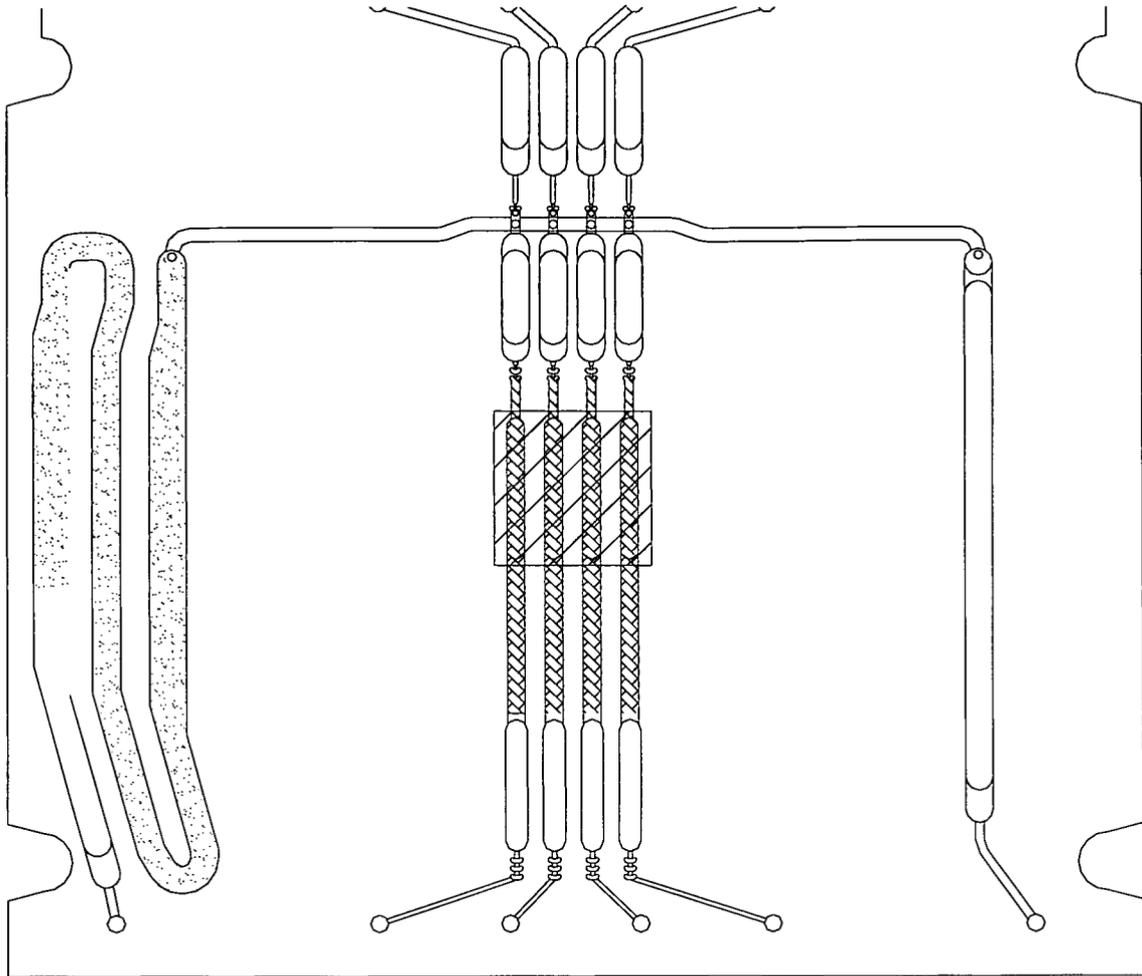
**FIGURA 12 (CONTINUACIÓN)**



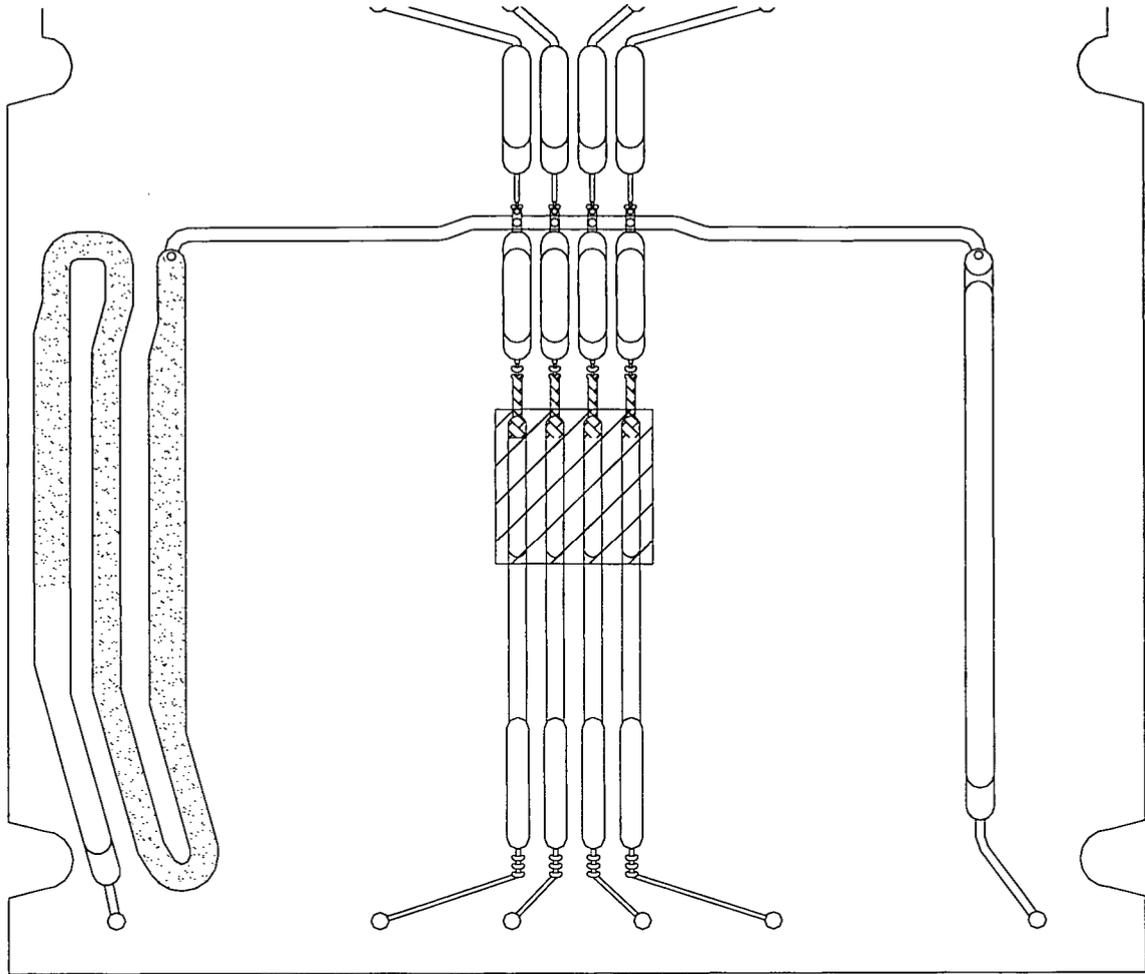
**FIGURA 12A**



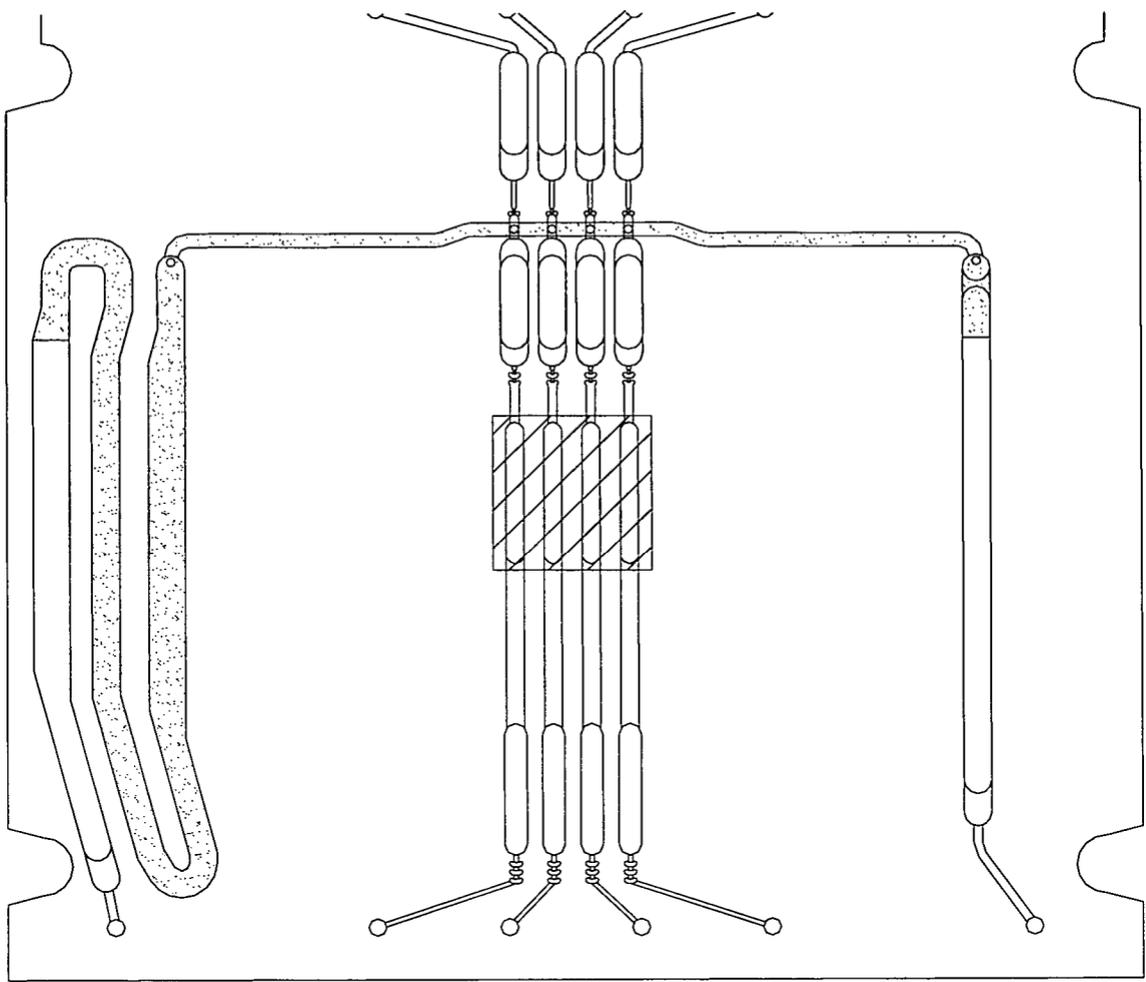
**FIGURA 12B**



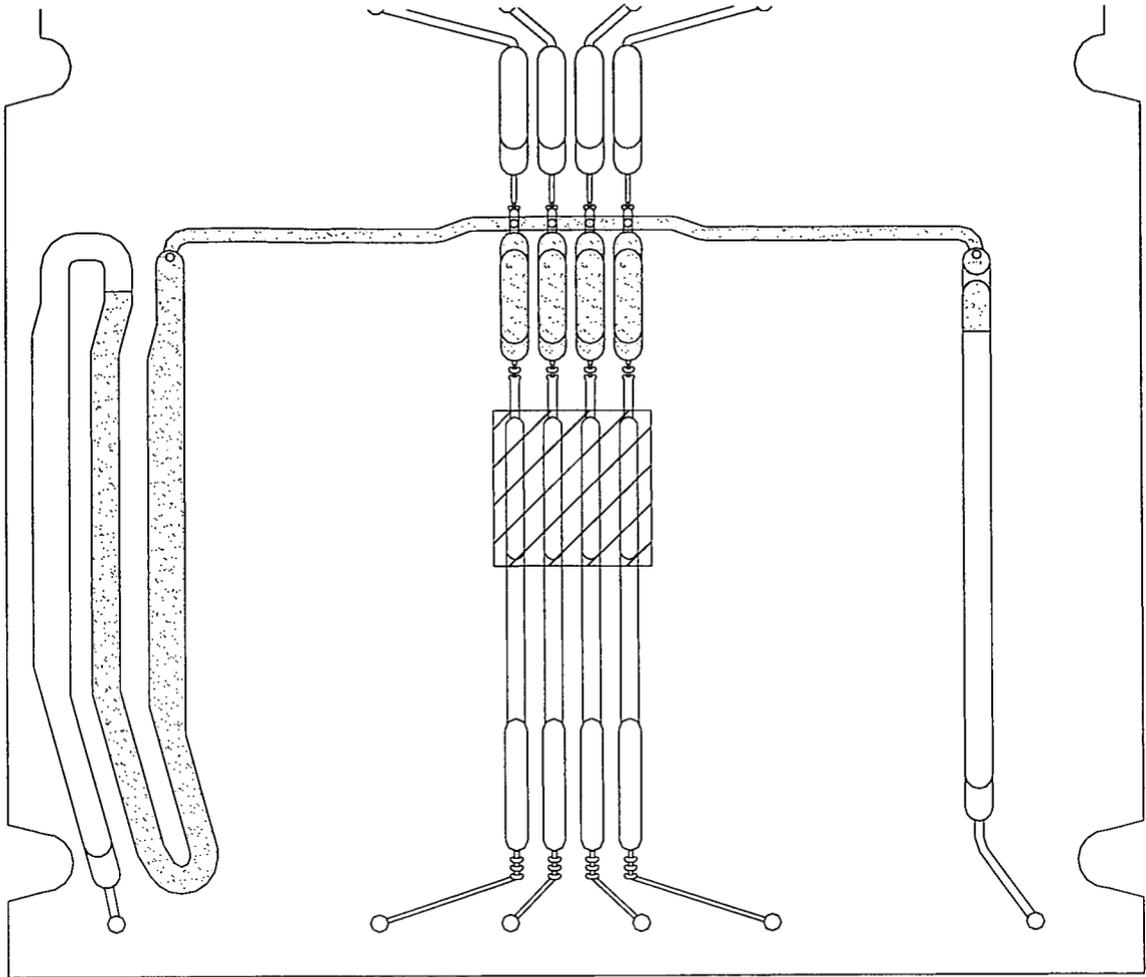
**FIGURA 12C**



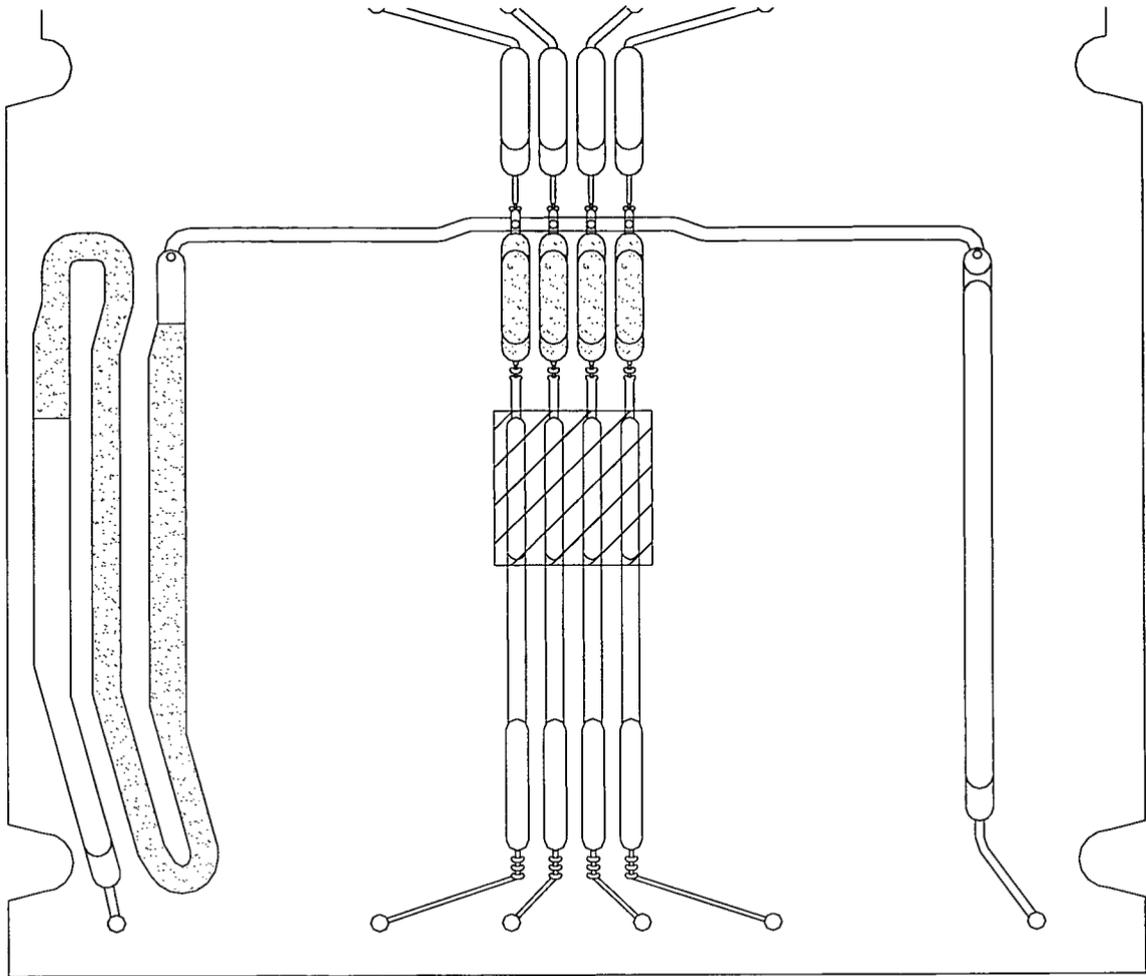
**FIGURA 12D**



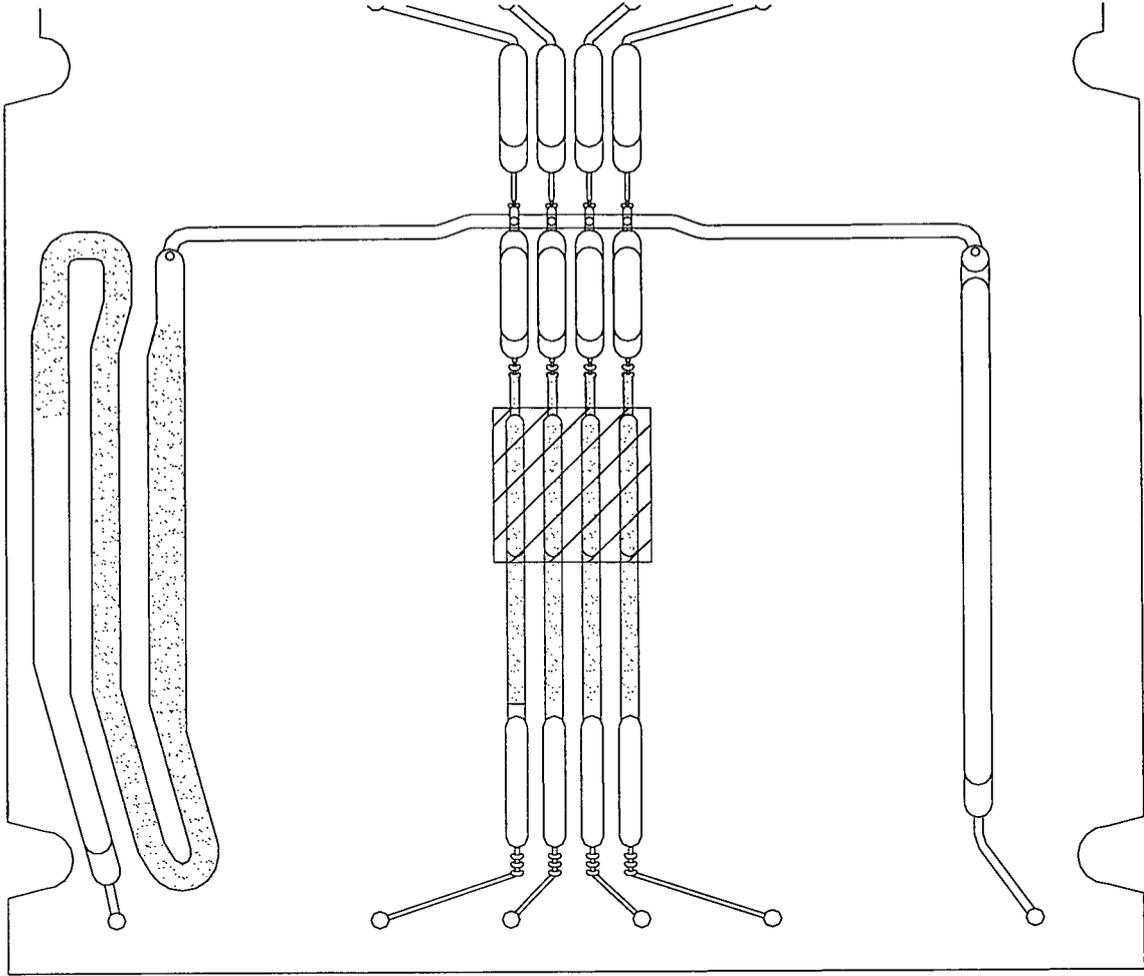
**FIGURA 12E**



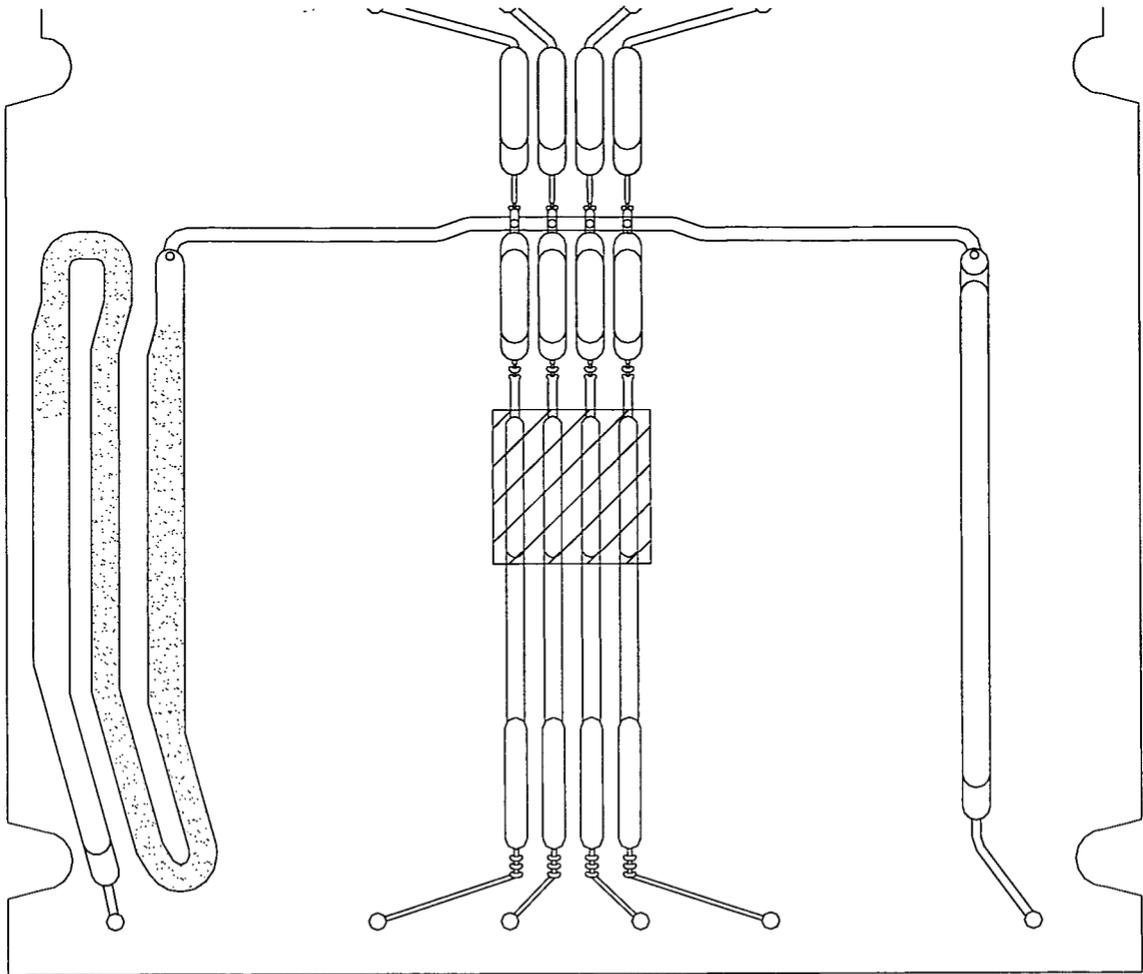
**FIGURA 12F**



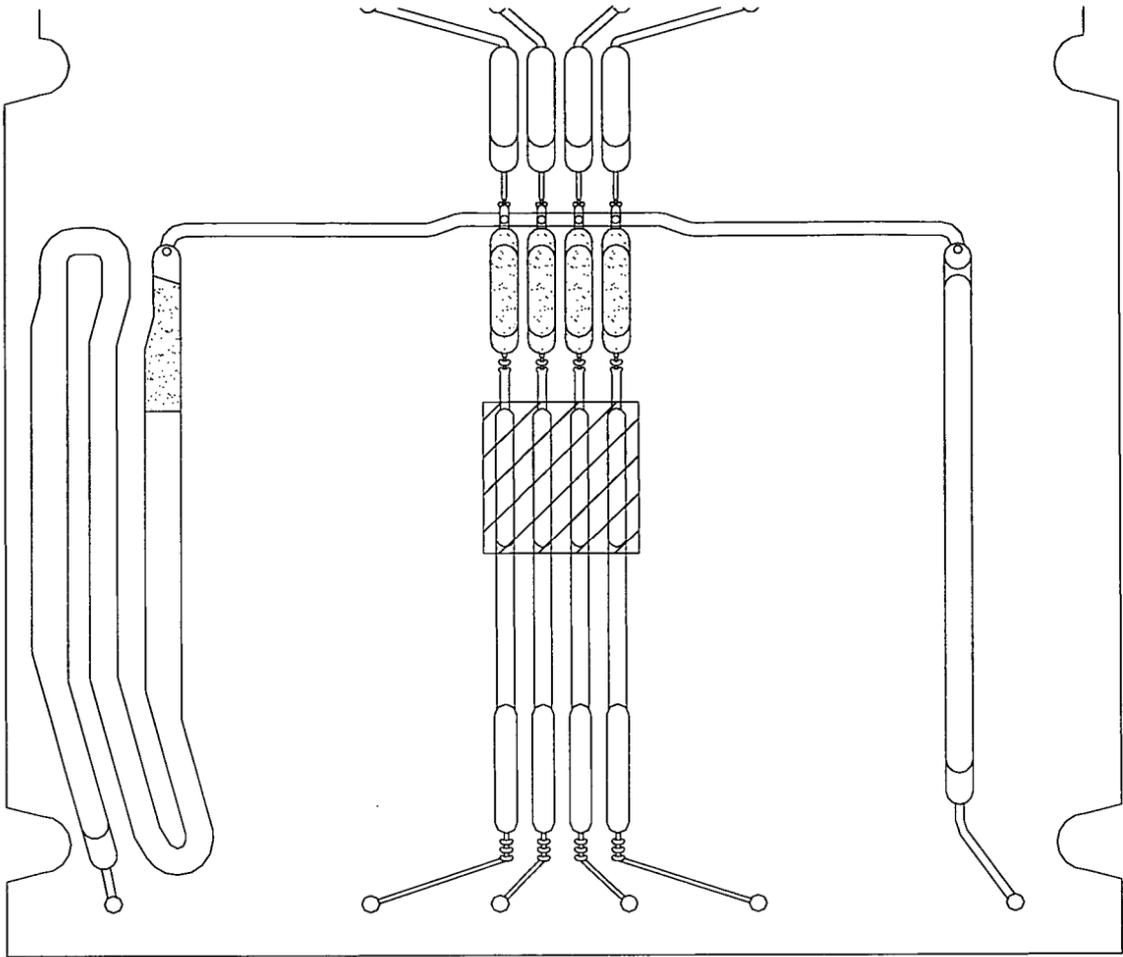
**FIGURA 12G**



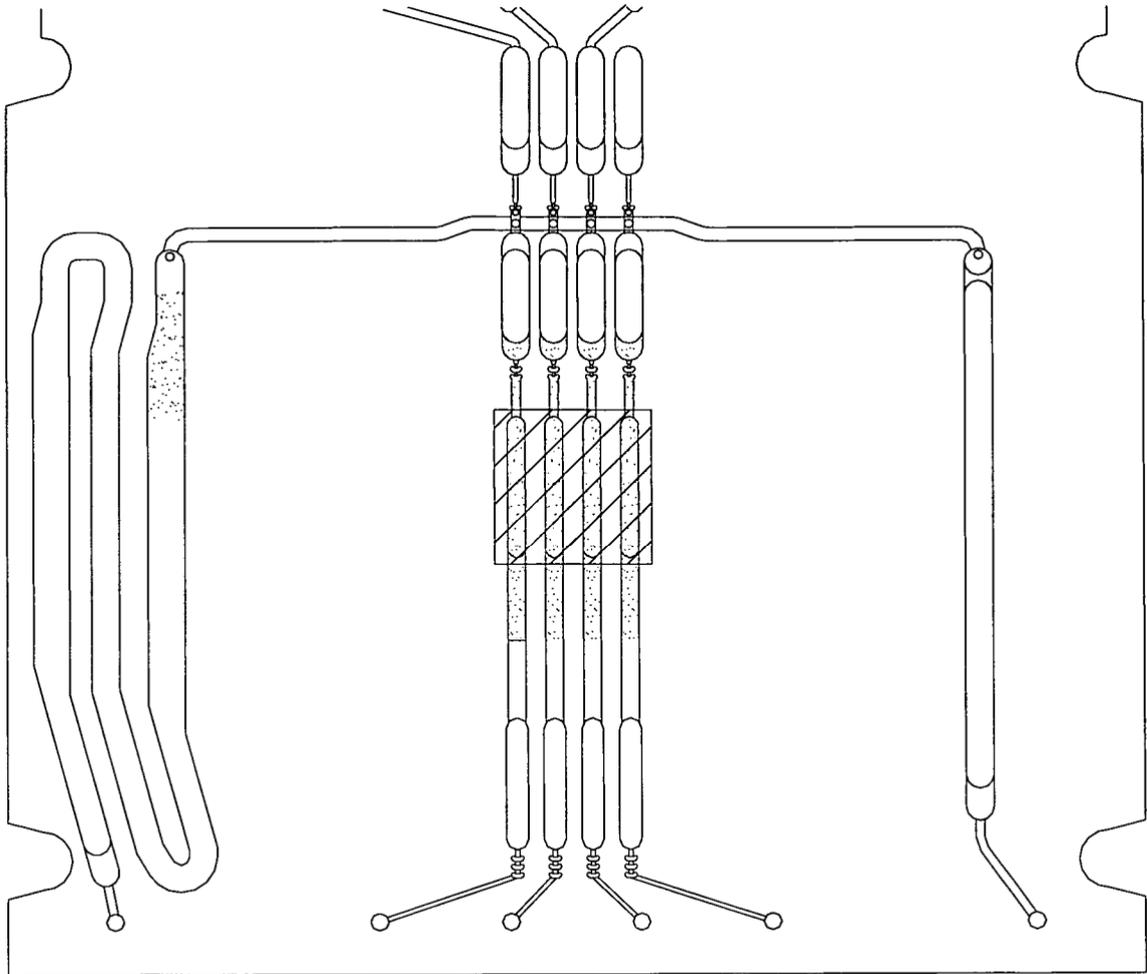
**FIGURA 12H**



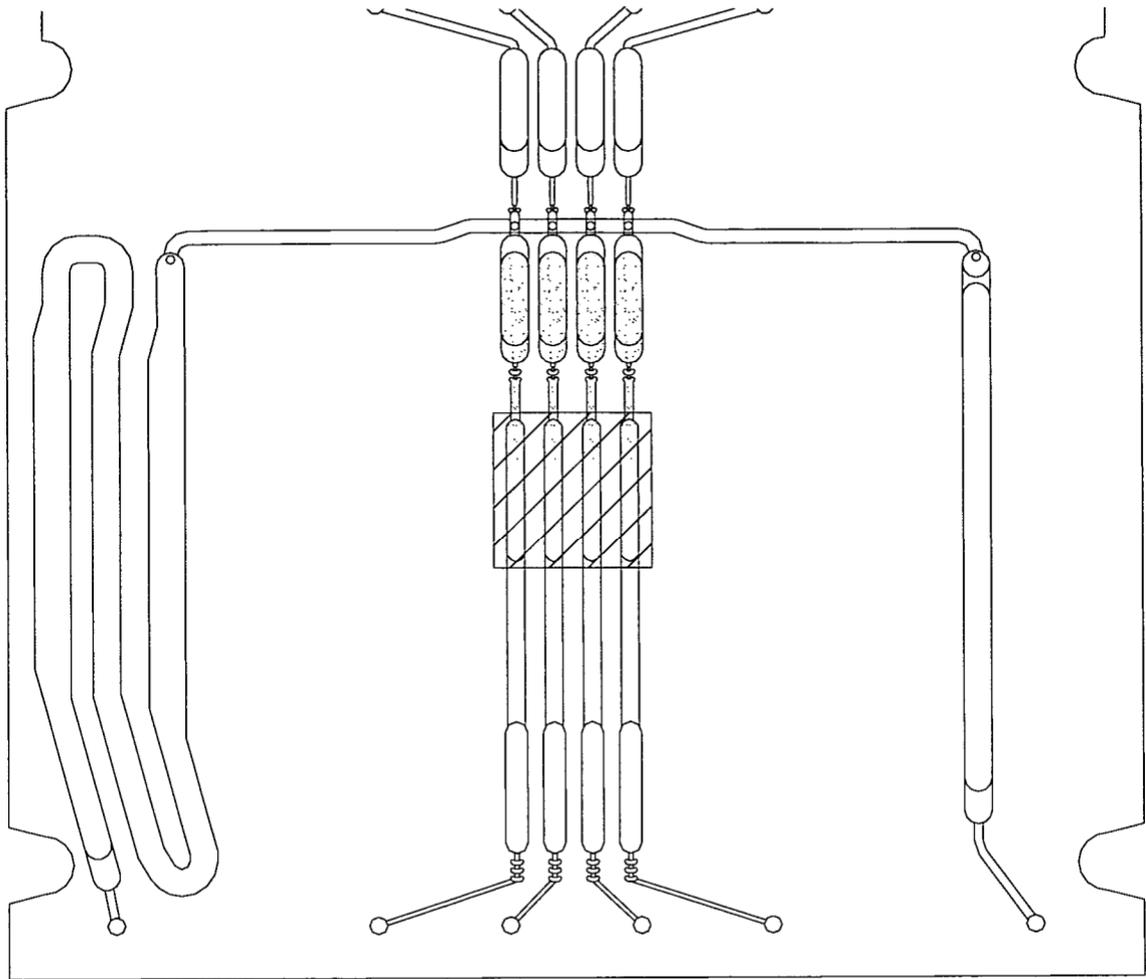
**FIGURA 12I**



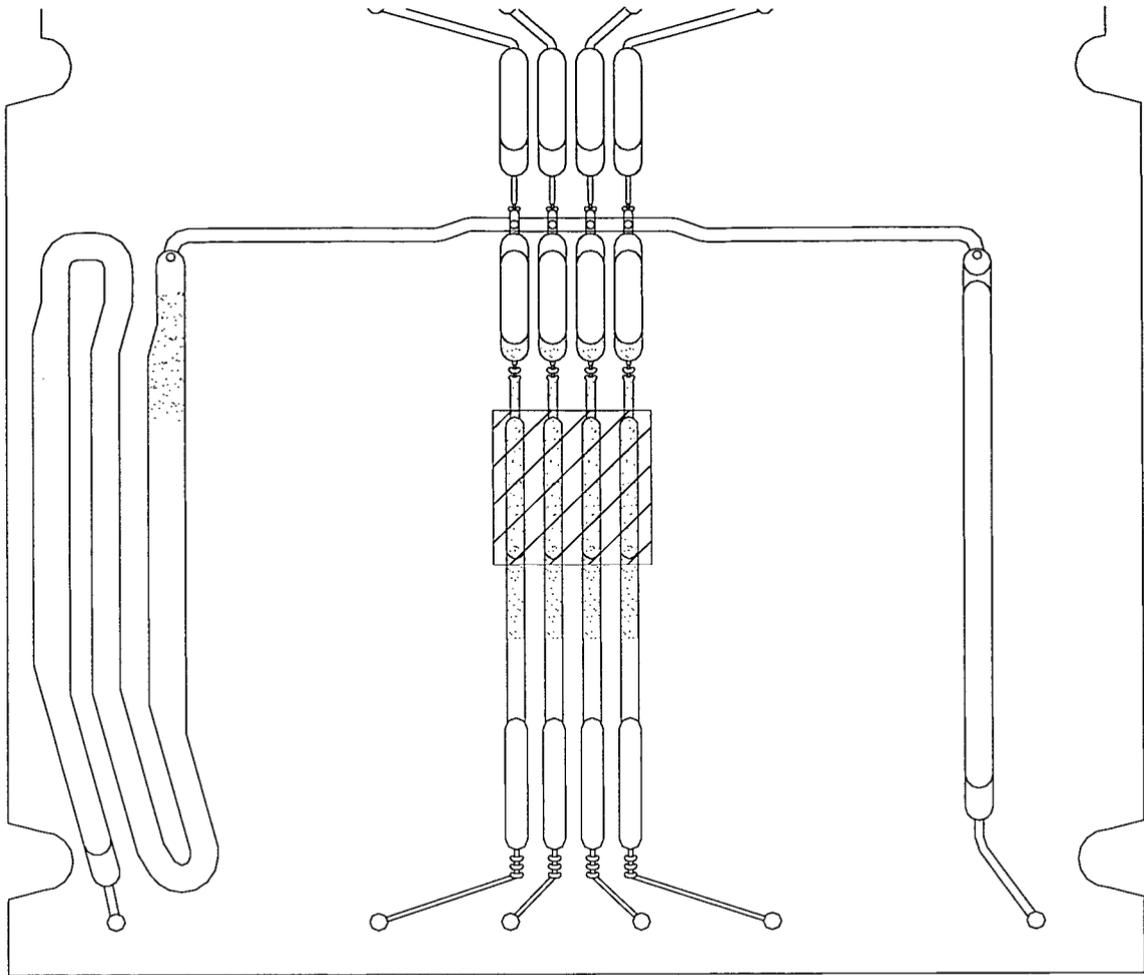
**FIGURA 12J**



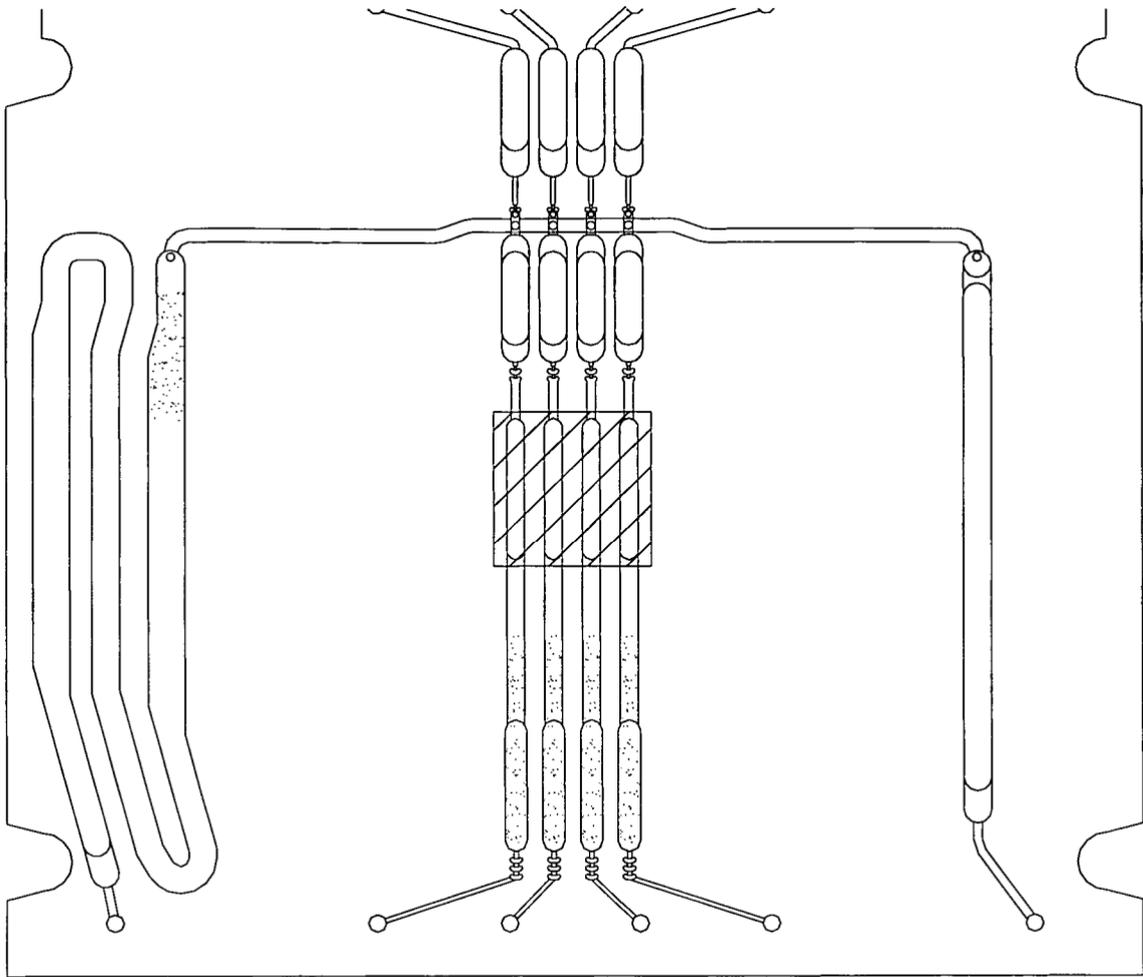
**FIGURA 12K**



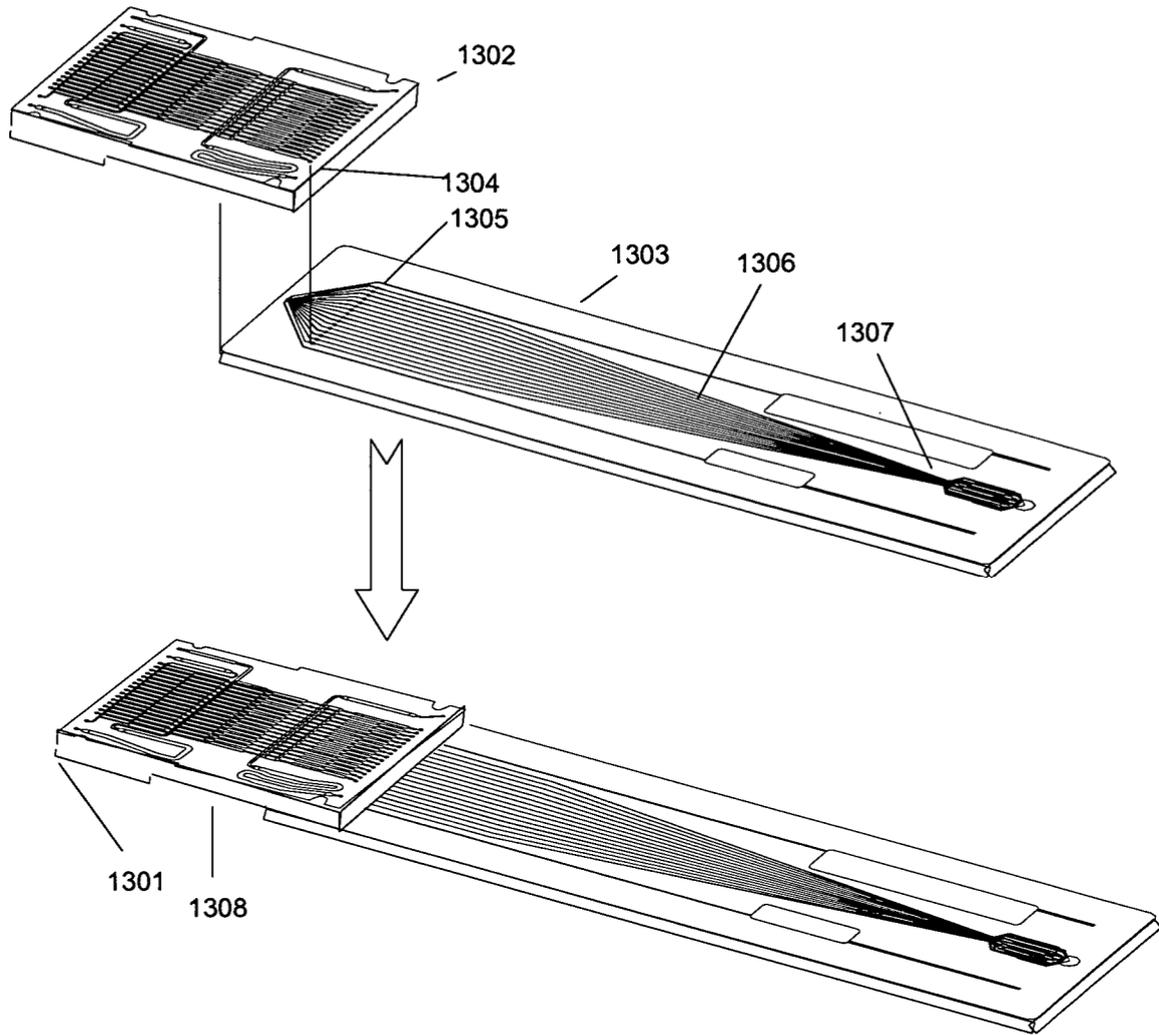
**FIGURA 12L**



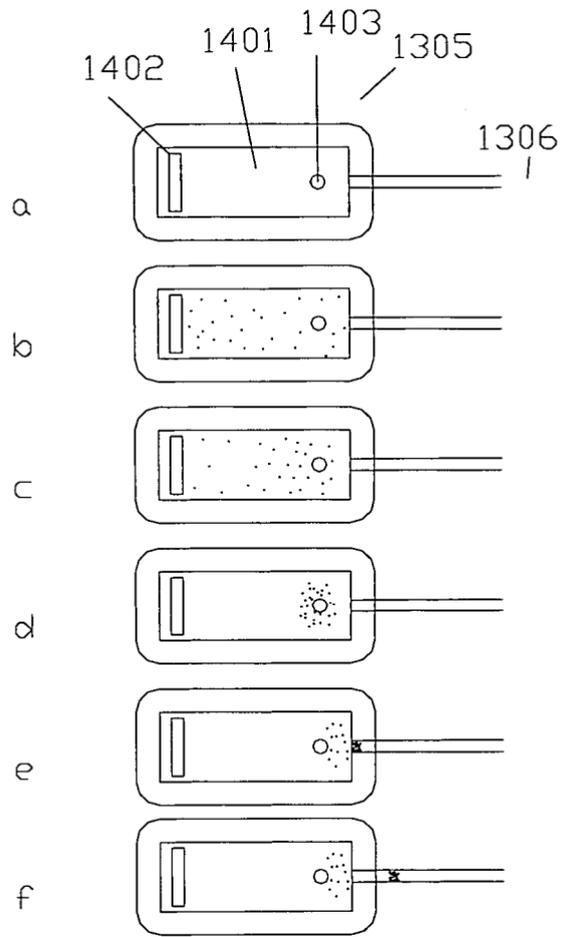
**FIGURA 12M**



**FIGURA 12N**



**FIGURA 13**



**FIGURA 14**

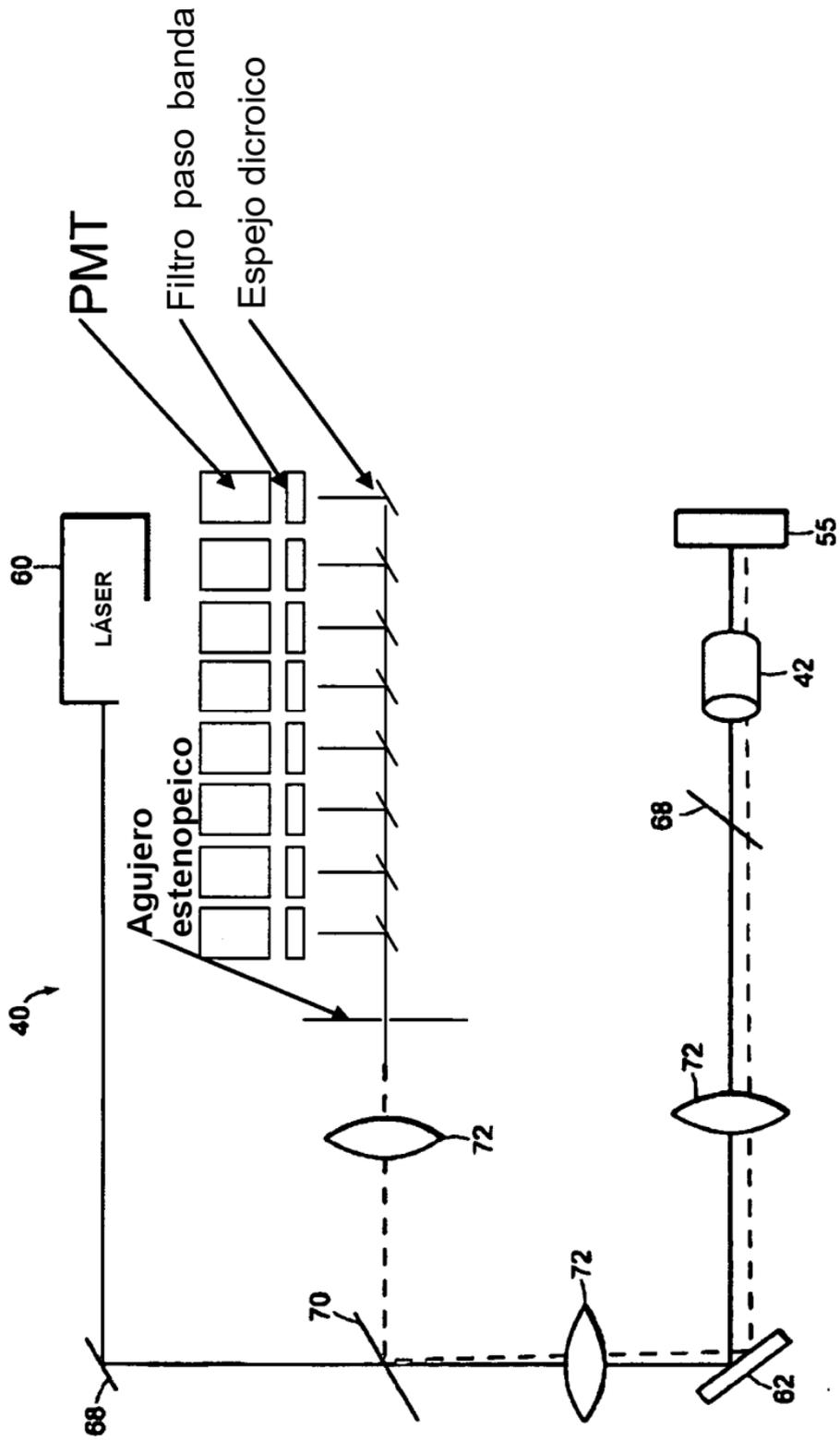


FIGURA 15

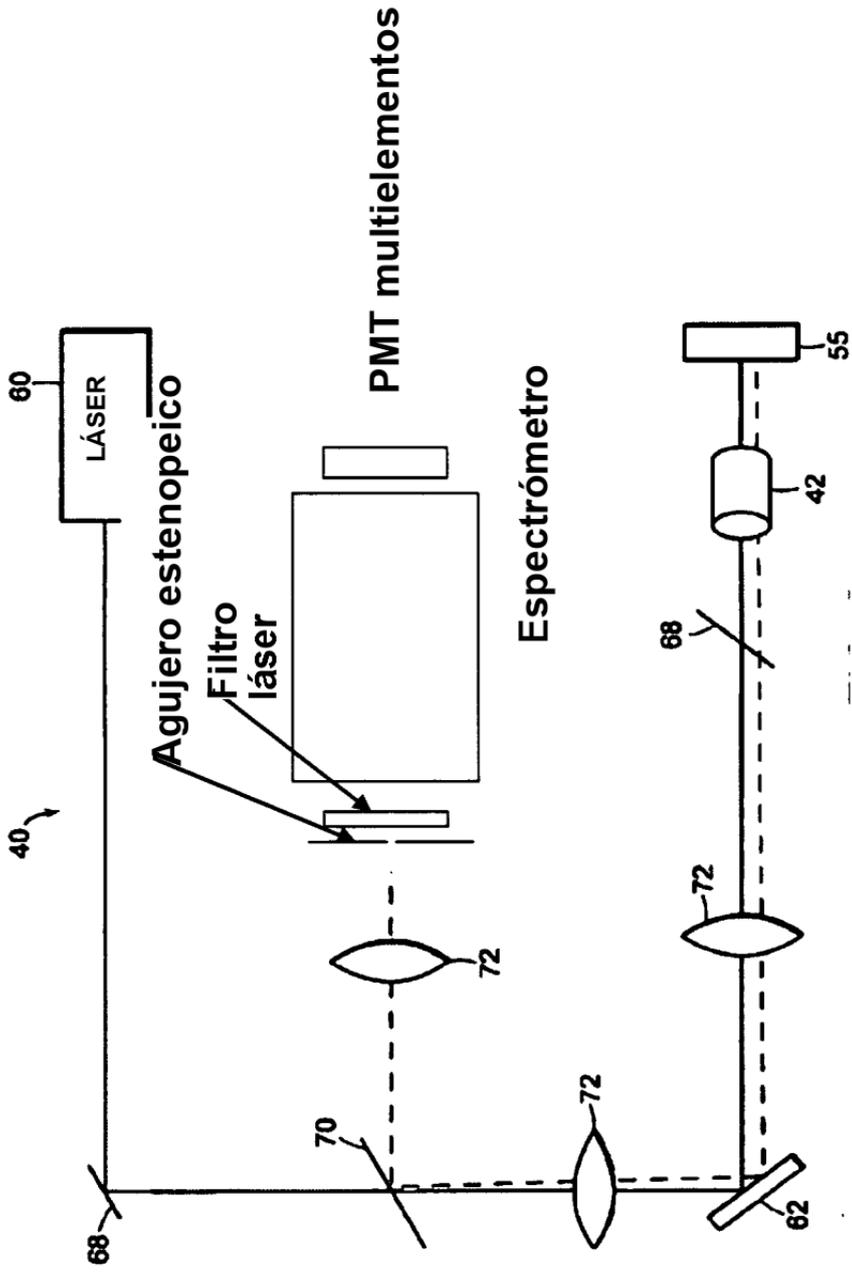
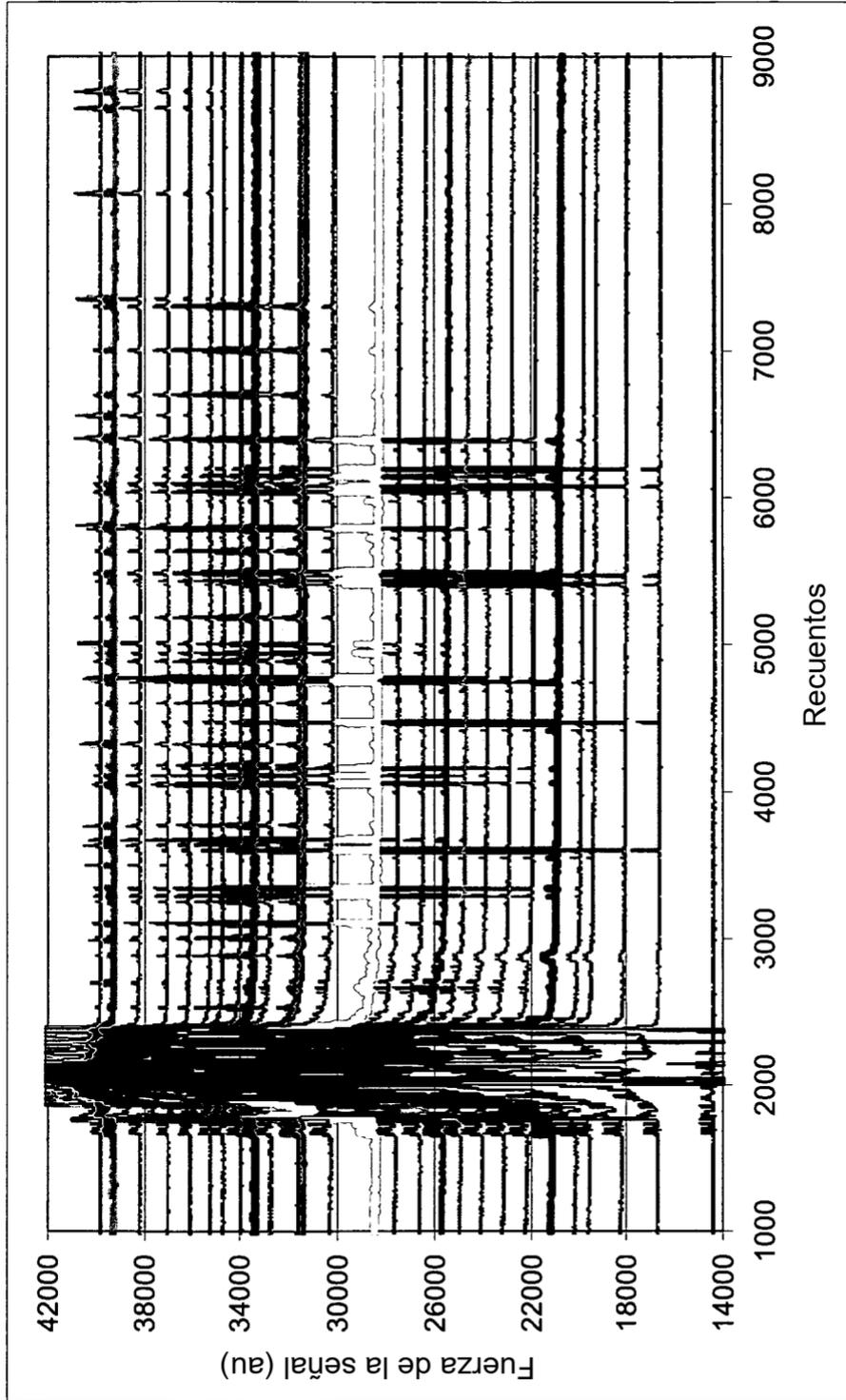
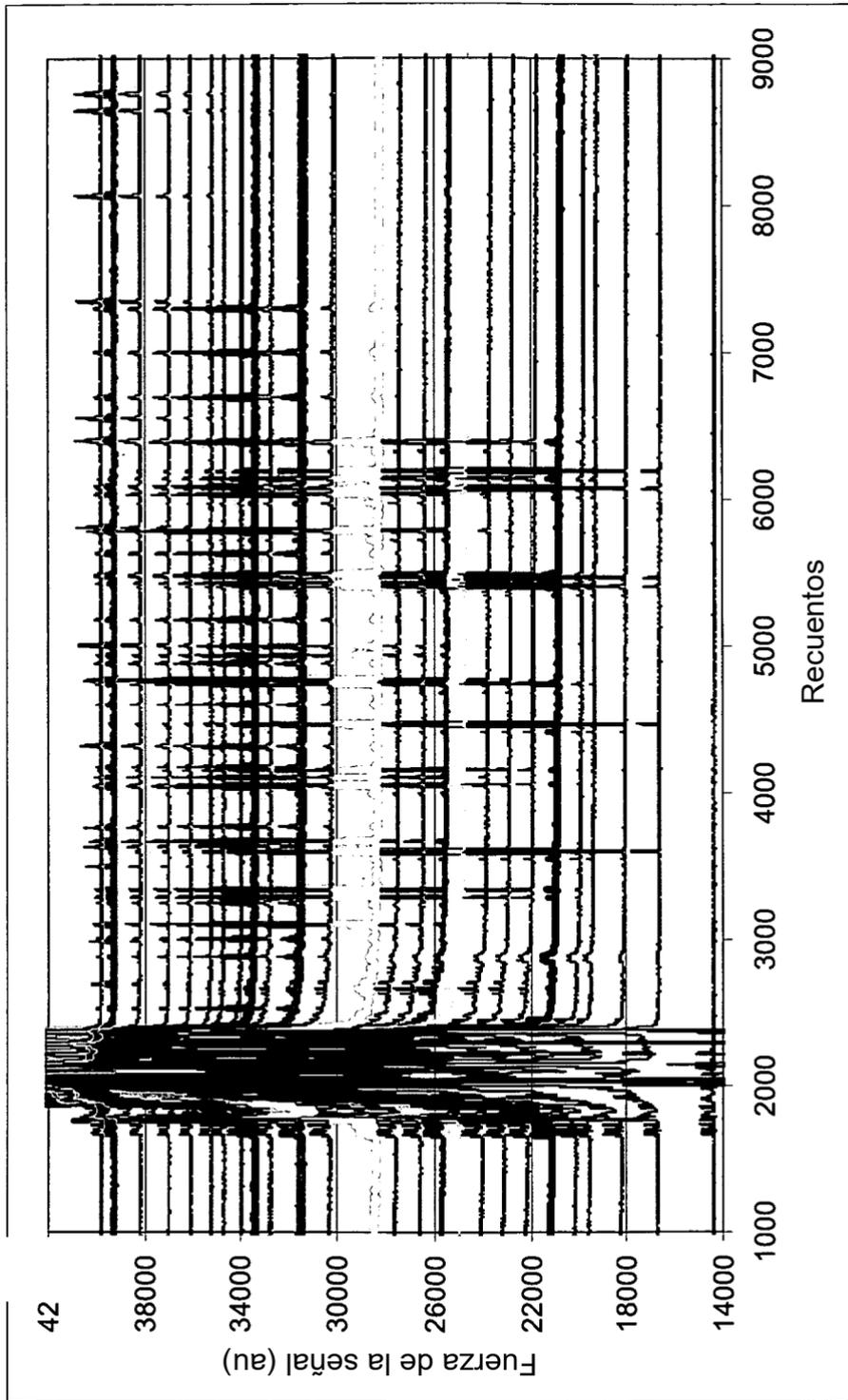


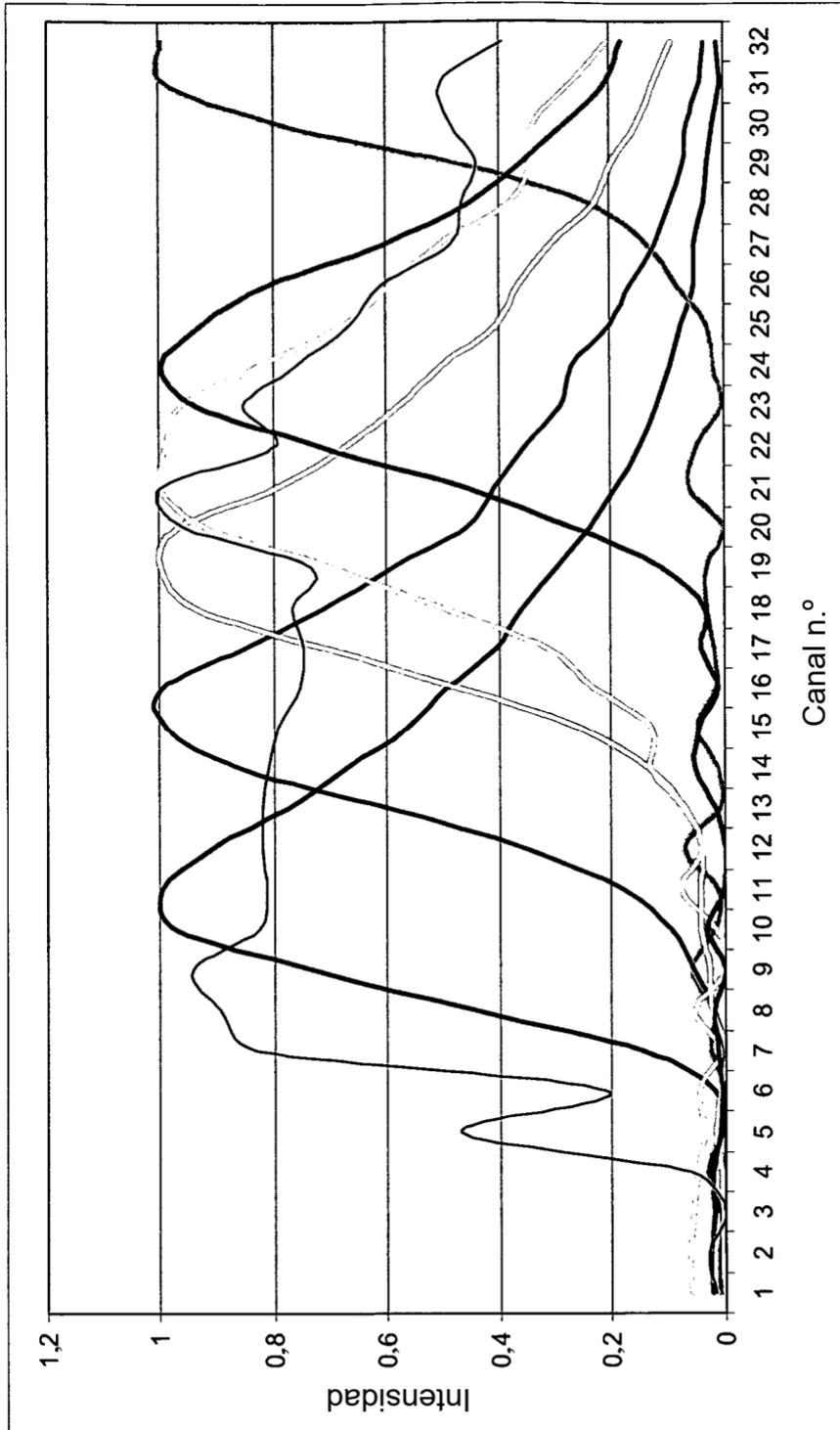
FIGURA 16



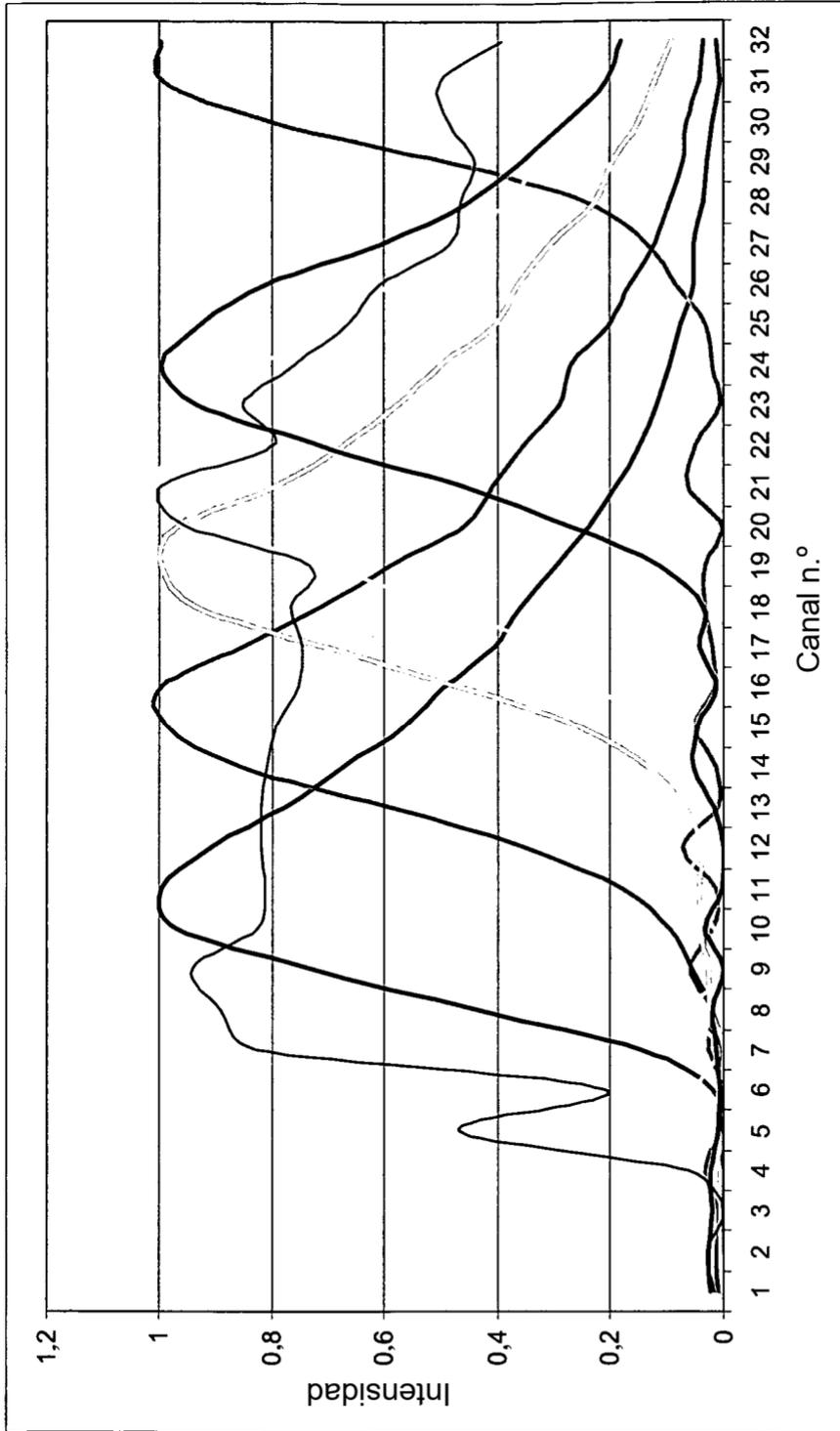
**FIGURA 17**



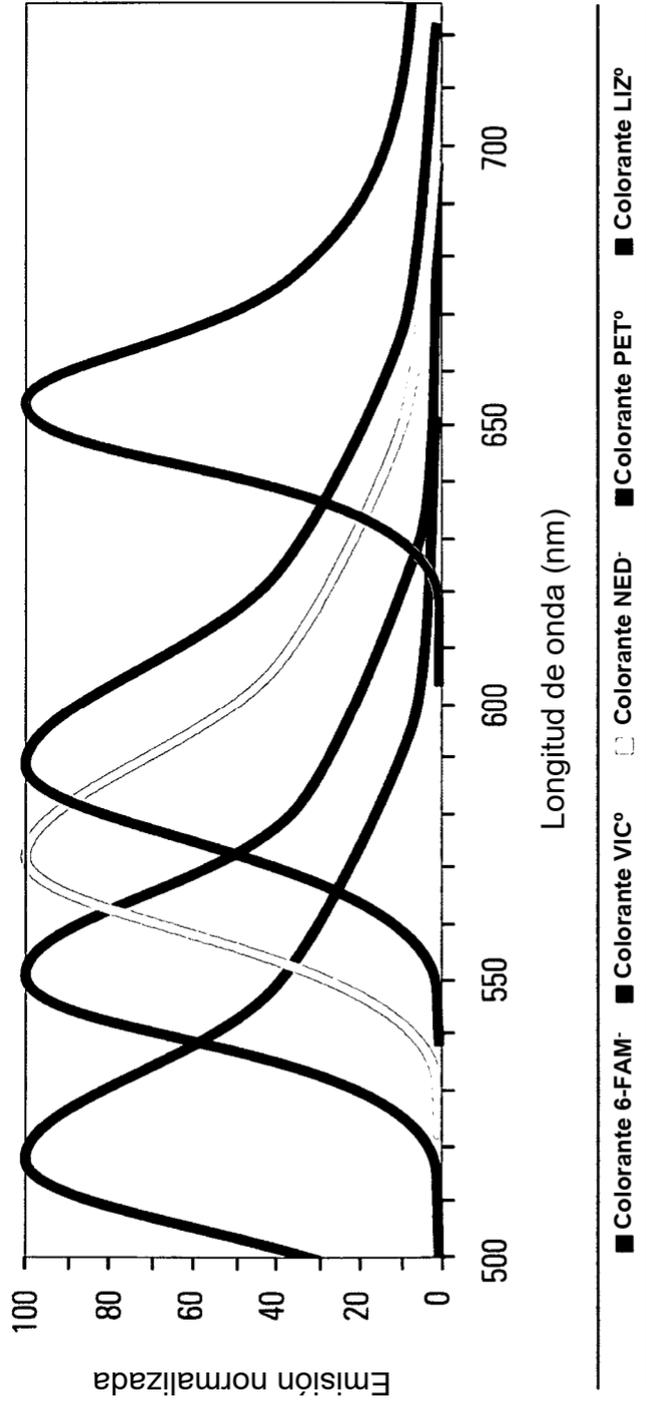
**FIGURA 17**



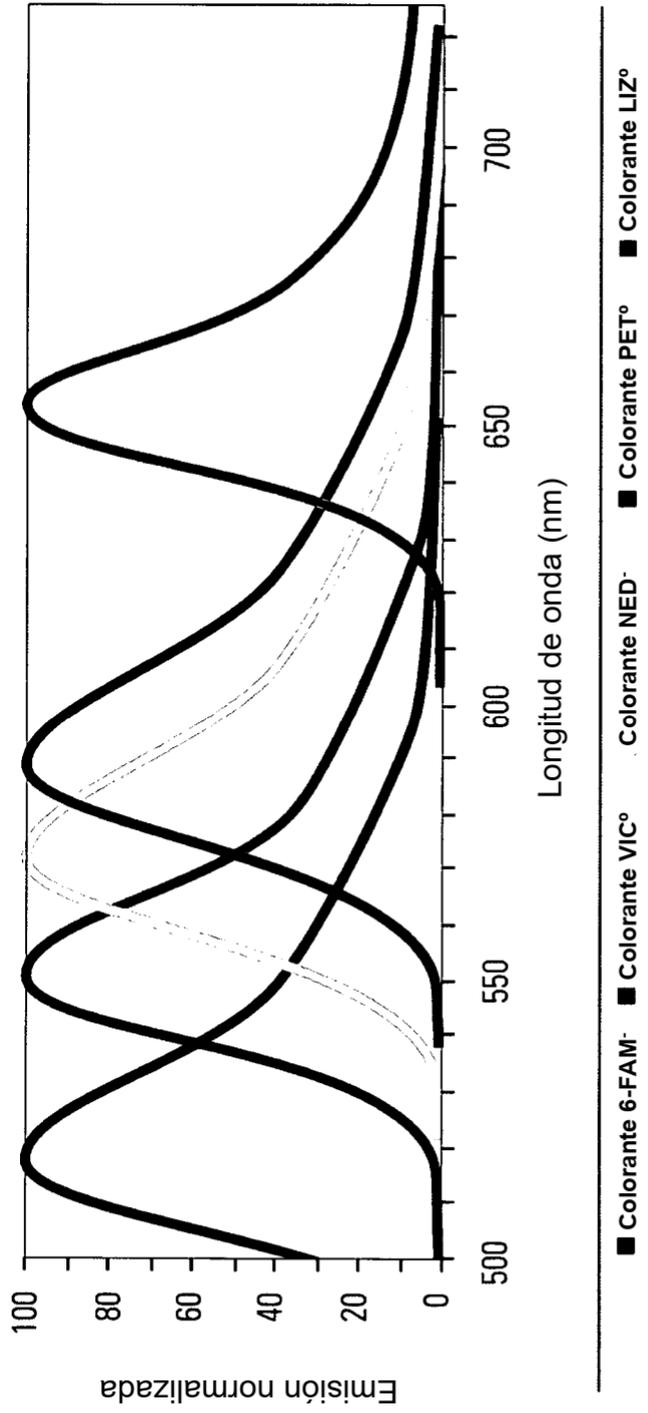
**FIGURA 18**



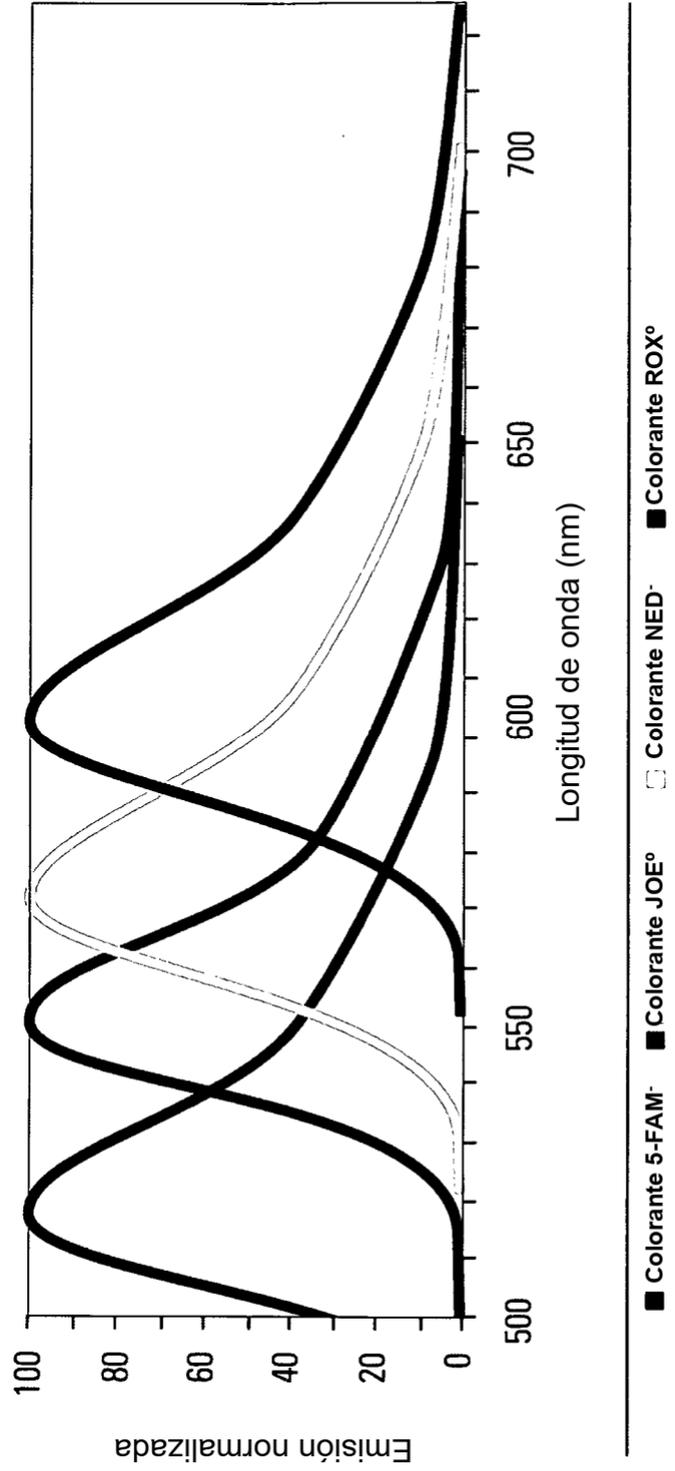
**FIGURA 18**



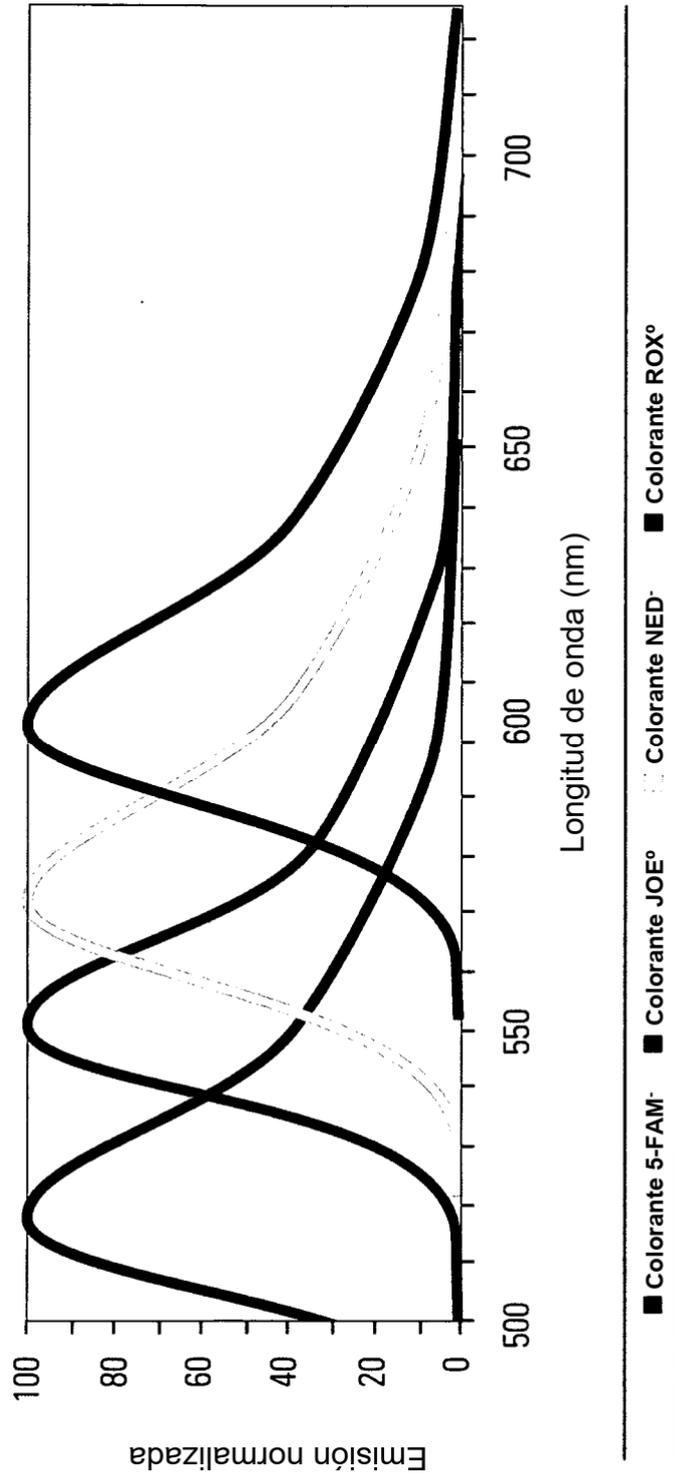
**FIGURA 19**



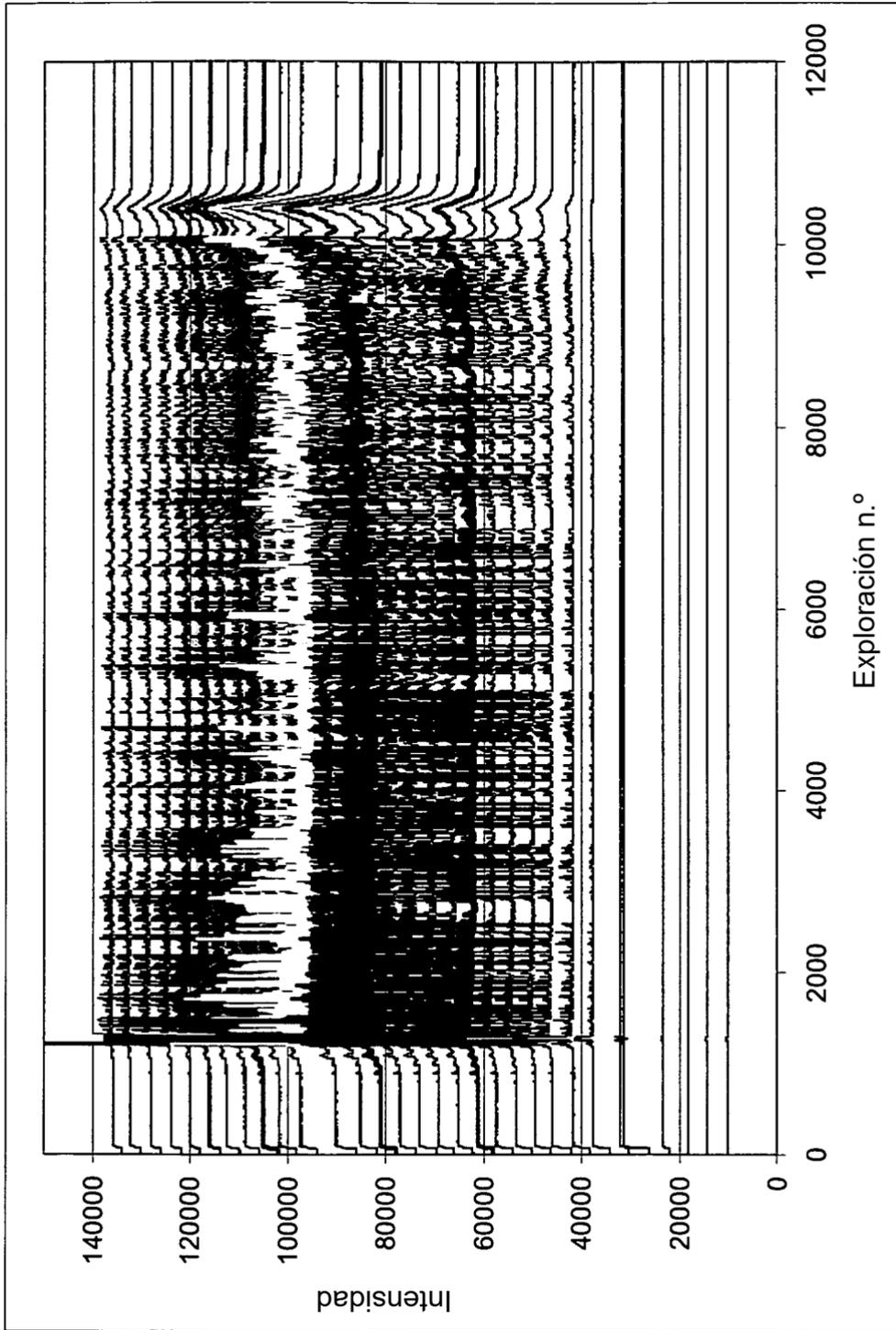
**FIGURA 19**



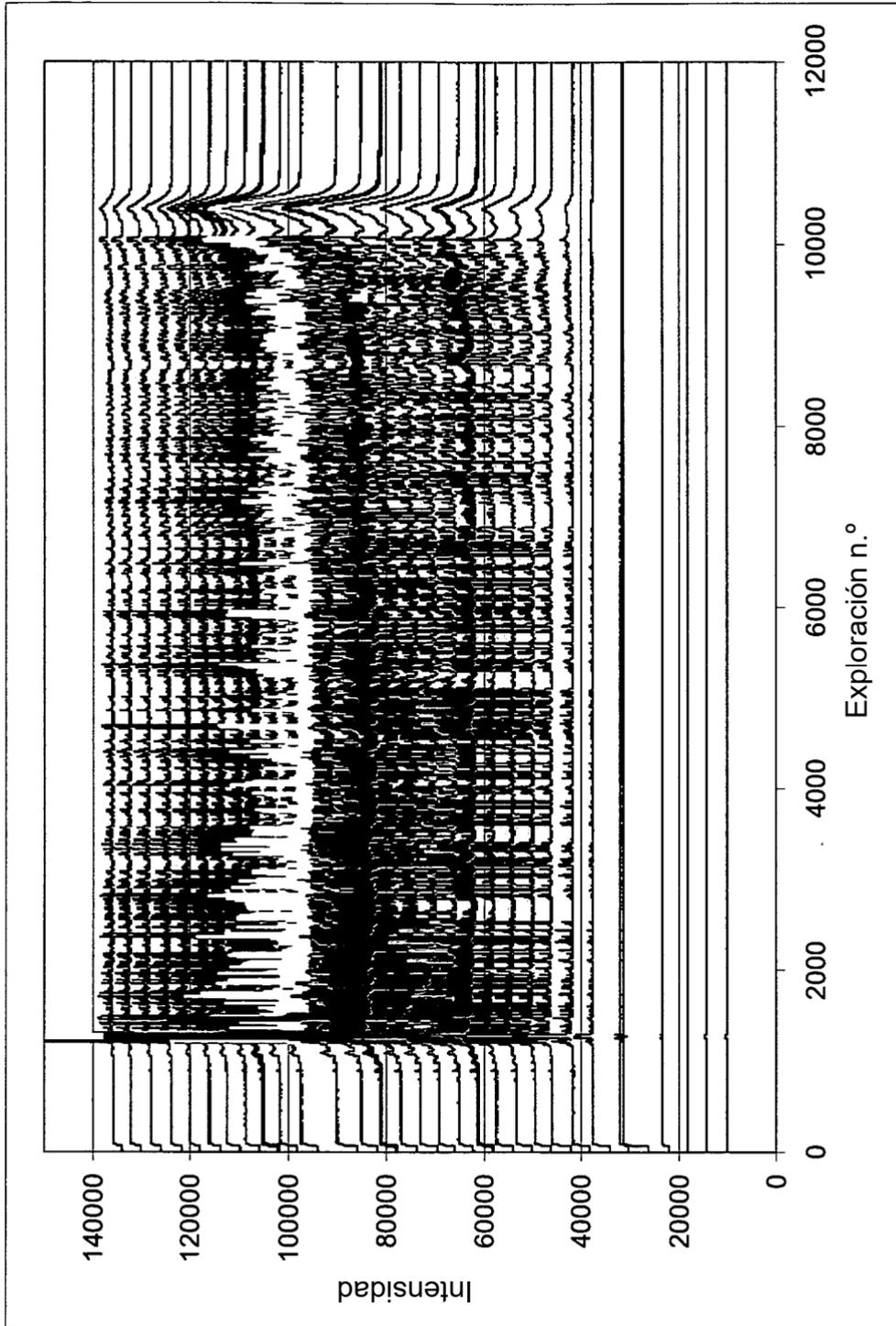
**FIGURA 20**



**FIGURA 20**



**FIGURA 21**



**FIGURA 21**



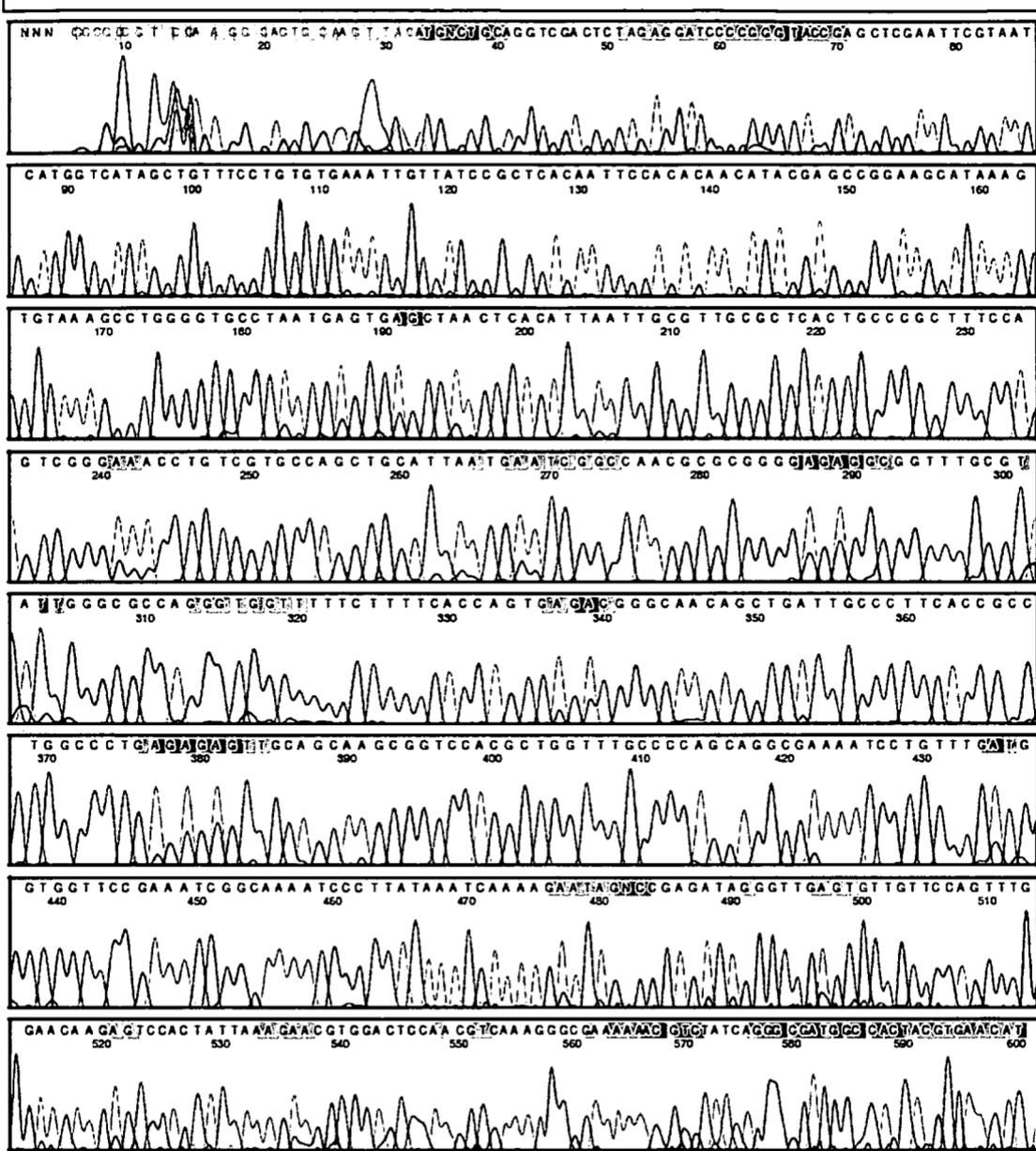


FIGURA 22