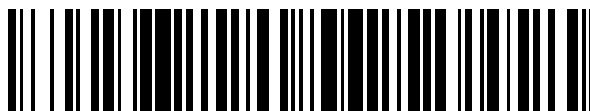


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 824**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| B01L 3/00 | (2006.01) |
| C12M 1/42 | (2006.01) |
| C12M 1/00 | (2006.01) |
| C12N 1/06 | (2006.01) |
| C12N 1/08 | (2006.01) |
| C12N 13/00 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2012 PCT/CA2012/000698**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13013304**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2012 E 12816873 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2737047**

54 Título: **Métodos y dispositivos para preparación de muestra eléctrica**

30 Prioridad:

25.07.2011 US 201161511201 P
16.01.2012 US 201261586906 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2020

73 Titular/es:

QVELLA CORPORATION (100.0%)
9133 Leslie Street, Suite 110
Richmond Hill, ON L4B 4N1, CA

72 Inventor/es:

TALEBPOUR, SAMAD;
KHINE, AYE AYE;
MAASKANT, ROBERT y
ALAVIE, TINO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 759 824 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

Métodos y dispositivos para preparación de muestra eléctrica

Antecedentes

5 La presente descripción se refiere a métodos de preparación y procesamiento de muestras biológicas. Más concretamente, la descripción se refiere al procesamiento de muestras biológicas que se usarán para llevar a cabo ensayos de diagnóstico y para usos terapéuticos.

10 A pesar del avance sin precedentes en las técnicas de medición en los últimos años, las mediciones no invasivas satisfactorias de analitos objetivo en muestras biológicas aún no son posibles en la mayoría de los casos. En general, una o más etapas de pretratamiento de muestra son necesarias. Se hace referencia a dichas etapas como preparación de la muestra, cuyo objetivo es proveer una muestra cruda apropiada para una medición con una relación señal-ruido satisfactoria. La preparación de la muestra se logra procediendo a través de las etapas de limpieza, enriquecimiento o concentración y equilibrio del medio. Además, en el caso de medición de contenidos celulares, las moléculas de interés deben liberarse al medio mediante lisis celular. Con frecuencia, una etapa de tratamiento de lisado, que implica varios reactivos, se necesita para hacer que el lisado esté listo para el ensayo mediante la modificación de las moléculas objetivo y no objetivo o mediante el ajuste de la composición del lisado. La preparación de la muestra es, con frecuencia, el cuello de botella en el proceso de medición, dado que tiende a ser lenta y, en general, implica múltiples reactivos y etapas manuales que requieren tiempo, complejidad y coste sustanciales.

20 La complejidad de preparación de la muestra puede apreciarse mejor mediante referencia a un ejemplo típico en el cual las bacterias patógenas en orina humana se identifican a través de la hibridación de ARNr donde una secuenciación específica en ARNr 16S se hibridiza con una sonda de ácido nucleico complementaria etiquetada. Un protocolo de preparación de muestra a modo de ejemplo emplea las cinco etapas pronosticadas de la siguiente manera: 1) partículas relativamente grandes como, por ejemplo, cristales, y los iones en exceso se retiran (limpieza); 2) el conteo de bacterias por unidad de volumen aumenta mediante la reducción del contenido de agua (líquido) (enriquecimiento); 3) los ribosomas se liberan mediante lisado de las células (lisis); 4) el lisado se trata de modo que el ARNr se desenreda parcialmente de las proteínas acompañantes y su conformación se modifica para exponer mejor la región objetivo a las sondas (tratamiento de lisado); y 5) la composición química e iónica del lisado se ajusta para soportar la hibridación (equilibrio del medio).

30 En algunas instancias, la preparación de la muestra se complica además por la necesidad de procesar la muestra con varios reactivos. Por ejemplo, los reactivos pueden necesitarse para la lisis, unión y elución, precipitación, retirada o inhibición de interferencias y/o contaminantes, desnaturalización de ADN para obtener ADN monocatenario, separación de ARNr de proteína ribosomal, y desnaturalización de enzimas u otras proteínas como, por ejemplo, ADNasa y ARNasa. Un ejemplo de un tratamiento de reactivo para la purificación de ácidos nucleicos implica lisis celular y desnaturalización molecular por un agente caotrópico (tiocianato de guanidinio) seguido por extracción de ácido nucleico mediante separación líquido-líquido fenol-cloroformo, que es un método complejo que implica reactivos muy peligrosos. Además, el procesamiento de la muestra por reactivos puede implicar etapas adicionales como, por ejemplo, calentamiento y molienda de perlas, por ejemplo, para mejorar la función y eficacia de los reactivos.

40 La tesis *Master of Science* de Daniel J. B. Stark ("*The use of a microelectroporator to study poration of Jurkat cells*", Rice University, Houston, Texas, 1 de septiembre de 2009, XP055171879, ISBN: 978-1-12-421298-2) describe un sistema de microelectroporación construido para proveer un entorno bien controlado y definido para estudios cuantitativos de electroporación y un método para permeabilizar membranas celulares para la administración de biomoléculas normalmente impermeables, de una línea inmortalizada de células T. Mediante el estudio de la electroporación en una solución con fuerza iónica baja, se ha descubierto que el inicio de la poración ocurre en un campo externamente aplicado de 700 V/cm, correspondiente a un potencial de transmembrana umbral de $0,83 \pm 0,34$ V. Un modelo de elemento finito se ha usado para calcular el efecto de la conductividad de la solución en el campo eléctrico aplicado, que domina la incertidumbre en la presente medición. Además, la señal de dispersión de luz directa aumentada, medida mediante el uso de la citometría de flujo, se encuentra correlacionada fuertemente con la poración exitosa. El uso de la dispersión de luz directa como un indicador identifica una población de células que es más del 90% porada y viable. La caracterización cuantitativa con citometría de flujo puede servir como un ensayo no invasivo de microelectroporación en células T que puede aplicarse sin marcadores fluorescentes.

45 Neuzil y otros (*Nucleic Acids Research*, 2006, Vol. 34, No. 11) describe el diseño, fabricación y ensayos de un chip PCR en tiempo real capaz de conducir un ciclo térmico en 8,5 s. Ello corresponde a 40 ciclos de PCR para capturar y concentrar las células antes del procesamiento eléctrico y la retirada de detritos celulares del lisado celular después del procesamiento eléctrico.

55 Por consiguiente, en un aspecto, se provee un método para procesar eléctricamente un líquido dentro de un dispositivo microfluídico para liberar al menos una macromolécula de al menos una célula dentro del líquido; el dispositivo microfluídico en 5 min y 40 s. El sistema PCR se ha fabricado con silicio micromaquinado en la forma de

un voladizo terminado con un disco. El calentador de película fina y un sensor de temperatura se han colocado en el perímetro del disco. Debido a la constante térmica del sistema de 0,27 s, hemos logrado una velocidad de calentamiento de 175°C s⁻¹ y una velocidad de enfriamiento de —125°C 5⁻¹. Una muestra de PCR encapsulada con aceite mineral se ha dispensado en un cubreobjetos de cristal colocado en el disco de silicio. El tiempo de ciclo PCR se ha determinado entonces por la transferencia de calor a través del cristal, que ha requerido solo 0,5 s. Una muestra de PCR en tiempo real con un volumen de 100 nl se ha ensayado mediante el uso de una sonda FAM. Dado que el único dispositivo PCR ha ocupado un área de unos pocos milímetros cuadrados solamente, los dispositivos pueden combinarse en un sistema paralelo para aumentar el caudal.

Compendio

Se proveen dispositivos y métodos para el lisado eléctrico de células y la liberación de macromoléculas de las células. Se provee un dispositivo microfluídico que incluye un canal plano que tiene un grosor en una escala submilimétrica, y que incluye electrodos en sus superficies interiores superior e inferior. Después de llenar el canal con un líquido, de modo que el canal contiene células dentro del líquido, una serie de pulsos de voltaje de polaridad alterna se aplican entre los electrodos del canal, donde la amplitud de los pulsos de voltaje y un ancho de pulso de los pulsos de voltaje son eficaces para provocar la electroporación irreversible de las células. El canal se configura para poseer propiedades térmicas de modo que la aplicación del voltaje produce un rápido aumento de la temperatura como resultado del calentamiento por efecto Joule para liberar las macromoléculas de las células electroporadas. El canal también puede incluir un filtro interno para capturar y concentrar las células antes del procesamiento eléctrico y retirada de detritos celulares del lisado celular después del procesamiento eléctrico.

Por consiguiente, en un aspecto, se provee un método de procesamiento eléctrico de un líquido dentro de un dispositivo microfluídico, el líquido conteniendo uno o más microorganismos; el dispositivo microfluídico incluyendo: un canal fluido que tiene una superficie de canal superior, una superficie de canal inferior, una pared lateral, y un grosor en una escala submilimétrica; un electrodo superior en la superficie de canal superior; y un electrodo inferior en la superficie de canal inferior; en donde el método incluye: hacer fluir el líquido hacia el canal; y aplicar una serie de pulsos de voltaje bipolares entre el electrodo superior y el electrodo inferior de modo que un campo eléctrico generado a lo largo del grosor del canal fluido es de entre 2 kV/cm y 30 kV/cm; y el líquido se calienta con una velocidad de calentamiento de al menos 250 grados por segundo; en donde la serie de pulsos de voltaje tiene una duración de subsegundos y en donde la amplitud, y ancho de pulso de los pulsos de voltaje se controlan además de modo que el líquido se calienta hasta una temperatura elevada suficiente para calentar de forma instantánea el líquido y electroporar, de manera irreversible, al menos un microorganismo dentro del líquido por lisado eléctrico y, de esta manera, liberar al menos una macromolécula del al menos un microorganismo.

En otro aspecto, se provee un dispositivo microfluídico para procesar un microorganismo que contiene líquido, el dispositivo microfluídico comprendiendo: un canal fluido que tiene una superficie de canal superior, una superficie de canal inferior, una pared lateral, y un grosor en una escala de micras; un primer puerto en comunicación fluida con un primer lado del canal; un segundo puerto en comunicación fluida con un segundo lado del canal; un electrodo superior provisto en la superficie de canal superior; un electrodo inferior provisto en la superficie de canal inferior; un suministro de energía; una unidad de controlador configurada para controlar el suministro de energía, y un medidor de corriente eléctrica en un bucle de realimentación de control con la unidad de controlador, la unidad de controlador configurándose para aplicar, mediante el suministro de energía, pulsos de voltaje bipolares entre el electrodo superior y el electrodo inferior de modo que, cuando el microorganismo que contiene líquido se provee dentro del canal fluido: un campo eléctrico generado a lo largo del grosor del canal fluido es de entre 2 kV/cm y 30 kV/cm; el líquido se calienta con una velocidad de calentamiento de al menos 250 grados por segundo; la serie de pulsos de voltaje tiene una duración de subsegundos; y la amplitud, y ancho de pulso de los pulsos de voltaje se proveen de modo que el líquido se calienta hasta una temperatura elevada suficiente para calentar de manera instantánea el líquido y electroporar, de manera irreversible, al menos un microorganismo dentro del líquido por lisado eléctrico y, de esta manera, liberar la al menos una macromolécula del al menos un microorganismo.

Una comprensión adicional de los aspectos funcionales y ventajosos de la descripción puede realizarse mediante referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos.

Breve descripción de los dibujos

Ahora se describirán las realizaciones, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos, en los cuales:

La Figura 1 muestra un esquema de un dispositivo de procesamiento de muestra eléctrico.

La Figura 2 muestra una vista en sección transversal esquemática paralela al flujo del dispositivo de procesamiento de muestra eléctrico.

La Figura 3 muestra vistas en sección transversal esquemáticas del dispositivo de procesamiento de muestra eléctrico, que está equipado con capacidad de limpieza de muestra y concentración de muestra, donde (a) muestra un filtro que divide el canal en dos porciones, y donde (b) ilustra el uso de microesferas como un material a modo de ejemplo para soportar un filtro dentro del canal.

- La Figura 4(a) muestra una vista en sección transversal esquemática del dispositivo de procesamiento de muestra eléctrico que está equipado con una capacidad de limpieza de muestra y concentración de muestra alternativa.
- La Figura 4(b) muestra una vista en planta esquemática del dispositivo de procesamiento de muestra eléctrico de la Figura 4a.
- 5 La Figura 4(c) provee un diagrama de flujo que ilustra un método de procesamiento eléctrico de células dentro de un líquido.
- La Figura 5(a) muestra un modelo de circuito equivalente para el dispositivo de la Figura 2.
- La Figura 5(b) muestra una aproximación al circuito equivalente en la Figura 5a.
- 10 La Figura 5(c) muestra la respuesta de corriente de dos canales típicos mediante el uso de electrodos SEOA1 o SEOA2 a un pulso bipolar.
- La Figura 6 muestra la envolvente de corriente medida para un canal abierto.
- La Figura 7 muestra la distribución de temperatura del canal para el análisis de calentamiento por efecto Joule del canal abierto.
- 15 La Figura 8 muestra la dinámica temporal del análisis de calentamiento por efecto Joule a temperatura transitoria de canal máxima.
- La Figura 9 muestra la envolvente de corriente pico dependiente del tiempo para el canal con una válvula de cierre en puertos de entrada y salida en una posición abierta y cerrada.
- La Figura 10 muestra una vista en sección transversal esquemática del dispositivo de procesamiento de muestra eléctrico que está equipado con una capacidad de regulación de presión.
- 20 La Figura 11 muestra el módulo de pretratamiento de muestra para reducir el contenido iónico.
- La Figura 12(a) muestra la envolvente de corriente medida para el canal en el cual las suspensiones de enzima se han sometido a tratamiento eléctrico.
- La Figura 12(b) muestra la actividad de enzima residual medida que sigue al tratamiento eléctrico con diferentes parámetros de ensayo.
- 25 La Figura 13 ilustra la curva de respuesta de dosis del ensayo de proteínas de Bradford determinada por el ensayo de estándares BSA.
- La Figura 14(a) muestra la envolvente de corriente medida para el canal en el cual la suspensión de *E.Coli* se ha sometido a lisis eléctrica según diferentes parámetros de ensayo.
- 30 La Figura 14(b) muestra los efectos de la amplitud de pulso en el rendimiento de la lisis eléctrica del dispositivo según lo determinado por la cuantificación de la liberación de proteínas de células *E. coli*.
- La Figura 14(c) muestra los efectos de la amplitud de pulso en el rendimiento de la lisis eléctrica del dispositivo según lo determinado por la cuantificación de la liberación de ácidos nucleicos de células *E. coli*.
- La Figura 14(d) muestra los efectos de la amplitud de pulso en el rendimiento de la lisis eléctrica del dispositivo según lo determinado por la medición de la hibridación de ARNr 16S liberado de células *E. coli* a sondas específicas.
- 35 La Figura 15(a) muestra la envolvente de corriente medida para el canal en el cual la suspensión de *E.Coli* se ha sometido a lisis eléctrica según diferentes parámetros de ensayo y amplitud de pulso constante.
- La Figura 15(b) muestra los efectos de la duración de tren y fuerza iónica en el rendimiento de la lisis eléctrica del dispositivo según lo determinado por la cuantificación de la liberación de proteínas de células *E. coli*.
- 40 La Figura 15(c) muestra los efectos de la duración de tren y fuerza iónica en el rendimiento de la lisis eléctrica del dispositivo según lo determinado por la cuantificación de la liberación de ácidos nucleicos de células *E. coli*.
- La Figura 15(d) muestra los efectos de la duración de tren y fuerza iónica en el rendimiento de la lisis eléctrica del dispositivo según lo determinado por la medición de la hibridación de ARNr 16 liberado de células *E. coli* a sondas específicas.
- 45 La Figura 15(e) muestra los efectos de la duración de tren y fuerza iónica en la actividad de la beta-galactosidasa asociada a células *E. coli* después de la lisis eléctrica.

La Figura 15(f) muestra la liberación de ácidos nucleicos de células *E. coli* por lisis eléctrica, visualizado después de resolver los ácidos nucleicos totales en electroforesis en gel de agarosa.

5 La Figura 15(g) ilustra una aplicación corriente abajo de ADN genómico en el lisado celular de células *E. coli* preparado por lisis eléctrica. El sobrenadante de lisado celular se ha sometido a amplificación por PCR del fragmento del gen ADNr 16S bacteriano. El producto PCR se ha visualizado después de resolverse en electroforesis en gel de agarosa.

La Figura 16(a) muestra las envolventes de corriente medidas para el canal en el cual el ADN plasmídico purificado y lisado GB de células *E. coli* para PCR se han tratado eléctricamente.

La Figura 16(b) ilustra el cambio conformacional en ácidos nucleicos como resultado del tratamiento eléctrico.

10 La Figura 16(c) muestra la calidad lista para PCR del lisado celular preparado por tratamiento eléctrico. El sobrenadante de lisado celular de perlas de vidrio se ha diluido en serie o se ha tratado eléctricamente con anterioridad a la amplificación por PCR del fragmento del gen ADNr 16S bacteriano. El producto PCR se ha visualizado después de resolverse en electroforesis en gel de agarosa.

La Figura 16(d) muestra el ADN plasmídico purificado del sobrenadante de lisado celular.

15 La Figura 16(e) demuestra la integridad de ADN plasmídico en el sobrenadante de lisado celular mediante el cultivo de *E. coli* en un medio de selección después de la transformación con plásmido pUC19 purificado.

La Figura 17(a) muestra las envolventes de corriente medidas, correspondientes a 4 conjuntos de parámetros, para los canales en los cuales las células de neumococo se han lisado eléctricamente.

20 La Figura 17(b) muestra los efectos de la duración de tren y fuerza iónica en el rendimiento de la lisis eléctrica del dispositivo según lo determinado por la cuantificación de la liberación de proteínas de neumococo.

La Figura 17(c) muestra los efectos de la duración de tren y fuerza iónica en el rendimiento de la lisis eléctrica del dispositivo según lo determinado por la cuantificación de la liberación de ácidos nucleicos de neumococo.

25 La Figura 17(d) muestra el espectro de ácidos nucleicos (izquierda) y amplificación por PCR del fragmento de gen ADNr 16S bacteriano (derecha) derivado del neumococo, visualizado después de resolverse en electroforesis en gel de agarosa.

La Figura 18(a) muestra las envolventes de corriente medidas, correspondientes a diferentes dispositivos usados para el lisado de células de neumococo.

La Figura 18(b) muestra los efectos del material de electrodo en el rendimiento de la lisis de las células según lo determinado por la cuantificación de la liberación de proteínas y ácidos nucleicos de neumococo.

30 La Figura 18(c) muestra la amplificación por PCR del fragmento de gen ADNr 16S bacteriano de neumococo, visualizado después de resolverse en electroforesis en gel de agarosa.

La Figura 19(a) muestra las envolventes de corriente medidas para los canales en los cuales las células *S.cerevisiae* se han lisado eléctricamente, para canales restringidos y abiertos.

35 La Figura 19(b) demuestra la eficacia de la lisis del método de lisis eléctrica, en comparación con la de la lisis de perlas de vidrio, según la concentración total de proteínas medida y el total de ácidos nucleicos liberados de las células *S.cerevisiae* lisadas.

La Figura 20(a) muestra las envolventes de corriente medidas, correspondientes a diferentes dispositivos usados para el lisado de células *E. coli*.

40 La Figura 20(b) muestra la transcripción inversa (RT)-amplificación por PCR de una sección de ARNr *E. coli* visualizada después de resolverse en electroforesis en gel de agarosa (S = sobrenadante, T = lisado total).

Descripción detallada

Varias realizaciones y aspectos de la descripción se describirán con referencia a los detalles descritos más abajo. La siguiente descripción y dibujos son ilustrativos de la descripción y no se interpretarán como restrictivos de la descripción. Numerosos detalles específicos se describen para proveer una comprensión exhaustiva de varias realizaciones de la presente descripción. Sin embargo, en ciertas instancias, los detalles conocidos o convencionales no se describen con el fin de proveer una descripción concisa de las realizaciones de la presente descripción. Debe comprenderse que el orden de las etapas de los métodos descritos en la presente memoria es inmaterial siempre que los métodos permanezcan operativos. Además, dos o más etapas pueden llevarse a cabo de forma simultánea o en un orden diferente del establecido en la presente memoria salvo que se especifique lo contrario.

50

Según su uso en la presente memoria, los términos "comprende" y "que comprende(n)" se interpretarán como inclusivos y de final abierto, y no exclusivos. De manera específica, cuando se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, los términos "comprende" y "que comprende(n)" y variaciones de ellos significan que las características, etapas o componentes especificados se incluyen. Dichos términos no se interpretarán como unos
5 que excluyen la presencia de otras características, etapas o componentes.

Según su uso en la presente memoria, el término "a modo de ejemplo" significa "que sirve como un ejemplo, instancia o ilustración" y no debe interpretarse como preferido o ventajoso con respecto a otras configuraciones descritas en la presente memoria.

Según su uso en la presente memoria, los términos "alrededor de" y "aproximadamente", cuando se usan en conjunto con rangos de dimensiones de partículas, composiciones de mezclas u otras propiedades o características físicas, pretenden cubrir ligeras variaciones que pueden existir en los límites superior e inferior de los rangos de dimensiones para no excluir realizaciones donde, en promedio, la mayoría de las dimensiones se satisfacen pero donde, estadísticamente, las dimensiones pueden existir fuera de dicha región. No se pretende excluir realizaciones como, por ejemplo, estas, de la presente descripción.

En las realizaciones seleccionadas descritas más abajo, se proveen métodos y dispositivos para someter una muestra a lisis eléctrica de células y/o a tratamiento eléctrico de especies moleculares dentro de la muestra. Los métodos descritos más abajo implican someter una muestra líquida a un tren de pulsos eléctricos de amplitud modulada en un canal fluido confinado para la lisis celular y/o tratamiento de macromoléculas. El tren de pulsos genera un campo eléctrico pulsado a lo largo del grosor del canal y genera, con capacidad de respuesta, calor dentro del canal, donde el grosor es pequeño en comparación con al menos otra dimensión del canal. El canal puede ser un volumen fluido cerrado como, por ejemplo, una cámara o recipiente de reacción, o puede ser un canal abierto apropiado para flujo fluido.

En las realizaciones seleccionadas en las cuales la muestra puede o puede no incluir células, un campo eléctrico se aplica como una serie de pulsos por medio de los cuales las macromoléculas dentro de la muestra se tratan o procesan. Sin pretender encontrarse limitado por la teoría, se cree que mientras el tren de pulso de voltaje actúa sobre el líquido dentro del canal, se establece una corriente iónica apreciable. Ello hace que el medio líquido (en general, un medio acuoso) se caliente rápidamente mediante calentamiento por efecto Joule y, de esta manera, se provee un mecanismo de tratamiento eléctrico a macromoléculas dentro del medio líquido. La temperatura máxima depende de la escala de tiempo del tren de pulsos eléctricos, el voltaje aplicado, la fuerza iónica del líquido, las características eléctricas y térmicas del canal y la regulación de presión del canal.

La temperatura del canal puede mantenerse a la temperatura deseada durante un período, llamado en la presente memoria el tiempo de residencia, por realimentación pasiva a través de un cambio de conductividad que surge de la transición de fase líquido-gas, o realimentación activa a través de mediciones de corriente.

Debido a la relación superficie grande-volumen del líquido confinado en el canal, y a las propiedades térmicas del canal (descritas en mayor detalle más abajo), y a la duración de subsegundos del tren de pulsos, el calentamiento y enfriamiento del líquido son rápidos. En el contexto de la presente descripción, se hace referencia al presente proceso de calentamiento y enfriamiento en una escala de tiempo de subsegundos como "calentamiento instantáneo". En algunas realizaciones, la velocidad de calentamiento es más rápida que una escala de tiempo para la difusión térmica.

En una realización, en la cual la muestra líquida provista dentro del canal incluye células, la aplicación de los pulsos eléctricos hace que las células experimenten una electroporación irreversible. El mecanismo de electroporación irreversible de microorganismos no se encuentra totalmente elucidado en la bibliografía. Se ha postulado que cuando un pulso con intensidad suficientemente alta se aplica a la suspensión celular, de modo que un voltaje superior a 1 V se establece a lo largo de la membrana celular, se generan poros en la membrana. El proceso se conoce como electroporación. Cuando el número de pulsos y/o ancho de pulsos es suficientemente grande, la membrana celular se romperá, y comprometerá, de forma permanente, la integridad de la membrana celular. El presente proceso se conoce como electroporación irreversible, que se acompaña de la liberación de algunos contenidos intracelulares de la célula. En general, la intensidad de campo eléctrico requerida para lograr la electroporación irreversible de microorganismos es mayor que alrededor de 10 kV/cm. Por ejemplo, muchos microorganismos pueden someterse a la electroporación irreversible para campos eléctricos dentro del rango de aproximadamente 12-45 kV/cm. La acción de dicho campo eléctrico intenso en el medio de suspensión se acompaña de corrientes iónicas apreciables que, para el dispositivo descrito en la presente memoria, aumentan la temperatura del medio mediante calentamiento por efecto Joule. Ello puede aumentar la eficacia de la electroporación irreversible y, de esta manera, reducir el umbral de electroporación irreversible y contribuir al daño de la membrana/pared celular dado que el calentamiento tiene una influencia significativa en la fluidez y estabilidad de la membrana celular.

Sin pretender encontrarse limitado por la teoría, se cree que los efectos de la electroporación irreversible y desintegración celular inducida por calor actúan juntos para mejorar la liberación de contenidos celulares. De aquí en

adelante, se hará referencia al proceso combinado por el cual las macromoléculas deseadas se liberan de las células como "lisis eléctrica".

5 En el caso de microorganismos con paredes celulares protectoras además de la membrana celular, la influencia de la electroporación irreversible sola puede no ser suficiente para liberar algunos de los contenidos celulares de interés cuando no se ven ayudados por dicho calentamiento. El calentamiento puede ser responsable de la desintegración de la pared celular en la medida en que permite la liberación de contenidos celulares de peso molecular más alto.

10 Sin sujetarse a cualquier teoría, se cree que el campo eléctrico intenso puede provocar la modificación estructural en macromoléculas como, por ejemplo, proteínas, debido a una modificación del equilibrio de fuerzas que mantiene sus estructuras nativas. Las alteraciones en la conformación pueden desconectar los grupos funcionales químicamente reactivos en una macromolécula y volverlos incapaces de llevar a cabo sus funciones catalíticas u otras funciones designadas. Sin embargo, las macromoléculas son, en general, más resistentes a los campos eléctricos que microorganismos comparativamente más grandes. El exceso de calor que actúa durante un período de hasta 100 ms puede provocar la fluctuación térmica excesiva de la estructura y puede privar a algunas de las macromoléculas de su funcionalidad. En términos generales, el calentamiento instantáneo y el campo eléctrico intenso contribuyen al mecanismo de tratamiento eléctrico descrito en la presente memoria, lo cual hace que las especies macromoleculares dentro del líquido experimenten cambios de conformación irreversibles. En realizaciones seleccionadas, el método de tratamiento eléctrico descrito más arriba se emplea de modo que la muestra (como, por ejemplo, un lisado) se convierte en más apropiada para aplicaciones corriente abajo como, por ejemplo, ensayos de diagnóstico. La lisis eléctrica de células y subsiguiente tratamiento eléctrico del lisado se llaman, ya sea de forma aislada o en combinación, procesamiento eléctrico a lo largo de la presente descripción.

20 Según se describe más abajo, la fuerza iónica de la muestra puede seleccionarse para encontrarse por debajo de un valor máximo con el fin de soportar el establecimiento de un campo eléctrico eficaz con una escala de tiempo apropiada para efectuar el procesamiento eléctrico. El valor máximo específico o rango de valores apropiados de la fuerza iónica dependerán, principalmente, de la capacidad de la fuente de voltaje aplicada para administrar un voltaje alto junto con la corriente correspondiente en la escala de tiempo en la cual se desea que ocurra el procesamiento. Se comprenderá que las personas con experiencia en la técnica pueden llevar a cabo experimentos de rutina con el fin de determinar un límite superior o rango de valores apropiados para la fuerza iónica en una aplicación dada. Dado que tanto la lisis eléctrica como el tratamiento eléctrico se llevan a cabo según las realizaciones seleccionadas en un medio con baja fuerza iónica y en ausencia de reactivos adicionales, una etapa de equilibrio del medio de lisis posterior, en general, requerida en métodos de preparación de muestra tradicionales, puede no ser necesaria. En otras aplicaciones, la fuerza iónica apropiada para una etapa subsiguiente puede alterarse fácilmente mediante la incorporación de una concentración apropiada de iones a la muestra o lisado procesado.

30 En algunas realizaciones, etapas de procesamiento de muestra adicionales como, por ejemplo, limpieza de muestra y concentración de muestra, pueden incorporarse de inmediato al dispositivo, potencialmente sin añadir complejidad o coste significativos al dispositivo o al proceso de fabricación. Ejemplos de la incorporación de dichas etapas de procesamiento adicionales se describen en mayor detalle más abajo. Por consiguiente, las realizaciones seleccionadas provistas en la presente memoria incluyen dispositivos y métodos que permiten el procesamiento directo y rápido de muestras sin requerir reactivos adicionales y etapas de procesamiento adicionales.

40 En las realizaciones seleccionadas, los dispositivos y métodos se proveen para la preparación de muestras que contienen microorganismos como, por ejemplo, pero sin limitación a, sangre, orina o medio de cultivo, para ensayos de diagnóstico. El dispositivo, que puede proveerse en la forma de un cartucho desechable, puede interactuar opcionalmente con cámaras de reacción donde las moléculas objetivo se someten a un proceso de detección o identificación.

45 Con referencia, ahora, a la Figura 1, se provee una realización a modo de ejemplo de un dispositivo para llevar a cabo un procesamiento de muestra eléctrico. La Figura 1 muestra una configuración a modo de ejemplo del dispositivo 1, mientras más detalles se proveen por la sección transversal esquemática que se muestra en la Figura 2. El dispositivo tiene un canal 2 delgado (donde el grosor del canal es pequeño en comparación con las dimensiones laterales del canal) que se define en un lado por la placa 5 base, capa 9 de aislamiento y electrodo 7 y, en el lado opuesto, por la placa 6 superior, capa 10 de aislamiento y electrodo 8. Las porciones superior e inferior se encuentran separadas por un espaciador delgado, en el cual el material se retira para formar la cavidad del canal. Normalmente, el espaciador está hecho de un material dieléctrico que puede ser ligeramente deformable bajo una presión de fijación aplicada, o que se une a las superficies superior e inferior de la cavidad del canal. El espaciador, por consiguiente, define las paredes laterales del canal, provee el obturador de líquidos, y eléctricamente aísla los electrodos superior e inferior entre sí.

55 En las realizaciones alternativas, el dispositivo no necesita incluir un espaciador separado, y las paredes laterales que definen las porciones laterales del canal pueden formarse, al menos en parte, dentro de un sustrato, de modo que el sustrato incluye una porción empotrada que tiene una superficie inferior y paredes laterales adaptadas para formar al menos una porción del canal.

El electrodo 7 inferior y electrodo 8 superior se encuentran eléctricamente aislados de la placa base y placa superior (sustratos) por capas, 9 y 10, inferior y superior eléctricamente aislantes. En una realización alternativa, una o ambas de las placas superior e inferior son no conductoras y la capa aislante eléctrica puede omitirse. Según los requisitos térmicos, pueden también proveerse capas aislantes térmicas que pueden estar separadas de o ser al menos una porción del material aislante eléctrico.

El canal incluye un puerto 3 de entrada a través del cual la muestra de fluido y otros fluidos pueden introducirse y que puede estar en comunicación fluida con cámaras corriente arriba donde el prefiltrado puede, de manera opcional, llevarse a cabo y que puede incluir cámaras donde los fluidos se almacenan. El dispositivo también está equipado con un puerto 4 de salida que puede estar en comunicación fluida con un aparato o cámara recolectora como, por ejemplo, una cámara de desechos o cámara de reacción de ensayo corriente abajo. El flujo a lo largo del canal se provee por un diferencial de presión entre puertos de entrada y salida. El dispositivo puede incluir características de fluido adicionales como, por ejemplo, válvulas para abrir y cerrar puertos 3 y 4.

El canal tiene dimensiones $A \times A \times L$ que, en una implementación a modo de ejemplo, pueden encontrarse en el orden de $0,1 \times 5 \times 10 \text{ mm}^3$, pero que pueden ser mayores o menores según los requisitos operativos. Dos electrodos 7 y 8 pretenden inducir un campo eléctrico a lo largo del canal.

El canal microfluídico tiene un grosor en una escala submilimétrica (a saber, micra). Un rango a modo de ejemplo para el grosor del canal es de $5 \text{ } \mu\text{m} < A < 1.000 \text{ } \mu\text{m}$. En algunas realizaciones, un grosor de canal apropiado para obtener lisis eléctrica y tratamiento eficaces con fuentes de voltaje prácticas (por ejemplo, en el rango de 10-200 V) puede ser de entre aproximadamente $50 \text{ } \mu\text{m}$ y $500 \text{ } \mu\text{m}$. La longitud y el ancho del canal pueden seleccionarse para proveer un volumen de canal apropiado y, de manera opcional, una velocidad de flujo adecuada a través del canal. Sin excluir el uso de los métodos y dispositivos descritos en la presente memoria para aplicaciones microfluídicas en las cuales la longitud y el ancho del canal se encuentran también en una escala submilimétrica, rangos a modo de ejemplo más típicos para la longitud y ancho del canal son aproximadamente de $1 \text{ mm} < A < 10 \text{ mm}$ y $5 \text{ mm} < L < 50 \text{ mm}$.

En una implementación a modo de ejemplo, uno o más del primer y segundo electrodos pueden proveerse como recubrimientos de metal que se depositan en capas eléctricamente aislantes provistas en las superficies de canal superior e inferior. Grososres a modo de ejemplo para el electrodo depositado incluyen $1 \text{ nm} < a < 1 \text{ } \mu\text{m}$, aunque capas más gruesas también pueden realizarse.

En otro ejemplo, uno o más del primer y segundo electrodos pueden proveerse como hojas metálicas, para las cuales las propiedades materiales y dimensiones se eligen según los requisitos eléctricos y térmicos. Grososres a modo de ejemplo para la hoja de metal incluyen $10 \text{ } \mu\text{m} < a < 500 \text{ } \mu\text{m}$, o $20 \text{ } \mu\text{m} < a < 200 \text{ } \mu\text{m}$.

En realizaciones previstas para muestras que contienen células o virus, a las que aquí se hace referencia de manera conjunta como células, el canal puede operarse para concentrar las células antes de la lisis eléctrica. Mediante la aplicación de un voltaje unipolar dependiente del tiempo en los electrodos, un campo eléctrico se establece en el canal, el cual ejerce una fuerza eficaz en las células cargadas y las lleva a una región delgada en las inmediaciones del electrodo anódico mientras el exceso de fluido se lleva fuera del puerto de salida. Para una retención mejorada de las células, el electrodo anódico puede cubrirse con ligandos de captura específicos a una clase de células que se desea retener. Dado que las células, concentradas en la extremidad inferior del canal, se mueven lentamente en el electrodo, estas se unen o hibridizan, de manera específica, con sus ligandos de captura correspondientes. El presente modo de concentración de muestra se ha descrito en Solicitud de Patente PCT co-pendiente Número WO/2011/014946A1.

Una realización alternativa en la cual el dispositivo se adapta para las capacidades de concentración y limpieza se presenta en la Figura 3(a). Un filtro 16, por ejemplo, un filtro de membrana, que tiene un grosor menor que el del canal (o, de manera equivalente, el espaciador de canal) se asegura dentro del canal de modo que el canal se divide en dos porciones 14 y 15 y, de esta manera, se permite que las células (u otra materia particulada) dentro de la muestra se retengan por el filtro mientras la muestra fluye entre el puerto 12 de entrada y el puerto 13 de salida. En algunas realizaciones, al menos una porción del filtro se coloca entre los electrodos superior e inferior.

En una implementación a modo de ejemplo, el filtro puede estar hecho de un material resistente químico y/o térmico como, por ejemplo, polietileno de densidad alta, o membrana de policarbonato. Por ejemplo, un filtro térmicamente resistente puede ser beneficioso en aplicaciones que implican un tratamiento térmico rápido para evitar la degradación del filtro durante el procesamiento eléctrico. Dado que dichos filtros de membrana son normalmente muy finos, por ejemplo, de aproximadamente 10 - 20 micras, puede requerirse un soporte para evitar el colapso del filtro sobre la superficie del canal debido a la presión del fluido, lo cual puede evitar el flujo de fluido a través del dispositivo. El soporte de filtro puede añadirse en la forma de estructuras introducidas en el canal que retienen el aislamiento eléctrico de los electrodos superior e inferior y que no impiden, de manera significativa, el flujo de muestra. En una realización, un soporte de filtro apropiado son microesferas 17 monodispersas que están unidas al filtro de membrana o a la superficie del canal según se muestra en el diagrama de sección transversal de la Figura 3(b). En otra realización, el soporte de filtro puede proveerse por estructuras espaciadoras adicionales ubicadas a cada lado del filtro, donde los espaciadores adicionales se colocan de modo que no impiden sustancialmente el flujo

de líquido dentro del canal. El soporte de filtro y/o el filtro pueden seleccionarse para formarse a partir de un material que tiene propiedades dieléctricas apropiadas para inducir el campo eléctrico para que fluya a través del líquido dentro del canal, en oposición al desvío del líquido y flujo a través del filtro y soporte de filtro.

5 Una realización alternativa del dispositivo adaptado para capacidades de concentración y limpieza se presenta en la vista en sección transversal A-A en la Figura 4(a) y vista en planta en la Figura 4(b). Un filtro 38, por ejemplo, un filtro de membrana, según se describe más arriba, se asegura dentro de una cámara 33 fluidicamente conectada al puerto 3 de entrada, al canal 2 eléctrico y al puerto 34 de salida de filtro. Un soporte 39 de difusor se provee para el filtro si fuera necesario. Cuando la válvula 36 de entrada de canal está cerrada y la válvula 35 de puerto de entrada y válvula 37 de puerto de salida de filtro están abiertas, el fluido de muestra puede fluir a través del filtro del puerto 3 de entrada al puerto 34 de salida de filtro y luego a una cámara de desechos en conexión fluida con el puerto 34 de salida y, de esta manera, las células dentro de la muestra se retienen por el filtro. Un fluido de resuspensión de composición y fuerza iónica apropiadas para el procesamiento eléctrico subsiguiente y procesos corriente abajo pasa entonces del puerto 3 de entrada hasta que el fluido de muestra se haya limpiado suficientemente a través del puerto 34 de salida de filtro. El puerto 37 de salida de filtro se cierra entonces y el puerto 36 de entrada de canal se abre y el fluido de resuspensión fluye del puerto de entrada y, de esta manera, lleva las células retenidas al canal eléctrico para el subsiguiente procesamiento eléctrico. De manera alternativa, las células retenidas se resuspenden y se llevan al canal eléctrico por el flujo del puerto 34 de salida de filtro mientras el puerto 37 de salida de filtro se encuentra abierto y el puerto 35 de entrada se encuentra cerrado. Se proveen contactos 41 eléctricos para la aplicación del campo eléctrico.

20 El pasaje de un gran volumen de fluido de muestra a través del filtro junto con el volumen relativamente pequeño de fluido de resuspensión usado para llevar las células retenidas al canal eléctrico permite que la concentración celular para el subsiguiente lisado y tratamiento aumente de manera arbitraria a partir de la concentración de muestra inicial. También permite la sustitución del fluido de muestra por un fluido de suspensión apropiado para procesos corriente abajo que incluyen lisado eléctrico y tratamiento eléctrico y subsiguientes ensayos. La anterior es una de una cantidad de diferentes disposiciones de válvulas y movimientos de fluidos que producen una funcionalidad equivalente que puede variar por las personas con experiencia en la técnica según la presente descripción.

30 La aplicación de un tren de pulsos eléctricos de amplitud modulada apropiado en los dos electrodos hace que las células se lisen. Dependiendo de la magnitud y duración del campo eléctrico resultante, el campo eléctrico y su aumento de temperatura asociado hacen que o inducen a que moléculas como, por ejemplo, proteínas y ácidos nucleicos se liberen de la célula como un lisado. Las moléculas liberadas además atraviesan una transformación en el período entre liberación y enfriamiento del líquido. Dichos procesos constituyen lo que en la presente memoria se identifican como lisis eléctrica y tratamiento eléctrico, los cuales pueden proveer etapas útiles en la preparación de muestras biológicas celulares para diagnóstico u otros propósitos. Según se describe más arriba, se cree que los mecanismos subyacentes que permiten dichas etapas de procesamiento eléctrico resultan de la respuesta eléctrica y térmica en el canal a partir de la aplicación del tren de pulsos designado.

35 Se cree que el funcionamiento del dispositivo implica establecer un campo eléctrico con corriente eléctrica consecuente en el canal de suficiente magnitud para provocar la lisis eléctrica de células y/o el tratamiento eléctrico de macromoléculas en el fluido de canal. Para un rendimiento mejorado, la electrolisis del fluido en la interfaz de electrodo con su producción de gas acompañante y formación de burbujas debe minimizarse. Algunas realizaciones provistas en la presente memoria logran esto mediante el aislamiento de uno o más de los electrodos de la muestra con una capa delgada de recubrimiento dieléctrico y, por consiguiente, se forma un electrodo de bloqueo que está libre de comunicación eléctrica directa con el líquido dentro del canal, lo cual sirve para evitar que cualquier proceso de transferencia de carga ocurra a lo largo de la interfaz electrodo-electrolito.

45 En otras realizaciones, el canal puede incluir electrodos de no bloqueo que pueden contactar directamente el líquido y, de esta manera, soportar una corriente farádica. Los productos de electrolisis se evitan operando el dispositivo mediante el uso de un tren de pulsos bipolares de alta frecuencia. Los iones producidos en la interfaz líquido-electrodo se neutralizan, de manera significativa, en ciclos alternos antes de dispersarse, de manera significativa, lejos hacia el medio a granel. Lamentablemente, la presencia de la corriente farádica en la interfaz soporta reacciones redox que pueden dañar las macromoléculas en los alrededores del electrodo. El presente efecto puede aliviarse mediante la provisión de una capa de permeación protectora. En términos generales, la capa de permeación puede proveerse para permitir los movimientos de iones del soluto al electrodo mientras evita que las macromoléculas alcancen la interfaz electrolito-electrodo.

50 Los métodos a modo de ejemplo para preparar un soporte sólido con una capa de permeación se describen de aquí en adelante. Dichos ejemplos pretenden ser no restrictivos, y se comprenderá que puede proveerse cualquier material o recubrimiento apropiado que permita el transporte de iones del soluto al electrodo mientras limita el transporte de macromoléculas. Los materiales de la capa de permeación pueden, de manera opcional, incluir grupos funcionales para lograr la función de transporte selectivo deseada de la capa.

60 Ejemplos de preparaciones de superficie son la deposición pequeñas moléculas como, por ejemplo, enlaces de organosilanos y tiol por interacción covalente o macromoléculas como, por ejemplo, poli-L-Lisina y PEI por adsorción física.

En una realización no restrictiva a modo de ejemplo, una capa de silano heterobifuncional con grupos funcionales, X-Si-X', puede depositarse sobre cualquier superficie (Y) en la cual una capa de silano pueda aplicarse para formar Y-O-Si-X'. X' puede ser trimetoxi (-OCH₃)₃, trietoxi (-OC₂H₅)₃ o tricloro (Cl₃) y formar la química Y-O-Si-X' tras la hidrólisis.

5 Un ejemplo de dicha superficie es una superficie hidroxilada de aluminio, con una capa de óxido natural o artificialmente procesada, y una capa de silano heterobifuncional que se genera por la formación de Al-O-Si-X'. X puede variar e interactúa, de manera covalente, con el respectivo grupo funcional de cualquier molécula adicional para fijarse a la capa de silano mediante cualquier química apropiada. Por ejemplo, X puede ser un grupo funcional de glicidilo de glicidiloxipropil-trimetoxisilano (GOPTS) o grupo funcional de aminas de 3-aminopropiltriethoxisilano (APTS). El grupo funcional glicidilo de GOPTS interactuará inmediatamente con un grupo funcional de aminas de la molécula que se fijará. Una activación adicional del grupo funcional de aminas de APTS con cualquier química de reticulación, por ejemplo, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), puede proveerse para la interacción covalente con un grupo funcional carboxilo de la molécula que se fijará. De manera opcional, el grupo funcional de aminas de APTS puede preactivarse con cualquier química conocida, por ejemplo, con una reticulación de glutaraldehído homobifuncional, para interactuar inmediatamente con el grupo funcional de aminas de la molécula que se inmovilizará.

De manera alternativa, las moléculas de proteína con alta afinidad y especificidad como, por ejemplo, avidina o estreptavidina pueden inmovilizarse en la superficie funcionalizada mediante cualquier química apropiada y una molécula biotinilada puede inmovilizarse inmediatamente sobre la superficie por la interacción de afinidad biotina-avidina.

La superficie puede prepararse por procedimientos presentados en el siguiente ejemplo no restrictivo. Placas de soporte de aluminio filtradas se han limpiado con agua, luego se han aclarado dos veces con metanol y se han secado al aire. 2% de 3-Aminopropil Triethoxisilano se ha preparado en 95% de Metanol 5% de agua y las placas se han sumergido en silano durante 5 min. Luego, las placas se han aclarado en metanol dos veces, se han secado al aire y se han cocido a 110°C durante 10 min. Después del enfriamiento, las placas se han sumergido en 2,5% de reticulación de glutaraldehído homobifuncional en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se han aclarado de manera minuciosa con agua y se han secado al aire.

En otra realización, la capa de permeación puede ser un hidrogel como, por ejemplo, un hidrogel tipo red basado en poliacrilamida (p.ej., Yu y otros, *BioTechniques* 34:1008-1022, 2003) o, por ejemplo, un hidrogel tipo cepillo como, por ejemplo, el hidrogel descrito en la Patente de Estados Unidos No. 6,994,964. Como se describe más arriba, la aplicación de una diferencia potencial eléctrica entre dos electrodos separados por una solución electrolítica puede resultar en reacciones electroquímicas en la interfaz electrodo—electrolito si el voltaje aplicado supera un valor umbral. En dicho caso, burbujas de gas pueden generarse en los electrodos debido a la electrólisis del agua o reacciones electroquímicas de iones electrolíticos. La formación de gas puede obstruir rápidamente el canal y llevar a la interrupción en las características de flujo normal. Además, el aumento de presión en el canal puede provocar el daño mecánico del dispositivo. Finalmente, los productos de las reacciones redox debido a corrientes farádicas pueden degradar las moléculas biológicas en la solución y hacer que la preparación de la muestra no sea apropiada para los ensayos corriente abajo.

Un método para evitar dicho problema es la aplicación de un voltaje alterno con frecuencia suficientemente alta de modo que la formación de burbujas de gas se minimiza según se describe más arriba. En otro enfoque, la generación de burbujas de oxígeno e hidrógeno puede suprimirse mediante la incorporación de un par redox a la muestra que fluye a lo largo de los electrodos. A modo de ejemplo, la quinhidrona, que es un complejo entre hidroquinona (H₂Q) que actúa como un donante de electrones y la *p*-benzoquinona (Q) que actúa como un aceptante de electrones, puede añadirse a las corrientes de flujo. En lugar de la oxidación y reducción de agua que genera oxígeno e hidrógeno, ahora, H₂Q se oxida y Q se reduce sin generación de burbujas. Una desventaja de ambos métodos antes mencionados es que las reacciones electroquímicas interfaciales que implican macromoléculas no pueden evitarse totalmente. Se observa además que la mayoría de las macromoléculas se cargan en un medio acuoso y, por consiguiente, pueden derivar en interfaces bajo la influencia de altos campos normalmente usados para la lisis eléctrica.

Según se describe más arriba, la generación de burbujas de gas y reacciones electroquímicas interfaciales pueden evitarse mediante la provisión de un canal que incorpora electrodos de bloqueo para suprimir una corriente farádica. Se conoce, sin embargo, que la aplicación de un campo eléctrico constante en un canal que contiene una solución iónica acuosa, donde el canal se configura para suprimir una corriente farádica, resulta en la formación de capas dobles eléctricas cerca de los electrodos que rápidamente exploran en campo eléctrico aplicado en las regiones interiores del canal. Por consiguiente, el campo eléctrico real experimentado por las células suspendidas, al cual se hace referencia como el "campo eficaz", puede caer a una pequeña fracción del campo nominalmente aplicado poco después de que el campo se haya encendido.

En una realización, las desventajas antes mencionadas relacionadas con la exploración del campo eléctrico dentro del líquido se evitan de la siguiente manera. Según se describe más arriba, el voltaje aplicado se provee como un tren de pulsos de amplitud modulada. Si la duración de los pulsos no supera el tiempo de carga característico de los

electrodos, entonces los efectos de blindaje en el campo eléctrico eficaz pueden tolerarse. Por consiguiente, en una realización, los electrodos (por ejemplo, electrodos 7 y 8 en las Figuras 1-3) se proveen como un sustrato conductor delgado y con un recubrimiento dieléctrico delgado en contacto con el fluido del canal, donde el perfil de superficie del conductor y dieléctrico se encuentra microestructurado para la mejora del área de superficie de modo que el área de superficie de electrodos de bloqueo supera sustancialmente el área de superficie de la superficie plana correspondiente. La gran capacitancia de esta manera lograda permite un tiempo de carga superior a un microsegundo como, por ejemplo, en el orden de decenas de microsegundos.

La capacitancia de la capa de bloqueo puede también mejorarse mediante la provisión de una capa dieléctrica delgada que tiene una constante dieléctrica alta. En una implementación a modo de ejemplo, el sustrato de metal es de aluminio, y la capa dieléctrica es de óxido de aluminio (Al_2O_3). Dicha capa dieléctrica de óxido de aluminio (Al_2O_3) está formada por la oxidación electroquímica del aluminio (aluminio anodizado). Con el fin de aumentar la superficie eficaz 100 veces y de proveer un aumento correspondiente a la capacitancia por unidad de área nominal, el electrodo se graba con una red densa de cavidades y túneles microscópicos.

En el contexto de la presente descripción, dichos tipos de electrodos se identifican por el término SEOA (aluminio oxidado de superficie mejorada). El grosor de la capa dieléctrica se determina por el voltaje aplicado durante el proceso de formación (anodización) electroquímica. En una implementación a modo de ejemplo, el grosor se elige para que sea de 2 nm por cada voltio que pueda aplicarse de manera segura en el electrodo. En ejemplos para los cuales los voltajes aplicados son de alrededor de 200 V, el grosor de la capa dieléctrica para la operación segura bajo pulsos de duración larga se calcula, de esta manera, en el orden de 400 nm. Dicho grosor puede, en algunos casos, resultar en un tiempo de carga que es demasiado corto y, por consiguiente, se reduce la duración del campo eficaz en el canal a periodos indeseablemente cortos. Además, una cantidad apreciable del voltaje aplicado cae en la capa dieléctrica, que tiene, en general, una constante dieléctrica mucho más baja en comparación con el agua. En la práctica, cuando la duración de los pulsos en el tren, t_p , no supera 1 ms, el grosor dieléctrico mucho más bajo de alrededor de 50 nm puede usarse sin los peligros de establecer corriente farádica debido al inicio de procesos de anodización en el electrodo. Investigaciones por los inventores han indicado que un grosor de capa de óxido de aluminio de 50-200 nm es apropiado para la mayoría de las aplicaciones descritas en la presente memoria. Por ejemplo, en el caso de la lisis eléctrica de bacterias Gram-positivas, los campos eléctricos de más de 10 kV/cm son deseables, y un grosor superior a 50 nm se desea para evitar la descarga disruptiva. En algunas realizaciones, el grosor dieléctrico y la mejora del área de superficie pueden seleccionarse para proveer una capacitancia en el rango de aproximadamente $0,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ a $200 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. En otras realizaciones, la capacitancia de la capa dieléctrica puede ser de entre aproximadamente $2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ a $50 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. La constante dieléctrica seleccionada puede depender de la fuerza iónica del líquido de suspensión y de las limitaciones de la respuesta de frecuencia de la eléctrica de impulsos. Por ejemplo, cuando la fuerza iónica del líquido se encuentra por debajo de 1 mM y las consideraciones de coste requieren que la máxima frecuencia operativa de la eléctrica de impulsos sea inferior a 10 kHz, puede elegirse que la capacitancia sea superior a $5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.

Aunque aspectos de la descripción se describen con referencia al aluminio oxidado de superficie mejorada (SEOA), se comprenderá que SEOA es meramente un material a modo de ejemplo para implementar las presentes realizaciones. En otro ejemplo, un sustrato con un metal diferente (con área de superficie alta) y una capa de óxido puede emplearse como, por ejemplo, tantalio y óxido de tantalio. En otra realización, el silicio y dióxido de silicio pueden emplearse, donde el silicio puede doparse con la concentración apropiada para proveer conductividad adecuada.

En una realización a modo de ejemplo que implica un electrodo de bloqueo formado a partir de silicio y dióxido de silicio, el silicio puede ser silicio poroso como, por ejemplo, silicio macroporoso o silicio microporoso. En un ejemplo, el silicio es silicio macroporoso con paredes de poros que son suficientemente gruesas para soportar el cultivo de una capa de óxido con un grosor en la escala de nanómetros, mientras mantiene una capa subyacente de silicio conductor. El grosor de la capa de óxido y la mejora de la superficie apropiados se seleccionan según se describe más arriba en el ejemplo de SEOA.

En la preparación de silicio poroso, el sustrato de silicio se dopa normalmente y, de esta manera, se provee un electrodo conductor para su uso con los presentes métodos. En algunas implementaciones, la porosidad del silicio puede controlarse mediante la variación de las condiciones de grabado, y/o posgrabado de la estructura en una solución de ataque adecuado (como, por ejemplo, ácido hidrofúrico). La capa de óxido puede añadirse después del grabado, donde el óxido se genera por oxidación en un entorno térmico adecuado. Como será aparente para las personas con experiencia en la técnica, el grosor de la capa de óxido puede controlarse según el tiempo y la temperatura de la incubación térmica. Los poros pueden formarse como una matriz ordenada de poros bidimensionales, por ejemplo, mediante definición fotolitográfica de sitios de nucleación de poros, o los poros pueden formarse como una estructura desordenada.

Las propiedades eléctricas del canal pueden modelarse por el circuito eléctrico equivalente presentado en la Figura 5(a). La capacitancia C_{DL} corresponde a la capacitancia de capa doble dinámica en las interfaces de capa dieléctrica y el líquido en el canal. R_{DL} es la resistencia paralela (en la dirección del grosor de canal) correspondiente a corriente de fuga en la capa doble.

En general, los valores de C_{DL} para superficies de metal planas caen en el rango de 5-50 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ dependiendo del tipo de electrodo, fuerza iónica y composición de la solución, temperatura y voltaje. Sin embargo, la aspereza de la superficie puede aumentar la capacitancia a valores más altos. La capacitancia C_{DE} es la capacitancia de la capa dieléctrica cuyo valor depende del grosor de la capa y del área eficaz del electrodo. La capacitancia para los electrodos SEOA usados en los experimentos descritos en la presente memoria ha sido de 6 o 36 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Dichos electrodos se han designado como SEOA1 y SEOA2, respectivamente.

La resistencia R_{DE} es la resistencia paralela equivalente de la capa dieléctrica y representa corriente de fuga en el condensador. Se reduce con la capacitancia, temperatura y voltaje crecientes. Los valores típicos para R_{DE} se encuentran en el orden de $100/C_{DE}$ $\text{M}\Omega$ con C_{DE} en μF . R_{CH} representa la resistencia de solución a granel y C_{CH} , la capacitancia a granel. El valor de C_{CH} es tan pequeño que puede aproximarse con circuito abierto. Para un canal con una altura de 100 μm , la resistencia R_{CH} es de alrededor de 200 Ω por cm^2 del electrodo, cuando la fuerza iónica del líquido es de 0,5 mM. R_{LOAD} es la suma de la resistencia de salida de suministro de energía y la resistencia de entrada de los electrodos. Todos los valores de parámetros eléctricos, a excepción de R_{LOAD} , R_{DE} y C_{DE} , dependen de la fuerza iónica de la solución portadora. La resistencia de la carga modifica la división de voltaje entre los componentes de circuito y se convierte en particularmente importante en fuerzas iónicas más altas.

Teniendo en cuenta los valores típicos de los parámetros eléctricos, el circuito equivalente puede simplificarse según se presenta en la Figura 5(b). Las resistencias R_{DE} y R_{DL} son suficientemente grandes de modo que pueden aproximarse como abiertas. Las capacitancias de capa doble y capacitancias de capa dieléctrica se han combinado en serie como C_{EFF} . El tiempo de carga de capa doble, según el presente modelo de circuito, se provee por

$$t_c \approx (R_{LOAD} + R_{CH})(C_{DE}C_{DL})/2(C_{DE} + C_{DL}) \equiv (R_{LOAD} + R_{CH})C_{EFF} \quad (1)$$

Se observa que el presente tiempo de carga es de 1-2 órdenes de magnitud más grande que el alcanzable sin mejora de la superficie del electrodo. Por consiguiente, el uso de SEOA como uno o más de los electrodos en el dispositivo provee un aumento sustancial en el tiempo de carga. Por ejemplo, en una realización, el tiempo de carga puede ser al menos de un microsegundo para líquidos que tienen una fuerza iónica por debajo de entre 10 mM y, de esta manera, se soportan los métodos antes descritos de lisis eléctrica y tratamiento de muestra. La Figura 5(c) presenta una respuesta de corriente típica del canal a un pulso cuadrado bipolar aplicado para electrodos SEOA1 y SEOA2. Según lo observado, la reducción de la corriente, que es un indicador del campo eficaz, es suficientemente pequeña en la duración de 50 μs de los pulsos cuadrados. Los canales, que se han llenado con 0,4 mM de tampón fosfato, tenían dimensiones de 28 x 3,17 x 0,1 mm^3 .

Un método a modo de ejemplo para emplear el presente dispositivo para el procesamiento de muestras se ilustra ahora con referencia a la Figura 2. La fuente, 20, de voltaje externa aplica una diferencia de potencial entre los dos electrodos, 7 y 8, en la forma de un tren de pulsos de amplitud modulada. En un ejemplo, los pulsos son pulsos cuadrados bipolares. Otras formas de pulso, que pueden facilitar el diseño de la eléctrica de impulsos, pueden utilizarse. Sin embargo, los datos publicados sobre la inactivación de microorganismos en muestras de comida indican que los pulsos cuadrados son más eficaces en términos de electroporación irreversible.

Las características eléctricas del canal dependen de la fuerza iónica de la solución acuosa. Por consiguiente, en las realizaciones a modo de ejemplo, la selección de un voltaje aplicado apropiado, la duración de pulsos y conteo de pulsos pueden llevarse a cabo según un conocimiento previo de la fuerza iónica de la solución de muestra o, de manera alternativa, según mediciones eléctricas en el sitio para establecer los parámetros del tren de pulsos. En un ejemplo, ello puede llevarse a cabo según la realimentación basada en la corriente eléctrica monitoreada por el medidor 21 mediante el bucle 22 de realimentación de control y la unidad 23 de controlador.

Tras aplicar el voltaje a los electrodos, el pasaje de la corriente iónica a través del líquido de muestra resulta en la generación de calor durante el tren de pulsos que es seguido por el rápido enfriamiento después de que el tren de pulsos haya cesado. Como se apreciará en los ejemplos experimentales presentados más abajo, el rendimiento del canal durante el tratamiento eléctrico depende de sus características térmicas, y la geometría del canal, dimensiones y propiedades térmicas del material se seleccionan para que sean aislantes de manera suficientemente térmica para soportar el calentamiento instantáneo bajo la aplicación de pulsos de voltaje a los electrodos (por ejemplo, de modo que la temperatura del líquido aumenta a una velocidad en exceso de aproximadamente 250 grados Celsius por segundo), mientras que también son conductores de manera suficientemente térmica para proveer un enfriamiento rápido de subsegundos después de retirar los pulsos de voltaje aplicados. En otras palabras, mediante la selección de materiales del canal con una conductividad térmica apropiada, y dimensiones y geometrías del canal que proveen una capacidad de calor apropiada (o, de manera equivalente, una masa térmica apropiada o capacidad de disipación de calor) para la relación superficie-volumen del canal, el aumento de calor inicial puede seguirse por un ciclo de enfriamiento rápido. Se comprenderá que puede haber muchas configuraciones diferentes de las dimensiones del canal y geometría y elecciones para los materiales del canal que exhibirán una respuesta térmica apropiada. Por consiguiente, los ejemplos específicos provistos en la presente memoria, y en los ejemplos de más abajo, se proveen como ejemplos heurísticos y no restrictivos. Otras configuraciones y elecciones de material pueden llevarse a cabo por experimentos de rutina sin apartarse del alcance de la presente descripción.

Las propiedades térmicas del canal dependen de muchos parámetros de canal diferentes. Por ejemplo, la conductividad del canal y la capacidad de calor pueden controlarse según la geometría y/o grosor del electrodo de metal. La mayoría de los electrodos tendrán una alta conductividad térmica, pero las propiedades térmicas del canal pueden adaptarse mediante la selección de un grosor de electrodo apropiado para proveer una capacidad de calor apropiada y un sustrato apropiado (p.ej., térmicamente aislante) en el cual se soportan los electrodos.

Por consiguiente, uno o más de los electrodos de canal pueden proveerse como una hoja de metal o recubrimiento que tiene una alta conductividad térmica y/o una alta capacidad de calor con respecto al volumen total de fluido en el canal para promover el enfriamiento rápido después del tratamiento eléctrico, mientras que, al mismo tiempo, provee una capacidad de calor suficientemente pequeña de modo que el calentamiento instantáneo puede producir un rápido aumento de la temperatura dentro del canal durante la aplicación de los pulsos de voltaje (por ejemplo, un aumento de la temperatura superior a aproximadamente 250 grados Celsius por segundo).

De manera alternativa o adicional, el canal puede incluir elementos de disipación de calor laterales. En una realización, la conductividad térmica de las paredes laterales del canal puede seleccionarse de modo que las paredes laterales pueden actuar como un disipador de calor lateral. En otro ejemplo, uno o ambos electrodos pueden extenderse más allá de la región que define el canal y, de esta manera, proveer otro trayecto de disipación de calor lateral.

El comportamiento eléctrico y térmico de los canales se ilustra ahora con un ejemplo de mediciones tomadas durante un experimento de canal típico. La Figura 6 muestra la envolvente de los pulsos de corriente eléctrica medidos en un canal cuyos puertos de entrada y salida se encontraban abiertos a la presión atmosférica y que estaba sujeta a un voltaje aplicado en la forma de un tren de pulsos bipolares cuadrados con $n=800$ pulsos, una amplitud de 196 V y una frecuencia de 10 kHz (la resistencia de la carga, R_{LOAD} en la Figura 5b, ha sido de 10 Ohm). La estructura del canal comprendía una placa superior de aluminio, placa inferior de vidrio, la superficie interna de cada placa incluyendo una capa aislante de poliimida de 0,1 mm, y con un electrodo SEOA (SEOA1) provisto en cada capa aislante de poliimida, de modo que los electrodos oxidados entran en contacto con un fluido dentro del canal, y con un espaciador de poliimida de 0,1 mm que define la altura del canal.

El canal con dimensiones de $28 \times 3,17 \times 0,1 \text{ mm}^3$ se ha llenado con 0,4 mM de tampón fosfato. La característica típica de la respuesta de corriente eléctrica del canal es el aumento monótono inicial de corriente a un valor máximo, seguido por una rápida reducción a un valor mínimo en tiempo t_c , acompañado en algunos casos por fluctuaciones casi periódicas según se ve en la Figura 6.

Dado que, en general, la conductividad de una solución acuosa es una función de temperatura que aumenta linealmente (*Aqueous Systems at Elevated Temperatures and Pressures, Chapter 10, Elsevier 2004*), uno puede concluir que la corriente en aumento inicial se debe al calentamiento por efecto Joule del fluido en el canal. Dado que el canal está abierto a la atmósfera, uno esperaría que la temperatura del fluido esté limitada a la temperatura del estado de saturación de líquidos a presión atmosférica para la cual la solución usada es de aproximadamente 100°C . Sin pretender estar limitada por la teoría, se cree que una entrada de energía adicional resultará en una transición de fase que ocurre en áreas del canal que han alcanzado dicha temperatura. La presencia de vapor en el canal, como resultado de la transición de fase, reducirá, de manera significativa, la conductancia del canal, lo cual llevará a la reducción observada de corriente.

Un análisis de diferencias finitas de transferencia de calor transitoria en el canal se ha usado para calcular temperaturas del canal tanto durante como después del tren de pulsos eléctricos. La ley de Fourier de conducción del calor se ha resuelto numéricamente en conjunto con la conservación de energía para un canal espacialmente discreto a lo largo del grosor y ancho del conjunto de canal en capas. El calentamiento por efecto Joule del fluido de canal se calcula suponiendo una dependencia térmica lineal de la conductancia del fluido, cuyos parámetros lineales se determinan a partir de la corriente experimentalmente medida al inicio de pulsos eléctricos y la solución iterativa de la corriente a 100°C que reside en la curva experimentalmente medida de la Figura 6. Por medio de ello, se calcula que el inicio del cambio de fase ocurre en el centro del canal en $t = 0,024\text{s}$, según se identifica en la Figura 6.

La distribución de temperatura espacial simulada en el canal en $t = 0,024\text{s}$ se provee en la Figura 7. La Figura 8 muestra la dependencia de tiempo calculada de la temperatura máxima espacial, suponiendo que el voltaje aplicado se establece en cero en $t = 0,024 \text{ ms}$. En el presente modelo, si el voltaje permanece aplicado durante un tiempo adicional t_r , la temperatura pico se mantendrá y la porción del fluido que alcance 100°C atravesará una transición de fase.

Se cree que la existencia de una fase mixta líquido-vapor que ocurre después del inicio de la transición de fase resulta en una reducción localizada de conductividad que, a su vez, lleva a una redistribución de corriente dentro del canal. Se cree además que después del inicio de la transición de fase, la región de fase mixta atraviesa una expansión debido al aumento continuado de las temperaturas del fluido fuera de la región de vaporización. Por consiguiente, a medida que la región de fase mixta se expande más, se espera que la corriente dentro del canal se reduzca sustancialmente a medida que la conductividad neta del canal cae.

Con referencia, ahora, a la Figura 6, el perfil de corriente dependiente del tiempo parece comportarse en una manera que es coherente con la interpretación provista más arriba. De manera específica, la corriente inicialmente aumenta hacia un valor máximo mientras se espera que la transición de fase se inicie, después de lo cual la corriente se reduce según lo pronosticado por el modelo de fase mixta.

5 Además, las características casi periódicas que siguen a la corriente máxima pueden atribuirse a ciclos de transición de fase adicionales, con correspondientes aumentos y reducciones de conductividad y corriente. Se cree que dichos ciclos de transición de fase son un resultado de la reducción de corriente y subsiguiente enfriamiento y condensación, lo cual, a su vez, lleva nuevamente a un aumento de corriente y otro ciclo de vaporización y condensación.

10 Se espera que la temperatura del fluido de canal se encuentre en un estado casi estable durante los ciclos de transición de fase. Como resultado, el presente mecanismo puede proveer el control pasivo de la temperatura pico durante el procesamiento eléctrico. Ello constituye un mecanismo de realimentación pasiva autolimitante para el control de la temperatura.

15 En otra implementación a modo de ejemplo, la corriente que fluye entre los electrodos del dispositivo puede monitorearse mediante la identificación de un pico inicial en la corriente dependiente del tiempo (que puede corresponder al inicio de una transición de fase en el líquido), y continuar aplicando los pulsos de voltaje para una duración establecida después de la detección de una reducción de la corriente por debajo del pico. La corriente también, o de manera alternativa, puede monitorearse para detectar la presencia de una o más características en la corriente dependiente del tiempo como, por ejemplo, mínima o máxima de corriente local, y la aplicación de los pulsos de voltaje puede mantenerse durante un intervalo de tiempo correspondiente a una o más de dichas características.

20 Con referencia, nuevamente, a la Figura 8, las simulaciones indican que después de la retirada del voltaje, el fluido del canal se enfría rápidamente debido a la difusión térmica del volumen relativamente pequeño de fluido del canal a los materiales vecinos de la célula de flujo, regresando casi a las temperaturas iniciales en menos de 1 segundo. Este es un mecanismo útil que puede aprovecharse para evitar el daño térmico a las macromoléculas que surgen de la exposición prolongada a altas temperaturas.

25 En otra realización, la presión dentro del canal puede controlarse con el fin de recalentar el fluido dentro del canal durante el tratamiento eléctrico. Por ejemplo, el canal puede incluir válvulas para abarcar el volumen interno y, de esta manera, aumentar la presión dentro del canal en respuesta a un aumento de temperatura eléctricamente inducido.

30 La Figura 9 muestra la envolvente de pulsos de corriente eléctrica experimentalmente medidos en un canal que tiene una configuración según se describe más arriba, pero que además incluye una válvula de cierre en el puerto de entrada y salida. El canal se ha sometido a un voltaje aplicado en la forma de un tren de pulsos cuadrados bipolares con $n=400$ pulsos, una amplitud de 200 V y una frecuencia de 10 kHz. Como puede verse en la Figura 9, cuando los puertos de entrada y salida de canal están cerrados, la corriente inicialmente sigue el comportamiento del canal de puerto abierto, pero, en lugar de alcanzar un valor máximo con la subsiguiente reducción de corriente, la corriente aumenta de manera monótona hasta el fin del tren de pulsos.

35 Por consiguiente, durante el calentamiento eléctrico, el exceso de presión de la presión atmosférica se acumula en el canal cerrado, de modo que el fluido del canal permanece en una fase líquida y se convierte en recalentado a medida que su temperatura supera la temperatura de estado de saturación de líquidos atmosférica. Los cálculos obtenidos del análisis térmico de diferencias finitas sugieren que el líquido confinado en el canal cerrado alcanza temperaturas que son, en promedio, aproximadamente 35°C más altas que el canal abierto en el presente ejemplo. El análisis térmico también indica que después de retirar el voltaje aplicado, el fluido recalentado se enfría rápidamente y regresa casi a las temperaturas iniciales en 1 segundo.

40 Mediante la regulación de la presión en el canal, la temperatura de fluido recalentado puede controlarse para limitar la temperatura pico y/o para mantener una temperatura cercana a la temperatura pico. De manera más específica, cuando la presión se mantiene en un valor fijo, la aplicación continuada de pulsos de voltaje después de alcanzar el valor de corriente pico (a saber, cerca del tiempo de inicio de transición de fase) mantendrá un estado casi estable en el cual la corriente, temperatura y conductividad pueden oscilar dentro de un rango de valores.

45 Con referencia a la Figura 10, se ilustra una realización a modo de ejemplo de un dispositivo de canal que incorpora dicho mecanismo de regulación de presión (por ejemplo, un mecanismo de regulación de presión activo, o un mecanismo de regulación de presión pasivo). El dispositivo, similar en otros aspectos a los dispositivos descritos anteriormente, tiene una válvula 31 de cierre en el puerto 3 de entrada y una válvula 32 de cierre en la sección de puerto 4 de salida del canal. Además, un mecanismo 30 de regulación de presión está en comunicación fluida con el canal 2 entre las válvulas de cierre de entrada y salida. El presente mecanismo de regulación de presión puede ser de la forma de cualquier regulador de presión de retorno o válvulas de liberación de presión conocidas en la técnica y se representa aquí por un pistón cargado por resorte y cavidad de expansión.

50

55

En una realización a modo de ejemplo, el dispositivo de regulación de presión es un pistón cargado por resorte o membrana donde el resorte se precarga de modo que el regulador se activa a una presión mínima predeterminada que corresponde a la temperatura de fluido recalentado deseada. Cuando dicha presión mínima se alcanza en el canal como resultado del calentamiento del fluido, el pistón se moverá hacia la cámara de expansión, y expandirá el volumen del canal eficaz en respuesta a un aumento adicional de la presión. Si la constante del resorte es suficientemente baja y se provee una cavidad de expansión suficientemente grande, la presión se mantendrá aproximadamente en un valor pico constante y un estado líquido saturado se alcanzará en el fluido cuando una cantidad de energía requerida se provea al canal. Con una entrada de energía adicional, una transición de fase ocurrirá en la región del canal que ha alcanzado el estado de saturación de líquidos y una fase mixta líquido-vapor se generará a aproximadamente una temperatura constante.

En una realización alterna, el resorte puede no tener una prefuerza y la rigidez del resorte puede elegirse de modo que la presión aumenta con la temperatura, pero a una velocidad que permite que el líquido alcance la saturación a una temperatura predeterminada. Por consiguiente, la temperatura resultante no será constante, pero se controlará o tendrá capacidad de respuesta al voltaje aplicado en una manera predeterminada.

Un ejemplo de dicha última realización es una membrana de rigidez predeterminada como parte del todo de una o ambas paredes del canal o una o más de las paredes de una cavidad sellada en comunicación fluida con el canal. Un ejemplo adicional de la presente realización es una cavidad o canal que se encuentra separado del canal principal por una membrana permeable al gas que permite el transporte de gas, pero no de líquido. Por consiguiente, la compresibilidad del aire o gas proveerá el cumplimiento para controlar la presión en la manera descrita.

En incluso otra realización, el dispositivo puede incluir un mecanismo de regulación de presión activo que es externamente controlable. Dicho dispositivo de regulación de presión activo puede controlarse de modo que la presión se regula dentro del canal en sincronización con el tiempo del voltaje aplicado. En otro ejemplo, el dispositivo puede incluir tanto un dispositivo de regulación de presión controlable como un sensor de presión, donde la señal de sensor de presión se provee como una señal de entrada (realimentación) a un controlador, y donde el controlador interactúa con el dispositivo de regulación de presión para controlar la presión dentro del canal.

En general, el dispositivo puede diseñarse para funcionar en un amplio rango de fuerzas iónicas. Sin embargo, la fuerza iónica alta como, por ejemplo, fuerza iónica por encima de aproximadamente 1 mM requiere, en general, circuitos que puedan administrar corrientes más altas. Ello resulta en requisitos de energía eléctrica más altos con sus complicaciones añadidas. Por lo tanto, la reducción de la fuerza iónica puede llevarse a cabo antes de la aplicación del voltaje.

La reducción de la fuerza iónica puede lograrse inmediatamente en casos donde el líquido de muestra incluye células mediante el filtrado de las células como se muestra en la Figura 3 y Figura 4 y haciendo fluir un líquido con fuerza iónica baja hacia el canal antes del procesamiento eléctrico. La Figura 4(c) provee un diagrama de flujo que ilustra un método para llevar a cabo el procesamiento eléctrico de células después de capturar inicialmente las células en un filtro según se describe en la Figura 4. En la etapa 100, un líquido de muestra fluye (como, por ejemplo, de un primer puerto 3 a un segundo puerto 34 en la Figura 4), a través del filtro (como, por ejemplo, el filtro 33 en la Figura 4). Las células dentro de la muestra líquida se capturan por el filtro, según se describe en la etapa 105. Después de haber capturado las células, un líquido adicional fluye, de manera opcional, a través del filtro para lavar las células y trayectos de fluido del fluido de muestra, como en la etapa 110. Entonces, un fluido apropiado para llevar a cabo la lisis eléctrica y el tratamiento y apropiado, de manera opcional, para procesos corriente abajo fluye para resuspender las células y llevarlas al canal eléctrico como en la etapa 115. Después de haber llevado las células al canal eléctrico suspendido en el presente líquido, el procesamiento eléctrico puede llevarse a cabo, como se muestra en la etapa 120. Luego, el lisado puede extraerse haciendo fluir el líquido adicional a través del canal y recogiendo la salida como en la etapa 125. Después de llevar a cabo la etapa de procesamiento eléctrico, la fuerza iónica del líquido adicional que reside dentro del canal puede aumentarse. Por ejemplo, ello puede lograrse mediante la incorporación de un reactivo que contiene sal al líquido adicional, o, en otro ejemplo, haciendo fluir el líquido adicional a través de un canal adicional que contiene sales secas que pueden disolverse para lograr la fuerza iónica deseada.

En otra realización, la reducción de iones en la muestra puede llevarse a cabo por el módulo 65 de limpieza de muestra de la Figura 11 que puede integrarse en el puerto 3 de entrada del dispositivo (es preciso ver la Figura 1) o en una cámara fluidicamente conectada corriente arriba del puerto de entrada. El módulo 6 de limpieza de muestra consiste en una entrada 60, una salida 61, un prefiltro 62 opcional, resinas 63 de intercambio iónico empaquetadas, y un filtro 64. El prefiltro 62 opcional excluye grandes partículas como, por ejemplo, resinas de intercambio catiónico y resinas de adsorción no iónica, que se emplean en algunas muestras como, por ejemplo, el medio de hemocultivo del sistema de hemocultivo Becton Dickinson.

Las resinas (63) de intercambio iónico incluyen resinas catiónicas y aniónicas mixtas que sirven para desionizar la muestra, y para capturar, de manera opcional, partículas iónicas más pequeñas que pueden estar presentes en la muestra. En el caso de muestras de hemocultivo, algunos medios de hemocultivo incluyen carbón activado y polvo de tierra de fuller, por ejemplo, como en el sistema BioMerieux. El filtro 64 retiene las resinas iónicas y los iones unidos y las partículas iónicas para evitar que entren en el dispositivo.

Para la desionización de iones y partículas iónicas, pueden usarse resinas de intercambio de cationes en la forma H⁺ mixtas y resinas de aniones en la forma OH⁻. En un ejemplo específico que implica iones Na⁺ and Cl⁻ en solución, Na⁺ en el medio se une a la resina de cationes a cambio de H⁺ y Cl⁻ se une a la resina de aniones a cambio de OH⁻. H⁺ y OH⁻ retirados formará moléculas de agua. El presente método se aplica ampliamente en aplicaciones de desionización de agua. En una implementación a modo de ejemplo, resinas de gel microporosas con el tamaño de los poros más grande que el tamaño de las bacterias pueden usarse. Además, en aplicaciones que implican bacterias, las bacterias negativamente cargadas pueden aún unirse a la superficie de la resina aniónica y unirse, de manera no específica, a la superficie de las resinas, y ello puede evitarse tratando ambos tipos de resinas con un surfactante no iónico como, por ejemplo, TritonX-100. Ejemplos de resinas mixtas son Amberlite MB-150 de Rohm & Hass y Dowex-Marathon MR-3 de Dow Chemicals con tamaños de partícula que se encuentran en un rango de 500-700 µm.

El funcionamiento del dispositivo de reducción de iones se describe, de aquí en adelante, mediante referencia a la Figura 3, como aplicado para tratar una muestra de orina que contiene células bacterianas para obtener un lisado listo para ensayo para un ensayo de hibridación ARNr 16S. Una vez que todo el líquido de la muestra haya atravesado el canal y las células suspendidas se retengan en el filtro de membrana (a saber, concentradas en el filtro), una etapa de lavado opcional puede llevarse a cabo inyectando un líquido de lavado en el canal. El flujo del líquido de lavado aleja el exceso de iones (p.ej., la presente etapa logra la limpieza de la muestra). El canal puede entonces llenarse con un líquido con fuerza iónica baja como, por ejemplo, 0,5 mM de tampón fosfato.

La liberación de contenidos celulares se logra mediante la aplicación de un tren de pulsos a los electrodos y, de esta manera, se provoca la lisis eléctrica. Entre los contenidos celulares liberados se encuentran los ribosomas que contienen ARNr 16S entrelazado con proteínas ribosomales. En una realización, los pulsos eléctricos se aplican de modo que la acción combinada de los pulsos persistentes y el medio calentado instantáneamente desnaturaliza/desnaturaliza el ARNr de las proteínas, posiblemente mediante la desnaturalización de las proteínas ribosomales. Además, el calentamiento instantáneo del medio puede también jugar un papel al lograr una reconfiguración de la molécula ARNr que es apropiada para ensayos de hibridación. Además, las enzimas ARNasa pueden también desactivarse mediante el mecanismo de tratamiento eléctrico descrito más arriba que implica efectos de campo eléctrico y calentamiento instantáneo. Finalmente, un diferencial de presión puede aplicarse al canal para administrar el lisado a través del puerto de salida a una cámara corriente abajo donde un ensayo puede llevarse a cabo. Antes de llevar a cabo un ensayo de hibridación, la fuerza iónica del lisado puede aumentarse hasta un nivel adecuado. Según se describe más arriba, ello puede lograrse mediante la incorporación de un reactivo que contiene sal al lisado, o, en otro ejemplo, haciendo fluir el lisado a través de un canal que contiene sales secas que pueden disolverse por el lisado para lograr la fuerza iónica deseada.

Según se describe más arriba, los presentes dispositivos y métodos pueden emplearse para un amplio rango de métodos de diagnóstico y otras aplicaciones de procesamiento de muestras. En algunas aplicaciones a modo de ejemplo, las etapas de lisis eléctrica y tratamiento eléctrico pueden llevarse a cabo en una sola etapa, donde una célula se lisa y el lisado se trata. De manera alternativa, la lisis eléctrica puede llevarse a cabo inicialmente, donde los parámetros eléctricos de las etapas de lisis eléctrica se seleccionan para proveer una lisis eficaz. El tratamiento eléctrico del lisado puede entonces proveerse en una etapa subsiguiente, donde los parámetros eléctricos de la etapa de tratamiento eléctrico se eligen para proveer un tratamiento eléctrico eficaz o suficiente.

En otras implementaciones a modo de ejemplo, la muestra puede administrarse al canal en la forma de un lisado según una etapa de lisis precedente o separada. De manera alternativa, la muestra puede contener moléculas que se tratarán según los métodos de tratamiento eléctrico mencionados más arriba, pero donde las moléculas pueden no originarse en una etapa de lisis precedente.

En una implementación a modo de ejemplo, los dispositivos y métodos pueden emplearse para aplicaciones que implican la lisis rápida de bacterias y la preparación de las bacterias lisadas para PCR. En particular, los presentes métodos pueden emplearse como un método de preparación de muestras para PCR de colonia, en el cual PCR se emplea para explorar colonias bacterianas transformadas con incorporación exitosa de una inserción de gen en un plásmido. Los presentes métodos de tratamiento eléctrico pueden emplearse para desnaturalizar o desactivar inhibidores de la PCR y/o contaminantes, de modo que PCR puede llevarse a cabo sin llevar a cabo una etapa previa de extracción o purificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, las bacterias obtenidas de una colonia bacteriana pueden suspenderse en un tampón de fuerza iónica baja y proveerse a un dispositivo según se describe más arriba, de modo que el tampón fluye hacia el canal. Un tren de pulsos de voltaje apropiado se aplica entonces para obtener lisis y tratamiento eléctrico del lisado (valores apropiados a modo de ejemplo se proveen en la descripción precedente). El lisado procesado puede entonces mezclarse directamente con los reactivos PCR apropiados para llevar a cabo la PCR directa.

En otra aplicación a modo de ejemplo, el presente método de tratamiento eléctrico puede emplearse para la desnaturalización de enzimas usadas para la digestión de ácidos nucleicos o modificaciones. Los presentes dispositivos y métodos pueden emplearse para el tratamiento eléctrico de una muestra con el fin de desnaturalizar o desactivar las enzimas. Se comprenderá, sin embargo, que la eficacia del presente método puede estar limitada por la fuerza iónica de la muestra, y la capacidad de emplear resinas de intercambio iónico para la desionización de

muestras. Los parámetros eléctricos requeridos para una inactivación de enzimas específica sin comprometer la integridad del ácido nucleico pueden determinarse llevando a cabo una serie de experimentos.

Los valores apropiados para los varios parámetros empleados en lisis eléctrica y tratamiento dependerán de las propiedades del líquido, células y macromoléculas de interés que se procesarán en el dispositivo. Los valores apropiados pueden también depender de la aplicación. Por ejemplo, en algunas aplicaciones, puede ser preferible lisar una célula y liberar macromoléculas intracelulares (como, por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas) sin provocar la desnaturalización o degradación sustanciales. En dicho caso, un protocolo de procesamiento eléctrico puede preferirse, en el cual el entorno térmico, campo eléctrico y escala de tiempo de tratamiento se eligen para lisar las células sin desnaturalizar o degradar las macromoléculas.

5 En otras aplicaciones, puede ser preferible lisar una célula y liberar macromoléculas intracelulares seleccionadas (como, por ejemplo, ácidos nucleicos) mientras se provoca la desnaturalización o degradación sustanciales de otras macromoléculas intracelulares que se liberan (como, por ejemplo, una nucleasa). En dicho caso, un protocolo de procesamiento eléctrico diferente puede preferirse, en el cual el entorno térmico, campo eléctrico y escala de tiempo de tratamiento se eligen para lisar las células y desnaturalizar o degradar las otras macromoléculas.

15 En términos generales, los siguientes rangos pueden emplearse para el procesamiento eléctrico de células. La fuerza del campo eléctrico dentro del canal que se produce por la aplicación de los pulsos de voltaje puede encontrarse en el rango de entre aproximadamente $200 \text{ V/cm} < E < 50 \text{ kV/cm}$, dependiendo del tipo de célula que se procesará y del grado de procesamiento eléctrico que se desea. Un rango de aproximadamente $2 \text{ kV/cm} < E < 30 \text{ kV/cm}$ puede ser preferible para la lisis de microorganismos y el uso del lisado para llevar a cabo ensayos de diagnóstico en los ácidos nucleicos liberados; dicho rango se usa en el contexto de la invención actualmente reivindicada.

25 Según implementaciones a modo de ejemplo diferentes, el ancho de pulso de pulsos de voltaje individuales puede encontrarse en el rango de entre aproximadamente $1 \mu\text{s} < t_p < 10 \text{ ms}$, dependiendo del tipo de célula que se procesará y del grado de procesamiento eléctrico que se desea. Un rango de aproximadamente $t_p < 1 \text{ ms}$ puede ser preferible para evitar la descarga disruptiva del recubrimiento dieléctrico en el caso de electrodos de bloqueo, minimizando la acumulación de los productos electroquímicos en el caso de electrodos de no bloqueo. Un rango de aproximadamente $t_p > 10 \mu\text{s}$ se prefiere para reducir las demandas de alta frecuencia de la eléctrica de impulsos.

30 Según otras implementaciones a modo de ejemplo, la duración durante la cual los pulsos de voltaje se aplican puede ser inferior a alrededor de 5 s, dependiendo del tipo de célula que se procesará y del grado de procesamiento eléctrico que se desea. En algunos casos como, por ejemplo, para minimizar la degradación inducida por calor de macromoléculas objetivo y reducir las demandas de potencia de la eléctrica de impulsos, una duración eficaz para el procesamiento eléctrico puede ser inferior a alrededor de 100 ms.

35 Según otras implementaciones a modo de ejemplo, la fuerza iónica de la célula que contiene líquido puede encontrarse en el rango de aproximadamente $0,1 \text{ mM} < I < 100 \text{ mM}$, dependiendo de la composición iónica de la muestra inicial que se procesará y del grado de procesamiento eléctrico que se desea. En algunos casos, cuando el filtrado se usa y el intercambio de fluidos se permite, un rango más adecuado para la fuerza iónica puede ser de aproximadamente $0,1 \text{ mM} < I < 10 \text{ mM}$, o $0,2 \text{ mM} < I < 1 \text{ mM}$.

40 Según otras implementaciones a modo de ejemplo, la temperatura pico del líquido dentro del canal durante la aplicación de pulsos de voltaje puede encontrarse en el rango de aproximadamente $30^\circ\text{C} < T_p < 250^\circ\text{C}$, dependiendo del tipo de célula que se procesará y del grado de procesamiento eléctrico que se desea. En algunas aplicaciones como, por ejemplo, lisis de microorganismos y uso de lisado para llevar a cabo ensayos de diagnóstico en los ácidos nucleicos liberados, puede ser preferible que el rango de temperatura resida dentro de aproximadamente $80^\circ\text{C} < T_p < 200^\circ\text{C}$.

45 La velocidad de calentamiento del líquido para el procesamiento eléctrico puede ser mayor que aproximadamente 250°C/s , dependiendo del tipo de célula que se procesará y del grado de procesamiento eléctrico que se desea. En algunos casos como, por ejemplo, lisis de bacterias Gram-positivas, hongos, y esporas, un rango adecuado puede incluir velocidades superiores a alrededor de 2.000°C/s .

50 El tiempo de enfriamiento del líquido después del tratamiento eléctrico puede ser inferior a aproximadamente 1 s, dependiendo de la sensibilidad térmica de la macromolécula objetivo. En algunos casos como, por ejemplo, cuando la macromolécula objetivo es particularmente sensible, un rango preferido puede incluir tiempos por debajo de alrededor de 100 ms.

55 Según se describe más arriba y en los siguientes ejemplos, los presentes dispositivos y métodos de procesamiento eléctrico pueden emplearse para la preparación de una amplia variedad de tipos de muestra. En muchos casos, una amplia variedad de tipos de célula puede procesarse con las mismas propiedades de dispositivo, pero con diferentes parámetros eléctricos y/o regulación de presión durante el procesamiento eléctrico. Los tipos específicos de células se consideran brevemente más abajo.

Los rangos precedentes de parámetros se proveen como ejemplos y no pretenden limitar el alcance de la descripción. Se comprenderá que las personas con experiencia en la técnica, ayudadas por la presente descripción, pueden identificar rangos apropiados o combinaciones de parámetros adicionales mediante experimentos de rutina.

5 En los ejemplos que siguen, el tren de pulsos ha consistido en un número, n , de ciclos de pulsos cuadrados bipolares con una frecuencia de 10 o 20 kHz. Tres tipos de canales con las siguientes dimensiones (A x A x L) se han utilizado: 0,1x6,4x28 mm³ (ancho-largo, con un volumen de alrededor de 18 μ l), 0,1x6,4x16 mm³ (ancho, con un volumen de alrededor de 10 μ l) y 0,1x3,2x28 mm³ (estrecho, con un volumen de alrededor de 9 μ l). Los conjuntos de amplitud de pulsos, V, la duración del tren, t, y la fuerza iónica se conocen como parámetros de ensayo en el contexto de la presente descripción.

10 Los siguientes ejemplos se presentan para permitir a las personas con experiencia en la técnica comprender y practicar las realizaciones de la presente descripción. No deben considerarse como una limitación del alcance de las presentes realizaciones, sino meramente como ilustrativos y representativos de aquellas. Los ejemplos pueden también servir para proveer rangos a modo de ejemplo y/o apropiados de parámetros para el funcionamiento del dispositivo en varias aplicaciones.

15 Ejemplo 1: Desactivación de enzimas

Los experimentos descritos en el presente ejemplo pretenden demostrar los efectos de parámetros eléctricos y térmicos en la capacidad del dispositivo de alterar la estructura y función de proteínas demostrando la desactivación (completa o parcial) de enzimas seleccionadas a modo de ejemplo. Los experimentos demuestran un aspecto de la función de tratamiento eléctrico y capacidad de los dispositivos descritos en la presente memoria, que implican la modificación de la conformación de proteínas.

20 Una mezcla de tres enzimas, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (G-8629, Sigma) 1 unidad/mL, beta-glucuronidasa (G-7396, Sigma) 100 unidades/mL y peroxidasa de rábano (HRP) 1:500.000 diluciones (A-0168, Sigma) se han preparado en 0,1 y 0,4 mM de tampón fosfato pH 7,4. El volumen de muestra de 200 μ L ha atravesado un canal estrecho en etapas de 5 μ L en intervalos de 10 s durante los cuales un solo tren de pulsos, con amplitud de 150 V y frecuencia de 10 kHz, se ha aplicado.

25 La muestra tratada se ha probado para la actividad de enzima en comparación con la muestra no tratada. La actividad de enzima se ha medido mediante el uso de los respectivos sustratos; glucosa-6-fosfato (G6P) 6,6 mM, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) 4,0 mM, cloruro de sodio 90 mM, albúmina de suero bovino (BSA) 1%, azida de sodio 0,09% en Tris 20 mM pH 5,0 para G6PDH, 4-Nitrofenilo β -D-glucurónido (N-1627, Sigma) 1 mM en 50 mM tampón fosfato pH 7,4 para Glucuronidasa y 3, 3',5',5'-Tetrametilbenzidina (TMB) seguido por solución de interrupción para HRP. La absorbancia se ha medido en 340 nm, 405 nm y 450 nm, respectivamente.

30 Las envolventes de corriente correspondientes a diferentes fuerzas iónicas se presentan en la Figura 12(a). Las actividades de enzimas residuales, para diferentes combinaciones de duraciones de trenes de pulsos y fuerzas iónicas se presentan en la Figura 12(b). Según se observa, la actividad de enzima atraviesa una drástica reducción de duraciones de trenes que superan la duración crucial, t_c , de alrededor de 40 ms. Los resultados sugieren que el tiempo de residencia después de t_c no tiene un efecto pronunciado en la reducción de actividad de enzima más allá de dicha duración. En el caso de fuerza iónica más baja de 0,1 mM, aunque el tiempo crucial, t_c , en aproximadamente 70 ms se ha pasado, la reducción de actividad es moderada, lo cual implica una posible correlación entre velocidad de calentamiento y desactivación de enzima.

40 Ejemplo 2: Lisis eléctrica de *Escherichia coli*

Los experimentos descritos en el presente ejemplo pretenden demostrar los efectos de los parámetros eléctricos en la eficacia del dispositivo para el lisado de células *E. coli*. Las células *E. coli* competentes NEB 5-alfa, transformadas con plásmido pUC19 que contiene gen de resistencia a la ampicilina y gen de la beta-galactosidasa, se han cultivado en placas de agar LB complementadas con 100 μ g/mL de Ampicilina, 60 μ g/mL X-gal y 0,1 mM isopropiltio- β -D-galactosidasa (IPTG). Una sola colonia azul de *E. coli* se ha cultivado en cultivo LB complementado con 100 μ g/mL de Ampicilina durante la noche a 37°C. Las células se han centrifugado a 7.000 rpm durante 5 min. El sedimento celular se ha lavado dos veces y se ha resuspendido en 0,1 a 0,4 mM de tampón fosfato pH 7,4 en una concentración de 0,5 a 1x10⁹ CFU/mL.

50 Con el fin de llevar a cabo la lisis eléctrica, 200 μ L de la muestra han atravesado un canal en etapas de 5 μ L cada 10 s. Luego, tres ensayos analíticos diferentes se han llevado a cabo para evaluar la eficacia de la lisis celular; el ensayo de proteínas totales, ensayo de ácidos nucleicos totales cuantitativo, y ensayo de hibridación ARNr 16S.

55 Las proteínas totales liberadas en el lisado celular pueden probarse por el Reactivo Bradford (B-6916, Sigma). El lisado celular se ha centrifugado a 7.000 rpm durante 5 min y 50 μ L del sobrenadante se han mezclado con un volumen igual de reactivo de ensayo de proteínas Bradford. El desarrollo de color se ha medido por espectrofotómetro en absorbancia 595 nm. Como un control de lisis celular de referencia, las células se han lisado mecánicamente mediante refinado con un volumen igual de perlas de vidrio (106 μ m, Sigma) durante 2 min y el sobrenadante de lisado celular de perlas de vidrio (GB) se ha probado después del centrifugado. La concentración

de proteínas se ha calculado mediante referencia a la curva dosis-respuesta de la Figura 13, que se ha preparado mediante ejecución del ensayo Bradford en diferentes concentraciones de BSA.

Con el objetivo de medir el ácido nucleico liberado de manera cuantitativa, el lisado celular se ha centrifugado a 7.000 rpm durante 5 min y 50 μ L del sobrenadante se han mezclado con un volumen igual de SYTO-9 mancha de ácido nucleico (S-34854, Invitrogen), 2,5 μ M de concentración en 0,1 mM de tampón fosfato pH 7,4. La señal de fluorescencia se ha medido por fluoroespectrofotómetro en una longitud de onda de excitación de 485 nm y longitud de onda de emisión de 515 nm.

El ARNr 16S específico a la bacteria en el lisado celular se ha detectado por un ensayo de hibridación de ácido nucleico intermedio de fase sólida. Aunque el lisado celular total puede usarse como una muestra lista para el ensayo, para demostrar la liberación eficaz de ARNr fuera de las células, el sobrenadante del lisado celular se ha usado en el ensayo. El lisado celular se ha centrifugado a 7.000 rpm durante 5 min para recoger el sobrenadante que contiene ARNr liberado. El sobrenadante de 50 μ L de volumen se ha añadido a pozos de ensayo de placa de Immobilizer Amino (Nunc), en los cuales 5 μ M de sonda de captura biotinilada y 20 μ g/mL de estreptavidina (R1) se han inmovilizado por manchado y sitios de unión no específicos se han bloqueado con 0,2% BSA y 0,1% Tween-20 en PBS pH 7,4. El reactivo R2, 0,2 μ M de sonda de detector FITC-conjugado en 1 M de tampón fosfato pH 7,4, de 50 μ L de volumen se ha añadido al pozo de ensayo y se ha incubado a 55°C durante 20 min. Después del lavado, 100 μ L del reactivo R3, 1:1000 dilución de anticuerpo anti-FITC HRP-conjugado en el tampón de bloqueo, se ha añadido al pozo y se ha incubado a temperatura ambiente durante 10 min. El sustrato TMB de 100 μ L de volumen se ha añadido después del lavado seguido por la incorporación de la solución de interrupción. El desarrollo de color se ha medido por espectrofotómetro en una longitud de onda de 450 nm.

2.1 Efectos de amplitud de pulsos en la eficacia de lisis eléctrica

La suspensión bacteriana de 5×10^8 CFU/mL en 0,1 mM de tampón fosfato pH 7,4 ha atravesado un canal estrecho en etapas de 5 μ L/10s y 10 kHz trenes de pulsos con diferentes duraciones y amplitudes se han aplicado a la suspensión. La duración, t , y amplitud, V , de cualesquiera dos conjuntos de parámetros diferentes, (t_1, V_1) y (t_2, V_2), estaban relacionadas por $t_1/t_2 = (V_2/V_1)^2$ para asegurar la administración de energía eléctrica casi equivalente al canal para ambos casos. Asimismo, además de seleccionar una fuerza iónica baja de 0,1 mM, las duraciones se han elegido suficientemente cortas para no calentar el líquido muy por encima de las temperaturas biológicas. La temperatura promedio lograda del canal, T_m , se ha calculado y registrado en la leyenda de la Figura 14(a), que ilustra la envolvente de corriente para diferentes parámetros de ensayo.

Los resultados de 3 ensayos analíticos; detecciones de proteínas totales, ácidos nucleicos totales y ARNr 16S, se presentan en las Figuras 14(b)-14(d). Aunque la amplitud tiene un efecto determinista en la liberación de los materiales intracelulares, el nivel de lisis según lo observado por la liberación de proteínas y ácidos nucleicos totales es mucho más bajo que en el caso del método comparativo de lisis GB. Sin embargo, en el caso del ensayo ARNr 16S, a pesar de una liberación de ácido nucleico total menos eficaz, la señal más alta de ARNr 16S se ha detectado para lisis eléctrica (con 190 V) en comparación con la lisis GB. El presente hallazgo indica la importancia de la accesibilidad de la región de hibridación específica en ARNr además de la concentración de ARNr en el lisado celular. La capacidad del método eléctrico de modificar la conformación macromolecular parece proveer una preparación de lisado celular lista para el ensayo más eficaz para ensayos de ARNr.

2.2 Efectos de la duración del tren y fuerza iónica en la eficacia de lisis eléctrica

La suspensión bacteriana de 1×10^9 CFU/mL en 0,1 o 0,4 mM de tampón fosfato pH 7,4 ha atravesado un canal estrecho en etapas de 5 μ L/10s y 10 kHz y 155 V trenes de pulsos con diferentes duraciones se han aplicado a la suspensión. Las envolventes de corriente se presentan en la Figura 15(a).

Los resultados de 3 ensayos analíticos se presentan en las Figuras 15(b)-15(d). En general, la liberación de materiales intracelulares aumenta drásticamente cuando la duración del tren es cercana a la duración crucial t_c . En el caso de fuerza iónica de 0,1 mM, aunque la duración del pulso se aproxima a t_c , el nivel de moléculas liberadas está por debajo del caso correspondiente de fuerza iónica más alta. Ello implica que la velocidad de calentamiento puede tener un efecto determinista en la lisis eléctrica y tratamiento.

2.3 El estado de proteínas en el lisado eléctricamente preparado

Con el fin de demostrar la acción del tratamiento eléctrico en las biomoléculas, la actividad de la enzima endógena de la beta-galactosidasa, expresada por el vector de plásmido pUC19, se ha medido. Con el fin de detectar la actividad de la enzima de la beta-galactosidasa, el lisado celular del ejemplo previo se ha centrifugado a 7.000 rpm durante 5 min y 50 μ L del sobrenadante se han mezclado con un volumen igual de 2-Nitrofenil β -D-galactopiranosido (N-1127, Sigma) 4 mg/mL en 0,1 mM de tampón fosfato pH 7,4. El desarrollo de color se ha medido por espectrofotómetro en absorbancia 420 nm. La actividad de enzima residual medida, normalizada para la actividad en el caso de lisis GB, se presenta en la Figura 15(e). Nuevamente, el aumento en la duración del tren cercana a y más allá de t_c tiene un efecto significativo en la desactivación de la enzima. El presente hallazgo indica que la lisis eléctrica modifica la conformación de las macromoléculas.

2.4 El estado de ácidos nucleicos en el lisado eléctricamente preparado

Para evaluar el espectro de diferentes tipos de ácidos nucleicos liberados por lisis eléctrica, en el ejemplo de la sección 2.2, los lisados celulares se han centrifugado a 10.000 rpm durante 5 min y los ácidos nucleicos en los sobrenadantes se han resuelto por electroforesis en gel en 0,5% de gel de agarosa en 0,5xTBE tampón y 0,5 µg/mL de bromuro de etidio (EtBr) a 150 voltios durante 45 min. La liberación de ADN genómico, ADN plasmídico y ARN total por lisis eléctrica se ha mostrado en la Figura 15(f).

En comparación con la lisis GB, el ADN genómico liberado por lisis eléctrica se ha observado principalmente como una banda de movilidad más lenta con menos intensidad de fluorescencia. Con el fin de aclarar más la presente observación, el tratamiento eléctrico se ha aplicado al ADN genómico purificado preparado mediante el uso del kit GenElute Bacterial Genomic DNA (NA2100, Sigma) y los resultados se han mostrado en la Figura 16.

Las células *E. coli* competentes DH5-alfa se han cultivado en placas de agar LB y una sola colonia de *E. coli* se ha cultivado en caldo LB durante la noche a 37°C. Siguiendo el protocolo del fabricante, las células se han pretratado con soluciones RNasa A y Proteinasa K antes de la incorporación de la solución de lisis celular y la incubación a 55°C durante 10 min. El ADN genómico, purificado mediante el uso de una columna de centrifugación y eluido en agua libre de nucleasa, se ha resuspendido en 0,2 mM de tampón fosfato pH 7,4 a una concentración equivalente de 0,5x10⁹ CFU/mL.

El ADN genómico purificado ha atravesado un canal ancho y largo en etapas de 10 µL/10s y se ha tratado eléctricamente con duraciones de tren de 34 o 44 ms y amplitud de pulso de 140 V. El perfil de corriente se presenta en la Figura 16(a). El ADN genómico con o sin tratamiento eléctrico se ha resuelto por electroforesis en gel de agarosa y los resultados se presentan en la Figura 16(b) (izquierda). El tratamiento eléctrico ha resultado en un desplazamiento de movilidad de ADN genómico según lo observado en la Figura 15f, lo cual indica el cambio en la conformación de ADN genómico durante la lisis eléctrica.

El ADN plasmídico liberado por lisis eléctrica también se ha resuelto como una banda de movilidad más lenta en la Figura 15(f). Con el fin de aclarar más la presente observación, el tratamiento eléctrico se ha aplicado al ADN plasmídico pUC19 purificado preparado mediante el uso del kit GenElute Plasmid Miniprep (PLN10, Sigma) y los resultados se han mostrado en la Figura 16.

Las células *E. coli* competentes NEB 5-alfa, transformadas con plásmido pUC19 se han cultivado en placas de agar LB complementadas con 100 µg/mL de Ampicilina. Una sola colonia azul de *E. coli* se ha cultivado en un cultivo LB complementado con 100 µg/mL de Ampicilina durante la noche a 37°C. Siguiendo el protocolo del fabricante, las células se han lisado en tampón de lisado de hidróxido de sodio y se han resuspendido en el tampón de neutralización/unión. El plásmido, purificado mediante el uso de una columna de centrifugación y eluido en agua libre de nucleasas, se ha resuspendido en 0,2 mM de tampón fosfato pH 7,4 a una concentración equivalente de 1x10⁹ CFU/mL.

El plásmido pUC19 purificado ha atravesado un canal ancho y largo en etapas de 10 µL/10s y se ha tratado eléctricamente con duraciones de tren de 34 o 44 ms y amplitud de pulso de 140 V. El perfil de corriente se presenta en la Figura 16(a). El ADN plasmídico con o sin tratamiento eléctrico se ha resuelto por electroforesis en gel de agarosa y según lo indicado en la Figura 16(b) (derecha), el tratamiento eléctrico resulta en un desplazamiento de movilidad similar al observado siguiendo la lisis eléctrica en la Figura 15(f), lo cual indica el cambio en la conformación de ADN plasmídico durante la lisis eléctrica.

2.5 Capacidad del dispositivo de preparar la muestra para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El presente ejemplo demuestra la eficacia de la acción del tratamiento eléctrico del dispositivo en términos de reducción de los factores inhibidores de la PCR, permitiendo el procesamiento de PCR directo sin la necesidad de reactivos o procesos adicionales. El gen ARNr 16S específico a la bacteria (ADNr) se ha amplificado por PCR, mediante el uso del kit Bacteria Identification Kit (BioChain Institute, Inc.). Los experimentos se han llevado a cabo mediante lisado de células *E. coli* competentes NEB 5-alfa resuspendidas en 0,1 y 0,4 de mM tampón fosfato pH 7,4.

Aunque el lisado celular total puede usarse como una muestra lista para el ensayo, para demostrar la liberación eficaz de ADN genómico fuera de las células, el sobrenadante del lisado celular se ha usado para PCR. El lisado celular preparado por lisis eléctrica se ha centrifugado a 7.000 rpm durante 5 min y el sobrenadante que contiene ADN genómico liberado se ha recogido. Como un control de lisis celular de referencia, las células se han lisado mecánicamente por vórtices con un volumen igual de perlas de vidrio. La reacción PCR se ha preparado mediante la mezcla de 1 µL del sobrenadante de lisado celular, 1 µL de mezcla de cebador de control universal, 12,5 µL de 2x de mezcla PCR y 10,5 µL de tampón TE. El fragmento de gen ARNr 16S específico a la bacteria universal de 475 pares de bases se ha amplificado por 1 ciclo de 95°C durante 120 segundos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 56°C durante 45 segundos y 72°C durante 40 segundos, y 1 ciclo de 72°C durante 600 segundos. El producto PCR resultante se ha resuelto por electroforesis en gel en 1,2% de gel de agarosa en 0,5xTBE de tampón y 0,5 µg/mL de bromuro de etidio a 150 voltios durante 30 min.

Un fragmento de ADNr 16S se ha amplificado de manera eficaz a partir de todos los lisados eléctricos preparados por diferentes parámetros eléctricos según se indica en la Figura 15(g), pero solo se ha observado una amplificación pobre para el lisado de perlas de vidrio.

5 El efecto de la inhibición de PCR por los inhibidores asociados a componentes celulares de bacterias es un mecanismo conocido y dicho efecto se supera normalmente por la dilución de la muestra o el uso del kit de retirada de inhibidor de la PCR con anterioridad a la amplificación por PCR. Cuando el lisado de perlas de vidrio se ha diluido en serie antes de las reacciones PCR según lo recomendado por el protocolo Bacteria Identification Kit, la amplificación por PCR exitosa se ha observado en la Figura 16(c), lo cual indica la presencia de factores inhibidores de la PCR en lisado GB. Con el fin de además demostrar la capacidad del procesamiento de la muestra lista para PCR mediante lisis eléctrica, tratamientos eléctricos se han aplicado al sobrenadante de lisado GB con potenciales factores inhibidores de la PCR mediante el pasaje del lisado a través de un canal ancho y largo y la aplicación de pulsos de 140 V y trenes de 10 kHz con una duración de 34 o 44 ms, para los cuales el perfil de corriente correspondiente se presenta en la Figura 16(a). Como se muestra en la Figura 16(c), el tratamiento eléctrico elimina el efecto de inhibición de PCR presente en el lisado GB.

15 2.6 Capacidad del dispositivo de liberar ADN plasmídico intacto para aplicaciones corriente abajo

El presente ejemplo demuestra la capacidad del dispositivo de liberar ADN plasmídico con integridad preservada para aplicaciones corriente abajo.

20 Las células *E.coli* competentes NEB 5-alfa, transformadas con plásmido pUC19 que contiene gen de resistencia a la ampicilina y gen de la beta-galactosidasa, se han cultivado en caldo LB con 100 µg/mL de Ampicilina durante la noche a 37°C. Las células se han centrifugado a 7.000 rpm durante 5 min. El sedimento celular se ha lavado dos veces y se ha resuspendido en 0,4 mM de tampón fosfato pH 7,4 en una concentración de 1×10^9 CFU/mL.

25 Como un método de purificación plasmídica de referencia, el plásmido pUC19 se ha purificado mediante el uso del kit GenElute Miniprep (Sigma). Siguiendo el protocolo del fabricante, las células se han lisado en tampón de lisado de hidróxido de sodio y se han resuspendido en el tampón de neutralización/unión. Durante la lisis celular, ácidos nucleicos bicatenarios de ADN genómico y ADN plasmídico se desnaturalizan por el pH alcalino. Durante la etapa de neutralización, aunque el ADN plasmídico puede renaturalizarse otra vez a una estructura bicatenaria, el ADN genómico desnaturalizado se precipita y se retira por centrifugación. El plásmido en el sobrenadante se ha purificado mediante el uso de una columna de centrifugación y eluido en agua libre de nucleasas. En el caso de perlas de vidrio o lisis eléctrica, el sobrenadante del lisado celular se ha mezclado con el tampón de neutralización/unión del kit GenElute Miniprep y la purificación ha continuado como el método de purificación plasmídica de referencia.

30 Los plásmidos purificados de 3 tipos de lisis celular diferentes se han resuelto por electroforesis en gel de agarosa y la liberación de plásmido por refinado de perlas de vidrio o lisis eléctrica se ha presentado en la Figura 16(d). La modificación de la estructura del ADN genómico como resultado de la lisis eléctrica por el dispositivo puede ser ventajosa para la purificación del ADN plasmídico sin el requisito de lisis química peligrosa y desnaturalización macromolecular por hidróxido de sodio. Por ejemplo, después del tratamiento eléctrico del lisado, el ADN genómico, que tiene un estado conformacional alterado (como se muestra en las Figuras 15(f), 16(b) y 16(d)), puede separarse del ADN plasmídico por un método de separación. El método de separación puede incluir la purificación en una columna de centrifugación y/o separación del ADN genómico alterado del ADN plasmídico mediante el uso de un filtro.

40 Con el fin de evaluar la integridad del ADN plasmídico para sus posibles aplicaciones corriente abajo, el plásmido pUC19 purificado a partir de la lisis GB o lisis eléctrica y el plásmido de referencia purificado por el kit GenElute se han transformado en una cadena DH5-alfa de células *E.coli* competentes, mediante el uso del kit de transformación TransformAid Bacteria (Fermentas). Los transformantes se han cultivado durante la noche en placas de agar LB complementadas con 100 µg/mL de Ampicilina, 60 µg/mL X-gal y 0,1 mM de isopropiltio-β-D-galactosidasa (IPTG) a 37°C.

45 El cultivo de las células *E.coli* transformadas se ha observado en el medio LB con Ampicilina y X-Gal con similar eficacia de transformación para los plásmidos obtenidos de 3 métodos de preparación de muestras diferentes, como puede verse en la Figura 16(e). Ello indica la liberación de plásmidos de calidad de clonación intacta por E-lisis.

Ejemplo 3: Lisis eléctrica de neumococo.

50 Los experimentos descritos en el presente ejemplo pretenden demostrar los efectos de los parámetros eléctricos en la eficacia del dispositivo para el lisado de células neumococo. Las células *S.pneumoniae* con cadena ATCC 6303 se han cultivado en agar con Tripticasa de Soja con 5% de sangre de oveja y una sola colonia de *S.pneumoniae* se ha cultivado en Caldo de Soja Tríptico durante la noche a 37°C. Para el experimento de lisis, las células se han centrifugado a 10.000 rpm durante 5 min. El sedimento celular se ha lavado dos veces y se ha resuspendido en 0,2 a 0,4 mM de tampón fosfato pH 7,4 en una concentración de 1×10^9 CFU/mL.

La eficacia de la lisis celular se ha evaluado por el ensayo de proteínas totales y el ensayo de ácidos nucleicos totales cuantitativo. Como un control de lisis celular de referencia, las células se han lisado mecánicamente

mediante el refinado con un volumen igual de perlas de vidrio (106 μm , Sigma) durante 2 min y el sobrenadante de lisado celular de perlas de vidrio (GB) se ha probado después de la centrifugación.

3.1 Efectos de la amplitud de pulso y duración del tren y fuerza iónica en la eficacia de la lisis eléctrica

5 La suspensión bacteriana de concentración de 1×10^9 CFU/mL en 0,2 y 0,4 mM de tampón fosfato pH 7,4 ha atravesado un canal ancho en etapas de 10 $\mu\text{L}/10\text{s}$ y trenes de pulso de 20 kHz con diferentes duraciones y amplitudes se han aplicado a la suspensión. La duración y amplitudes de cualesquiera dos conjuntos de parámetros diferentes, (t_1, V_1) y (t_2, V_2) , estaban relacionadas por $t_1/t_2 = (V_2/V_1)^2$ para asegurar la administración de energía eléctrica casi equivalente al canal para ambos casos. Los experimentos se han repetido para cinco valores diferentes de amplitud. Las envolventes de corriente para dos límites de amplitud se presentan en la Figura 17(a).
10 Para ambas fuerzas iónicas, las duraciones del tren son más largas que el t_c correspondiente.

Los resultados de dos ensayos analíticos, detecciones de proteínas totales y ácidos nucleicos totales, se presentan en las Figuras 17(b)-17(c). La eficacia del lisado se mejora mediante el aumento de la amplitud de pulsos y la velocidad de calentamiento.

3.2 El estado de ácidos nucleicos en el lisado eléctricamente preparado

15 Para evaluar el espectro de diferentes tipos de ácidos nucleicos liberados por lisis eléctrica, los lisados celulares se han centrifugado a 10.000 rpm durante 5 min y los ácidos nucleicos en los sobrenadantes se han resuelto por electroforesis en gel en 0,5% de gel de agarosa en 0,5xTBE tampón y 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio (EtBr) a 150 voltios durante 45 min. La liberación de ADN genómico y ARN total por lisis eléctrica se ha observado en la Figura 17(d) (izquierda). En comparación con lisis de perlas de vidrio, el ADN genómico liberado por lisis eléctrica se ha observado principalmente como una banda de movilidad más lenta con menos intensidad de fluorescencia. De
20 manera similar al caso de *E. coli*, la presente observación se ha atribuido al cambio conformacional del ADN genómico a un estado relajado.

3.3. Capacidad del dispositivo de preparar la muestra para la reacción en cadena de la polimerasa (*Streptococcus pneumoniae*).

25 El presente ejemplo demuestra la eficacia de la acción del tratamiento de lisado del dispositivo en términos de reducción de los factores inhibidores de la PCR, permitiendo el procesamiento de PCR directo sin la necesidad de reactivos adicionales. El gen ARNr 16S específico a la bacteria (ADNr) se ha amplificado por PCR, mediante el uso del kit Bacteria Identification Kit (BioChain Institute, Inc.). Los experimentos se han llevado a cabo mediante lisado de células *Streptococcus pneumoniae* bajo el conjunto de parámetros similar a (0,4 mM, 240V), el caso cuya corriente correspondiente se representa en la Figura 17(a).
30

Aunque el lisado celular total puede usarse como una muestra lista para el ensayo, para demostrar la liberación eficaz de ADN genómico fuera de las células, el sobrenadante del lisado celular se ha usado para PCR. El lisado celular se ha centrifugado a 7.000 rpm durante 5 min y el sobrenadante que contiene ADN genómico liberado se ha recogido. El sobrenadante de lisado celular de 1 μL de volumen se ha usado para la amplificación por PCR. El
35 producto PCR resultante de 475 fragmentos de pares de bases de ADNr 16S se ha resuelto por electroforesis en gel en 1,2% de gel de agarosa en 0,5xTBE tampón y 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio a 150 voltios durante 30 min. Un fragmento de ADNr 16S se ha amplificado de manera eficaz a partir del sobrenadante de lisado eléctrico según lo indicado en la Figura 17(d) (derecha).

3.4 Dependencia del rendimiento de lisis del dispositivo en el material de electrodo

40 El presente estudio muestra las ventajas de usar SEOA como material de electrodo en términos de preservación de la integridad de macromoléculas durante la lisis eléctrica. Las células *S.pneumoniae*, suspendidas en 0,4 mM tampón fosfato pH 7,4, se han lisado en canales anchos geoméricamente similares; un canal teniendo electrodos SEOA2 y el otro teniendo electrodos de cobre. La amplitud de pulsos y frecuencia han sido de 200 V y 20 kHz, respectivamente. La envolvente de corriente correspondiente a estos casos se presenta en la Figura 18(a).

45 Los rendimientos de los dispositivos se han evaluado ejecutando ensayos de proteínas Bradford y ensayos de ácidos nucleicos totales, siguiendo los protocolos del ejemplo 3.1. Los resultados se presentan en la Figura 18(b). Mientras los dos canales son similares en términos de liberación de proteínas, la señal de ácido nucleico total es muy baja para el caso de electrodo de cobre, lo cual indica la posible degradación de las moléculas de ácido nucleico durante la lisis eléctrica. Con el fin de verificar más esta observación, PCR se ha llevado a cabo en
50 muestras lisadas por los dos dispositivos y el resultado se ha presentado en la Figura 18(c).

Ejemplo 4: Lisis eléctrica de *Saccharomyces cerevisiae*

Los experimentos descritos en el presente ejemplo pretenden demostrar los efectos de los parámetros eléctricos en la eficacia del dispositivo para el lisado de células del hongo *S.cerevisiae*. Las células se han cultivado en agar con Tripticasa de Soja con 5% de sangre de oveja y una sola colonia de *S.cerevisiae* se ha cultivado en Caldo de Soja
55 Triptico durante la noche a 37°C. Para el experimento de lisis, las células se han centrifugado a 10.000 rpm durante

5 min. El sedimento celular se ha lavado dos veces y se ha resuspendido en 0,4 mM tampón fosfato pH 7,4 en una concentración de $2,5 \times 10^7$ CFU/mL.

5 La eficacia de la lisis celular se ha evaluado por el ensayo de proteínas totales y el ensayo de ácidos nucleicos totales cuantitativo. Como un control de lisis celular de referencia, las células se han lisado mecánicamente mediante refinado con un volumen igual de perlas de vidrio (710-1180 μm , G1152 Sigma) durante 2 min y el sobrenadante de GB se ha probado después de la centrifugación.

10 La suspensión celular ha atravesado un canal ancho en etapas de 10 $\mu\text{L}/10\text{s}$ y trenes de pulso de 20 kHz con una duración de 29 ms y amplitud de pulso de 190 V. Los experimentos se han repetido bajo dos condiciones, puertos abiertos y restringidos. En el último caso, una restricción en el movimiento del líquido en los puertos de entrada y salida ha permitido el recalentamiento. Las envolventes de corriente para los dos casos se presentan en la Figura 19(a). La temperatura promedio calculada del líquido recalentado en el canal restringido ha sido aproximadamente de 160°C.

Los resultados de dos ensayos analíticos, mediciones de proteínas y ácidos nucleicos totales liberados, se presentan en la Figura 19(b). La eficacia de la lisis se mejora sustancialmente por el recalentamiento.

15 Ejemplo 5: Capacidad del dispositivo de preparar una muestra lista para el ensayo para la transcripción Inversa (RT)-PCR de ARNr

20 El presente ejemplo demuestra la disposición del ensayo del lisado preparado en el dispositivo al someter el lisado a transcripción enzimática de una sección del ARNr seguida por amplificación por PCR del ADNc resultante. Los ensayos se han llevado a cabo mediante el uso de tres canales anchos con diferentes alturas; $a=100 \mu\text{m}$, $a=200 \mu\text{m}$, y $a=400 \mu\text{m}$. Las fuerzas iónicas de las suspensiones celulares lisadas en dichos canales han sido, respectivamente, de 0,4, 0,8 y 1,6 mM y, por consiguiente, se aseguran las corrientes iónicas iniciales casi similares en los canales para un voltaje aplicado dado. Además, el líquido se ha inyectado en diferentes etapas de 5 $\mu\text{L}/10\text{s}$ (para $a=100 \mu\text{m}$), 10 $\mu\text{L}/10\text{s}$ (para $a=200 \mu\text{m}$) y 20 $\mu\text{L}/10\text{s}$ (para $a=400 \mu\text{m}$) en los tres canales de modo que cada célula ha experimentado los trenes de pulsos de 10 kHz y 160 V dos veces. Las envolventes de corriente para los tres casos se presentan en la Figura 20(a).

30 El ARNr 16S específico a la bacteria se ha detectado por la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), mediante el uso del sistema SuperScript III One-Step RT-PCR con Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies). Las células *E.coli* NEB5-alfa de 10^4 CFU/mL en 0,4 a 1,6 mM tampón fosfato pH 7.4 se han lisado por E-lisis. Como métodos de lisis celular de referencia, las células se han lisado mecánicamente mediante refinado con un volumen igual de perlas de vidrio o térmicamente por incubación a 95°C durante 5 min. Como un control RT-PCR negativo, agua de grado RT-PCR (Invitrogen, Life Technologies) se ha usado en lugar de la muestra. La reacción RT-PCR de 25 μL de volumen se ha preparado mediante la mezcla de 1 μL de muestra (ya sea el lisado, denotado por T, o el sobrenadante del lisado, denotado por S), 12,5 μL de mezcla de 2X Reacción, 0,5 μL de cebador directo (ARNr 16S directo, 10 μM , Integrated DNA Technology), 0,5 μL de cebador inverso (BU1.3R, 10 μM), 0,5 μL de SuperScript III RT/Platinum *Taq* Mix, 10 μL de agua de grado RT-PCR. El cebador directo ARNr 16s (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTAG-3') es un cebador comercialmente disponible, y BU1.3R (5'-TAAGGTTCTTCGCGTTGCTT-3') es un cebador universal específico para bacterias diseñado por software de alineación en secuencia (Bioedit, Ibis Biosciences, Estados Unidos) y software de diseño de cebadores (Primer3, National Institutes of Health). El fragmento de gen ARNr 16S de 992 pares de bases se ha amplificado por RT-PCR de una etapa por transcripción inversa a 55°C durante 10min, inactivación de transcriptasa inversa a 94°C durante 2 min, seguido por 30 ciclos de amplificación de ADNc a 94°C durante 15 seg, 55°C durante 30 seg, y 68°C durante 45 seg, y extensión final a 68°C durante 5min.

45 El producto PCR resultante se ha resuelto por electroforesis en gel en 1% de gel de agarosa en 0,5xTBE tampón y 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio a 150 voltios durante 30 min. El producto RT-PCR de ARNr derivado de E-lisis de células *E.coli* NEB5-alfa se ha observado en la Figura 20(b) (donde "S" denota PCR llevada a cabo en el sobrenadante del lisado, y "T" denota PCR llevada a cabo en el lisado total). El resultado ha indicado que mientras canales más altos ($a=200$ y $400 \mu\text{m}$) se desempeñan de manera similar al refinado de perlas de vidrio, la señal correspondiente al canal $a=100 \mu\text{m}$ es mucho más alta, lo cual hace que el dispositivo sea más apropiado para la detección sensible de células bacterianas.

50 Las realizaciones específicas descritas más arriba se han mostrado a modo de ejemplo, y debe comprenderse que dichas realizaciones pueden ser susceptibles de varias modificaciones y formas alternativas, la invención definiéndose por las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de procesamiento eléctrico de un líquido dentro de un dispositivo (1) microfluídico, el líquido conteniendo uno o más microorganismos;
- el dispositivo microfluídico incluyendo:
- 5 un canal (2) fluídico que tiene una superficie de canal superior, una superficie de canal inferior, una pared lateral, y un grosor en una escala submilimétrica;
- un electrodo (8) superior en la superficie de canal superior; y
- un electrodo (7) inferior en la superficie de canal inferior;
- en donde el método incluye:
- 10 hacer fluir el líquido hacia el canal; y
- aplicar una serie de pulsos de voltaje bipolares entre el electrodo superior y el electrodo inferior, la serie de pulsos de voltaje teniendo una duración de subsegundos, caracterizado por que la serie de pulsos de voltaje se provee de modo que:
- un campo eléctrico generado a lo largo del grosor del canal fluídico es de entre 2 kV/cm y 30 kV/cm; y
- 15 el líquido se calienta con una velocidad de calentamiento de al menos 250 grados por segundo;
- en donde la amplitud, y ancho de pulso de los pulsos de voltaje se controlan además de modo que el líquido se calienta hasta una temperatura elevada suficiente para calentar de manera instantánea el líquido y electroporar, de manera irreversible, al menos un microorganismo dentro del líquido mediante lisado eléctrico y, de esta manera, liberar al menos una macromolécula del al menos un microorganismo.
- 20 2. El método según la reivindicación 1 en donde las propiedades térmicas de dichas superficies de canal se seleccionan de modo que un tiempo de enfriamiento de dicho canal (2), en ausencia de los pulsos de voltaje, se encuentra en una escala de tiempo de subsegundos.
3. El método según la reivindicación 1 o 2 en donde los pulsos de voltaje están provistos de una amplitud y duración eficaces de modo que una temperatura del líquido aumenta hasta un valor que es aproximadamente igual al de una
- 25 temperatura de transición de fase líquido-vapor.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que además comprende monitorear una corriente que fluye entre el electrodo (8) superior y el electrodo (7) inferior, y controlar uno o más del voltaje aplicado, duración de pulsos y conteo de pulsos de los pulsos de voltaje en respuesta a cambios en la corriente.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que además comprende abarcar el volumen del canal
- 30 mientras se aplican los pulsos de voltaje de modo que una presión dentro del canal aumenta y el líquido se recalienta.
6. El método según la reivindicación 5 que además comprende la etapa de regular una presión del líquido dentro del canal (2) mientras se aplican los pulsos de voltaje.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde las macromoléculas incluyen una enzima, y en
- 35 donde los pulsos de voltaje están provistos de una amplitud, ancho de pulso y duración para reducir una actividad de la enzima.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde las macromoléculas incluyen un inhibidor de la PCR, y en donde los pulsos de voltaje están provistos de una amplitud, ancho de pulso y duración para reducir o eliminar efectos inhibitorios del inhibidor de la PCR.
- 40 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde las macromoléculas incluyen un ácido nucleico, el método además comprendiendo la etapa de llevar a cabo la PCR para amplificar una secuencia del ácido nucleico sin llevar a cabo una etapa subsiguiente de extracción o purificación de ácidos nucleicos.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde los pulsos de voltaje se proveen de modo que el líquido se calienta con una velocidad de calentamiento de al menos 2.000 grados por segundo.
- 45 11. Un dispositivo (1) microfluídico para procesar un microorganismo que contiene líquido, el dispositivo microfluídico comprendiendo:
- un canal (2) fluídico que tiene una superficie de canal superior, una superficie de canal inferior, una pared lateral, y un grosor en una escala de micras;

- un primer puerto (3) en comunicación fluida con un primer lado de dicho canal;
- un segundo puerto (4) en comunicación fluida con un segundo lado de dicho canal;
- un electrodo (8) superior provisto en dicha superficie de canal superior;
- un electrodo (7) inferior provisto en dicha superficie de canal inferior; y
- 5 un suministro (20) de energía; y
- una unidad (23) de controlador configurada para controlar el suministro de energía, caracterizada por que:
- el dispositivo además comprende un medidor (21) de corriente eléctrica en un bucle (22) de realimentación de control con la unidad (23) de controlador, y en donde:
- 10 la unidad (23) de controlador se configura para aplicar, mediante el suministro (20) de energía, pulsos de voltaje bipolares entre dicho electrodo superior y dicho electrodo inferior de modo que, cuando el microorganismo que contiene líquido se provee dentro del canal fluido:
- un campo eléctrico generado a lo largo del grosor del canal fluido es de entre 2 kV/cm y 30 kV/cm;
- el líquido se calienta con una velocidad de calentamiento de al menos 250 grados por segundo;
- la serie de pulsos de voltaje tiene una duración de subsegundos; y
- 15 la amplitud, y ancho de pulso de los pulsos de voltaje se proveen de modo que el líquido se calienta hasta una temperatura elevada suficiente para calentar de forma instantánea el líquido y electroporar, de manera irreversible, al menos un microorganismo dentro del líquido mediante un campo eléctrico y, de esta manera, liberar la al menos una macromolécula del al menos un microorganismo.
- 20 12. El dispositivo microfluídico según la reivindicación 11 en donde las propiedades térmicas de dichas superficies de canal se seleccionan además de modo que un tiempo de enfriamiento de dicho canal (2), en ausencia de los pulsos de voltaje, se encuentra en una escala de tiempo de subsegundos.
13. El dispositivo microfluídico según la reivindicación 11 o 12 en donde uno o más de dicho electrodo (8) superior y dicho electrodo (7) inferior es un electrodo de bloque cubierto con una capa dieléctrica, de modo que dicho electrodo de bloqueo está libre de la comunicación eléctrica directa con un líquido en dicho canal (2).
- 25 14. El dispositivo microfluídico según la reivindicación 13 en donde dicho electrodo de bloqueo comprende una superficie microestructurada, y en donde el grosor y área de superficie de la capa dieléctrica se configuran para proveer una capacitancia en el rango de 0,5 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ a 200 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$.
- 30 15. El dispositivo microfluídico según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 en donde el suministro de energía se configura para proveer los pulsos de voltaje de modo que el líquido se calienta con una velocidad de calentamiento de al menos 2.000 grados por segundo.

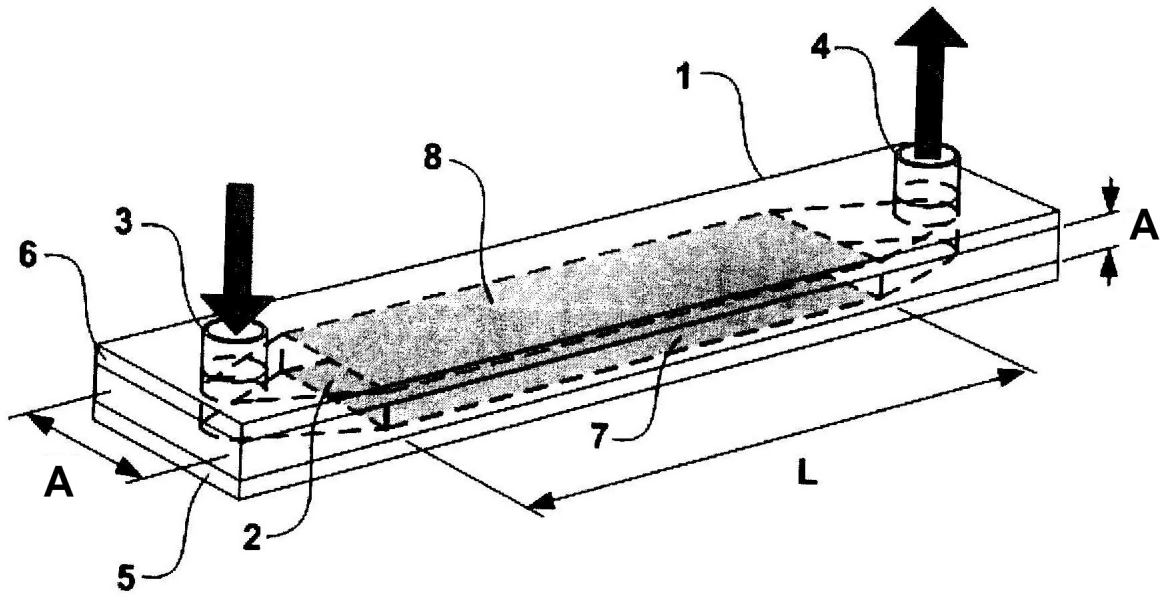


Figura 1

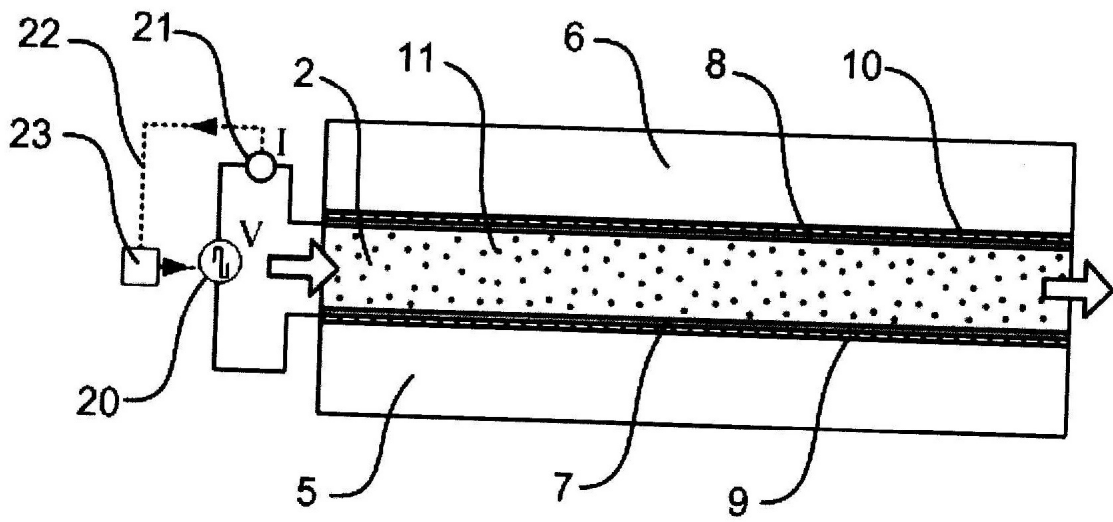


Figura 2

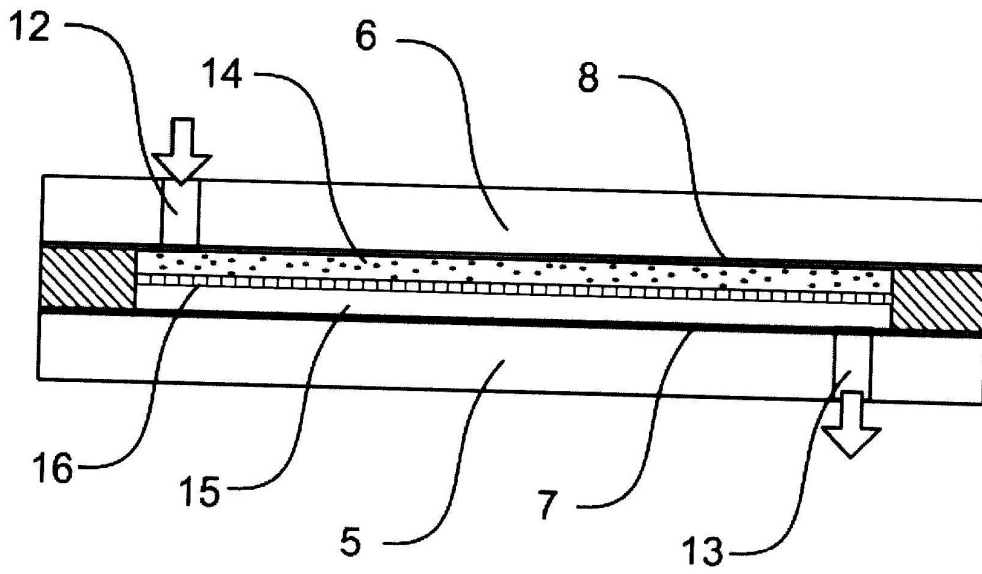


Figura 3(a)

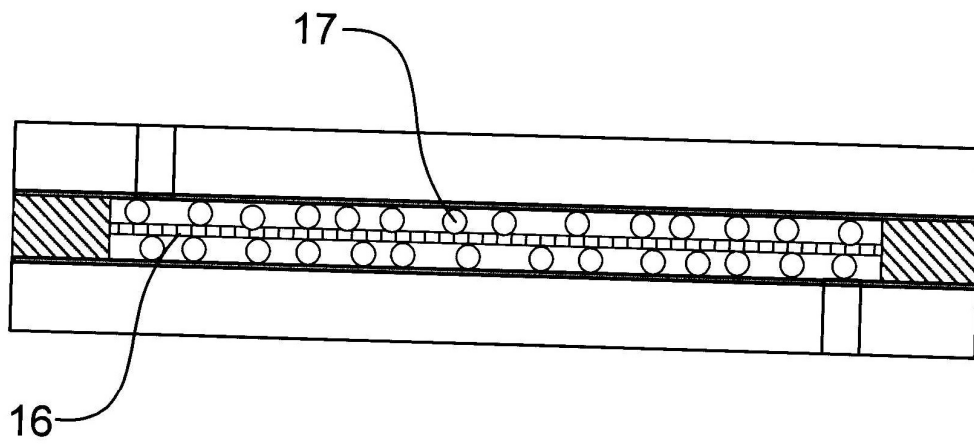


Figura 3(b)

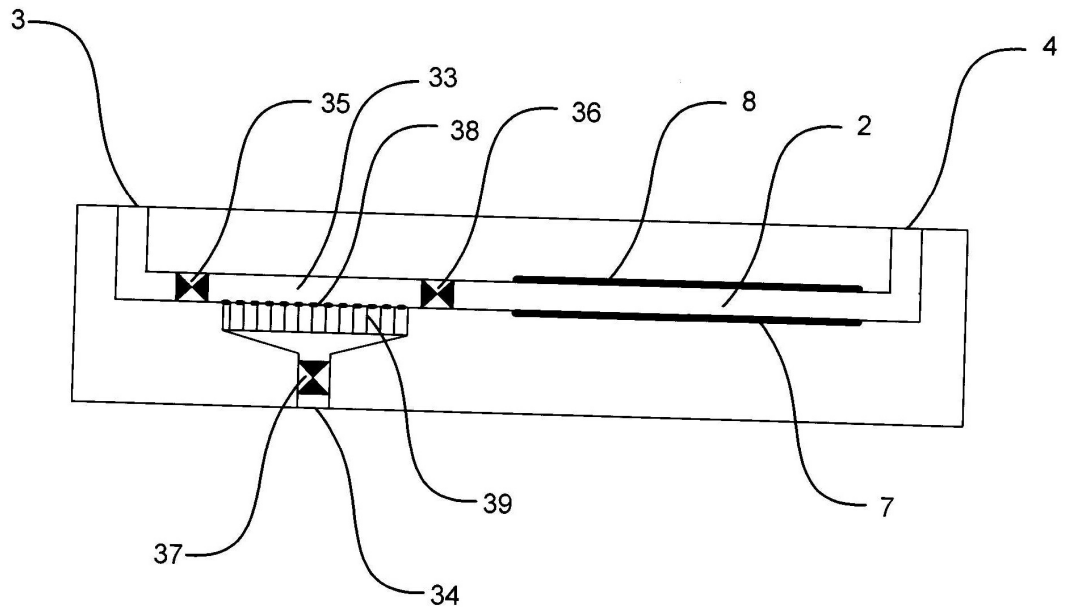


Figura 4(a)

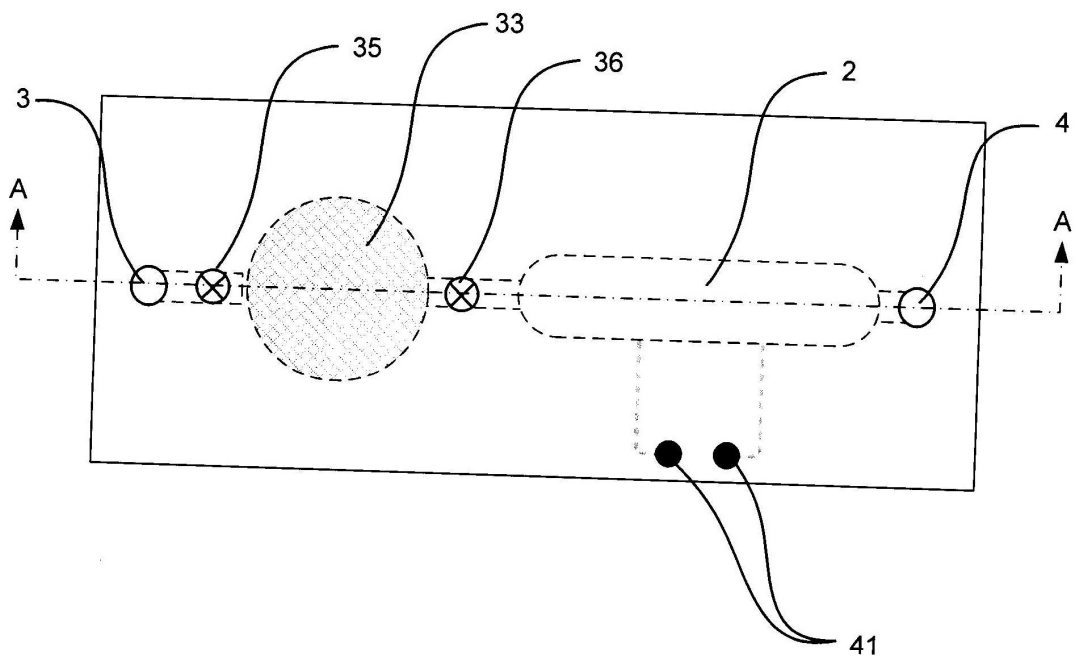


Figura 4(b)

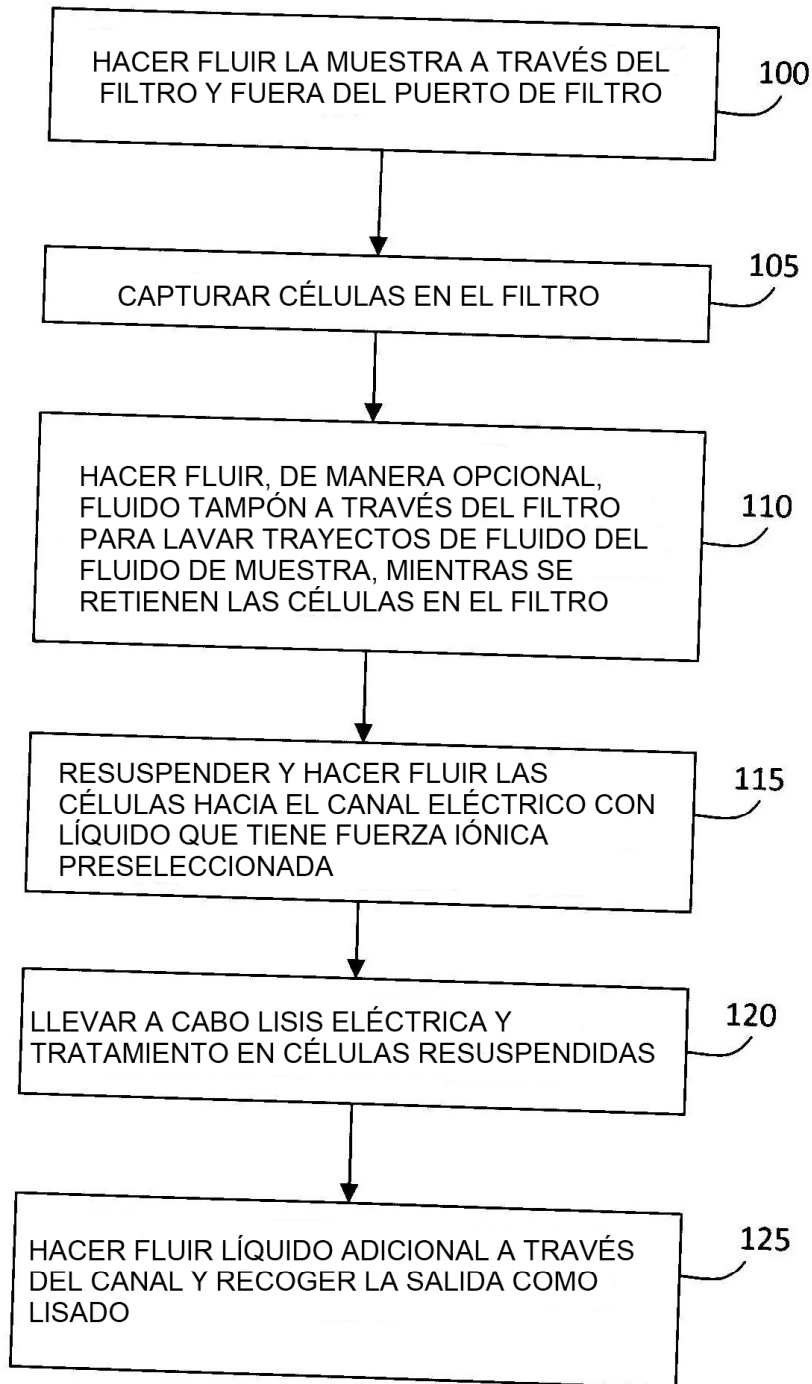


Figura 4(c)

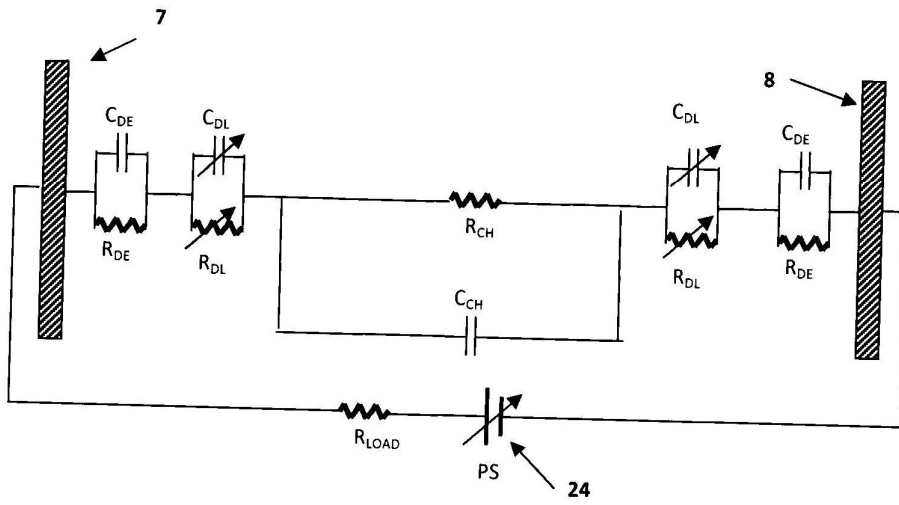


Figura 5(a)

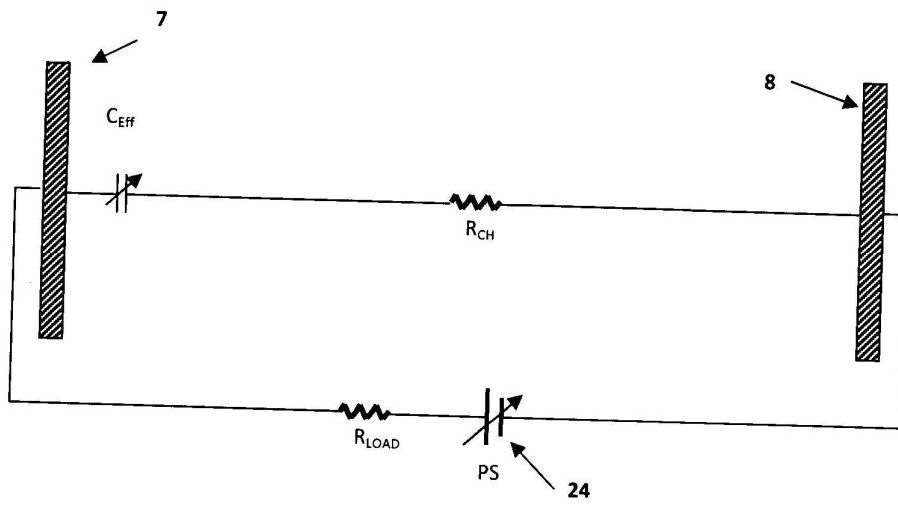


Figura 5(b)

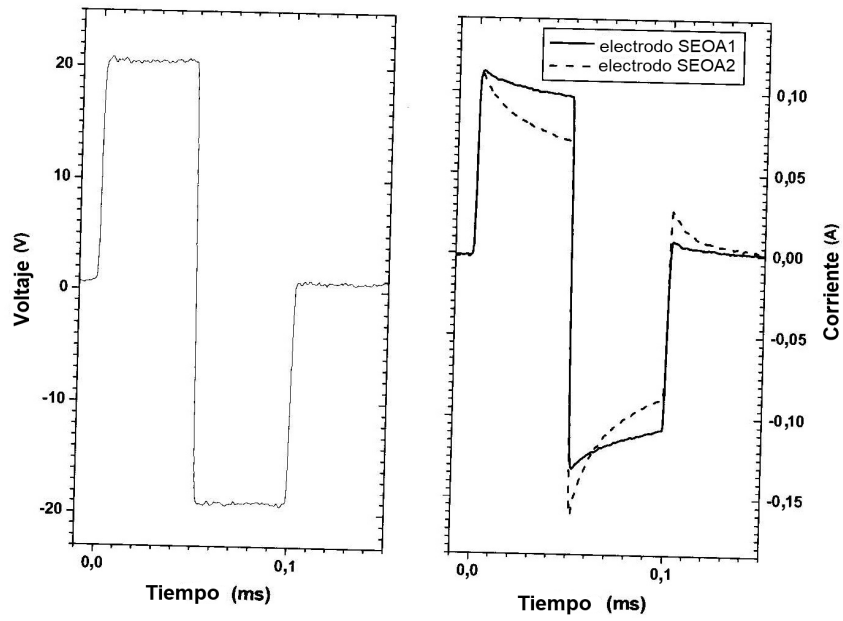


Figura 5(c)

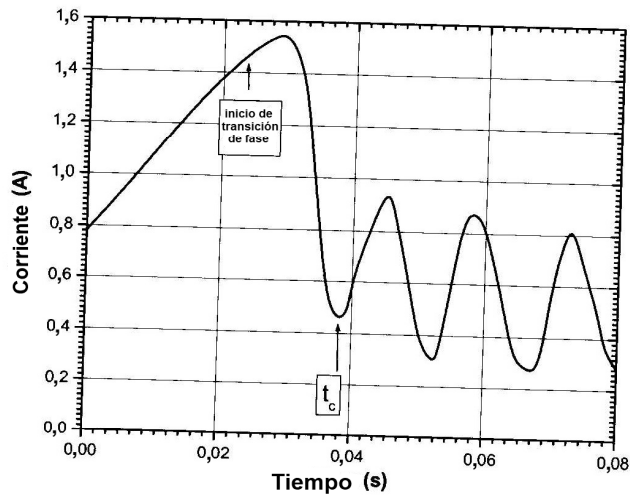


Figura 6

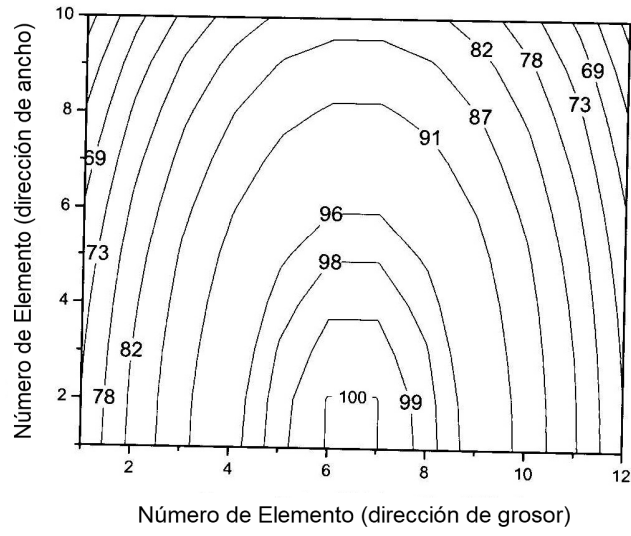


Figura 7

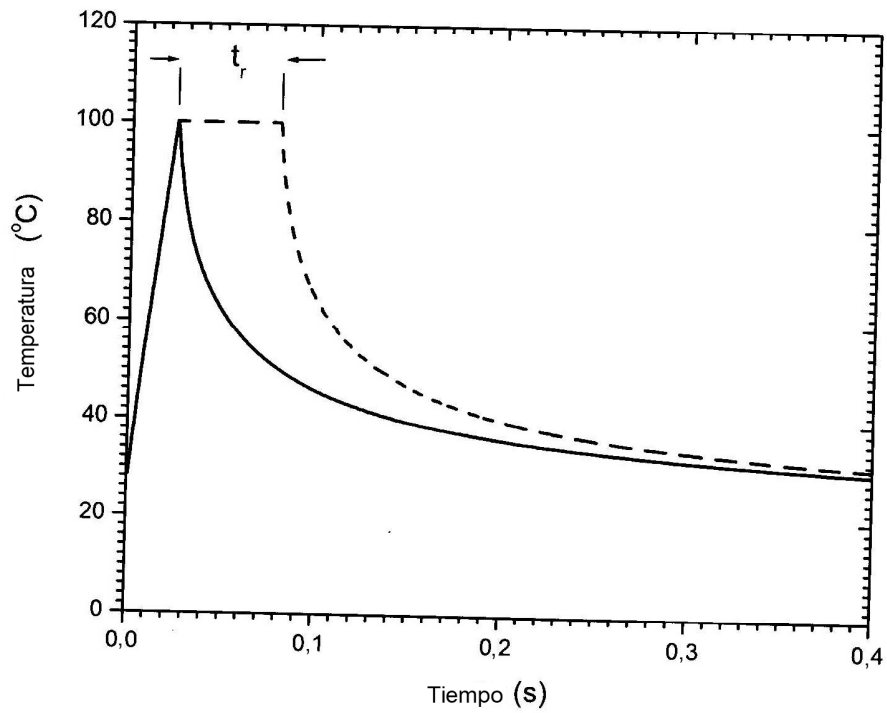


Figura 8

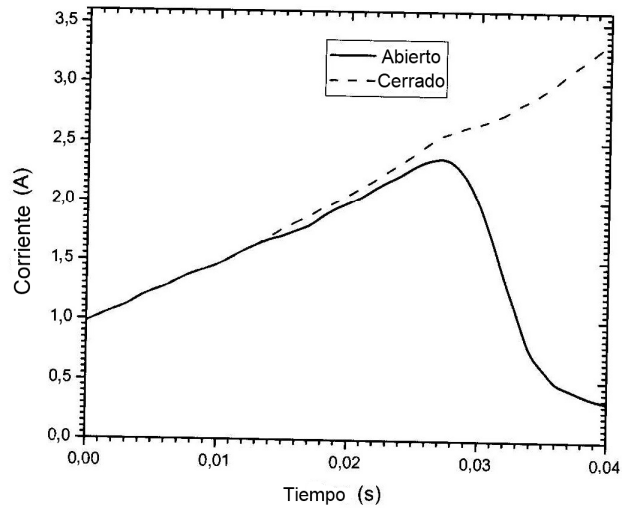


Figura 9

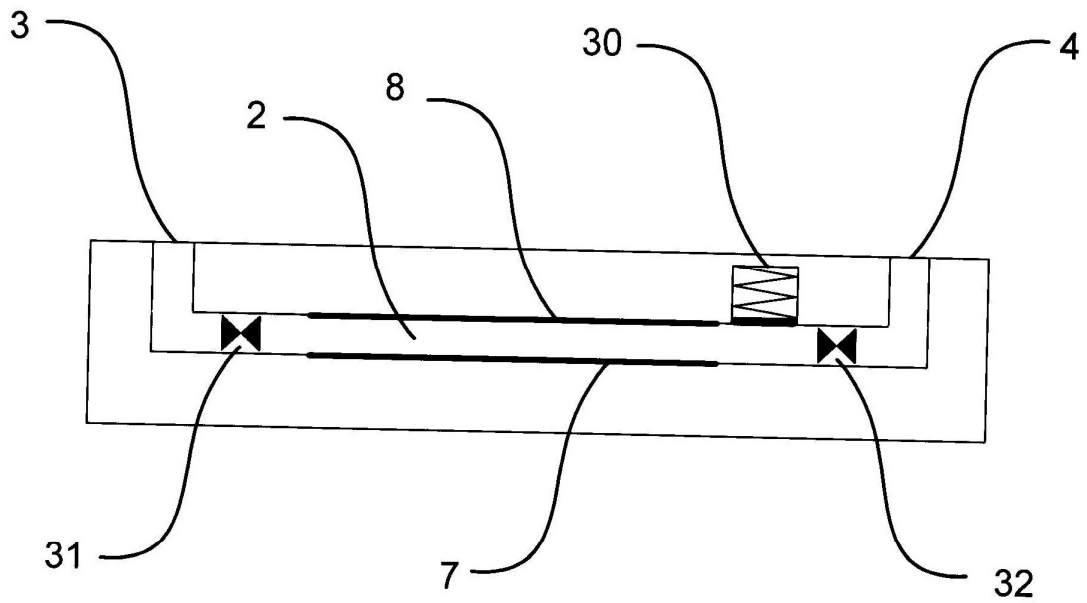


Figura 10

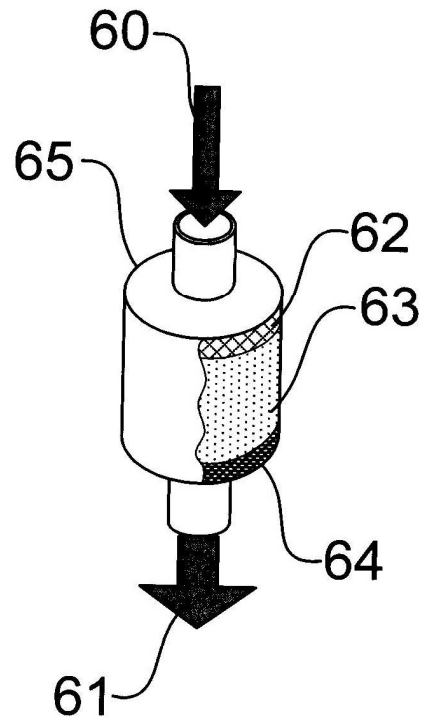


Figura 11

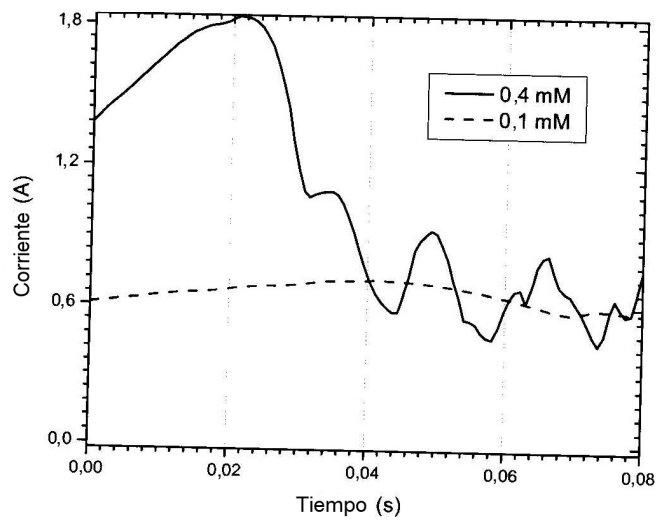


Figura 12(a)

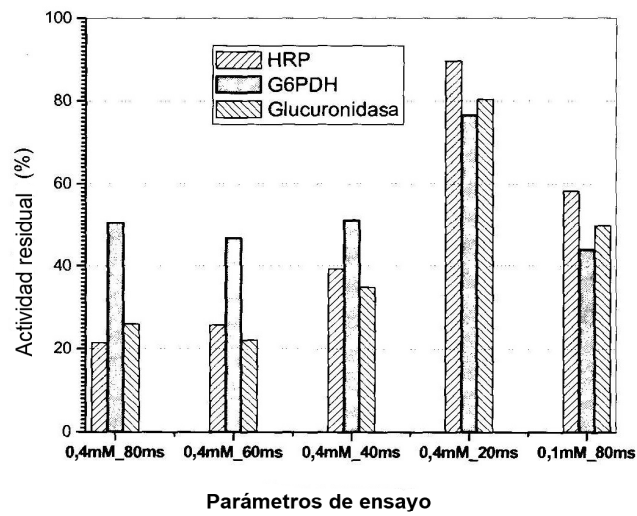


Figura 12(b)

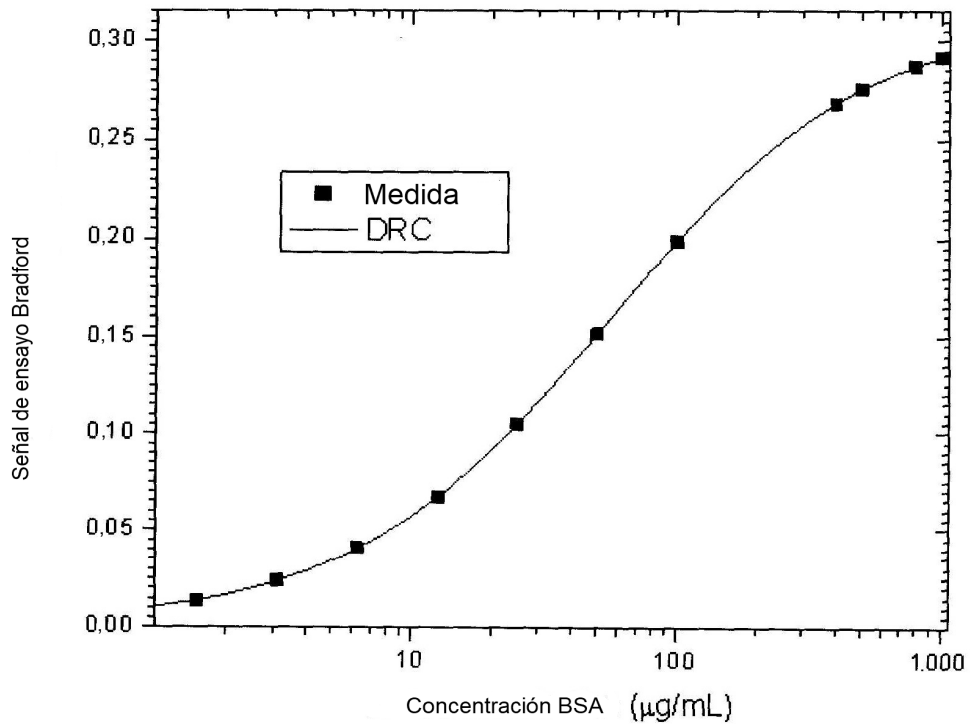


Figura 13

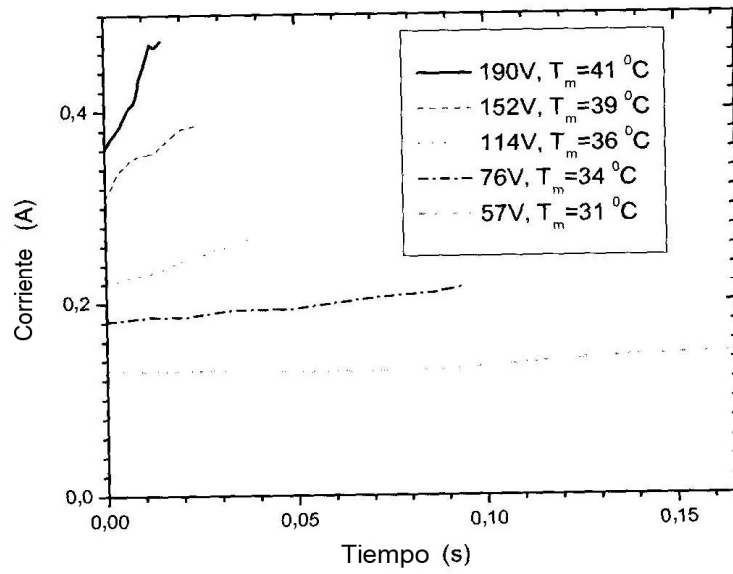


Figura 14(a)

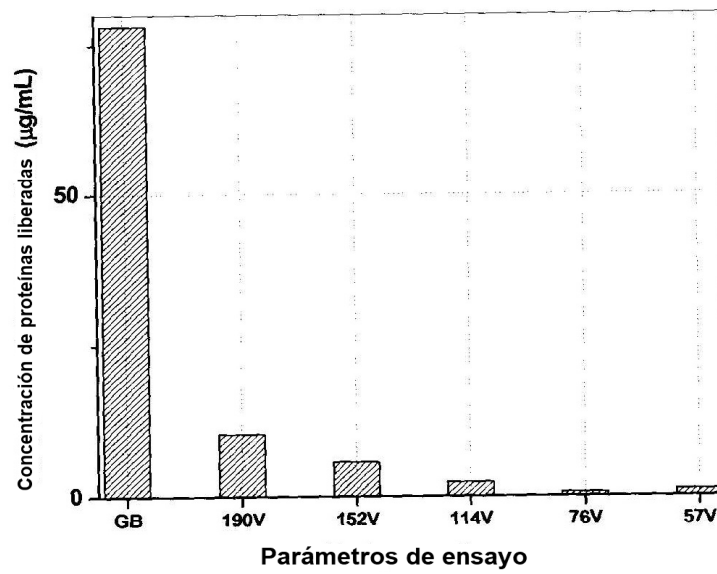


Figura 14(b)

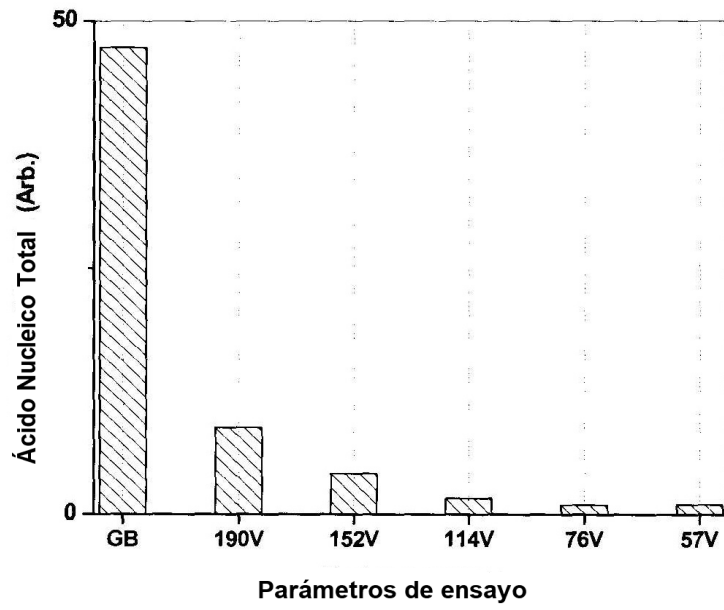


Figura 14(c)

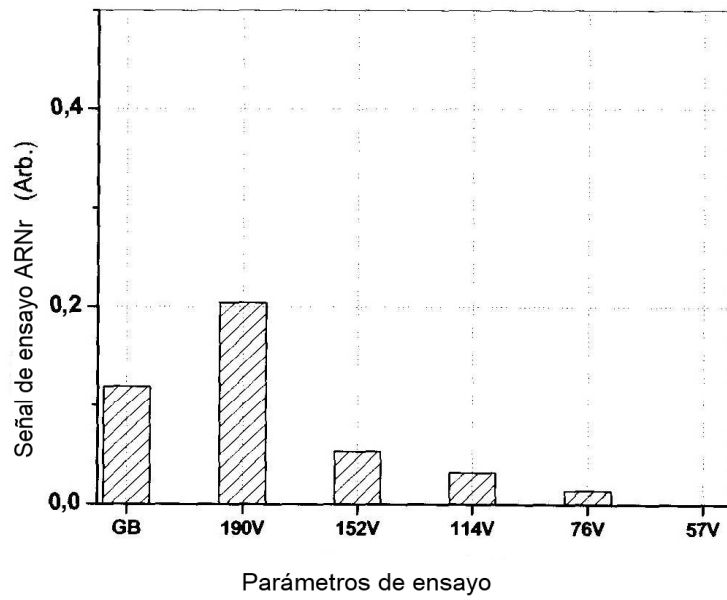


Figura 14(d)

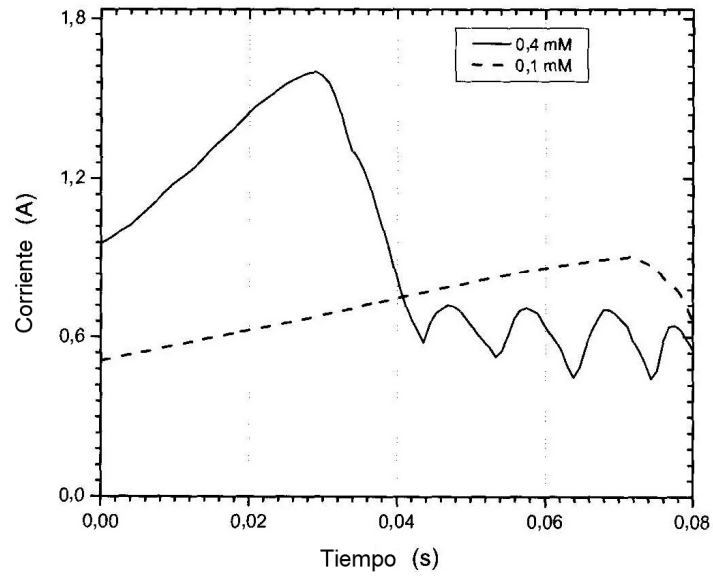


Figura 15(a)

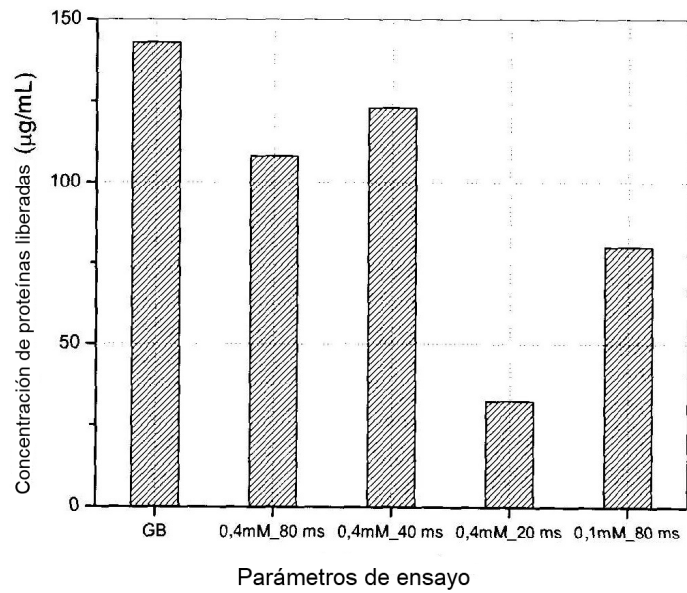


Figura 15(b)

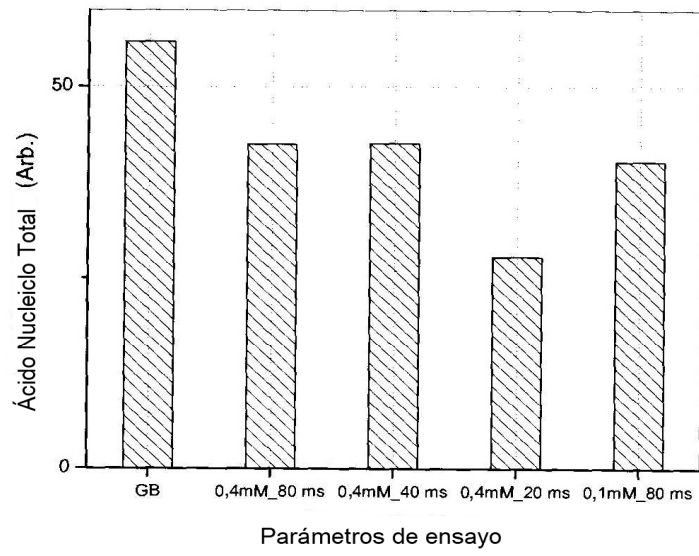


Figura 15(c)

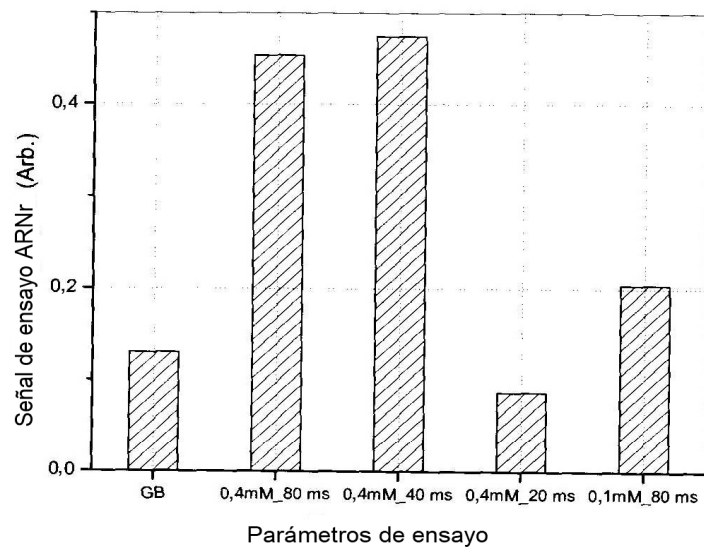


Figura 15(d)

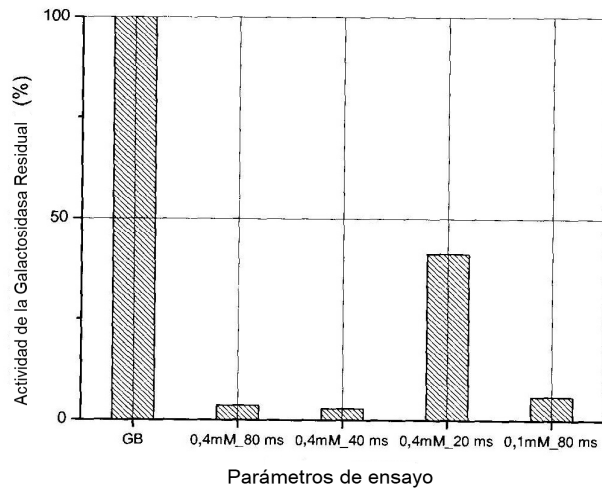


Figura 15(e)

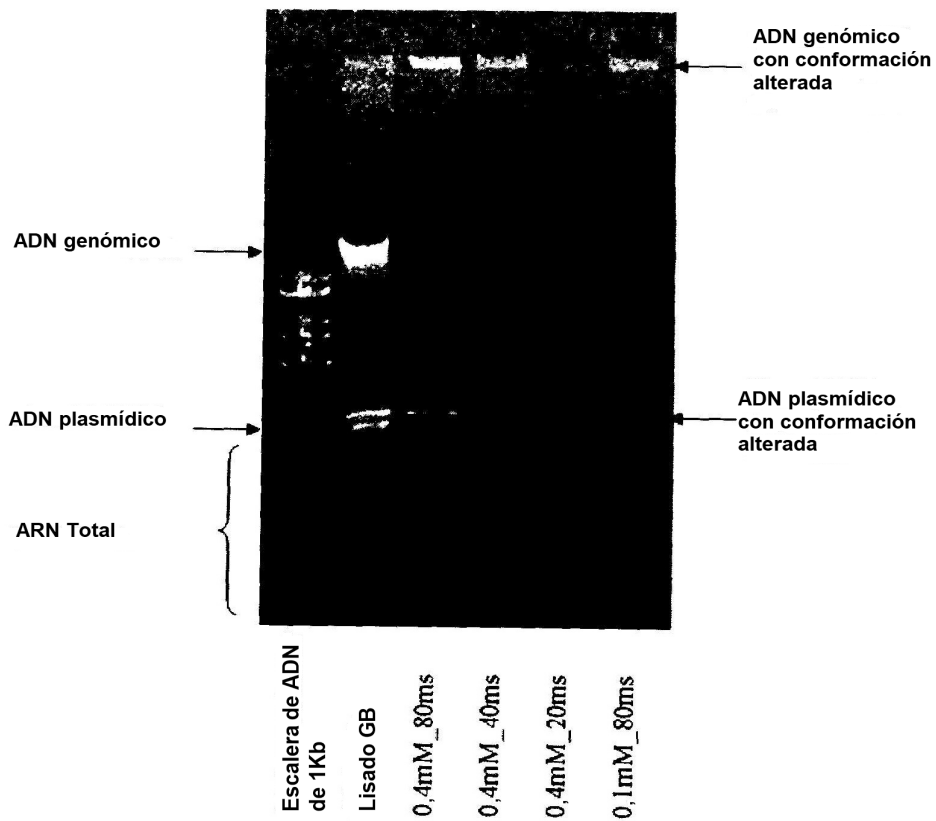


Figura 15(f)

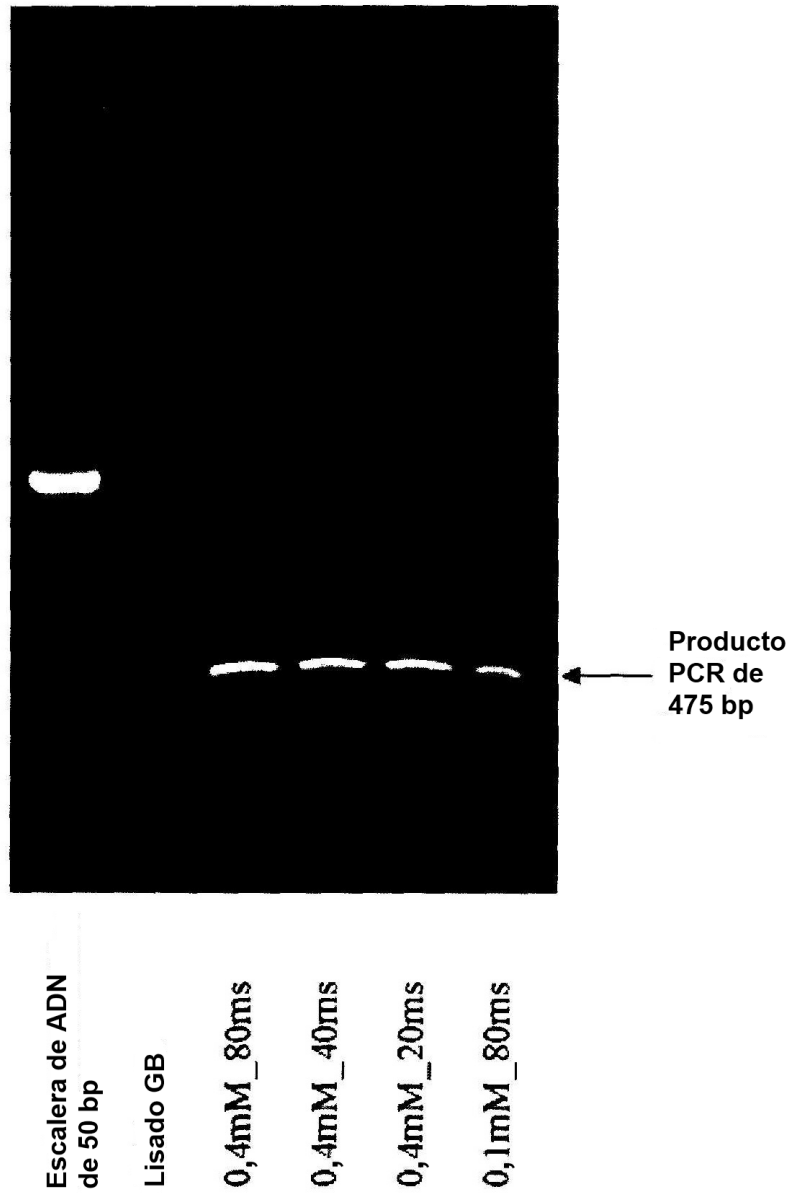


Figura 15(g)

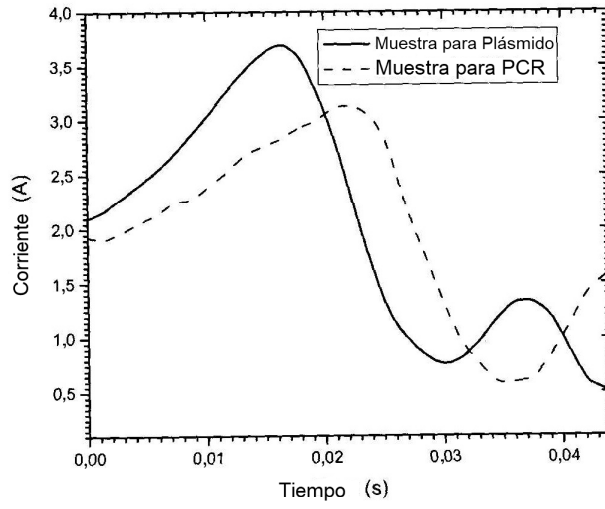


Figura 16(a)

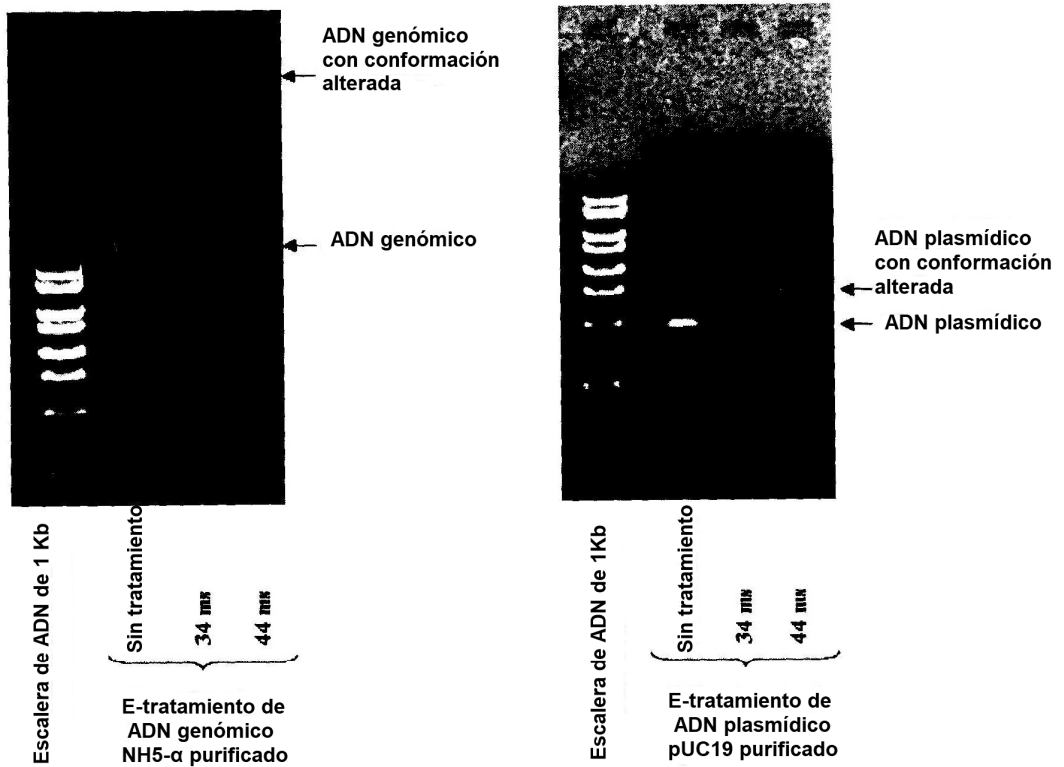


Figura 16 (b)

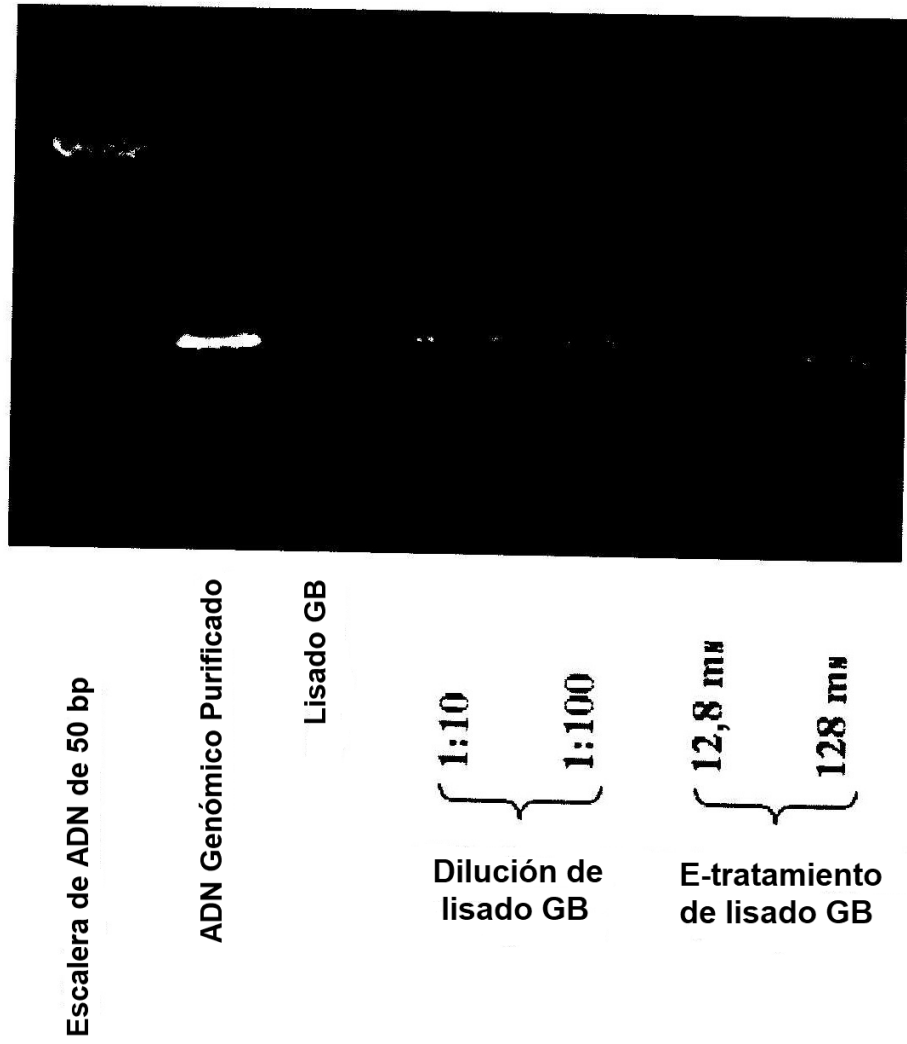


Figura 16(c)

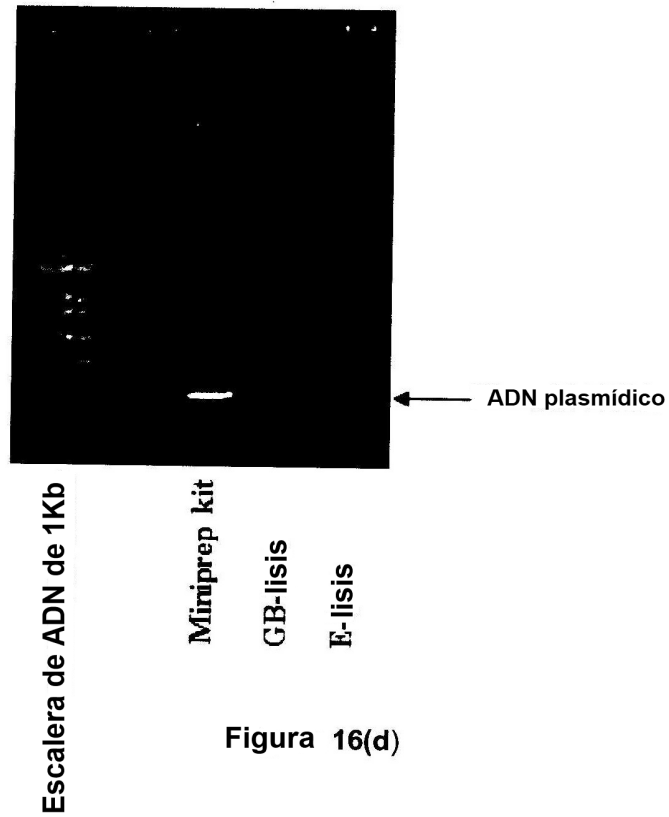


Figura 16(d)

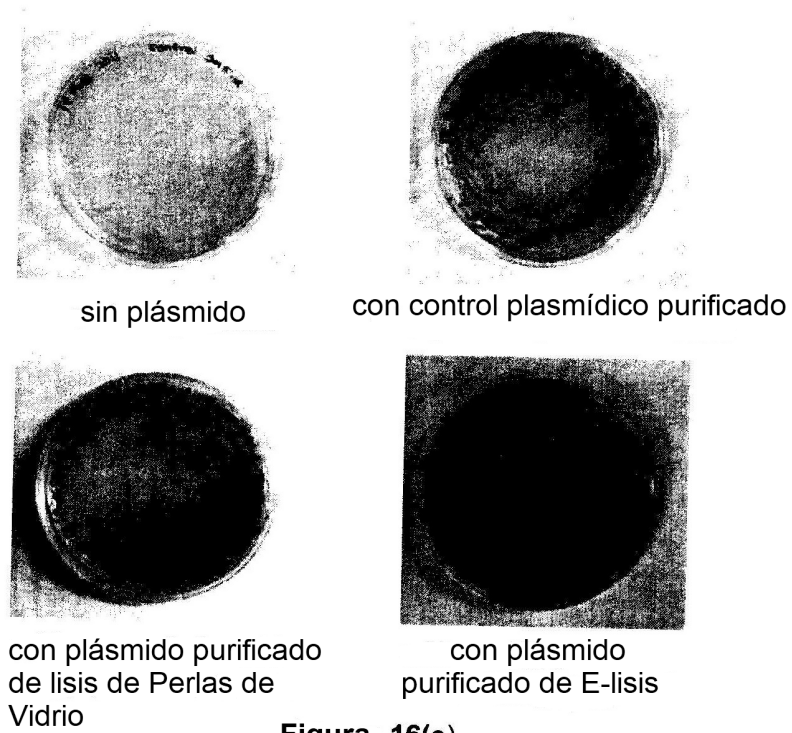


Figura 16(e)

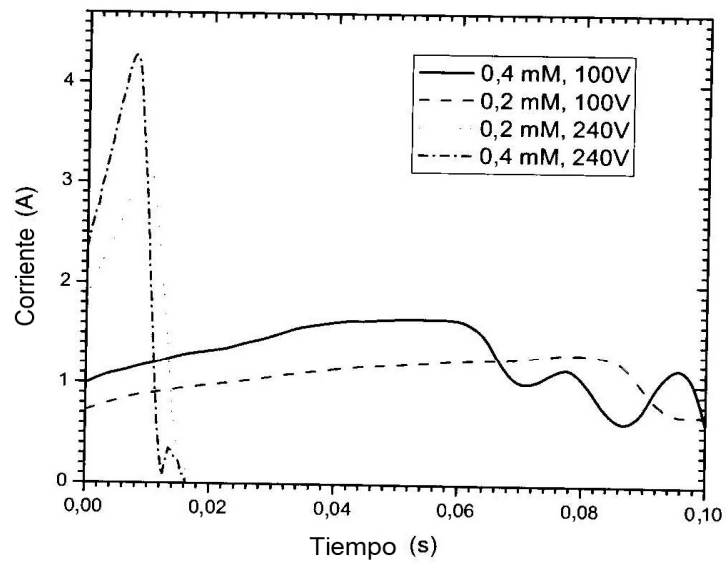


Figura 17(a)

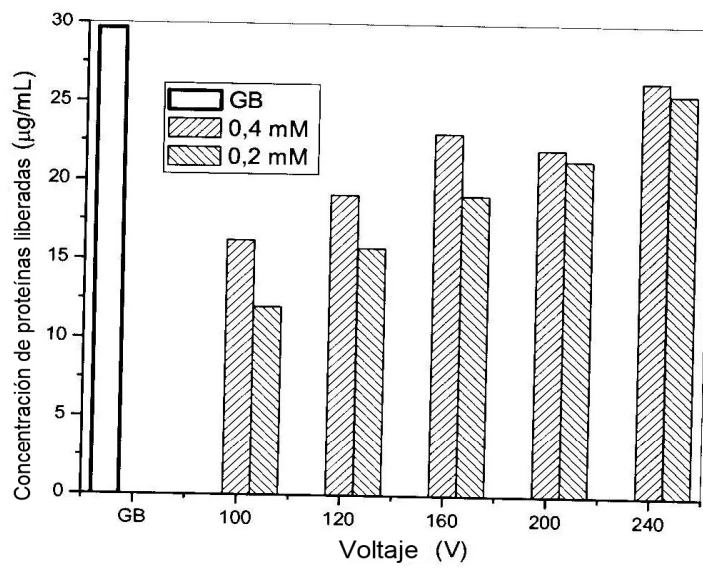


Figura 17(b)

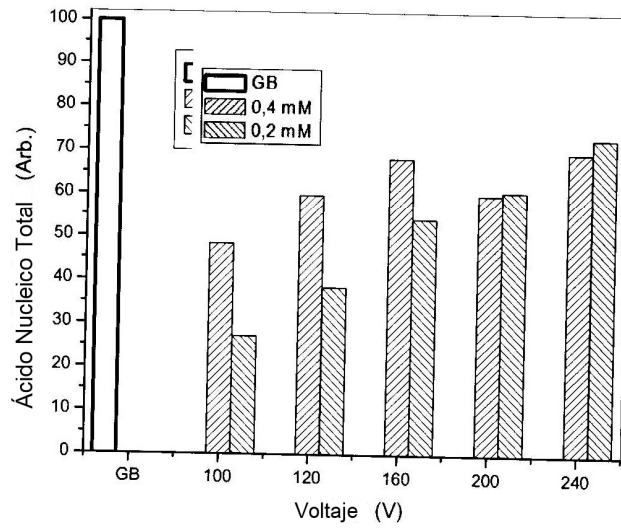


Figura 17(c)

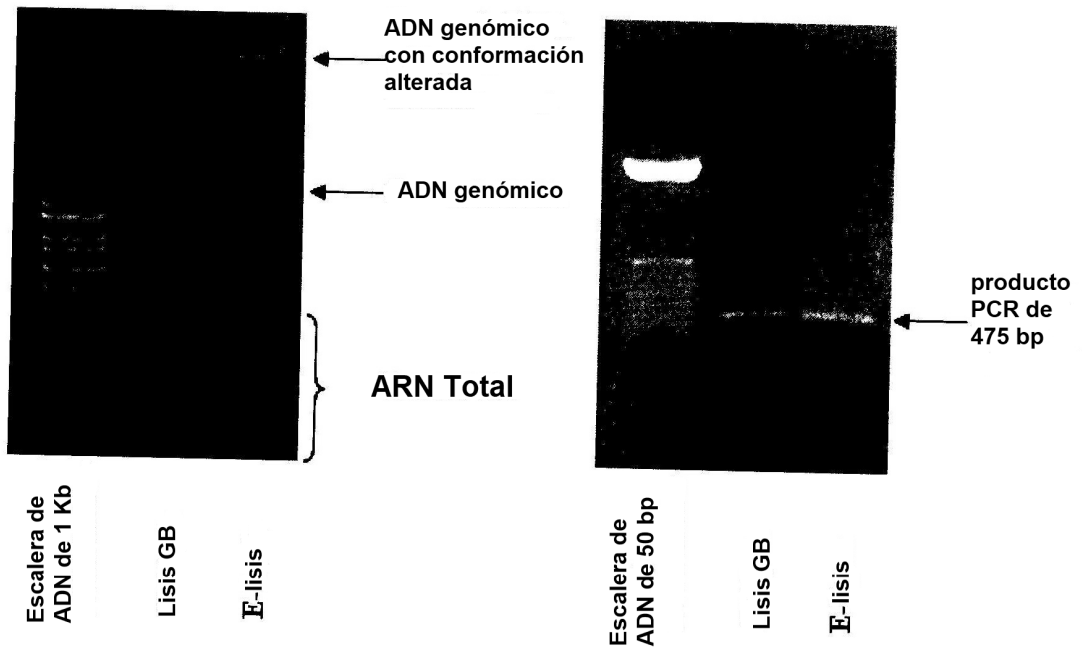


Figura 17(d)

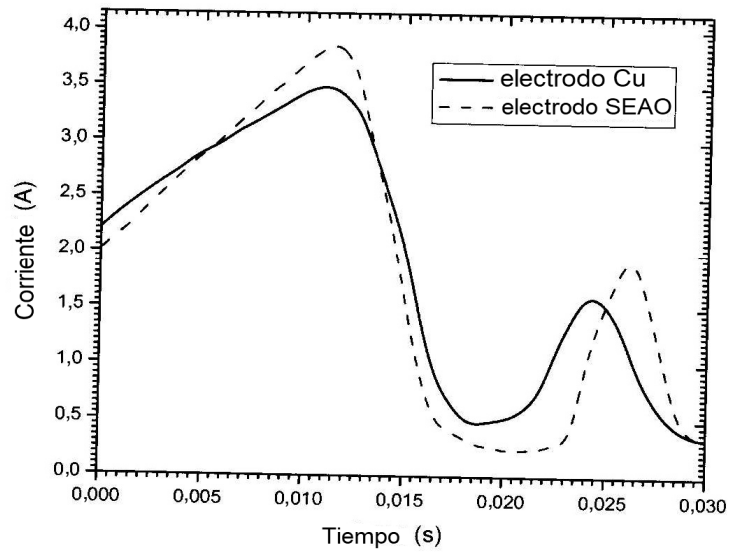


Figura 18(a)

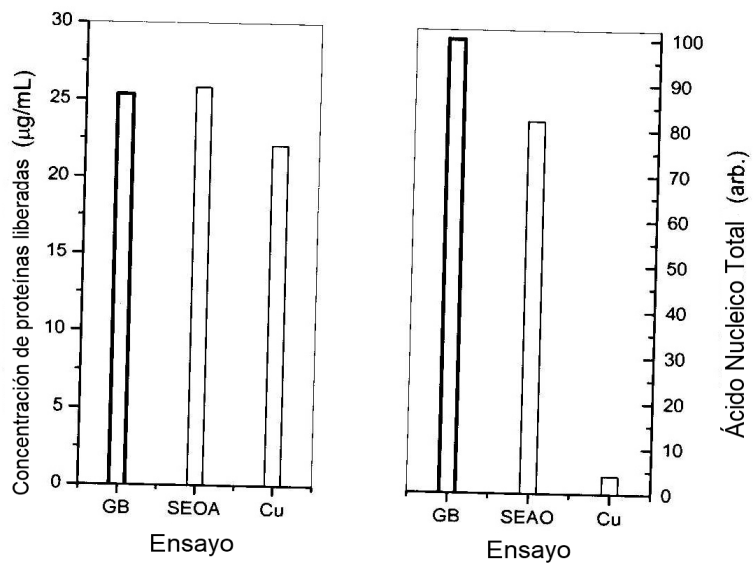


Figura 18(b)

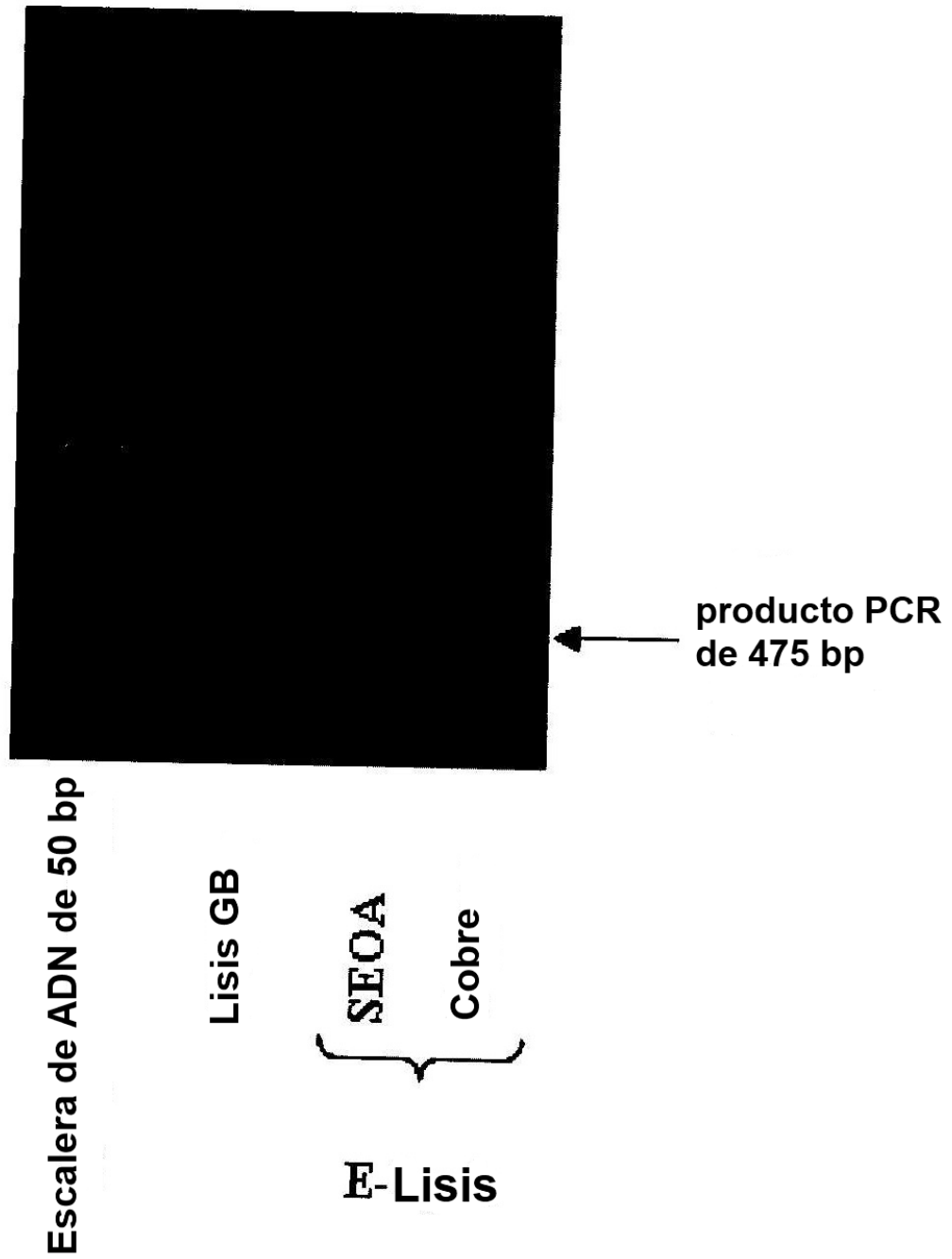


Figura 18(c)

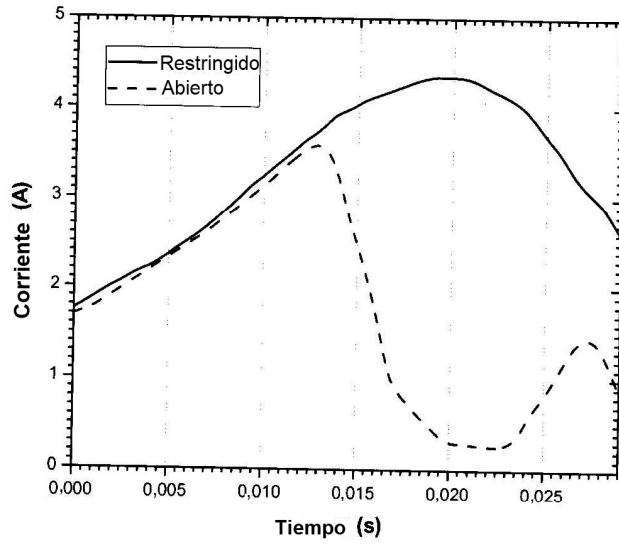


Figura 19(a)

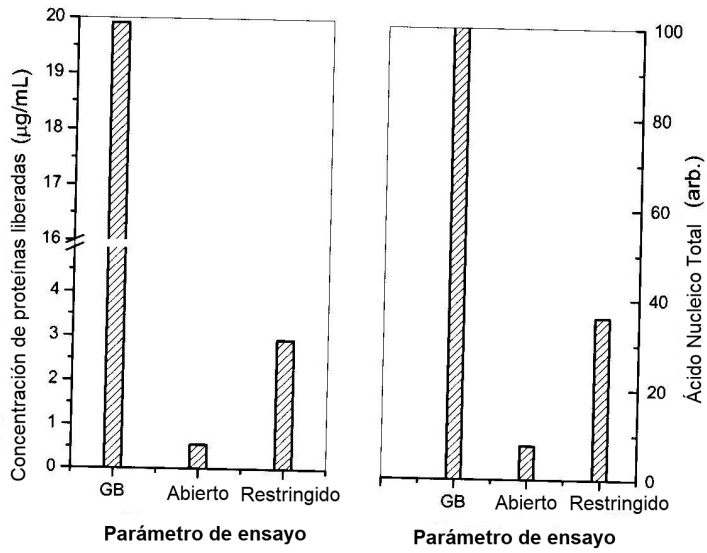


Figura 19(b)

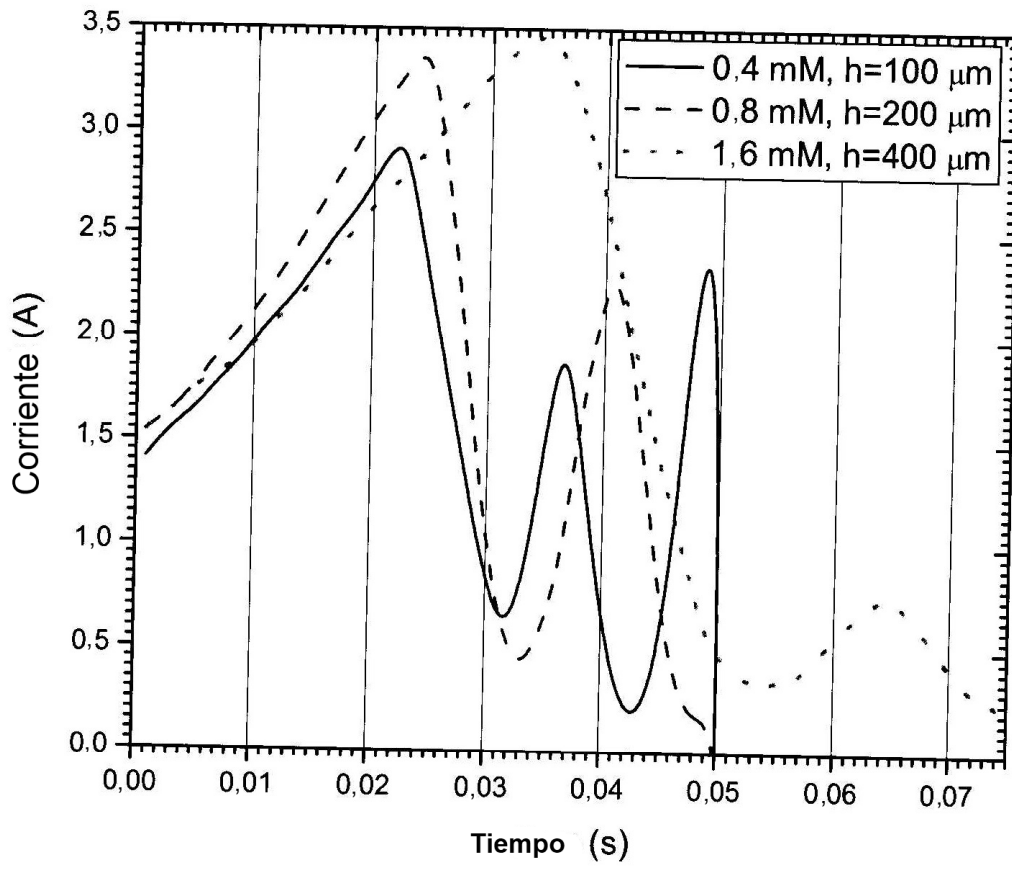


Figura 20(a)

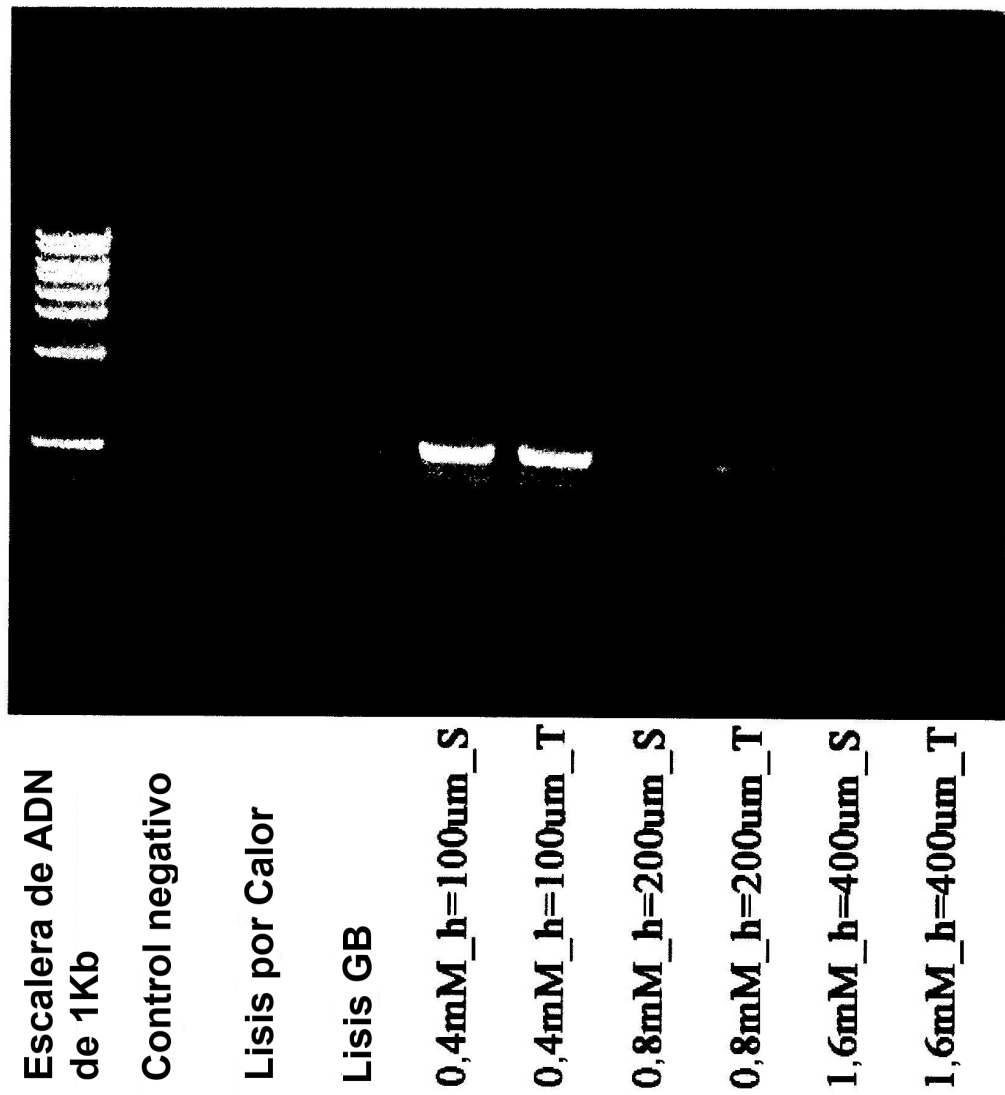


Figura 20(b)