



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 15/1017 (2020.02); *B01L 3/502715* (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2017110274, 02.09.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.09.2015

Дата регистрации:
26.05.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
03.09.2014 EP 14183411.9

(43) Дата публикации заявки: 03.10.2018 Бюл. № 28

(45) Опубликовано: 26.05.2020 Бюл. № 15

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 03.04.2017

(86) Заявка РСТ:
EP 2015/070045 (02.09.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/034620 (10.03.2016)

Адрес для переписки:
190000, Санкт-Петербург, BOX-1125,
"ПАТЕНТИКА"

(72) Автор(ы):

БЕНИТЕС ПОРРАС Франсеск (ES),
ПАРЕХА ГОМЕС Хосеп (ES)

(73) Патентообладатель(и):

СТАТ-ДИАГНОСТИКА ЭНД
ИННОВЭЙШН СЛ (ES)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 8747669 B1, 10.06.2014. US 2012/
0107799 A1, 03.05.2012. US 2012/0178179 A1,
12.07.2012. EP 1300680 A2, 09.04.2003. US
20130086998 A1, 11.04.2013. US 2013/0288234 A1,
31.10.2013.

R U
2 7 2 2 0 7 5 C 2

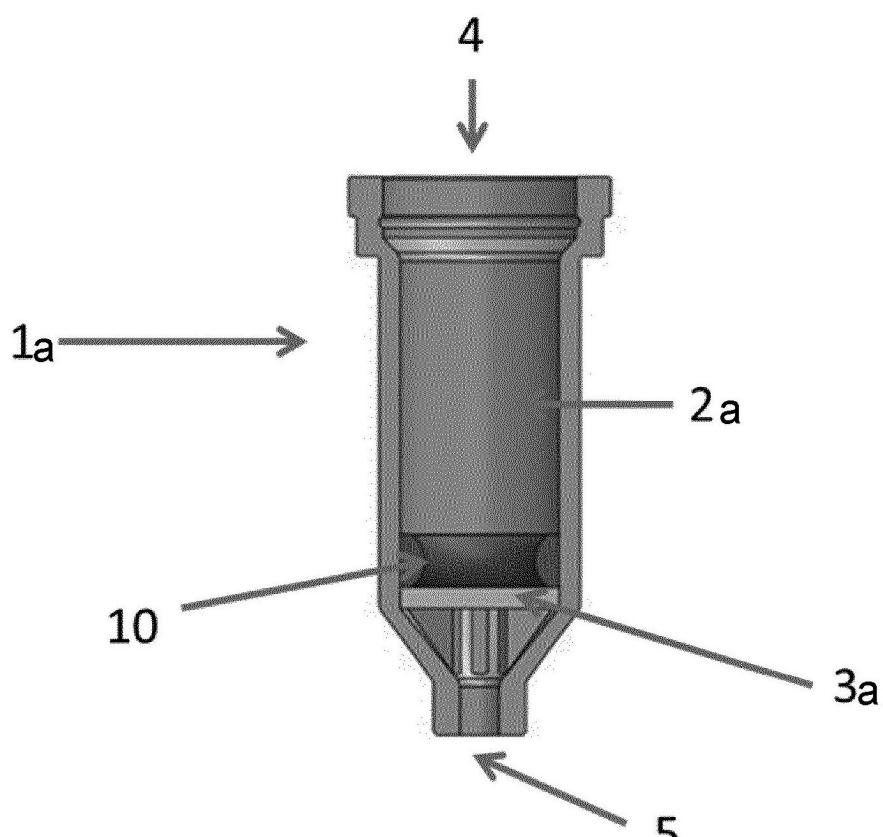
(54) КАРТРИДЖ ДЛЯ ОЧИСТКИ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области биотехнологии. Предложено микрожидкостное устройство для автоматической очистки биологических или химических анализаторов (варианты) и способ очистки биологического или химического анализа из сложного биологического образца (варианты). В одном варианте устройство содержит резервуар, полость очистки, приемный контейнер для отходов и перекрывающий поперечное сечение полости очистки фильтр. В другом варианте устройство содержит замкнутую камеру с фильтром. Причем полость очистки и камера содержат первый порт для газового

обмена с вакуумным генератором, второй порт для жидкостного обмена с резервуаром и третий порт для газового и жидкостного обмена с приемным контейнером. В одном варианте способ включает поступление образца в полость очистки, а в другом варианте поступление образца в камеру, при этом каждый способ включает протекание образца через фильтр в приемный контейнер и элюирование анализа из фильтра. Изобретения обеспечивают непрерывную автоматизированную очистку нуклеиновых кислот. 4 н. и 30 з.п. ф-лы., 1 табл., 16 ил.

R U 2 7 2 2 0 7 5 C 2



ФИГ. 1

R U 2 7 2 2 0 7 5 C 2

R U 2 7 2 2 0 7 5 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 722 075⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
C12M 1/12 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
C12N 15/1017 (2020.02); *B01L 3/502715* (2020.02)

(21)(22) Application: 2017110274, 02.09.2015

(24) Effective date for property rights:
02.09.2015

Registration date:
26.05.2020

Priority:

(30) Convention priority:
03.09.2014 EP 14183411.9

(43) Application published: 03.10.2018 Bull. № 28

(45) Date of publication: 26.05.2020 Bull. № 15

(85) Commencement of national phase: 03.04.2017

(86) PCT application:
EP 2015/070045 (02.09.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/034620 (10.03.2016)

Mail address:
190000, Sankt-Peterburg, BOX-1125,
"PATENTIKA"

(72) Inventor(s):
BENITES PORRAS Fransesk (ES),
PAREKHA GOMES Khosep (ES)

(73) Proprietor(s):
STAT-DIAGNOSTIKA END INNOVEJSHN
SL (ES)

(54) CARTRIDGE FOR PURIFICATION OF NUCLEIC ACID

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: disclosed is a microfluidic device for automatic purification of biological or chemical analytes (versions) and a method of purifying a biological or chemical analyte from a complex biological sample (versions). In one version, the device comprises a reservoir, a cleaning cavity, a receiving container for wastes and a filter overlapping the cross-section of the cleaning cavity. In another version, the device comprises a closed chamber with a filter. Cleaning chamber and chamber comprise first port for

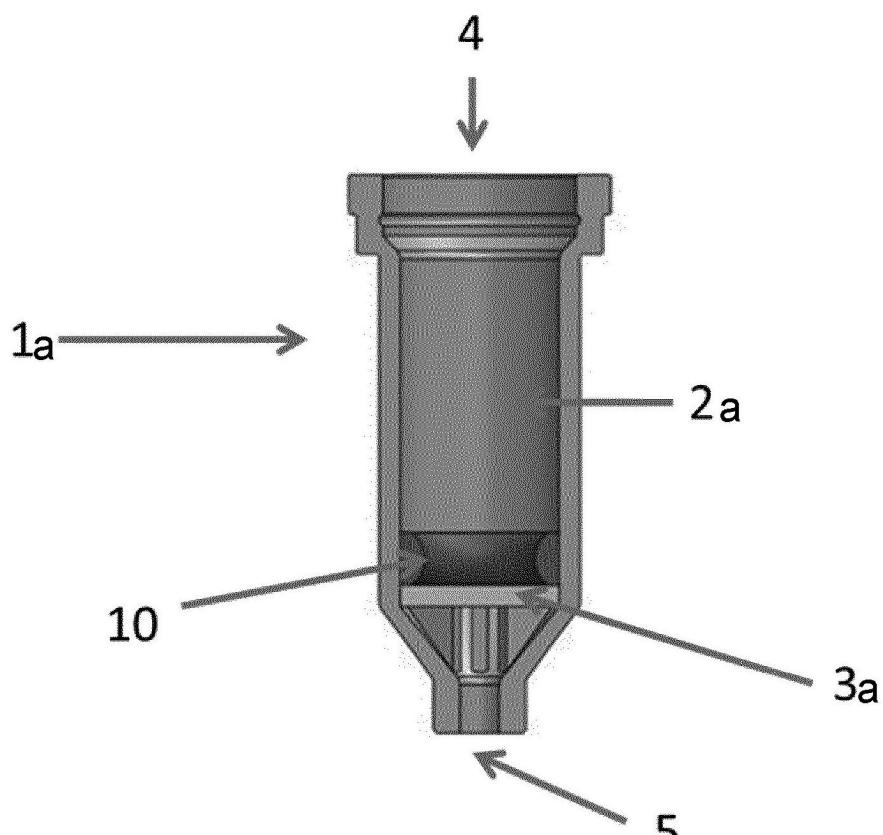
gas exchange with vacuum generator, second port for liquid exchange with reservoir and third port for gas and liquid exchange with receiving container. In one version, the method includes feeding a sample into a cleaning cavity, and in another embodiment, feeding a sample into a chamber, wherein each method involves passing a sample through a filter into a receiving container and eluting the analyte from the filter.

EFFECT: inventions provide continuous automated purification of nucleic acids.

34 cl, 1 tbl, 16 dwg

R U 2 7 2 2 0 7 5 C 2

R U 2 7 2 2 0 7 5 C 2



ФИГ. 1

R U 2 7 2 2 0 7 5 C 2

Введение

[1] Первоначальный способ очистки нуклеиновой кислоты, основанный на сродстве ДНК и РНК к поверхностям двуокиси кремния (адсорбция в твердой фазе), был описан Бумом и др. Притяжению нуклеиновой кислоты к поверхностям двуокиси кремния

5 способствует высокая концентрация хаотропных солей (обычно изотиоцианата гуанидина или гидрохлорида гуанидина). В способе Бума используют раствор хаотропной соли для денатурации биологического образца и принуждения его к прохождению через фильтр с использованием центробежных сил, способствующих адсорбции ДНК и РНК на поверхности двуокиси кремния. После связывания

10 нуклеиновых кислот с фильтром выполняют одну или более операций промывки этаноловыми буферами для удаления хаотропных солей и других биологических примесей при удержании нуклеиновых кислот связанными (в последующих приложениях хаотропные соли являются разрушающими для большинства нуклеиновых кислот). После избавления от этилового спирта (посредством вращения с высокой скоростью)

15 в качестве последней операции необходимо регидратировать нуклеиновые кислоты с использованием элюирующего буферного раствора (вода или буфер с низкой концентрацией соли). Регидратация способствует отделению ДНК и РНК от поверхности двуокиси кремния, а конечное вращение обеспечивает раствор, в котором очищенные нуклеиновые кислоты ресуспендированы.

20 [2] Разновидности этого протокола были описаны в другом месте с использованием центробежной силы или вакуума в качестве движущей силы потока жидкости. Однако все эти способы достаточно громоздки и занимают много времени, поскольку включают несколько операций дозирования пипеткой и последовательное приложение различных движущих сил для управления потоком жидкости, что обычно дает высокую

25 изменчивость выхода для повторяемых процессов очистки.

[3] Например, при ручном выполнении протокола очистки посредством вакуума процесс очистки состоит из 5 основных операций, соответствующих потоку 5 различных жидкостей через фильтр из двуокиси кремния, а именно: смеси образца, содержащей нуклеиновые кислоты, промывочного буфера 1 и промывочного буфера 2 для промывки 30 фильтра и удаления любых количеств загрязняющих веществ, воздуха для высушивания фильтра и удаления любых следов летучих загрязняющих веществ, и элюирующего буфера для высвобождения нуклеиновых кислот из фильтра с возможностью дальнейшей доступности нуклеиновых кислот для последующих приложений (таких как амплификация и обнаружение при проведении количественной полимеразной цепной 35 реакции). В конце каждой операции в течение одной или двух минут поддерживают вакуумное отсасывание даже после протекания объема жидкости через фильтр. Это гарантирует, что практически никакая жидкость не осталась внутри щелей фильтра перед закапыванием следующей жидкости.

[4] Воспроизводимость выхода нуклеиновых кислот зависит от возможности 40 воспроизведения времени контакта образца и буферов с фильтром, а также величины и распределения жидкого потока, что зависит от навыков оператора.

[5] Таким образом, задача настоящего изобретения состоит в разработке устройства очистки, обеспечивающего воспроизводимые результаты очистки, не зависящие от отдельного оператора.

45 [6] Это достигнуто посредством микрожидкостного устройства и способа для очистки биологических или химических анализаторов из сложного биологического образца.

Микрожидкостное устройство содержит камеру со встроенным фильтром, несколько резервуаров и клапанов. Устройство может быть связано с внешними насосами, которые

работают посредством автоматизированного инструмента. Таким образом, предлагаемые устройство и способ обеспечивают непрерывное автоматизированное выполнение классического способа очистки нуклеиновой кислоты.

ОПИСАНИЕ

- [7] Настоящее изобретение относится к микроридкостному устройству, содержащему замкнутую камеру, содержащую фильтр для очистки биологических или химических анализов из сложного биологического образца, причем указанная камера содержит множество портов в дополнение к указанному фильтру, как изложено ниже:
- 5 первый порт, обеспечивающий возможность газового обмена камеры с вакуумным генератором через первый путь потока;
 - 10 второй порт, обеспечивающий возможность жидкостного обмена камеры с одним или большим количеством резервуаров через второй путь потока;
 - 15 третий порт, обеспечивающий возможность газового и жидкостного обмена камеры с одним или большим количеством приемных контейнеров и с вакуумным генератором через третий путь потока; и
 - 20 фильтр, размещенный между третьим портом и первым и вторым портами так, что текучая среда, входящая в камеру через первый и/или второй порт и выходящая из камеры через третий порт, протекает через фильтр.
- [8] Раскрытое здесь изобретение также относится к способу очистки биологического или химического аналита из сложного биологического образца с использованием раскрытоого здесь микроридкостного устройства, причем способ включает следующие операции:
- 25 (a) обеспечение возможности поступления жидкого образца в камеру через второй порт посредством приложения отрицательной разности давлений между камерой и первым резервуаром с открытием при этом клапанов внутри путей потока для первого и второго портов и закрытием для третьего порта;
 - 30 (b) обеспечение возможности протекания образца через фильтр в первый приемный контейнер посредством приложения отрицательной разности давлений между указанным первым приемным контейнером и камерой с открытием при этом клапанов внутри путей потока для первого порта, продувкой до атмосферного давления для второго порта и открытием для третьего порта; и
 - 35 (c) элюирование аналита из фильтра посредством приложения отрицательной разности давлений между камерой и одним из приемных контейнеров с открытием при этом клапанов внутри путей потока для первого и второго портов и закрытием для третьего порта.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- [9] Очистка может в принципе быть основана на любом эффекте, широко известном в хроматографии (например, на вытеснении, сродстве, катионном обмене, анионном обмене, эксклюзии, обращенной фазе и нормальной фазе), и его выбор, главным образом, зависит от подлежащего очистке аналита. Эксклюзионная хроматография, однако, менее предпочтительна по сравнению с другими методиками, поскольку постоянная связь не может быть достигнута в случае первой методики. Что касается последней, то могут быть обнаружены условия, при которых подлежащий очистке анализ может быть выборочно связан со средой, а другие составные части образца в идеале проходят через среду без закрепления.

[10] Микроридкостное устройство согласно настоящему изобретению включает замкнутую камеру, содержащую фильтр. Фильтр в настоящем описании обозначает среду, которая дифференцированно взаимодействует с различными составными частями

образца. В обычной хроматографии такую среду обычно называют стационарной фазой. Дифференциальное взаимодействие (также называемое разделением) вызывает различные времена удержания и, таким образом, очистительный эффект при перемещении в соответствующем буфере (в хроматографии обычно называемом подвижной фазой) через указанную среду.

[11] Фильтр, используемый в раскрытом в настоящем описании устройстве, представляет собой фильтр, приспособленный для очистки биологических или химических анализов из сложного биологического образца. Анализ представляет собой материал, подлежащий очистке. Сложный биологический образец представляет собой образец, содержащий кроме подлежащего очистке анализа много различных составных частей различного размера и химической природы, таких как протеины, нуклеиновые кислоты, гормоны, липиды, соли. Предпочтительный образец представляет собой лизат клетки.

[12] В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения фильтр выполнен из двуокиси кремния или по меньшей мере содержит ее. Например, фильтр может быть выполнен в виде мембранны из двуокиси кремния или смолы, содержащей или гранулы из двуокиси кремния или гранулы, покрытые двуокисью кремния. Поверхности из двуокиси кремния пригодны для отделения или очищения нуклеиновых кислот, в частности ДНК. Двуокись кремния, как известно, адсорбирует молекулы ДНК при определенных концентрации солей и значении рН, и адсорбция двуокисью кремния стала важной методикой для очистки ДНК.

[13] В одном варианте реализации настоящего изобретения элемент фильтра интегрирован в полость очистки и закреплен фиксационным кольцом. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения очистительные мембранные фильтры вставлены в полость, которая представляет собой часть корпуса микроридкостного устройства, и мембранный фильтр удерживается в определенном положении фиксационным кольцом, которое сжимает его (фиг. 2А и 2В).

[14] В альтернативном варианте реализации настоящего изобретения полость очистки представляет собой отдельную часть, которая собрана в микроридкостном устройстве и устраняет необходимость в фиксационном кольце, удерживающем мембранный фильтр на месте. Сама полость очистки снабжена элементом зажима, который фиксирует полость и мембранный фильтр в определенном положении с правильным сжатием мембранны (фиг. 2С и 2Д).

[15] Отдельная полость, удерживаемая в определенном положении, предпочтительно элементом зажима, имеет несколько преимуществ по сравнению с полостями, содержащими фиксационное кольцо.

[16] Воспроизводимое сжатие мембранны фильтра достигнуто посредством элемента зажима. Это гарантирует воспроизводимое сжатие, обеспечивающее воспроизводимый поток жидкостей через мембранный фильтр и, следовательно, воспроизводимый выход очищенных нуклеиновых кислот или другого очищенного анализа.

[17] Правильное расположение полости очистки в микроридкостном устройстве предпочтительно гарантировано его элементом зажима без необходимости управления величиной сжатия, задаваемой конструкцией. Это облегчает производство.

[18] Полость очистки устраняет необходимость в фиксационном кольце, что приводит к уменьшению загрязнения образца. Фиксационные кольца разрывают путь текучей среды и собирают остатки жидкостей, что образует загрязнение между буферами и приводит к определенному количеству загрязняющих веществ в окончательном очищенном элюяте, что может воспрепятствовать проведению последующего анализа,

например, полимеразной цепной реакции. Съемная полость очистки обеспечивает плавное перемещение на своих стенках, что уменьшает количество загрязняющих веществ, способных прилипать к стенке, обычно в 5-10 раз.

[19] Предпочтительно аналиты представляют собой нуклеиновые кислоты. Термин

- 5 нуклеиновая кислота включает информационную РНК в обработанной и необработанной формах, транспортную РНК, гетерогенную ядерную РНК, рибосомную РНК, запертую нуклеиновую кислоту, митохондриальную РНК, ядерную РНК, малую интерферирующую РНК, малую ядерную РНК, малую ядрышковую РНК, малую специфическую к тельцам Кахаля РНК, микроРНК, двухцепочечную РНК, рибозимы,
- 10 рибопереключатели, вирусную РНК, двухспиральную ДНК, одноцепочечную ДНК, плазмидную ДНК, космидную ДНК, хромосомную ДНК, вирусную ДНК, митохондриальную ДНК, ядерную ДНК, малую ядерную ДНК или аналогичные или также все другие возможные нуклеиновые кислоты.

[20] Камера обладает множеством портов в дополнение к указанному фильтру, а

- 15 именно: первый порт, обеспечивающий возможность газового обмена камеры с вакуумным генератором через первый путь потока; второй порт, обеспечивающий возможность жидкостного обмена камеры с одним или большим количеством резервуаров через второй путь потока; третий порт, обеспечивающий возможность газового и жидкостного обмена камеры с одним или большим количеством приемных
- 20 контейнеров и с вакуумным генератором через третий путь потока.

[21] Вакуумный генератор расположен выше по течению от камеры. Один или большее количество резервуаров также расположены выше по течению от камеры, но в другом пути потока, чем вакуумный генератор. Один или большее количество приемных контейнеров расположены ниже по течению от камеры. Далее ниже по

- 25 течению от приемного контейнера(-ов) размещен вакуумный генератор третьего пути потока.

[22] Резервуар(-ы) обычно представляет собой по меньшей мере один резервуар, содержащий подлежащий очистке образец, и при необходимости один или большее количество резервуаров, содержащих один или большее количество промывочных

- 30 буферов и/или элюирующий буфер и/или буфер регенерации. Один или большее количество контейнеров обычно представляет собой по меньшей мере один контейнер для приема аналита и при необходимости один или большее количество контейнеров для приема других жидкостей, например, элюата, промывочного буфера(-ов) и/или буфера(-ов) регенерации.

- 35 [23] Фильтр расположен между третьим портом и первым и вторым портами, так что текучая среда, входящая в камеру через первый и/или второй порт и выходящая из камеры через третий порт, протекает через фильтр. Наиболее удобно расположение фильтра по полному поперечному сечению камеры. Однако, нет необходимости заполнения средой до полной высоты камеры. Предпочтительно размещение фильтра
- 40 непосредственно над третьим портом.

[24] В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения устройство представляет собой микрожидкостной картридж. Картридж означает расходный компонент, приводимый в действие большим узлом через соответствующий интерфейс. Обычно узел содержит дорогостоящие и/или долговечные элементы или элементы,

- 45 которые легко чистить, и часть программного кода для автоматизации управления процессом. Узел может альтернативно содержать дополнительные элементы для выполнения других процессов выше по течению или ниже по течению от узла очистки.

[25] В одном варианте реализации настоящего изобретения устройство выполнено

одноразовым, что означает, что устройство предназначено для однократного использования с последующим удалением. В другом варианте реализации устройство выполнено повторно используемым, что обычно требует регенерации устройства после каждого использования.

5 [26] Устройство может дополнительно содержать клапаны, которые в идеале изолируют вакуумный генератор. Вакуумный генератор откачивает давление камеры, образуя, таким образом, относительное отрицательное давление. В зависимости от конфигурации портов (то есть, их открытости или закрытости) происходит всасывание текучей среды из одного из резервуаров в камеру и/или из камеры в один из приемных 10 контейнеров. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения вакуумный генератор представляет собой шприцевой насос или диафрагменный насос. В еще одном предпочтительном варианте реализации вакуум может быть приложен к первому порту и/или третьему порту посредством одного и того же вакуумного генератора.

15 [27] Известные микрожидкостные устройства не содержат средств слежения за давлением в системе. Настоящее изобретение предпочтительно содержит один или большее количество датчиков давления. Датчик давления предпочтительно расположен внутри третьего пути потока выше по течению от приемных контейнеров. Другой датчик давления предпочтительно расположен внутри первого пути потока ниже по 20 течению от вакуумного генератора. Вышеупомянутые датчики давления могут быть использованы для определения падения давления, вызванного фильтром, что указывает на флюидное состояние фильтра. Таким образом, можно определить:

(i) момент окончания операции способа, минимизируя тем самым время и объем буферов (например, момент полного высушивания фильтра во время операции сушки);
 25 (ii) момент достаточного очищения от жидких остатков во время операций очистки, которые предпочтительно имеют место после потока каждой жидкости и перед потоком следующей жидкости;

(iii) протекли ли жидкости полностью через фильтр, что обеспечивает системе возможность приложить 'своевременное' увеличение давления всасывания при 30 увеличенной сопротивляемости потоку жидкости вследствие плотности и вязкости образца;

(iv) время, необходимое для протекания каждой жидкости через фильтр, которое может быть сравнено с заданным пороговым значением для управления способом 35 очистки.

[28] Как описано выше, раскрытое в настоящем описании устройство содержит три порта для связи с камерой: первый порт (порт для выпуска газа), второй порт (порт для впуска жидкости) и третий порт (порт для выпуска жидкости/газа). Каждый порт может быть индивидуально открыт, закрыт или продут в атмосферу посредством 40 клапана, расположенного внутри соответствующего пути потока. Удобно использование многопортовых клапанов и, при необходимости, двух или трех портов, активируемых одним многопортовым клапаном. В предпочтительном варианте реализации глухой объем, огражденный третьим путем потока между его соответствующим клапаном и фильтром, составляет величину от 1 мкл до 10 мл. Управляемый поток жидкостей 45 (включая ситуацию без потоков для полного увлажнения фильтра) достигнут посредством приложения вакуума к соответствующему порту и открытия и закрытия соответствующих клапанов в ходе каждой операции. Это обеспечивает устройству более высокую воспроизводимость по сравнению с известными устройствами независимо

от биологического типа образца.

[29] Например, в известном комплекте очистки с ручным выполнением очистительного протокола посредством вакуума процесс очистки включает пять основных операций, соответствующих потоку пяти различных жидкостей через фильтр, 5 а именно, загрузку смеси образца, содержащей нуклеиновые кислоты, промывку промывочным буфером 1 и промывочным буфером 2 для прополаскивания фильтра и удаления любых количеств загрязняющих веществ, высушивание фильтра воздухом, удаление любых следов летучих загрязняющих веществ, и элюирование для выпуска нуклеиновых кислот из фильтра с возможностью дальнейшей их доступности для 10 находящихся ниже по течению приложений (таких как амплификация и обнаружение количественной полимеразной цепной реакции). В конце каждой операции в течение одной или двух минут поддерживают вакуумное отсасывание даже после протекания объема жидкости через фильтр для гарантии того, что практически никакая жидкость не осталась внутри щелей фильтра перед закапыванием следующей жидкости (этую 15 операцию называют продувкой).

[30] Для достижения того же самого эффекта автоматизированный протокол включает в основном те же самые операции, достигаемые посредством соединения каждого порта с соответствующими резервуарами и приложения соответствующих перепадов давления в любой момент времени посредством источника давления 20 (например, шприцевого насоса или ротационного насоса), совокупности клапанов, совокупности микрорезервуаров и микроконтроллера с использованием программного обеспечения для автоматизации всех операций.

[31] Раскрытое в настоящем описании микрорезервуарное устройство в частности предназначено для использования в способах, в которых один или большее количество 25 анализаторов должны быть отделены от других составных частей, то есть, в способе очистки. Таким образом, другая задача настоящего изобретения представляет собой способ очистки биологического или химического анализа из сложного биологического образца при использовании раскрытоего в настоящем описании микрорезервуарного устройства, причем способ включает следующие операции:

30 (a) обеспечение возможности поступления жидкого образца в камеру через второй порт посредством приложения отрицательной разности давлений между камерой и первым резервуаром с открытием при этом клапанов внутри путей потока для первого и второго портов и закрытием для третьего порта;

(b) обеспечение возможности протекания образца через фильтр в первый приемный 35 контейнер посредством приложения отрицательной разности давлений между указанным первым приемным контейнером и камерой с закрытием при этом клапанов внутри путей потока для первого порта, продувкой до атмосферного давления для второго порта и открытием для третьего порта; и

(c) элюирование анализа из фильтра посредством приложения отрицательной 40 разности давлений между камерой и одним из приемных контейнеров с открытием при этом клапанов внутри путей потока для первого и второго портов и закрытием для третьего порта.

[32] Давление в операции (a) может быть выработано вакуумным генератором, расположенным в первом пути потока. Давление в операции (b) может быть выработано 45 вакуумным генератором, расположенным в третьем пути потока.

[33] Элюирование в операции (c) может быть детально выполнена следующим образом:

i) обеспечение возможности поступления элюирующего буфера, содержащегося в

третьем резервуаре, в камеру через второй порт, посредством приложения отрицательной разности давлений между камерой и третьим резервуаром с открытием при этом клапанов внутри путей потока для первого и второго портов и закрытием для третьего порта; давление может быть выработано вакуумным генератором, расположенным в

5 первом пути потока;

ii) обеспечение возможности контакта элюирующего буфера с фильтром в течение заданного времени с открытием при этом клапанов клапаны внутри путей потока для первого и второго портов и закрытием для третьего порта; эта операция обеспечивает увлажнение фильтра, достаточное для выделения нужного анализа; и

10 iii) обеспечение возможности протекания элюирующего буфера (содержащего

выделенный анализ) через фильтр во второй приемный контейнер посредством приложения отрицательной разности давлений между указанным вторым приемным контейнером и камерой с закрытием при этом клапанов внутри путей потока для первого порта, продувкой до атмосферного давления для второго порта и открытием

15 для третьего порта; давление может быть выработано вакуумным генератором третьего пути потока.

[34] В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает между операциями (a) и (b) операцию, обеспечивающую возможность контакта образца с фильтром в течение заданного времени, причем

20 клапаны внутри путей потока оставлены открытыми для первого и второго портов и закрытыми для третьего порта.

[35] Способ может при необходимости включать между операциями (b) и (c) одну или большее количество из следующих операций:

(i) очистка и сушка фильтра в течение заданного времени посредством приложения

25 отрицательного давления между третьим путем потока и камерой, причем указанная разность отрицательного давления выработана вакуумным генератором, расположенным в третьем пути потока, клапаны внутри путей потока закрыты для первого порта, продуты до атмосферного давления для второго порта и открыты для третьего порта; и/или

30 (ii) обеспечение возможности поступления промывочного буфера, расположенного во втором резервуаре, в камеру через второй порт и его протекания через фильтр в приемный контейнер посредством приложения отрицательной разности давлений между указанным приемным контейнером и указанным вторым резервуаром, причем клапаны в путях текучей среды открыты для второго и третьего портов и закрыты для первого порта; давление может быть выработано вакуумным генератором, расположенным в

35 третьем пути потока; и/или

iii) обеспечение возможности протекания газа через фильтр в течение заданного времени посредством приложения отрицательного давления между третьим путем потока и камерой, причем клапаны внутри путей потока закрыты для первого порта,

40 продуты до атмосферного давления для второго порта и открыты для третьего порта; газ вытесняет жидкость и сушит фильтр; давление может быть выработано вакуумным генератором, расположенным в третьем пути потока.

[36] В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения перепад давления определен для определения того, когда один или большее количество клапанов 45 должны быть переключены и, таким образом, следующая операция способа должна быть выполнена. Падение давления через фильтр указывает, что клапан(-ы) может быть активирован для выполнения последующей операции способа.

[37] В еще более предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения

поток газа для высушивания фильтра применяют, только если величина первой производной перепада давления между первым и вторым датчиками давления ниже заданного порогового значения.

[38] В таблице 1 приведены подробности одного примера операций способа,

подлежащих выполнению для процесса очистки автоматическими средствами.

Диаграммы текущей среды, показанные на фигурах, показывают конфигурацию порта/клапана для каждой из указанных операций.

Таблица 1. Детальный протокол для примера процесса очистки.

10	Образец	Операция 1	фигура 3	Начальная операция – помещение образца в фильтр очистки
		Операция 2	фигура 4	Помещение образца в фильтр очистки (перемещение плунжера)
		Операция 3	фигура 5	Сброс давления
		Операция 4	фигура 6	Возврат плунжера в исходное положение
		Операция 5	фигура 7	Инкубация образца
		Операция 6	фигура 8	Перемещение образца из фильтра очистки в отходы/контейнер № 13(перемещение плунжера)
		Операция 7	фигура 5	Сброс давления
		Операция 8	фигура 6	Возврат плунжера в исходное положение
		Операция 9	фигура 9	Продувка
15	Промывочный буфер 1 (клапан №7- > позиция 2; резервуар № 16)	Операция 10	фигура 3	Перемещение промывочного буфера 1 в фильтр очистки
		Операция 11	фигура 4	Перемещение промывочного буфера 1 в фильтр очистки (перемещение плунжера)
		Операция 12	фигура 5	Сброс давления
		Операция 13	фигура 6	Возврат плунжера в исходное положение
		Операция 14	фигура 7	Инкубация промывочного буфера 1
		Операция 15	фигура 8	Перемещение промывочного буфера 1 из фильтра очистки в отходы/контейнер № 13 (перемещение плунжера)
		Операция 16	фигура 5	Сброс давления
		Операция 17	фигура 6	Возврат плунжера в исходное положение
		Операция 18	фигура 9	Продувка
25		Операция 19	фигура 3	Перемещение промывочного буфера 2 в фильтр очистки
30	Промывочный буфер 2 (клапан №7- > позиция 3; резервуар № 17) (перемещение плунжера)	Операция 20	фигура 4	Перемещение промывочного буфера 2 в фильтр очистки (перемещение плунжера)
		Операция 21	фигура 5	Сброс давления
		Операция 22	фигура 6	Возврат плунжера в исходное положение
		Операция 23	фигура 7	Инкубация промывочного буфера 2
		Операция 24	фигура 8	Перемещение промывочного буфера 1 из фильтра очистки в отходы/контейнер № 13
		Операция 25	фигура 5	Сброс давления
		Операция 26	фигура 6	Возврат плунжера в исходное положение
		Операция 27	фигура 9	Продувка
		Высушивание	фигура 10	Высушивание фильтра очистки
35	Элюирование (клапан № 7 -> позиция 4; резервуар № 18)	Операция 29	фигура 3	Перемещение элюирующего буфера в фильтр очистки
		Операция 30	фигура 4	Перемещение элюирующего буфера в фильтр очистки (перемещение плунжера)
		Операция 31	фигура 5	Сброс давления
		Операция 32	фигура 6	Возврат плунжера в исходное положение
		Операция 33	фигура 11	Инкубация элюирующего буфера
40	Элюирование	Операция 34	фигура 12	Перемещение элюирующего буфера из фильтра очистки в контейнер № 14 (перемещение плунжера)

[39] Преимущество настоящего изобретения состоит в том, что может быть достигнута полная автоматизация, и никакие проводимые вручную операции не нужны для выполнения процесса очистки, что, таким образом, обеспечивает воспроизводимость результатов. Кроме того, устройство/процесс очистки могут быть связаны с другими размещенными выше или ниже по течению устройствами/процессами (например, связанными с лизисом, амплификацией и регистрацией). В отличие от известного уровня техники происходит перемещение жидкостей в камеру и на фильтр посредством вакуума, прилагаемого к первому порту при закрытом третьем порте. Это предотвращает поток

через фильтр, что обеспечивает возможность предварительного увлажнения фильтра в течение заданного времени инкубации. Перемещение жидкостей через фильтр происходит посредством вакуума, приложенного к третьему порту после открытия клапана этого порта. В целом, равные или увеличенные выходы нуклеиновой кислоты 5 получены по сравнению с известными способами.

Краткое описание чертежей

[40] На фиг. 1 показана очистительная колонна (1а) из коммерческого комплекта для ручной очистки, содержащая пластмассовый корпус (2а) и мембранный фильтр (3а), сжимаемый и удерживаемый на месте фиксационным кольцом (10). Пластмассовый 10 корпус содержит отверстие (4) для поступления жидкости и отверстие (5) для выхода жидкости.

[41] На фиг. 2А показана часть микрожидкостного устройства (100) с интегрированной полостью (101) очистки и мембранным фильтром (3а), удерживаемым на месте фиксационным кольцом (10).

[42] На фиг. 2В показан повернутый вид микрожидкостного устройства (100) с интегрированной полостью (101) очистки и мембранным фильтром (3а), удерживаемым на месте фиксационным кольцом (10). Также показаны газовый порт (102), порт (103) впуска жидкости и порт (104) выпуска, связанные с полостью (101) очистки.

[43] На фиг. 2С показана отдельная полость (200) очистки.

[44] На фиг. 2Д показана полость (200) очистки, собранная в микрожидкостном устройстве (100). Элемент (201) зажима удерживает на месте полость (200) очистки и прилагает правильное сжатие к мембранныму фильтру (3а). Также показаны газовый порт (203), порт (204) впуска жидкости и порт (205) выпуска.

[45] На фиг. 2Е показана конфигурация порта и направление потока во время загрузки 25 жидкости (операция 1) и промывки/элюирования (операция 2). Сплошная стрелка указывает на поток жидкости; пунктирная стрелка указывает на поток газа; X указывает на порт, закрытый клапаном.

[46] На фиг. 3-11 показаны детализированные диаграммы текучей среды, 30 указывающие на конфигурацию порта/клапана для каждого из шагов, детализированных в таблице 1. Следует понимать, что устройство согласно настоящему изобретению может содержать, но не обязательно содержит, каждый из элементов, показанных на фигурах. В описании и/или в пунктах формулы изобретения указаны существенные элементы. В дополнение к указанным элементам один или большее количество 35 дополнительных необязательных элементов могут быть выбраны независимо друг от друга.

Дополнительные элементы обозначены следующим образом:

1: вакуумный генератор 1b (например, шприцевой насос);

2: вакуумный генератор 2b (необязательный, например, диафрагменный насос);

3b, 4-7: клапаны (например, многопортовые клапаны);

8 и 9: датчики давления (не обязательные); 10: камера;

11: фиксационное кольцо (необязательное); 12: фильтр;

13: контейнер для приема отходов (необязательный);

14: приемный контейнер для элюата;

15: резервуар для образца;

16-17: резервуары (необязательные);

18: резервуар для элюирующего буфера.

(57) Формула изобретения

1. МикроЖидкостное устройство для автоматической очистки биологических или химических анализаторов, содержащее:
 - а. один или большее количество резервуаров выше по потоку от полости очистки;
 - б. один или большее количество приемных контейнеров для отходов ниже по потоку от полости очистки; причем
 - с. указанная полость очистки задает замкнутую колонну конической формы с полой внутренней частью, выполненную с возможностью отсоединения от микроЖидкостного устройства и содержащую:
 - (i) первый порт, обеспечивающий возможность газового обмена полости очистки с вакуумным генератором через первый путь потока;
 - (ii) второй порт, обеспечивающий возможность жидкостного обмена полости очистки с указанными одним или большим количеством резервуаров через второй путь потока;
 - (iii) третий порт, обеспечивающий возможность газового и жидкостного обмена полости очистки с указанными одним или большим количеством приемных контейнеров и с вакуумным генератором через третий путь потока; причем указанные первый, второй и третий порты расположены на внешней периферийной поверхности полости очистки, и
 - д. фильтр, перекрывающий поперечное сечение полости очистки в ортогональном направлении к направлению потока жидкости, выполненный с возможностью очищать биологические или химические анализы из сложного биологического образца и размещенный рядом с третьим портом так, что текучая среда, входящая в полости очистки через первый и/или второй порт и выходящая из полости очистки через третий порт, протекает через фильтр.
2. МикроЖидкостное устройство по п.1, в котором микроЖидкостное устройство представляет собой микроЖидкостный картридж и является одноразовым или повторно используемым.
3. МикроЖидкостное устройство по п.1 или 2, в котором подлежащие очистке анализы представляют собой нуклеиновые кислоты.
4. МикроЖидкостное устройство по пп.1-3, в котором фильтр содержит двуокись кремния.
5. МикроЖидкостное устройство по п.4, в котором фильтр содержит мембрану из двуокиси кремния или смолы, содержащей или гранулы из двуокиси кремния, или гранулы, покрытые двуокисью кремния.
6. МикроЖидкостное устройство по пп.1-5, в котором полость очистки содержит элемент зажима, выполненный с возможностью фиксировать положение полости очистки в микроЖидкостном устройстве.
7. МикроЖидкостное устройство по пп.1-6, в котором вакуумный генератор представляет собой шприцевой насос, диафрагменный насос или их комбинацию.
8. МикроЖидкостное устройство по пп.1-7, в котором обеспечена возможность подачи вакуума к первому порту и/или третьему порту одним вакуумным генератором.
9. МикроЖидкостное устройство по пп.1-8, в котором внутри третьего пути потока выше по течению от приемных контейнеров расположен датчик давления.
10. МикроЖидкостное устройство по п.9, в котором внутри первого пути потока между полостью очистки и вакуумным генератором расположен другой датчик давления.
11. МикроЖидкостное устройство по пп.1-10, в котором порты выполнены с возможностью индивидуального открытия, закрытия или продувки в атмосферу посредством одного или большего количества многопортовых клапанов внутри своих путей потока.

12. Микрорежимное устройство по п.11, в котором глухой объем, огражденный третьим путем потока текучей среды между его соответствующим клапаном и фильтром, составляет от 1 мкл до 10 мл.

13. Способ очистки биологического или химического аналита из сложного

5 биологического образца с использованием микрорежимного устройства согласно пп.1-12, включающий следующие операции:

(а) обеспечение возможности поступления указанного образца в полость очистки через второй порт посредством приложения отрицательной разности давлений между полостью очистки и первым резервуаром;

10 (б) обеспечение возможности протекания указанного образца через фильтр в первый приемный контейнер посредством приложения отрицательной разности давлений между указанным первым приемным контейнером и полостью очистки; и

(с) элюирование аналита из фильтра посредством приложения отрицательной разности давлений между полостью очистки и одним из приемных контейнеров.

15 14. Способ по п.13, в котором элюирование в операции (с) включает следующее:

i) обеспечение возможности поступления элюирующего буфера, содержащегося в третьем резервуаре, в полость очистки через второй порт посредством приложения отрицательной разности давлений между полостью очистки и третьим резервуаром;

10 ii) обеспечение возможности контакта элюирующего буфера с фильтром в течение заданного времени инкубации и

20 iii) обеспечение возможности протекания элюирующего буфера через фильтр во второй приемный контейнер посредством приложения отрицательной разности давлений между указанным вторым приемным контейнером и полостью очистки.

15. Способ по п.13 или 14, дополнительно включающий между операциями (а) и (б)

25 операцию, обеспечивающую возможность контакта указанного образца с фильтром в течение заданного времени инкубации.

16. Способ по пп.13-15, дополнительно включающий между операциями (б) и (с) одну или большее количество из следующих операций:

30 (i) очистка и сушка фильтра в течение заданного времени посредством приложения отрицательного давления между третьим путем потока и полостью очистки; и/или

(ii) обеспечение возможности поступления промывочного буфера, расположенного во втором резервуаре, в полость очистки через второй порт и его протекания через фильтр в приемный контейнер посредством приложения отрицательной разности давлений между указанным приемным контейнером и указанным вторым резервуаром;

35 и/или

(iii) обеспечение возможности протекания газа через фильтр в течение заданного времени посредством приложения отрицательного давления между третьим путем потока и полостью очистки.

17. Способ по пп.13-16, дополнительно включающий приведение в действие одного

40 или большего количества клапанов в первом пути потока, втором пути потока и третьем пути потока посредством разницы давлений.

18. Микрорежимное устройство для автоматической очистки биологических или химических анализаторов, содержащее замкнутую камеру, содержащую фильтр для очистки биологических или химических анализаторов из сложного биологического образца и

45 множество портов в дополнение к указанному фильтру, причем указанная камера содержит:

а. первый порт, обеспечивающий возможность газового обмена камеры с вакуумным генератором через первый путь потока;

b. второй порт, обеспечивающий возможность жидкостного обмена камеры с одним или большим количеством резервуаров через второй путь потока;

c. третий порт, обеспечивающий возможность газового и жидкостного обмена камеры с одним или большим количеством приемных контейнеров и с вакуумным генератором
5 через третий путь потока; причем указанные первый, второй и третий порты расположены на внешней периферийной поверхности камеры, и

d. фильтр, размещенный между третьим портом и первым и вторым портами, перекрывающий поперечное сечение камеры в ортогональном направлении к направлению потока жидкости, размещенный рядом с третьим портом так, что текущая
10 среда, входящая в камеру через первый и/или второй порт и выходящая из камеры через третий порт, протекает через фильтр.

19. Устройство по п.18, в котором устройство представляет собой микрожидкостный картридж и является одноразовым или повторно используемым.

20. Устройство по п.18 или 19, в котором подлежащие очистке аналиты представляют
15 собой нуклеиновые кислоты.

21. Устройство по пп.18-20, в котором фильтр является двуокисью кремния, предпочтительно мембраной из двуокиси кремния или смолы, содержащей или гранулы из двуокиси кремния или гранулы, покрытые двуокисью кремния.

22. Устройство по пп.18-21, в котором фильтр интегрирован в полость очистки и
20 закреплен фиксационным кольцом.

23. Устройство по пп.18-21, в котором полость очистки представляет собой отдельную часть, размещенную в устройстве с фиксацией, таким образом, указанного фильтра.

24. Устройство по пп.18-23, в котором вакуумный генератор представляет собой шприцевой насос, диафрагменный насос или их комбинацию.

25. Устройство по пп.18-24, в котором обеспечена возможность подачи вакуума к первому порту и/или третьему порту одним вакуумным генератором.

26. Устройство по пп.18-25, в котором внутри третьего пути потока выше по течению от приемных контейнеров расположен датчик давления.

27. Устройство по п.26, в котором внутри первого пути потока ниже по течению от
30 вакуумного генератора расположен другой датчик давления.

28. Устройство по пп.18-27, в котором порты выполнены с возможностью индивидуального открытия, закрытия или продувки в атмосферу посредством одного или большего количества многопортовых клапанов внутри своих путей потока.

29. Устройство по п.28, в котором глухой объем, огражденный третьим путем потока
35 текучей среды между его соответствующим клапаном и фильтром, составляет от 1 мкл до 10 мл.

30. Способ очистки биологического или химического аналита из сложного биологического образца с использованием микрожидкостного устройства согласно пп.18-29, включающий следующие операции:

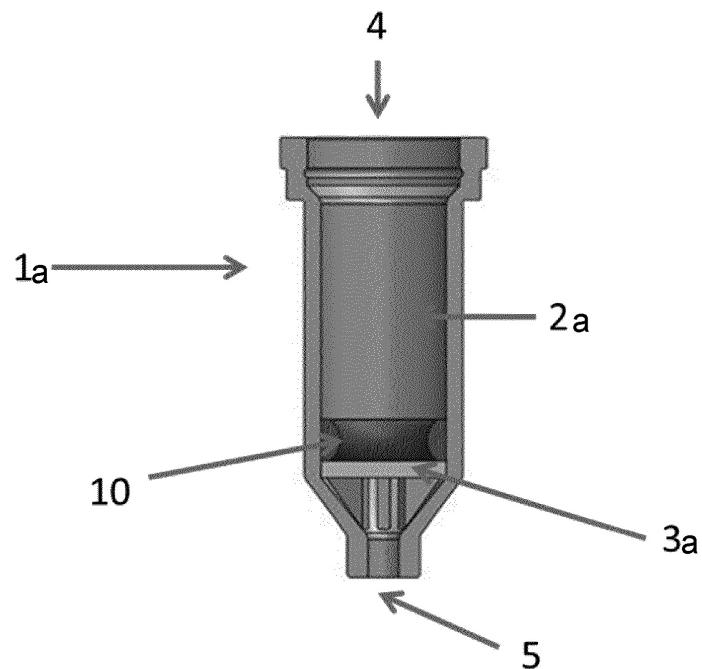
40 (a) обеспечение возможности поступления жидкого образца в камеру через второй порт посредством приложения отрицательной разности давлений между камерой и первым резервуаром с открытием при этом клапанов внутри путей потока для первого и второго портов и закрытием для третьего порта;

(b) обеспечение возможности протекания образца через фильтр в первый приемный контейнер посредством приложения отрицательной разности давлений между указанным первым приемным контейнером и камерой с закрытием при этом клапанов внутри путей потока для первого порта, продувкой до атмосферного давления для второго порта и открытием для третьего порта; и

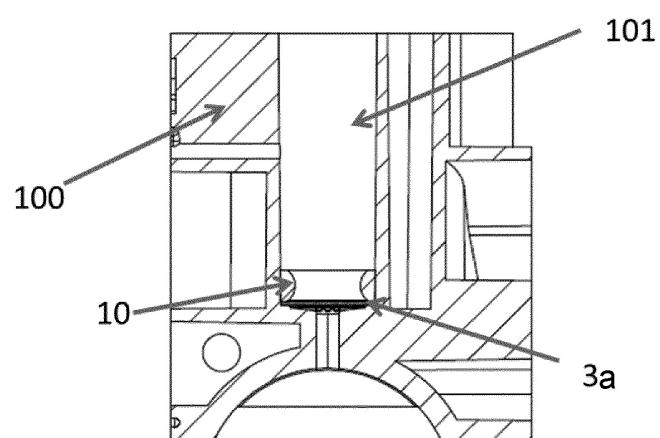
(с) элюирование аналита из фильтра посредством приложения отрицательной разности давлений между камерой и одним из приемных контейнеров с открытием при этом клапанов внутри путей потока для первого и второго портов и закрытием для третьего порта.

- 5 31. Способ по п.30, в котором
 - элюирование в операции (с) выполняют следующим образом:
 - i) обеспечение возможности поступления элюирующего буфера, содержащегося в третьем резервуаре, в камеру через второй порт посредством приложения отрицательной разности давлений между камерой и третьим резервуаром с открытием при этом
 - 10 клапанов внутри путей потока для первого и второго портов и закрытием для третьего порта; и
 - ii) обеспечение возможности контакта элюирующего буфера с фильтром в течение заданного времени инкубации с открытием при этом клапанов внутри путей потока для первого и второго портов и закрытием для третьего порта; и
 - 15 iii) обеспечение возможности протекания элюирующего буфера через фильтр во второй приемный контейнер посредством приложения отрицательной разности давлений между указанным вторым приемным контейнером и камерой с закрытием при этом клапанов внутри путей потока для первого порта, продувкой до атмосферного давления для второго порта и открытием для третьего порта.
- 20 32. Способ по п.30 или 31, дополнительно включающий между операциями (а) и (б) операцию, обеспечивающую возможность контакта образца с фильтром в течение заданного времени инкубации, с открытием при этом клапанов внутри путей потока для первого и второго портов и закрытием для третьего порта.
- 25 33. Способ по пп.30-32, дополнительно включающий между операциями (б) и (с)
 - одну или большее количество из следующих операций:
 - (i) очистка и сушка фильтра в течение заданного времени посредством приложения отрицательного давления между третьим путем потока и камерой с закрытием при этом клапанов внутри путей потока для первого порта, продувкой до атмосферного давления для второго порта и открытием для третьего порта; и/или
 - 30 (ii) обеспечение возможности поступления промывочного буфера, расположенного во втором резервуаре, в камеру через второй порт и его протекания через фильтр в приемный контейнер посредством приложения отрицательной разности давлений между указанным приемным контейнером и указанным вторым резервуаром с открытием при этом клапанов в путях потока для второго и третьего портов и закрытием для
 - 35 первого порта; и/или
 - iii) обеспечение возможности протекания газа через фильтр в течение заданного времени посредством приложения отрицательного давления между третьим путем потока и камерой с закрытием при этом клапанов внутри путей потока для первого порта, продувкой до атмосферного давления для второго порта и открытием для
 - 40 третьего порта.
- 34. Способ по пп.30-33, в котором один или большее количество клапанов приводят в действие разницей давлений.

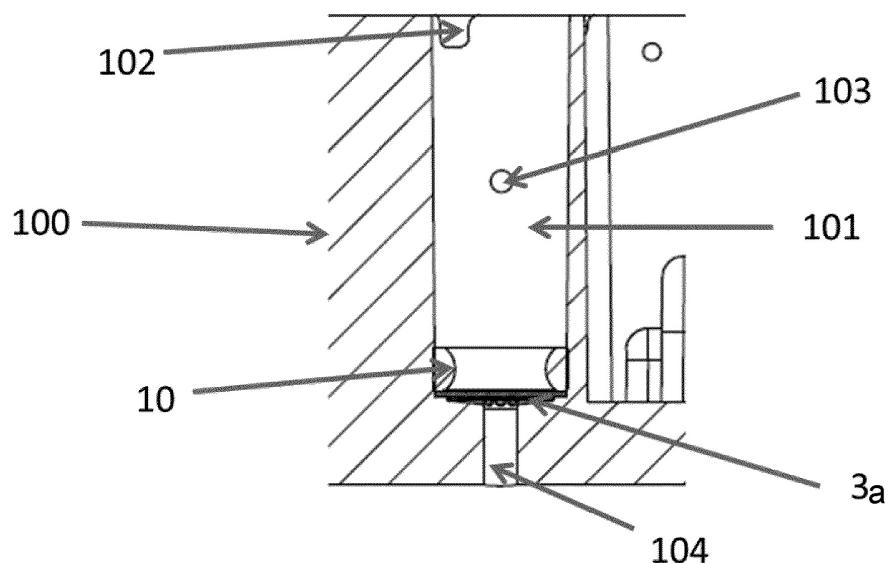
Фиг. 1



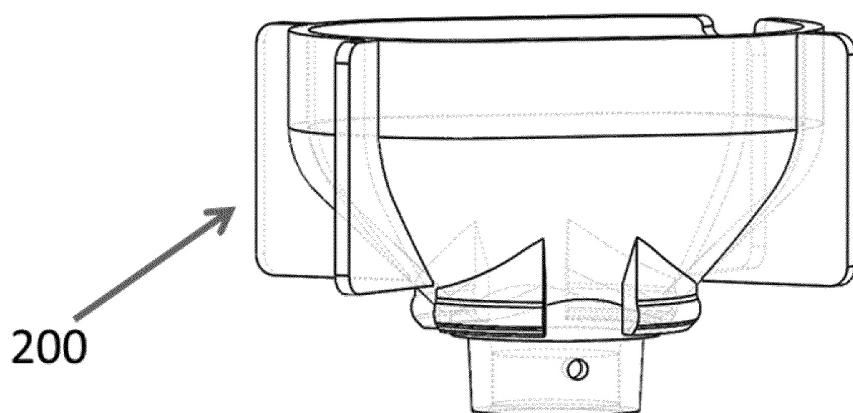
Фиг. 2А



Фиг. 2В

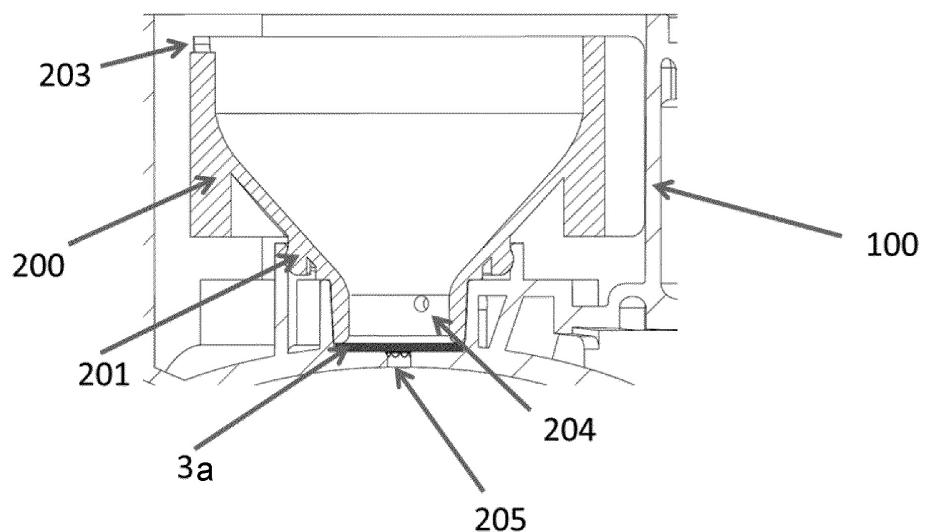


Фиг. 2С



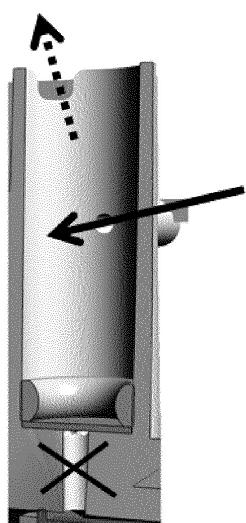
3/13

Фиг. 2D

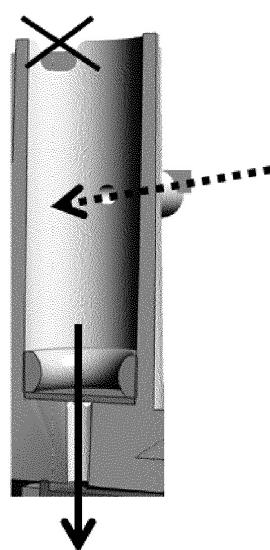


Фиг. 2Е

операция 1

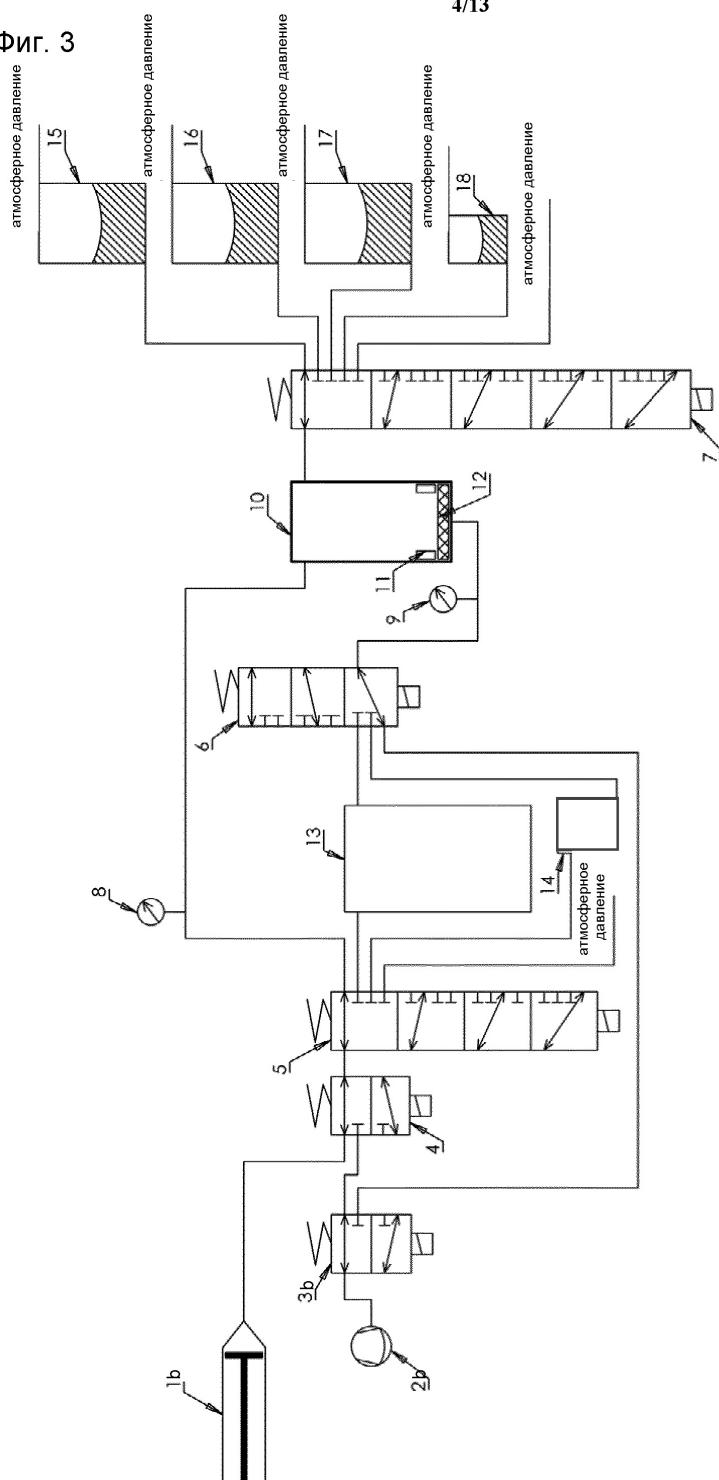


операция 2



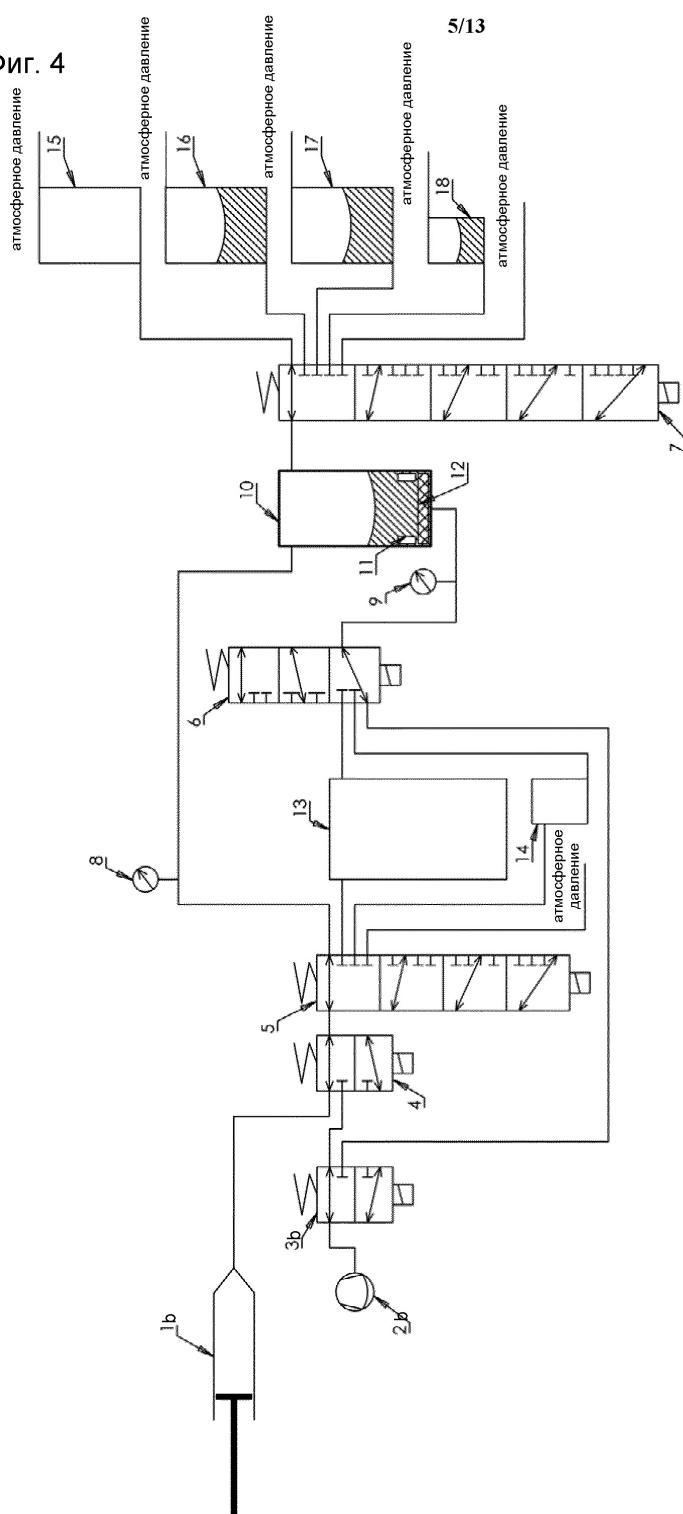
4/13

Фиг. 3



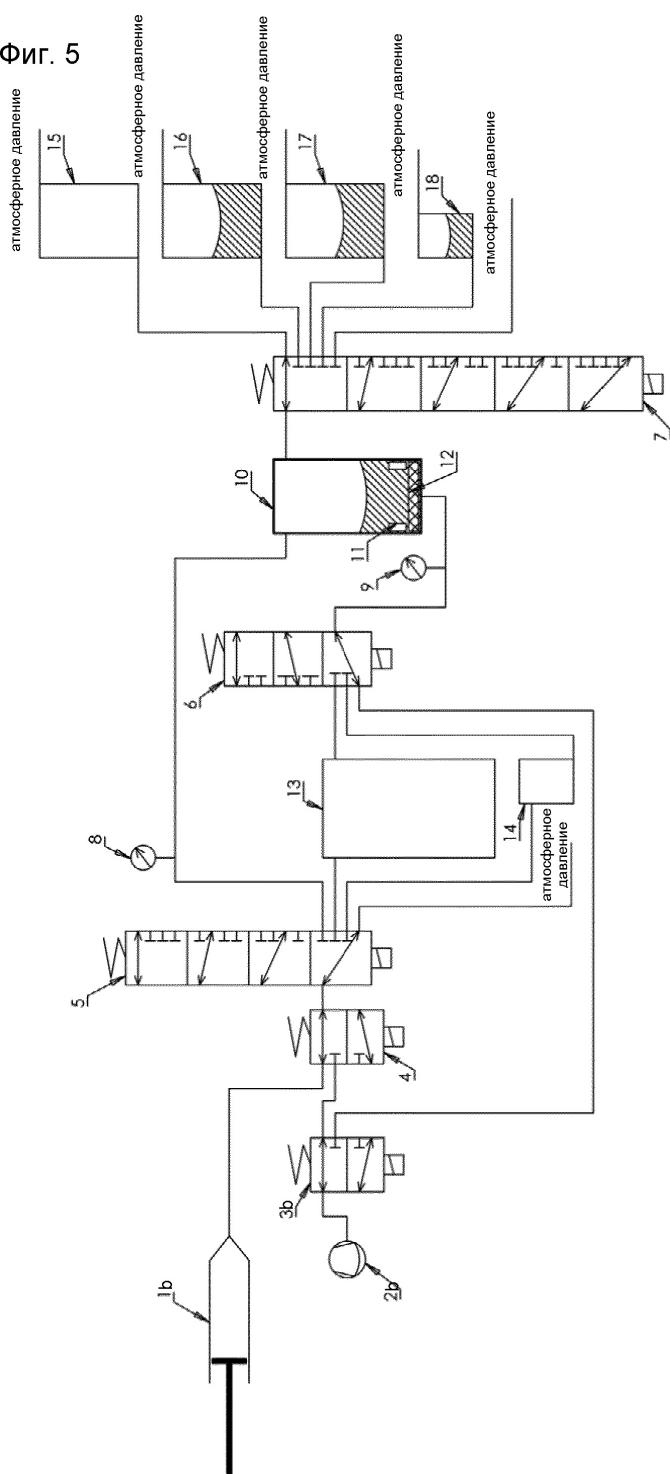
5/13

Фиг. 4



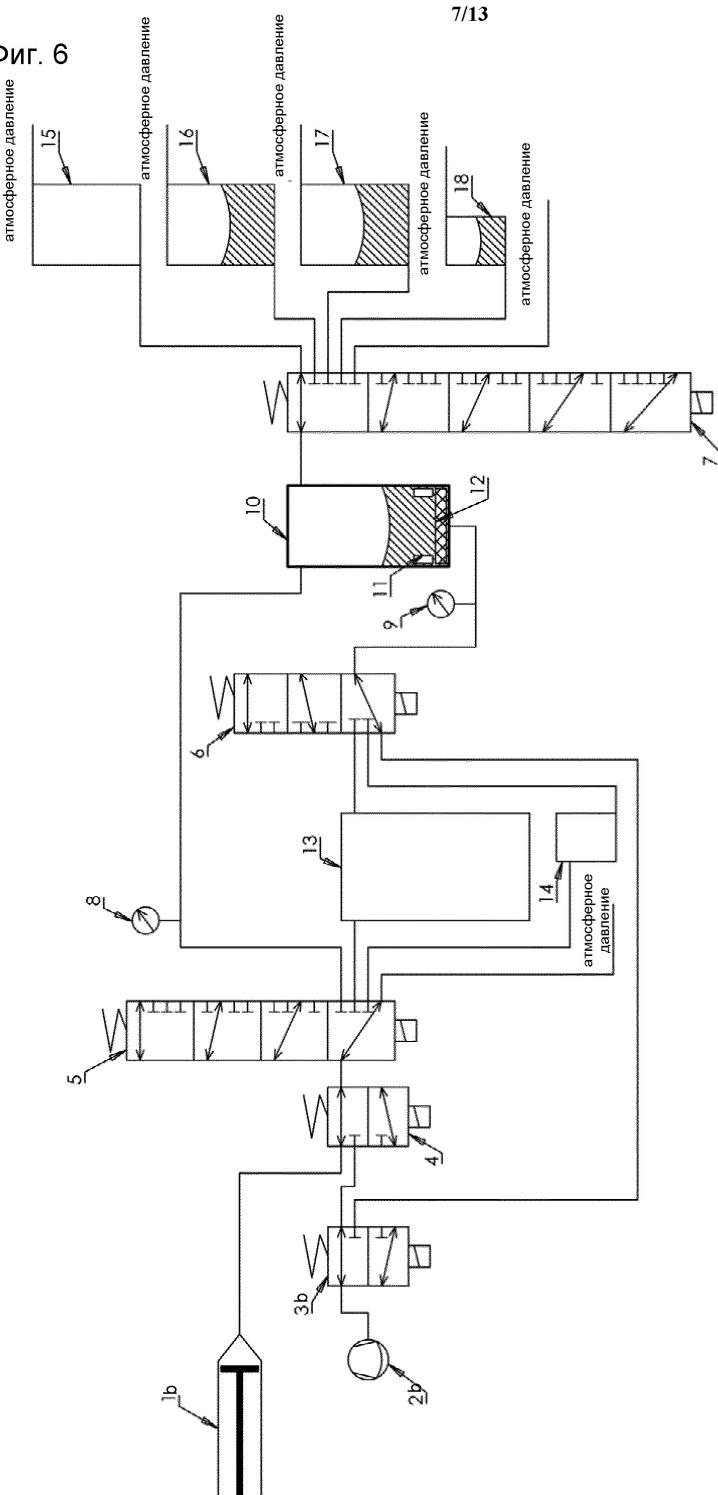
6/13

ФИГ. 5



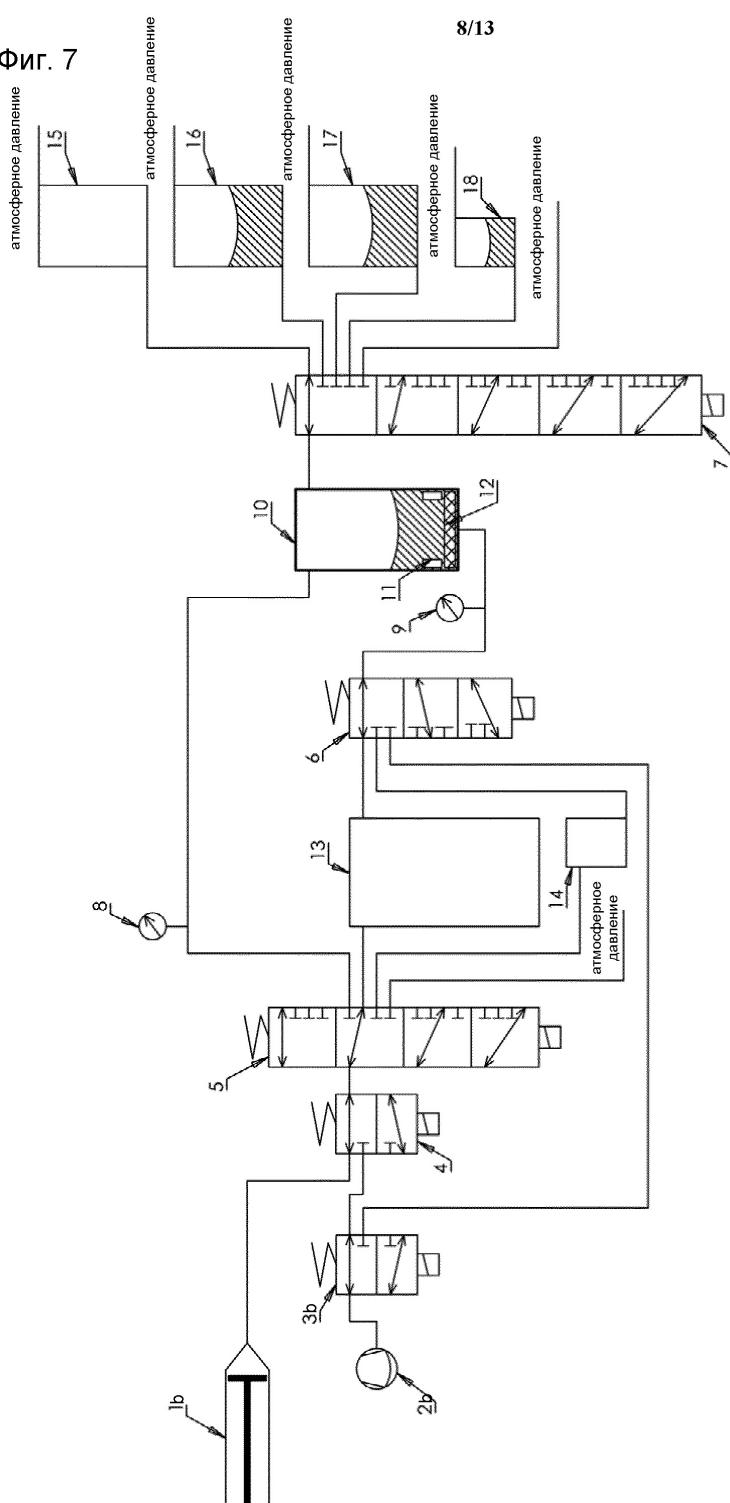
7/13

Фиг. 6



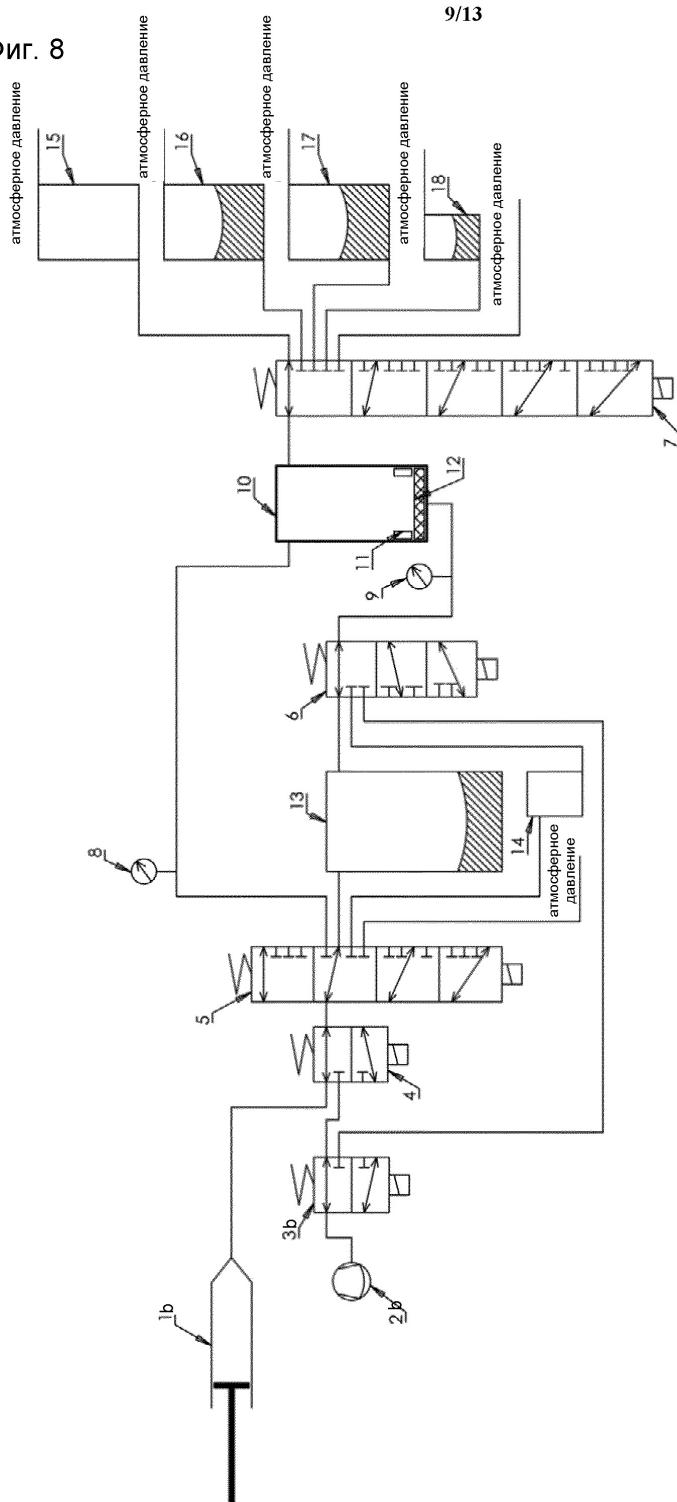
8/13

ФИГ. 7



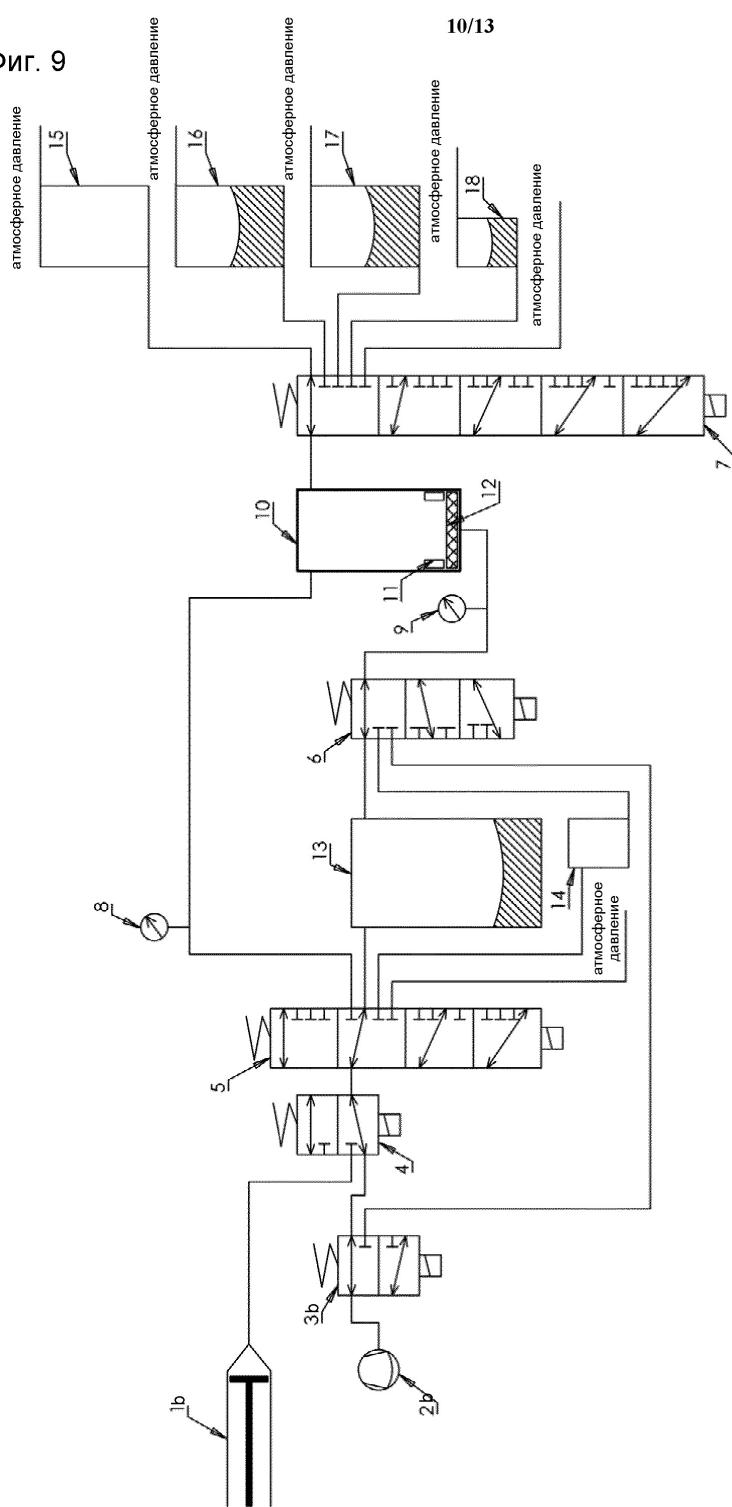
9/13

ФИГ. 8



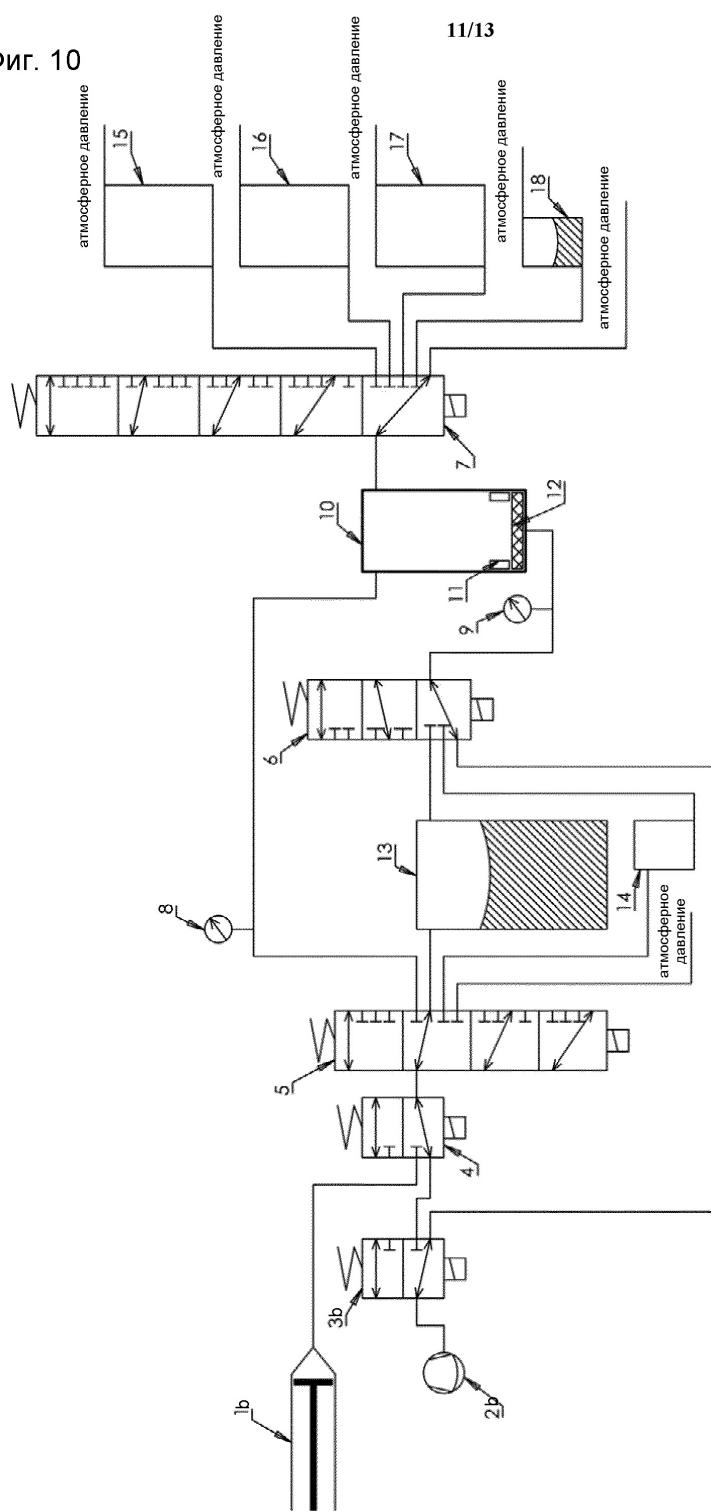
10/13

Фиг. 9



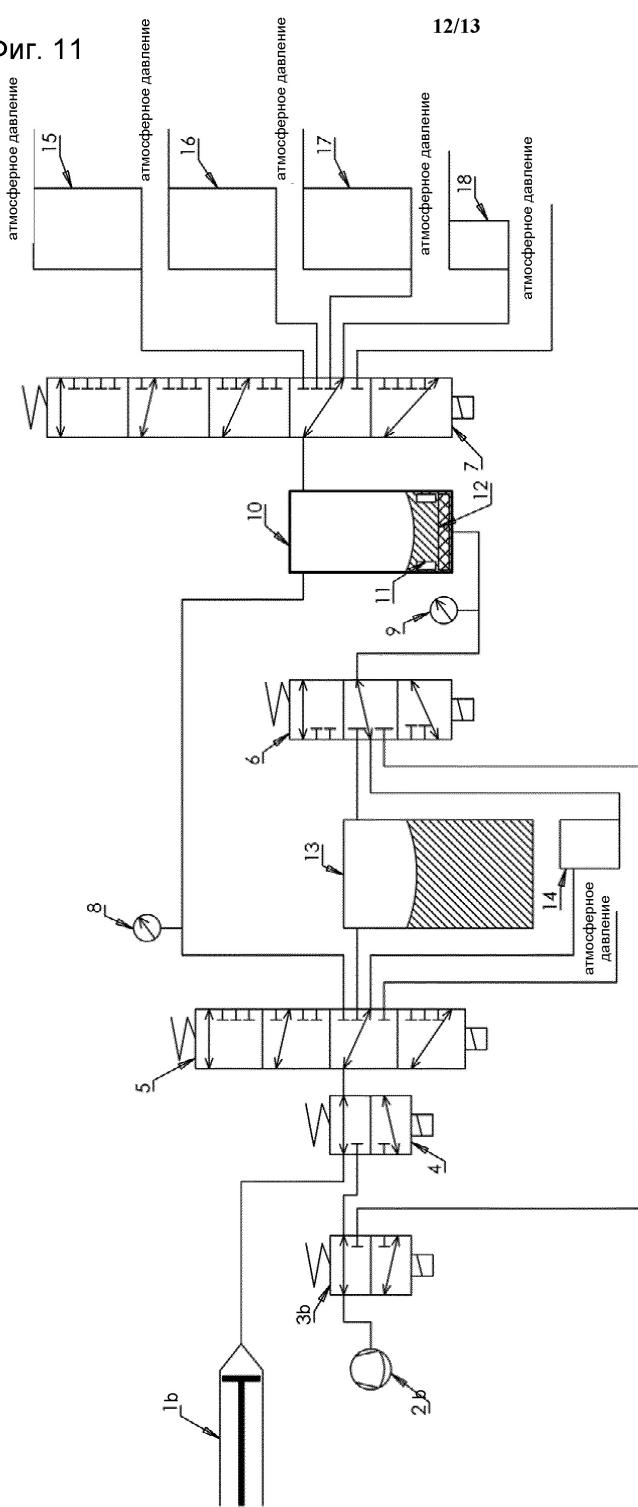
Фиг. 10

11/13



12/13

Фиг. 11



13/13

Фиг. 12

